

OK



**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
MODELAGEM MOLECULAR DA ENZIMA PHOSPHOGLUCOSE
ISOMERASE DE *TRYPANOSOMA BRUCEI*.**

Luiz Marcelo Eugenio

OK

USP/IFSC/SBI



8-2-001394

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências: Física Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Otavio H. Thiemann

São Carlos
2001

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

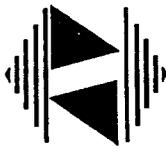
Eugenio, Luiz Marcelo

Expressão, purificação, caracterização e modelagem molecular da enzima phosphoglucose isomerase de *Trypanosoma brucei* / Luiz Marcelo Eugenio.--São Carlos, 2001.
126p.

. Dissertação (Mestrado) --Instituto de Física de São Carlos, 2001.

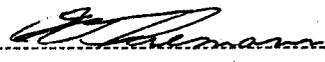
Orientador: Prof. Dr. Otavio H. Thiemann

1. Phosphoglucose isomerase. 2. *Trypanosoma brucei*.
I. Título

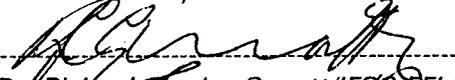


MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUIZ MARCELO EUGÊNIO APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 12 DE JUNHO DE 2001.

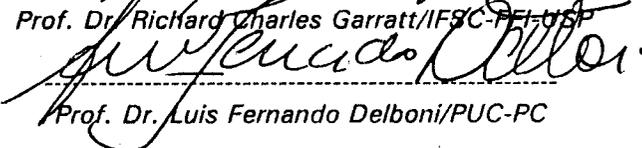
COMISSÃO JULGADORA:



Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann/IFSC-FFI-USP



Prof. Dr. Richard Charles Garratt/IFSC-FFI-USP



Prof. Dr. Luis Fernando Delboni/PUC-PC

Dedicatória

Aos meus familiares, meus pais (Wilson e Maria Aparecida), meus irmãos Evandro, Jussarinha e Renata e também à namorada mais preciosa que já conheci até hoje, que por coincidência é a minha.

Agradecimentos

- * À Profa. Dra. Eny Maria Vieira, por ter-me apresentado ao grupo de Cristalografia;
- * Aos Prof. Dr. Glaucius Oliva e Prof. Dr. Richard Charles Garratt, por terem-me aceito no grupo;
- * Aos amigos Beatriz Guimarães e Paulo Henrique, por terem-me apoiado nos primeiros trabalhos de laboratório;
- * À Dra. Dulce, pela orientação durante o período de iniciação científica;
- * Ao Prof. Dr. Luís Fernando Delboni, pela orientação durante o primeiro ano de mestrado;
- * Ao Prof. Dr. Otavio H. Thiemann, pela orientação durante o segundo ano de mestrado e pela confiança depositada;
- * Ao Carlos Tomich, pelo grande auxílio na construção dos modelos
- * Aos funcionários do grupo de Cristalografia e Biofísica: Maria Helena, Jaciara, Wanda, Bianca, Susana, Andressa, Augusto e Geraldo;
- * A todos os grandes amigos do grupo, que me proporcionaram um convívio extremamente agradável;
- * Ao IFSC-USP, pela utilização das estruturas e serviços prestados;
- * À FAPESP, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------|------|
| <i>Dedicatória</i> | ii |
| <i>Agradecimentos</i> | iii |
| <i>Lista de Figuras</i> | vii |
| <i>Lista de Tabelas</i> | xi |
| <i>Resumo</i> | xiii |
| <i>Abstract</i> | xiv |

| | |
|---|-----------|
| 1) Capítulo 1 | 1 |
| 1.1) Tripanossomose Africana | 1 |
| 1.2) O Planejamento Racional de Drogas baseado em Estruturas de Proteínas..... | 4 |
| 1.3) O ciclo de vida do parasita..... | 7 |
| 1.4) A enzima Alvo..... | 10 |
| 1.5) Objetivos..... | 15 |
| 1.5.1) Objetivos específicos..... | 15 |
| 1.6) Referências Bibliográficas..... | 17 |
| | |
| 2) Capítulo 2 | 19 |
| 2.1) Clonagem | 20 |
| 2.2) Materiais, Métodos e Resultados..... | 25 |
| 2.2.1) Montagem do inserto e subclonagem no vetor pBluescript..... | 25 |
| 2.2.1.1) Inserção do DNA Recombinante PGI-Tb/pBSKS ⁺ em Bactérias <i>Escherichia coli</i> DH5 α | 28 |
| 2.2.1.2) Seleção das Bactérias <i>Escherichia coli</i> DH5 α Transformada com o DNA Recombinante PGI-Tb/pBSKS ⁺ | 29 |
| 2.2.2) Subclonagem do gene PGI-Tb no vetor pGEM-T..... | 31 |
| 2.2.2.1) Amplificação do Gene PGI-Tb (PCR) | 31 |
| 2.2.2.2) Purificação do Gene PGI-Tb..... | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.2.3) Subclonagem do inserto no vetor pGEM-T..... | 34 |
| 2.2.3) Subclonagem do inserto no vetor de expressão pQE-30..... | 35 |
| 2.2.4) Expressão da enzima PGI-Tb..... | 38 |
| 2.2.4.1) Otimização do tempo de crescimento de bactérias..... | 40 |
| 2.2.4.2) Otimização da lise celular..... | 42 |
| 2.2.4.3) Otimização da concentração de IPTG..... | 44 |
| 2.3) Conclusões..... | 46 |
| 2.4) Referências Bibliográficas..... | 47 |
| | |
| 3) Capítulo 3..... | 48 |
| 3.1) Cromatografia Líquida de Afinidade..... | 49 |
| 3.2) Cromatografia líquida de exclusão por tamanho..... | 52 |
| 3.3) Materiais e Métodos..... | 54 |
| 3.3.1) Estabelecimento do Protocolo de Purificação utilizando coluna de afinidade.... | 54 |
| 3.3.2) Clivagem com o Fator-Xa..... | 55 |
| 3.3.3) Protocolo de Purificação utilizando-se coluna de exclusão por tamanho Superdex-200..... | 56 |
| 3.3.4) Eletroforese em Gel de Poliacrilamida | 56 |
| 3.3.5) Determinação da Concentração de PGI-Tb..... | 57 |
| 3.3.6) Determinação de Massa molecular da PGI-Tb..... | 57 |
| 3.4) Resultados e Discussões..... | 58 |
| 3.4.1) Clivagem com o Fator-Xa..... | 65 |
| 3.4.2) Protocolo de Purificação utilizando-se coluna de exclusão por tamanho Superdex-200..... | 67 |
| 3.5) Conclusões..... | 68 |
| 3.6) Referências Bibliográficas..... | 69 |

| | |
|--|------------|
| 4) Capítulo 4..... | 70 |
| 4.1) Cinética Enzimática..... | 71 |
| 4.2) Materiais e Métodos..... | 74 |
| 4.2.1) Medidas da Atividade Enzimática e sua relação com o tempo e pH..... | 74 |
| 4.2.2) Determinação das constantes catalíticas da enzima phosphoglucose isomerase (K_m , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_m) | 76 |
| 4.2.3) Determinação de IC_{50} | 77 |
| 4.2.4) Focalização Isoelétrica da enzima..... | 78 |
| 4.3) Resultados e Discussões..... | 79 |
| 4.3.1) Medidas da Atividade Enzimática e sua relação com o tempo e pH..... | 79 |
| 4.3.2) Determinação das constantes catalíticas da enzima phosphoglucose isomerase. | 83 |
| 4.3.3) Determinação de IC_{50} | 86 |
| 4.3.4) Focalização Isoelétrica da PGI-Tb..... | 91 |
| 4.4) Conclusões..... | 93 |
| 4.5) Referências Bibliográficas..... | 94 |
| | |
| 5) Capítulo 5..... | 95 |
| 5.1) Modelagem por homologia..... | 96 |
| 5.2) Materiais e Métodos..... | 102 |
| 5.2.1) O programa BLAST..... | 102 |
| 5.2.2) O programa Multalign..... | 102 |
| 5.2.3) O programa Modeller..... | 103 |
| 5.2.4) Avaliação Estereoquímica da estrutura (1DQR) | 104 |
| 5.2.5) O programa 'O' | 105 |
| 5.3) Resultados e Discussões..... | 106 |
| 5.4) Conclusões..... | 120 |
| 5.5) Referências Bibliográficas..... | 121 |
| | |
| 6) Capítulo 6..... | 124 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| FIGURA 1.1 – Microscopia eletrônica de varredura do parasito <i>Trypanosoma brucei</i> colorida artificialmente..... | 1 |
| FIGURA 1.2 – Distribuição geográfica da doença do sono nos países do continente Africano..... | 2 |
| FIGURA 1.3 – Tsé-Tsé do gênero <i>Glossina</i> , inseto transmissor da tripanosomose africana..... | 8 |
| FIGURA 1.4 – Representação do ciclo evolutivo do parasita <i>Tripanosoma brucei</i> no interior do tubo digestivo do hospedeiro intermediário..... | 9 |
| FIGURA 1.5 - Reação de isomerização de uma aldose (Glicose-6-fosfato) em uma cetose (Frutose-6-fosfato) catalisada pela PGI..... | 11 |
| FIGURA 1.6 – Mecanismo da reação de isomerização catalisada pela PGI, proposto por Jeffery..... | 13 |
| FIGURA 1.7 – Mecanismo da reação de epimerização catalisada pela PGI, proposto por Seeholzer..... | 14 |
| FIGURA 2.1 – Apresentação de algumas enzimas de restrição juntamente com seus sítios de reconhecimento..... | 21 |
| FIGURA 2.2 – Mapa físico do vetor de expressão pQE-30 usado para a expressão da proteína PGI-Tb em grandes quantidades | 22 |
| FIGURA 2.3 – Fluxograma representando as etapas adotadas para a subclonagem do gene responsável pela expressão da enzima PGI-Tb..... | 24 |
| FIGURA 2.4 – Representação esquemática de ligação entre os fragmentos Tb-p7 clivado com as enzimas <i>Sal</i> I e <i>Hind</i> III e Tb-p22 clivado com as enzimas <i>Hind</i> III e <i>Pst</i> I e o vetor pBluescript clivado com as enzimas <i>Sal</i> I e <i>Pst</i> I..... | 27 |
| FIGURA 2.5 – Seqüência de bases dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene PGI-Tb em reação de PCR..... | 32 |
| FIGURA 2.6 – Condições experimentais utilizadas durante os vários ciclos necessários para a reação de PCR..... | 33 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 2.7 – Representação esquemática da clonagem no vetor pGEM-T..... | 34 |
| FIGURA 2.8 – Eletroforese em gel de poliacrilamida..... | 39 |
| FIGURA 2.9 - Curva de crescimento de células induzidas com IPTG e sem ser induzidas..... | 41 |
| FIGURA 2.10 - Curva de atividade específica para a PGI-Tb em diferentes tempos de sonicação..... | 43 |
| FIGURA 2.11 – Curva de atividade específica versus concentração de IPTG para 4 e 8 horas de indução..... | 44 |
| FIGURA 3.1 – Cromatografia de afinidade envolvendo a interação entre o níquel coordenado com a resina ligada na coluna e os resíduos de histidina inseridos no N-terminal da PGI-Tb..... | 50 |
| FIGURA 3.2A – Estratégia de purificação adotada para a PGI-Tb..... | 51 |
| FIGURA 3.2B – Fórmula estrutural da histidina adicionada estrategicamente no segmento N-terminal da PGI-Tb e do imidazol usado durante a eluição da enzima em questão..... | 52 |
| FIGURA 3.3 – Cromatografia de exclusão por tamanho usado para purificação da PGI-Tb..... | 53 |
| FIGURA 3.4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturante..... | 58 |
| FIGURA 3.5 – Perfil cromatográfico da eluição da PGI-Tb na coluna superose 12.... | 61 |
| FIGURA 3.6 – Curva de calibração da coluna superose 12..... | 62 |
| FIGURA 3.7 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida das frações referentes à purificação da PGI-Tb através da coluna de níquel Ni-NTA..... | 64 |
| FIGURA 3.8 - Representação esquemática da enzima PGI-Tb..... | 65 |
| FIGURA 3.9 - Resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida após a incubação com o Fator-Xa por quatro dias..... | 66 |
| FIGURA 4.1 - Atividade Específica medida em intervalos de aproximadamente dez dias. A curva em preto representa a enzima estocada a 4°C e a vermelha a 25°C..... | 80 |
| FIGURA 4.2 – Curva de atividade específica da PGI-Tb em função do pH, a atividade é máxima quando a enzima é diluída no tampão Tris-HCl pH 8..... | 82 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 4.3 – Curva mostrando a dependência da velocidade em relação à concentração de substrato (frutose-6-fosfato), juntamente com a curva de Michaelis-Menten para a isomerização catalisado pela PGI de <i>L. mexicana</i> e <i>T. brucei</i> | 84 |
| FIGURA 4.4 – Inibidores de PGI de levedura, <i>Bacillus stearothermophilus</i> e músculo de coelho..... | 86 |
| FIGURA 4.5 – Curva mostrando a relação entre a concentração de inibidor em função do coeficiente angular usados para calcular o IC ₅₀ | 88 |
| FIGURA 4.6 - Focalização isoeétrica da enzima PGI-Tb obtida pelo sistema PhastSystem..... | 92 |
| FIGURA 5.1- Alinhamento entre a seqüência de PGI de músculo de coelho (código PDB - 1DQR) e PGI-Tb..... | 107 |
| FIGURA 5.2- Diagrama de Ramachandran com a disposição dos ângulos diedros para o dímero de PGI-Tb..... | 110 |
| FIGURA 5.3 – Distribuição de score para o monômero do modelo de PGI-Tb avaliado pelo programa Whatif modo Quality..... | 111 |
| FIGURA 5.4 - Valores de score obtido ao longo da seqüência de PGI-Tb através do programa verify 3D..... | 113 |
| FIGURA 5.5 – Sobreposição estrutural dos carbonos α das estruturas de PGI-humana (verde), PGI-coelho (azul) com o modelo de PGI-Tb (vermelho)..... | 114 |
| FIGURA 5.6 - Sobreposição estrutural entre as PGI humana (laranja), coelho (bastão) e PGI-Tb (bastão a bolas) na região do sítio ativo destacando os resíduos His, Glu e Lys..... | 115 |
| FIGURA 5.7 – A) Monômero do modelo de PGI-Tb ressaltando a tríade catalítica. B) monômero da PGI de músculo de coelho apresentando a tríade catalítica ligada ao inibidor 6-fosfogluconato..... | 116 |
| FIGURA 5.8 – Monômero do modelo de PGI-Tb ressaltando a localização do sítio de especificidade pelo substrato e a mesma região sobreposta com a PGI de músculo de coelho..... | 117 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 5.9 – Sítio ativo da PGI de coelho resolvida a 2.5 Å de resolução em complexo com o inibidor 6-fosfogluconato..... | 118 |
| FIGURA 6.1 Representação esquemática dos diferentes genes repensáveis pela expressão da PGI-Tb..... | 124 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|-----|
| TABELA 2.1 – Reagentes utilizados na clivagem do fragmento clonado no vetor Tb-p7, utilizando-se as enzimas <i>Sal</i> I e <i>Hind</i> III..... | 26 |
| TABELA 2.2 – Reagentes utilizados na clivagem do fragmento clonado no vetor Tb-p22, utilizando-se as enzimas <i>Pst</i> I e <i>Hind</i> III..... | 26 |
| TABELA 2.3 – Reagentes utilizados na ligação dos fragmentos Tb-p7 e Tb-p22 entre si e este no vetor pBluescript..... | 28 |
| TABELA 2.4 - Reagentes utilizados na clivagem do plasmídeo recombinante PGI-Tb/pBSKS ⁺ utilizando-se a enzima <i>Pst</i> I..... | 30 |
| TABELA 2.5 - Reagentes utilizados na clivagem do plasmídeo recombinante PGI-Tb/pBSKS ⁺ utilizando-se a enzima <i>Sal</i> I..... | 31 |
| TABELA 2.6 - Reagentes utilizados na amplificação do gene PGI-Tb em reação de PCR..... | 32 |
| TABELA 2.7 - Reagentes utilizados na ligação do gene de PGI-Tb no vetor pGEM-T..... | 35 |
| TABELA 2.8 - Reagentes utilizados na clivagem do inserto PGI-Tb, com as enzimas <i>Pst</i> I e <i>Bam</i> HI..... | 36 |
| TABELA 2.9 – Reagentes usados na reação de ligação do gene PGI-Tb no vetor de expressão pQE-30..... | 37 |
| TABELA 3.1 – Padrão de massa molecular utilizado na coluna superose 12 e seus respectivos volumes de eluição | 60 |
| TABELA 4.1 – Valores de atividade específica em (U/mg) para a PGI de levedura (Sigma) usada para padronizar o método e de <i>T. brucei</i> | 79 |
| TABELA 4.2 – Valores de V_{max} , k_{cat} , K_m , e k_{cat}/K_m para a PGI de <i>T. brucei</i> , <i>L. mexicana</i> e <i>T. cruzi</i> citosólica e glicossomal para o substrato frutose-6-fosfato..... | 84 |
| TABELA 4.3 – Valores do coeficiente angular médio para as diferentes concentrações dos inibidores analisados, usados para calcular o valor de IC_{50} | 87 |
| TABELA 4.4 – Valores de IC_{50} determinados para a PGI-Tb..... | 89 |
| TABELA 5.1 – Organismo aonde foram extraídas as PGIs e seus respectivos valores de identidade seqüencial em relação a PGI-Tb..... | 106 |

| | |
|--|-----|
| TABELA 5.2 – Valores da resolução e identidade seqüencial das PGIs de <i>Bacillus stearothermophilus</i> e músculo de coelho encontrado no PDB..... | 108 |
| TABELA 5.3 – Valores de score 3D obtidos através do programa Verify 3D para o modelo de PGI-Tb..... | 113 |

Resumo

A tripanossomose africana, ou doença do sono, como é popularmente conhecida, atingiu 25 mil pessoas só em 1995. Estima-se que a doença seja responsável pela morte de 10.000 pessoas a cada ano, segundo os dados da Organização Mundial da Saúde. Sua distribuição é exclusivamente africana, devido ao fato de sua transmissão depender da Tsé-Tsé, mosca do gênero *Glossina* que encontra lá condições favoráveis para sua proliferação. Atualmente os medicamentos existentes não são eficientes e devem ser ministrados em doses altas, provocando graves efeitos colaterais. O parasita *Trypanosoma brucei*, na forma encontrada no sangue dos mamíferos (tripomastigota), é o responsável pela doença e, assim como toda a família Trypanosomatidea, é altamente dependente de glicose. Esses parasitas consomem a quantidade de glicose equivalente à sua massa em aproximadamente sete horas. A via glicolítica torna-se, portanto, chave para o desenvolvimento de inibidores que possam ser utilizados no combate a estes parasitas. Nesse sentido, temos realizado estudos com a enzima glicose-6-fosfato isomerase (glucose-6-fosfato isomerase; Phosphoglucose Isomerase PGI; EC 5.3.1.9), responsável pela isomerização reversível da D-glicose-6-fosfato e D-frutose-6-fosfato e participa na glicólise como a segunda enzima da via. Os trabalhos realizados até aqui culminaram na sua expressão em forma recombinante, purificação através de coluna de afinidade, e caracterizações enzimáticas. Sua atividade específica foi determinada através de métodos já estabelecidos encontrados na literatura. O IC_{50} da enzima frente a quatro inibidores da reação foi determinado. O trabalho finaliza com a construção de um modelo estrutural da enzima determinado através de métodos de modelagem molecular por homologia.

Abstract

The African trypanosomiasis, or sleeping sickness as is popularly known, affected 25 thousand people only in 1995. It is estimated that the disease is responsible for 10 thousand deaths per year, according to data provided from the World Health Organization (WHO). The distribution of the disease is exclusively African due to the transmission being dependent on the tsé-tsé vector. A fly, belonging to the *Glossinia* genus, finds in the African continent favorable conditions for its proliferation. Presently the existing drugs are not efficient and have to be applied in high dosage, resulting in severe side effects. The bloodstream form (trypomastigote) of the parasite *Trypanosoma brucei* is responsible for the disease and such as the whole Trypanosomatidae family is dependent on glucose. Those parasites consume a quantity of glucose equivalent to its mass in approximately seven hours. This characteristic results in the glycolytic pathway been a key target for drug development against those parasites. In this direction we are developing research with the enzyme glucose-6-phosphate isomerase (Phosphoglucose Isomerase PGI; EC 5.3.1.9) responsible for the reversible isomerisation of D-glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate. PGI participates as the second enzyme in the glycolytic pathway. The work developed so far resulted in the expression of the recombinant form of the parasite PGI, its affinity purification and enzymatic characterization. The specific activity was determined with established methods. The IC50 of four inhibitors was determined and a structural model of *T. brucei* PGI was built by molecular modeling techniques.

1.1) Tripanossomose Africana

A doença do sono foi descrita desde 1800 como doença do homem, entretanto seu agente etiológico só foi estabelecido um século depois. Em 1907, Forde foi o primeiro a identificar o *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) no sangue de um europeu no rio Gâmbia [Pessoa, 1969]. Os agentes etiológicos da enfermidade são os protozoários do gênero *Trypanosoma* (Figura 1.1), transmitidos ao hospedeiro mamífero através de picadas de Tsé-Tsé do gênero *Glossina* ao se alimentarem do sangue de suas vítimas.



FIGURA 1.1 - Microscopia eletrônica de varredura do parasito *Trypanosoma brucei* colorida artificialmente [Wellcome News #23, 2000].

Os focos da doença se distribuem em uma vasta área do continente Africano em duas formas: *Trypanosoma brucei rhodesiense*, encontrado geralmente no leste do continente; e *Trypanosoma brucei gambiense*, ocupando a parte central. A doença está restrita a esse continente pelo fato de sua transmissão depender do vetor, a Tsé-Tsé, que encontra nessas regiões condições favoráveis para sua proliferação.

Sem um tratamento adequado, ambas as formas (*T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense*) são fatais, sendo que a forma *T. b. rhodesiense* leva suas vítimas à morte em um prazo de aproximadamente um ano [Rey, 1991].

A Organização Mundial da Saúde classificou as áreas atingidas em quatro regiões distintas, sendo elas: **regiões epidêmicas**, onde são registradas um grande número de casos; **regiões de alta endemia**, onde o número de casos está aumentando; **regiões de baixa endemia**; e **regiões de risco** onde há pouco ou não há registro da doença. O mapa abaixo (Figura 1.2) apresenta a distribuição geográfica da doença de acordo com as regiões mencionadas.

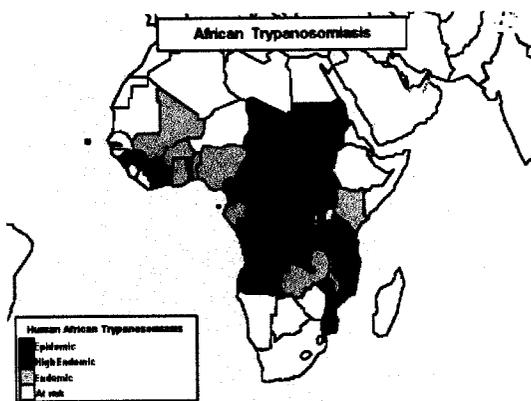


FIGURA 1.2 - Distribuição geográfica da doença do sono nos países do continente Africano

Segundo os dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde, em pesquisa realizada em agosto de 1999, 55 milhões de pessoas vivem em regiões consideradas de risco, sendo que em 1995 foram registrados 25 mil novos casos nessas regiões. Estima-se que o número de vítimas seja maior, devido ao freqüente erro de diagnósticos ou falta de acesso aos mesmos, uma vez que as áreas mais atingidas se localizam em regiões de baixa renda per-capita. O número real de vítimas afligidas por infecções por *Trypanosoma brucei* pode girar em torno de 300 mil.

As moscas do gênero *Glossina* também transmitem outras tripanossomoses ao gado e à fauna bravia, com forte impacto sobre as atividades agropecuárias, pois essas parasitoses destroem impiedosamente os rebanhos de gados e muitos animais domésticos. Reduz-se, em consequência, a fonte de alimentação protéica, e torna-se muito difícil ou impossível, em certas áreas, o uso da força animal na produção e nos transportes das zonas rurais atingidas por tais flagelos [Rey, 1991]. Em consequência desses efeitos, a doença é apontada como o principal obstáculo para o desenvolvimento dessas regiões.

A doença em humanos apresenta-se em duas fases: a primeira denominada fase aguda, marcada principalmente por surtos de febre que podem durar 3 ou 4 dias, onde o paciente refere-se a períodos de mal-estar, com dores de cabeça (mialgias), vertigens e dores articulares (nos casos mais típicos, essa fase dura cerca de um ano); os casos não tratados passam para a fase crônica da doença no segundo ano, onde os parasitas invadem o sistema nervoso. Os sintomas da fase aguda intensificam-se, surgindo transtornos nervosos e mentais progressivos, a prostração, e por fim o coma e a morte.

Atualmente, os medicamentos existentes possuem certo grau de eficiência quando os pacientes são tratados nas fases iniciais da doença, durante a etapa de invasão do parasita no sistema nervoso. Entretanto, como se trata de regiões economicamente pobres, raramente isso acontece.

A pentamidina, o nifurtimox e a suramina são eficazes durante a fase aguda contra a forma gambiense, podendo ser usada contra a forma rhodesiense. Quando o parasita já invadiu o sistema nervoso central utiliza-se o melarsoprol.

Todos esses medicamentos são considerados tóxicos, causando efeitos colaterais indesejáveis [Brown, 1975]. A pentamidina pode produzir hipertensão e vômitos. A suramina causa, entre outros sintomas, a fobia e danos renais. O melarsoprol pode provocar danos ao miocárdio, hipertensão, cólicas e outros efeitos colaterais. Devido às condições de vida das pessoas das regiões endêmicas, os casos não são tratados, ocasionando a morte dos pacientes. Estima-se que a doença seja responsável pela morte de 10.000 pessoas a cada ano [World Health Organization, 1993].

O fato de não haver uma droga específica e eficiente contra a doença do sono e os medicamentos existentes causarem sérios efeitos colaterais motiva o estudo para o desenvolvimento de novas drogas.

1.2) O Planejamento Racional de Drogas baseado em Estruturas de Proteínas

O planejamento racional de drogas tem como objetivo o descobrimento de novos compostos baseado em detalhes estruturais de uma molécula alvo (enzima) e a interação dela com pequenas moléculas. Informações estruturais em combinação com métodos gráficos capazes de revelar o volume acessível, potencial eletrostático e hidrofobicidade do sítio ativo da enzima alvo, têm se mostrado uma ferramenta muito eficiente no apoio à metodologia [Silva, 1999].

O conhecimento das propriedades químico estruturais do sítio ativo da enzima alvo pode ser usado para modelar pequenas moléculas que podem encaixar-se nesse sítio (molecular docking) e atuar como inibidor da enzima. Uma segunda alternativa seria a descoberta de um composto de partida com a enzima alvo, cuja análise constitui uma

preciosa fonte de sugestões sobre onde e como modificações podem ser feitas para melhorar sua afinidade e seletividade para com a enzima. A descoberta de um composto de partida é seguida pela descoberta da sua estrutura cristalográfica em complexo com o receptor, sua análise constitui uma fonte de sugestões sobre onde e como modificações podem ser feitas para melhorar a sua afinidade e seletividade para com a enzima. Além disso, para que um inibidor possa ser aceito como droga, deve possuir determinados pré-requisitos farmacológicos. Portanto, a colaboração de pesquisadores experientes em diferentes campos de atuação e muito esforço computacional e experimental são necessários para que, a partir da estrutura de uma proteína alvo, através da busca de inibidores e otimização deles, se chegue a uma eficiente droga. É importante ressaltar que, em todos os passos de otimização de um determinado inibidor, a estrutura do complexo com a enzima revela importantes informações sobre melhorias a serem feitas. Estima-se que o tempo médio para o desenvolvimento de uma nova droga é de 10 anos, chegando a custar 100 milhões de dólares [Kuntz, 1992].

Até o momento, a técnica denominada difração de raios-X por monocristais é a preferida para a obtenção de detalhes em nível atômico, que geralmente é requerido para o desenvolvimento de uma dada droga [Babu et al., 1995].

O desenvolvimento de novas drogas que sejam efetivas e menos tóxicas requer o conhecimento do ciclo de vida e dos mecanismos metabólicos do *T. brucei* e do hospedeiro humano. O parasita tem um ciclo de vida complexo, tanto no vetor - uma mosca do gênero *Glossina*-, como no hospedeiro mamífero, durante o qual se apresenta de três formas distintas: tripomastigotos, epimastigotos, e amastigotos.

No sangue de hospedeiro mamífero a forma tripomastigota é predominante. Uma característica fundamental nesse estágio de vida é a presença de uma organela denominada glicossomo, onde ocorre o metabolismo da glicose. Nesta forma a taxa de consumo de glicose é 50 vezes maior que a dos mamíferos [Wang, 1984], consumindo quantidade de glicose igual à sua massa em aproximadamente 7 horas. Na forma tripomastigota, a mitocôndria foi reduzida a um canal periférico sem ciclo de Krebs funcional, não possuindo também formas de estoque de energia metabólica, como carboidratos e moléculas com grupos fosfato de alta energia. Isto aumenta tremendamente a vulnerabilidade deste organismo a compostos que venham a afetar o ciclo da glicólise conforme observado por testes *in vivo* [Opperdoes; Borst, 1977] e *in vitro* [Clarkson; Brohm, 1976]. Um dos caminhos para o desenvolvimento de novas drogas contra a doença do sono é explorar o fato de que, na forma sanguínea, o parasita (tripomastigota) depende exclusivamente da via glicolítica como fonte de energia. Portanto, compostos que bloqueiem a glicólise podem matar o parasita, e poderão ser utilizados como drogas contra a doença.

Com o objetivo de desenvolver novas drogas para combater doenças causadas por *Trypanosomas* (*T. cruzi*, responsável pela doença de Chagas) e *Leishmania* (várias espécies responsáveis pela leishmaniose), as estruturas tridimensionais de algumas enzimas glicolíticas foram determinadas, como, por exemplo, a Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *T. cruzi* [Souza et al., 1998] e de *L. mexicana* [Kim et al., 1995]. Investigações detalhadas da GAPDH de *T. cruzi* levaram à identificação do sítio de ligação do NAD⁺ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, cofator da enzima). Com os

resultados das investigações foi possível propor um composto extraído de um extrato de vegetal capaz de se ligar à enzima, impedindo o acesso do NAD⁺.

O planejamento racional de drogas baseado em estrutura é hoje a tecnologia mais eficiente e de melhor relação custo benefício para o desenvolvimento de novas drogas, podendo contribuir em todas as etapas do processo. É uma metodologia que se baseia na inibição da atividade específica de macromoléculas envolvidas em determinadas vias enzimáticas de agentes causadores de doenças. Um dos passos difíceis no desenho racional de drogas é encontrar uma molécula inibidora da enzima alvo. Esta molécula, denominada composto de partida, tem algumas propriedades desejadas de uma eventual droga. O descobrimento de um composto de partida pode ocorrer através da química combinatória, do uso de sofisticados programas ou da busca em produtos naturais.

1.3) O ciclo de vida do parasita

Em verdade os agentes etiológicos da doença do sono são atualmente considerados como cinco subespécies de *Trypanosoma brucei*. São eles:

- *Trypanosoma brucei gambiense*
- *Trypanosoma brucei rhodesiense*
- *Trypanosoma brucei brucei*
- *Trypanosoma brucei evansi*
- *Trypanosoma brucei equiperdum*

As cinco espécies são morfologicamente indistinguíveis, entretanto as três últimas não infectam o homem. Todas as subespécies de *Trypanosoma brucei* caracterizam-se pelo polimorfismo de suas populações, que exibem no sangue do hospedeiro invertebrado tanto formas longas e delgadas, como formas curtas e grossas, além de elementos com morfologia intermediária. A Tsé-Tsé, mostrada na figura 1.3, infecta-se enquanto se alimenta do sangue de vertebrados com a parasitemia.

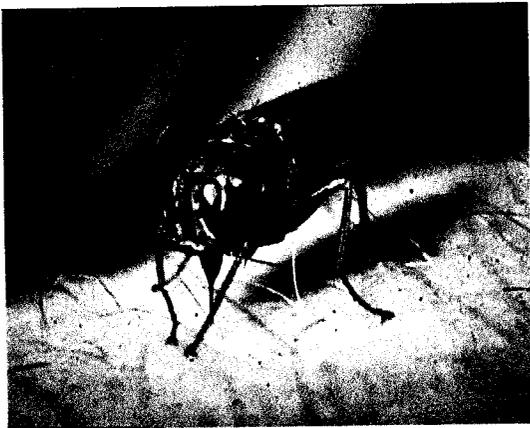


FIGURA 1.3 – Tsé-Tsé do gênero *Glossina*, inseto transmissor da tripanossomose africana.

O ciclo evolutivo, no hospedeiro invertebrado, completa-se no intestino médio (estômago), no intestino anterior e nas glândulas salivares do inseto. A forma sanguínea do parasita (infectante) é ingerida pela mosca, ficando contido no intestino médio. Enquanto o sangue é ingerido, as formas grossas do parasita começam a transformar-se em elementos alongados (por volta do terceiro ao quarto dia), com cinetoplasto afastado da extremidade posterior, membrana ondulante menos pronunciada e flagelo com sua porção livre anterior sempre presente. A figura 1.4 abaixo representa o ciclo evolutivo dos parasitas no tubo digestivo do inseto.

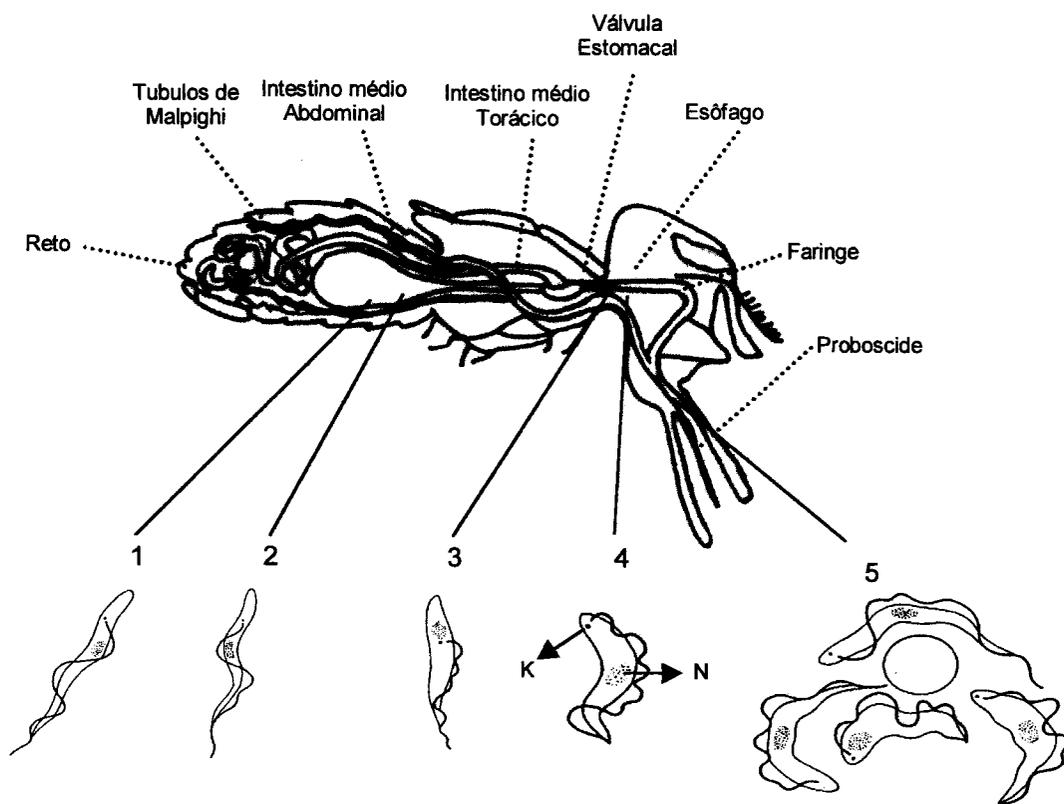


FIGURA 1.4 – Representação do ciclo evolutivo do parasita *Tripanosoma brucei* no interior do tubo digestivo do hospedeiro intermediário. 1 - Forma tripomastigota do estômago, 2 – forma proventricular, 3 – epimastigota da glândula salivar, 4 – forma metatripomastigota (altamente infectante), 5 – forma sanguínea encontrada nos hospedeiros vertebrados. K-Kinetoplasto, N-Núcleo.

Os parasitas tripomastigotas, que chegam a medir 35 µm de comprimento, dividem-se ativamente durante uns dez dias e vão ocupando situação cada vez mais distal; até transporem a borda posterior da membrana peritrófica. Penetram, então, no espaço compreendido entre essa membrana e o epitélio do intestino médio e por aí migram em direção à extremidade cefálica do órgão. Atravessam a zona de implantação da membrana peritrófica e invadem o proventrículo da mosca entre o décimo e o vigésimo dia da infecção. Ao chegarem ao proventrículo, os tripanosomastigotas tornam-se mais finos e longos (forma proventricular), continuam sua migração em direção anterior e chegam aos canais das glândulas salivares e às estruturas glandulares.

Nas glândulas salivares, permanecem livres ou fixados ao epitélio pela extremidade flagelar, e continuam a multiplicar-se ativamente, adotando a forma epimastigota grossa, não infectante para o homem ou outros mamíferos.

No fim dessa evolução, os parasitos, ao retomarem a forma tripomastigotas, tornam-se altamente infectantes para os hospedeiros vertebrados. Apresentam-se então como pequenos tripanossomos (14 a 18 μm de comprimento), grossos, com núcleo central e cinetoplasto próximo do extremo posterior geralmente sem flagelo livre. São os tripomastigotas metacíclicos, ou metatripomastigotas infectantes, que o inseto passa a inocular nas pessoas expostas a suas picadas. O ciclo no inseto dura de três a sete semanas.

1.4) A enzima Alvo

A enzima Phosphoglucose Isomerase (PGI; EC 5.3.1.9) é uma enzima glicolítica e, portanto, essencial em todos os tecidos. Ela catalisa a interconversão reversível entre glicose-6-fosfato (aldose) e frutose-6-fosfato (cetose), (figura 1.5). Esta reação envolve o deslocamento de hidrogênio do carbono 2 para o carbono 1, ocorrendo facilmente em qualquer direção, como pode ser predito pela variação de energia livre padrão relativamente pequena ($\Delta G^{\circ} = 0.4 \text{Kcal/mol}$) [Lehninger, 1990].

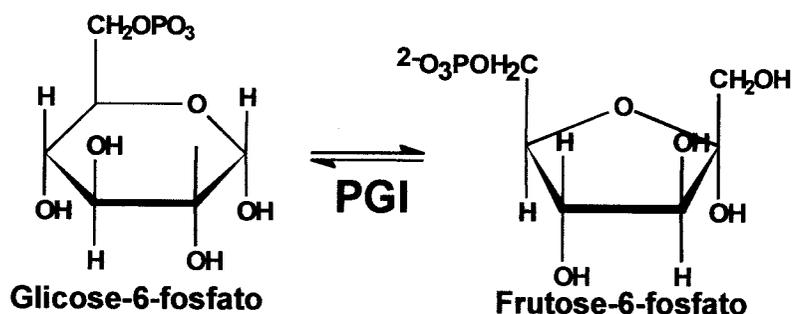


FIGURA 1.5 - Reação de isomerização de uma aldose (Glicose-6-fosfato) em uma cetose (Frutose-6-fosfato) catalisada pela PGI.

Além da via glicolítica, a enzima participa da gluconeogênese [Blum, 1994] e do ciclo da pentose fosfato [Barret, 1997], podendo ser encontrada em eucariotos, bactérias e archaea. A PGI é ativa na forma dimérica, composta de duas subunidades idênticas com uma massa molecular variando entre 110 e 132 KDa [Muirhead; Shaw, 1974].

A densidade eletrônica correspondente à ligação do inibidor 6-fosfogluconato é encontrada em cada um dos dois idênticos bolsões de ligação do substrato, sendo estes localizados entre dois domínios α/β em forma de sandwicks [Jeferry et al., 2000]. Todas as enzimas glicolíticas possuem domínios com estruturas tipo α/β , assim como outras enzimas ou proteínas que se ligam ou que transportam metabólitos. As regiões de loop presentes na estrutura não contribuem para sua estabilidade, porém participam da ação catalítica da macromolécula. Esse tipo de domínio contém folhas torcidas β e hélices- α em ambos os lados [Branden; Tooze, 1991].

Estudos realizados por Labudova [Labudova et al., 1999] revelaram que a atividade específica de PGI é significativamente diferente em várias regiões do cérebro em pacientes com síndrome de Down em relação ao controle, apontando a mesma como sendo chave para estudo da doença. A enzima pode ser usada como ferramenta de

diagnóstico na medicina. Estudos revelaram alta concentração de PGI em pacientes com câncer. Também foi reportada sua presença em pequenas quantidades em pacientes com hepatite. Esses estudos, em conjunto com a aldolase em soro de pacientes com distrofia muscular, abriram um campo na enzimologia clínica [Parks; Argawal, 1972].

Trabalhos realizados recentemente revelaram que importantes proteínas (como algumas neuroleucinas, fatores de mobilidade autocrina e fatores de maturação) são muito semelhantes se não idênticas à PGI. Neuroleucina de rato e humana podem ser alinhadas com PGI de músculo de porco sem inserções ou deleções [Sun et al., 1999].

Muitos dos açúcares de 4 a 6 átomos de carbono tais como 6-fosfogluconato ou eritrose-4-fosfato, servem como inibidores competitivos da reação. Açúcares não fosforilados não são substratos e não servem como inibidores.

O composto 6-fosfogluconato é um forte inibidor competitivo da PGI ($K_i = 0,140$ mM para PGI de *T. brucei*). Análise do efeito inibitório da droga usada contra a doença do sono, suramina, mostrou efeito inibitório misto (competitivo e não competitivo) e K_i igual a $0,290$ mM. Outro inibidor irreversível potente, ácido agarílico, apresentou IC_{50} igual a 10μ M, sendo que as enzimas de levedura e de coelho foram pouco afetadas (menos de 20% a 60μ M). Óxido de melarseno, princípio ativo da droga melarsoprol usada contra tripanossomas, teve inibição fraca contra PGI de *T. brucei* (IC_{50} igual a 100μ M).

O mecanismo de isomerização tem sido proposto por Jeffery e colaboradores (figura 1.6) e envolve uma catálise do tipo ácido / base com a transferência de próton via um enediol intermediário, envolvendo resíduos com pKa no valor de 6.7 e 9.4, implicando em uma histidina não protonada e uma lisina protonada. Na primeira parte

da reação, a forma cíclica da glicose-6-fosfato liga-se ao sítio ativo da enzima e há a transferência de próton da enzima para o oxigênio do anel, sendo que a protonação desse oxigênio é acompanhada pela sua abertura. O próton do carbono 2 é relativamente ácido devido à sua ligação a um carbono carbonílico. Uma base abstrai o próton do carbono 2 e o par de elétrons é usado para formar uma ligação dupla entre os carbonos 1 e 2, formando o cis-enediol intermediário. Estudos envolvendo a mudança de solvente revelaram que o mesmo próton extraído do carbono 2 é transferido para o carbono 1. Essa transferência é acompanhada pela modificação que resulta na perda de um próton do oxigênio do carbono 2 e no ganho de um próton pelo oxigênio do carbono 1. O passo final da reação envolve a transferência de um par de elétrons do oxigênio para o carbono 2. O oxigênio da cetose abstrai um próton do solvente para completar o anel fechado da frutose-6-fosfato.

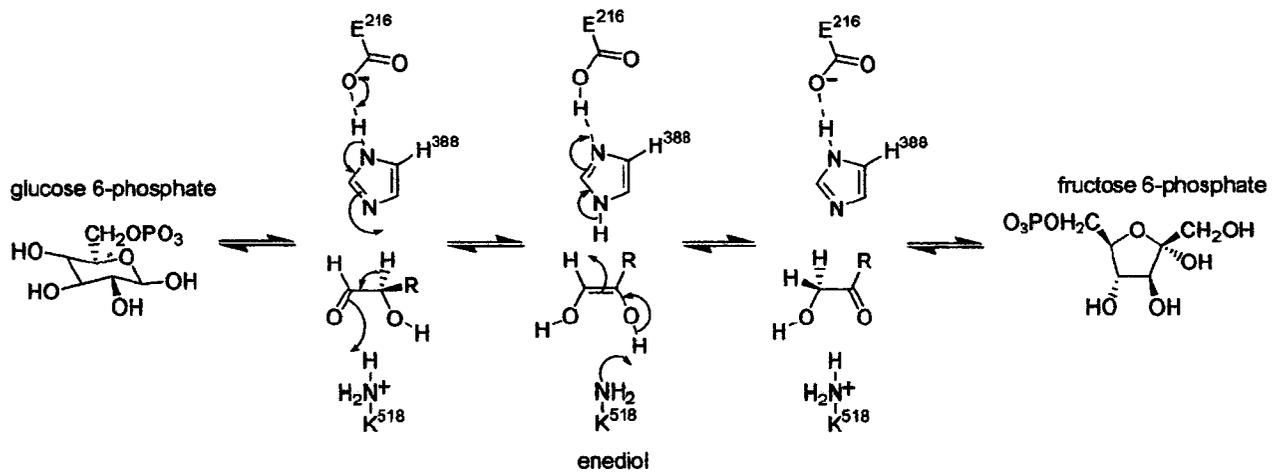


FIGURA 1.6 – Mecanismo da reação de isomerização catalisada pela PGI, proposto por Jeffery [Jeffery et al., 2000]

Uma segunda reação catalisada pela PGI é a epimerização. Essa reação consiste na conversão de glicose-6-fosfato a manose-6-fosfato. Os trabalhos realizados por Seeholzer [Seeholzer, 1993] revelaram que a taxa de formação de manose-6-fosfato é 2×10^5 vezes mais lenta que a taxa de isomerização da frutose-6-fosfato. O autor propõe um mecanismo de epimerização mostrando as principais diferenças em relação a isomerização. A figura 1.7 apresenta o mecanismo.

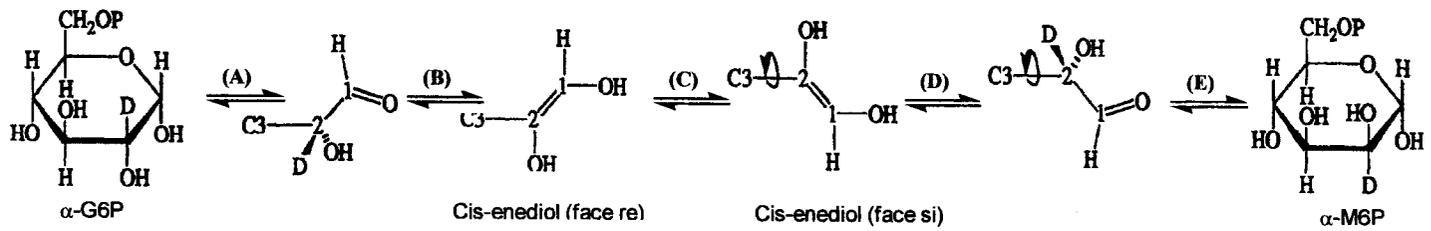


FIGURA 1.7 – Mecanismo da reação de epimerização catalisada pela PGI, proposto por Seeholzer [Seeholzer 1993].

A primeira parte da reação (reação A) consiste na abertura do anel da glicose-6-fosfato. Essa abertura permite em giro em torno da ligação entre os carbonos 1 e 2 formando um equilíbrio entre essas duas formas (o equilíbrio não é apresentado na figura 1.7). Em seguida (reação B) existe a abstração do próton (deutério) do carbono 2 possibilitando a formação do intermediário cis-enediol. A epimerização ocorre quando o intermediário cis gira em torno da ligação entre os carbonos 2 e 3 (reação C) e expõe a face si para um ácido conjugado da base catalítica, resultando na protonação do carbono 2 (reação D). Em seguida há a formação do anel da manose-6-fosfato (reação E). Os

dados de RMN foram capazes de comprovar a formação de manose-6-fosfato a partir de glicose-6-fosfato na presença de PGI.

1.5) Objetivos

Este trabalho faz parte de um projeto mais amplo, que tem como objetivo a determinação da estrutura tridimensional pela técnica de difração de raios-X por monocristais da enzima PGI de *Trypanosoma brucei*, para posteriormente usar a informação estrutural para o desenvolvimento de inibidores específicos contra esta enzima. Entretanto, como a obtenção de monocristais é dependente de muitas variáveis, alguns autores fazem referência a ela mais como uma arte do que uma técnica propriamente dita. Estaremos realizando estudos de expressão, purificação e caracterização da enzima. Estudos estruturais da mesma foram realizados através da técnica de modelagem molecular por homologia. Os objetivos mais específicos são listados no item a seguir.

1.5.1) Objetivos específicos

- Construção de plasmídeo contendo a sequência codificadora para a enzima PGI de *Trypanosoma brucei* partindo de plasmídeos gentilmente cedidos pelo Dr. Paul Michels do Research Unit for Tropical Diseases, Catholic University of Louvain, Bruxelas, Bélgica, específicos para a expressão em grande quantidade de proteína em bactéria
- Purificação por coluna de afinidade do produto que contém uma extensão de

resíduos de histidinas através de coluna de níquel;

- Caracterização por métodos enzimáticos;
- Medidas da atividade específica da enzima e determinação das constantes catalíticas;
- Determinação do IC_{50} da enzima frente aos inibidores D-Arabinonhydroximate-5-phosphate (5PAH), D-Arabinonate-5-phosphate (5PAA), D-Arabinonamide-5-phosphate (5PAAm), D-Arabinonhydrazide-5-phosphate (5PAHz) sintetizados por Renaud Hardré da Universidade de Paris, França;
- Construção do modelo estrutural da enzima PGI de *Trypanosoma brucei*.

1.6) Referências Bibliográficas

- BABU, S. Y.; EALICK, S. E.; BUGG, C. E.; MONTGOMERY, J. A.; SECRIST, J. Structure-Based Design of Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase *Acta Cryst.* v.D51 p.529-535 1995
- BARRET The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitology Today* v.13, p.11-16, 1997.
- BLUM, J. J. Energy Metabolism in *Leishmania*. *J. Bioenerg. Biomembr* v.26, p.147-155 1994.
- BRANDEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to Protein Structure** New York 1991
- BROWN, H.W. **Parasitologia Clínica**. Cuarta Edicion, México 1975.
- CLARKSON, A.B.; BROHN, F. Trypanosomiasis: an approach to chemotherapy by the inhibition of carbohydrate catabolism *Science* v.194, p.204-206, 1976.
- JEFFERY, C.; BAHNSON, B.; CHIEN, W.; RINGE, D.; PETSKO, G.; Crystal Structure of Rabbit Phosphoglucose Isomerase, a glycolitic enzyme that moonlights as neuroleukin, autocrine motility factor, and differentiation mediator *Biochemistry* v.39, p.955-964, 2000.
- KIM, H.; FEIL, I. K.; VERLINDE, C. L. M.; PETRA, P. H.; HOL, W. G.; Crystal structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania mexicana* *Biochemistry* v.34(46) p.14975-14986 1995.
- KUNTZ, I.D. Structure-Based Strategies for Drug Design and Discovery. *Science* v.257 p.1078-1082 1992.
- LABUDOVA, O.; CAIRNS, N.; KITZMULLER, E.; LEBEC, G. *J. Neural. Transm.* v.57, p.247-256, 1999
- LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica** Brasil 1990.
- MUIRHEAD, H.; SHAW, P. Three-dimensional Structure of Pig phosphoglucose isomerase at 6 Å Resolution *J. Mol. Biol.* v.89, p.195-203, 1974
- OPPERDOES, F. R.; BORST, P. Location of nine glycolitic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.* v.80 p.360-364 1977

- PARKS, R.E.; ARGAWAL, R.P. **The enzymes** 3.ed New York, Academic Press 1972 v.7 p.271-301
- PESSOA, S.B. **Parasitologia Médica**. Sétima Edição, Rio de Janeiro Guanabara Koogan 1969.
- REY, L. **Parasitologia**. Segunda Edição, Rio de Janeiro Guanabara Koogan 1991
- SEEHOLZER, S.H. Phosphoglucose isomerase: A ketol isomerase with aldol C2-epimerase activity **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.90 p.1237-1241 1993
- SILVA, Carlos Henrique Tomich. Planejamento racional de inibidores de enzimas-alvo aplicado a diferentes doenças: modelagem, síntese, bioquímica e Qsar. São Carlos, 1999. 161p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo
- SOUZA, D.H.F.; GARRATT, R.C.; ARAÚJO, B.G.; GUIMARÃES, B.G.; JESUS, W.D.P.; MICHELS, P.M.; OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design **FEBS Lett.** v. 424 p.131-135 1998
- SUN, Y.; CHOU, C.; CHEN, W.; WU, R.; MENG, M.; HSIAO, C.; The Crystal Structure of a multifunctiona protein: Phosphoglucose Isomerase / motility factor / neuroleukin **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.96, p.5412-5417, 1999
- World Health Organization. **African Trypanosomiasis**. Genebra, 1993.
- WANG, C. C. Parasite enzymes as potential target for antiparasitic chemotherapy. **J. Med. Chem.** v.27, p.1-9 1984.

Capítulo – 2

A Clonagem do gene

Responsável pela expressão da

Enzima phosphoglucose isomerase

A partir de 1970 uma nova maneira de explorar as principais moléculas constituintes das células começou a ser posta em prática. Essas metodologias inovadoras foram coletivamente chamadas de técnica do DNA recombinante. A partir daí abriu-se um caminho para o estudo de uma gama muito grande de proteínas, mesmo aquelas que são expressas em pequenas quantidades. A estratégia adotada para clonagem do gene responsável pela expressão da enzima PGI-Tb divide-se em três partes distintas. A expressão da enzima deu-se após a subclonagem do gene no vetor de expressão pQE-30. Testes revelaram a expressão da enzima de forma solúvel. Todos os detalhes adotados em cada um dos passos serão detalhados a partir de agora.

2.1) Clonagem

Em linhas gerais, clonagem consiste na introdução de um gene de interesse (inserto) dentro de uma região específica de um DNA circular (vetor), e a inserção deste conjunto em um organismo que, por sua vez, produzirá novos organismos com material genético idêntico à geração anterior. O desenvolvimento dessa metodologia permitiu um grande salto no estudo de moléculas constituintes das células, uma vez que seu domínio permitiu a expressão de proteínas em grandes quantidades, mesmo aquelas que são normalmente pouco expressas nos organismos. O segredo da técnica reside nas chamadas enzimas de restrição ou endonucleases de restrição, que reconhecem seqüências específicas de bases na dupla hélice e cortam ambas as fitas. Aliadas a estas se encontram as DNAs-ligases que refazem a ligação fosfodiéster.

As enzimas de restrição são encontradas em ampla variedade de organismos procariotos. Seu papel biológico é clivar DNA exógeno. A maioria dessas enzimas reconhece seqüências de quatro a oito pares de base e hidrolisa uma ligação fosfodiéster em cada fita nessa região. Uma característica marcante de muitos desses sítios é que eles possuem uma dupla simetria rotacional, isto é, a seqüência de reconhecimento é palindrômica e os sítios de clivagem são posicionados simetricamente. Algumas enzimas de restrição, juntamente com suas respectivas seqüências, são mostradas a seguir, (figura 2.1).

| | | | |
|-----------------|--------------------------|-----------------|----------------------|
| <i>Bam</i> HI | G'GATC C C CTAG'G | <i>Bgl</i> II | A'GATC T T CTAG'A |
| <i>Bsp</i> 120I | G'GGCC C C CCGG'C | <i>Dpn</i> I | GA'TC CT'AG |
| <i>Dra</i> I | TTT'AAA AAA'TTT | <i>Eco</i> RI | G'AATT C C TTAA'G |
| <i>Hinc</i> II | GTPy'PuAC CAPu'PyTG | <i>Hind</i> III | A'AGCT T T TCGA'A |
| <i>Hpa</i> II | C'CG G G GC'C | <i>Mae</i> III | 'GTNAC CANTG' |
| <i>Not</i> I | GC'GGCC GC CG CCGG'CG | <i>Pvu</i> II | CAG'CTG GTC'GAC |
| <i>Sal</i> I | G'TCGA C C AGCT'G | <i>Sau</i> 3A | 'GATC CTAG' |

FIGURA 2.1 – Apresentação de algumas enzimas de restrição juntamente com seus sítios de reconhecimento. As aspas são regiões onde as enzimas de restrição rompem a ligação fosfodiéster.

As enzimas de restrição mais usadas na clonagem são aquelas que geram extremidades coesivas complementares de até quatro nucleotídeos de comprimento [Howe, 1985].

As DNA-ligases refazem as ligações rompidas pelas enzimas de restrição, catalisando a formação de uma ligação fosfodiéster entre as duas moléculas. Para isso é necessário um grupamento OH livre na extremidade 3' de uma das cadeias de DNA e um grupamento fosfato na extremidade 5' da outra. Após a ligação, a molécula de DNA torna-se fita dupla. ATP ou NAD⁺ são as fontes de energia necessárias para esta reação.

Tendo sido preparado o inserto, resta fazer a escolha do vetor que melhor se adequie a cada situação. O vetor de clonagem ou veículo de clonagem tem como uma, entre várias funções, a de transportar o inserto para dentro da célula hospedeira onde ele

será replicado. Esse vetor deve possuir algumas características principais como, por exemplo, uma seqüência que permita sua replicação dentro da célula hospedeira, uma região com múltiplos sítios de clonagem (MCS), e um gene que confere resistência a um antibiótico, geralmente ampicilina ou canamicina. A região MCS contém sítios únicos para várias enzimas de restrição posicionadas de forma adjacente, local onde será inserido o gene de interesse. O gene que confere resistência ao antibiótico tem a função de selecionar as células que receberam o plasmídeo.

Os vetores de expressão são utilizados com a finalidade de gerar proteínas em grandes quantidades e para esse propósito o gene de interesse é subclonado nesse vetor, geralmente plasmídeos que além de possuir as seqüências mencionadas ainda possuem promotores fortes e sítio de ligação ao ribossomo. A figura 2.2 apresenta o vetor de pQE-30, usado para a expressão de proteínas em grandes quantidades.

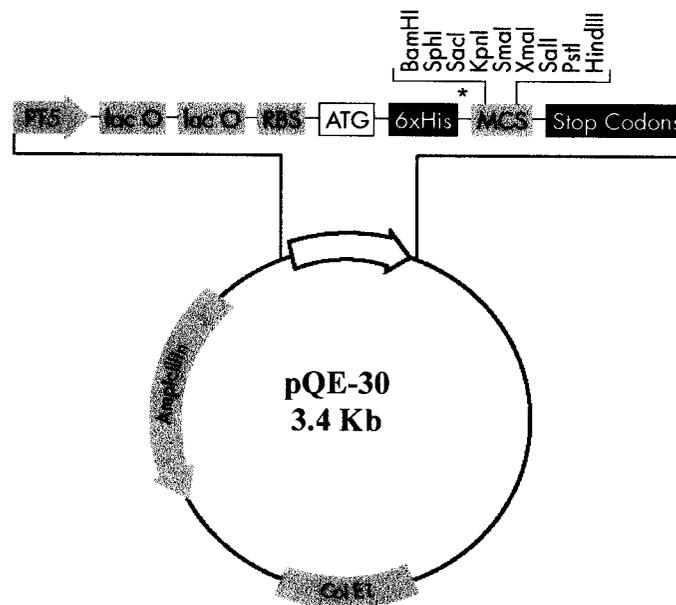


FIGURA 2.2 – Mapa físico do vetor de expressão pQE-30 usado para a expressão da proteína PGI-Tb em grandes quantidades

Após a preparação do DNA-recombinante, gene de interesse ligado ao plasmídeo, segue-se inserindo o conjunto em um organismo hospedeiro, o qual torna-se apto a recebê-lo após um tratamento da sua membrana, sendo por isso denominadas células competentes. A introdução do plasmídeo é feita através de um choque térmico ou, alternativamente, submetendo as células a pulso elétrico de alta voltagem.

É interessante salientar que o processo, como um todo, tem o suporte de outras técnicas, como PCR (Polymerase Chain Reaction) e eletroforese em gel de agarose, que permite avaliar o andamento da clonagem em cada etapa.

O PCR foi um importante marco na biologia molecular. Essa técnica possibilitou enormes perspectivas para análise dos genes. O método permite a amplificação de segmentos de DNA *in vitro*, baseando-se na hibridização de dois primers que se ligam em segmentos específicos do gene a temperaturas mais baixas. Em seguida, a DNA-polimerase inicia a polimerização, uma vez que no meio reacional estão presentes os desoxirribonucleotídeos (dNTPs). A cada ciclo de PCR dois novos genes são obtidos a partir de um único.

As considerações feitas sobre clonagem são vastas e muita literatura é encontrada abordando o assunto em maiores detalhes. O objetivo desse capítulo foi apresentar o tema ao leitor em linhas gerais. A partir de agora, apresentaremos o método de subclonagem utilizado para a PGI-Tb nos vetores pBluescript, pGEM-T de clonagem, e no pQE-30 de expressão, apresentado na figura 2.2. A estratégia usada para a expressão da PGI-Tb é apresentada na figura 2.3.

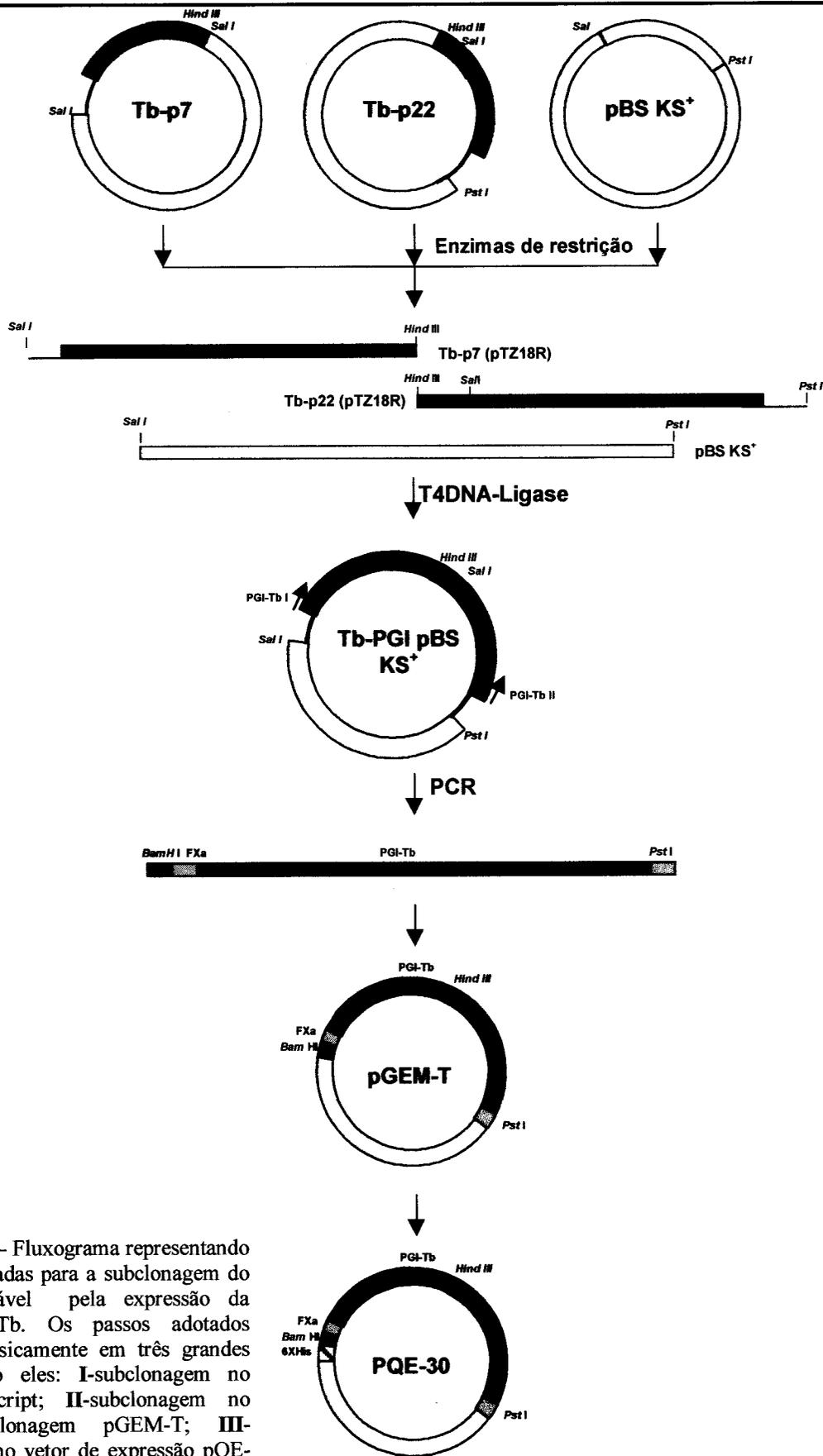


FIGURA 2.3 – Fluxograma representando as etapas adotadas para a subclonagem do gene responsável pela expressão da enzima PGI-Tb. Os passos adotados dividem-se basicamente em três grandes grupos, sendo eles: **I**-subclonagem no vetor pBluescript; **II**-subclonagem no vetor de clonagem pGEM-T; **III**-subclonagem no vetor de expressão pQE-30.

2.2) Materiais, Métodos e Resultados.

2.2.1) Montagem do inserto e subclonagem no vetor pBluescript

A figura 2.3 apresenta um fluxograma mostrando os passos adotados durante o processo de subclonagem do gene responsável pela expressão da enzima PGI-Tb divididos em três grandes grupos, sendo eles a subclonagem do inserto nos vetores de clonagem pBluescript, pGEM-T e, finalmente, no vetor de expressão pQE-30. O gene foi gentilmente cedido pelo Dr. Paul Michels do Research Unit for Tropical Disease, Catholic of Louvain, Bruxelas, Bélgica, sendo recebido separadamente em dois fragmentos: a metade 5' de 1.8Kpb foi clonada no vetor Tb-p7, possuindo dois sítios de restrição para as enzimas *Sal* I localizadas nas extremidades e um sítio para a enzima *Hind* III; a metade 3' de 2.4 Kpb clonada no vetor Tb-p22 possui sítio para as enzimas *Sal* I, *Hind* III e *Pst* I. Os fragmentos possuem um sítio comum para *Hind* III. O primeiro passo, portanto, consiste em montar o gene no vetor de clonagem pBluescript. Para isso, os plasmídeos Tb-p7 e Tb-p22 foram clonados em células competentes *E. coli* DH5 α . O processo deu-se adicionando uma alíquota de cada um dos fragmentos em contato com 100 μ L de células competentes e submetendo-os a choque térmico. 20 μ L de cada amostra foi adicionada em meio de cultura LB sólido na presença de 100 μ g/mL de ampicilina. Uma colônia de cada meio foi adicionada em meio de cultura LB líquido, permanecendo nessas condições por 16 horas a 37°C.

Em seguida, a extração dos plasmídeos se deu através de ruptura alcalina das células e posterior purificação. A eficiência da purificação foi feita através da análise por eletroforese em gel (1%Agarose/1X TAE, pH8.3). Uma alíquota de 3 μ L do produto

puro foi analisada, obtendo-se um resultado de acordo com o esperado para o tamanho dos fragmentos (dados não apresentados).

O produto purificado foi submetido a uma clivagem, utilizando as enzimas de restrição *Sal* I e *Hind* III para o fragmento clonado no vetor Tb-p7, e *Hind* III e *Pst* I, para o fragmento clonado no vetor Tb-p22. As tabelas 2.1 e 2.2 abaixo apresentam os reagentes usados durante o processo de clivagem. A reação de clivagem do incerto Tb-p7 se deu por 16 horas a 37°C e a do incerto Tb-p22 se deu por 3 horas na mesma temperatura.

TABELA 2.1 - Reagentes utilizados na clivagem do fragmento clonado no vetor Tb-p7, utilizando-se as enzimas *Sal* I e *Hind* III.

| <i>Reagentes</i> | <i>Volume (μL)</i> | <i>Concentração</i> |
|------------------|--------------------|---------------------|
| Tb-p7 | 20 | 300 ng/μL |
| 10 x buffer plus | 4 | |
| <i>Sal</i> I | 2 | 10 U/μL |
| <i>Hind</i> III | 2 | 10 U/μL |
| H ₂ O | 12 | |
| Volume Total | 40 | |

TABELA 2.2 - Reagentes utilizados na clivagem do fragmento clonado no vetor Tb-p22, utilizando-se as enzimas *Pst* I e *Hind* III

| <i>Reagentes</i> | <i>Volume (μL)</i> | <i>Concentração</i> |
|------------------|--------------------|---------------------|
| Tb-p22 | 20 | 300 ng/μL |
| 10 x buffer plus | 4 | |
| <i>Pst</i> I | 2 | 10 U/μL |
| <i>Hind</i> III | 2 | 10 U/μL |
| H ₂ O | 12 | |
| Volume Total | 40 | |

O produto de clivagem foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1%Agarose/1X TAE, pH8.3). Uma alíquota de 3 µL do produto puro foi analisada.

Após a purificação do produto de clivagem e tratamento do plasmídeo pBluescript com as enzimas de restrição *Sal* I e *Pst* I, procedeu-se a ligação dos fragmentos entre si e do conjunto resultante ao vetor.

Como já observado anteriormente, a ligação do inserto ao vetor se vale da presença de regiões coesivas deixadas pelas enzimas de restrição. A figura 2.4 a seguir apresenta de forma esquemática o processo de ligação ocorrido entre os fragmentos mencionados e o vetor de clonagem pBluescript.

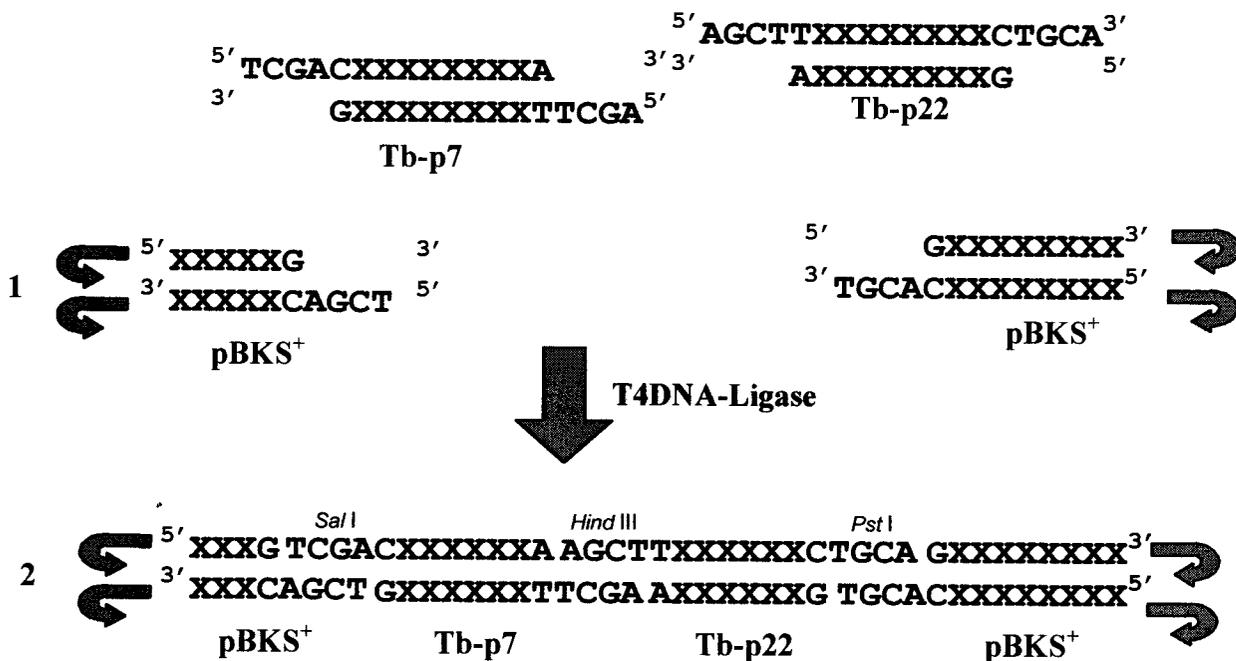


FIGURA 2.4 – Representação esquemática de ligação entre os fragmentos Tb-p7 clivado com as enzimas *Sal* I e *Hind* III e Tb-p22 clivado com as enzimas *Hind* III e *Pst* I e o vetor pBluescript clivado com as enzimas *Sal* I e *Pst* I. As letras X fazem referência à seqüência de bases localizadas entre as extremidades coesivas de cada fragmento. As flechas indicam a continuidade do DNA do vetor.

A reação de ligação foi realizada a 4°C durante 12 horas. A tabela 2.3 a seguir apresenta os reagentes usados na montagem do inserto no vetor pBluescript.

TABELA 2.3 - Reagentes utilizados na ligação dos fragmentos Tb-p7 e Tb-p22 entre si e este no vetor Bluescript

| Reagente | Volume (μL) | Concentração |
|-------------------------------|--------------------------|----------------------|
| PBSKS ⁺ | 1 | 50 ng/ μL |
| Fragmento Tb-p7 (purificado) | 3 | |
| Fragmento Tb-p22 (purificado) | 3 | |
| T4 DNA-ligase | 1 | 400 U/ μL |
| Buffer T4 DNA ligase (5x) | 2 | |
| Volume total | 10 | |

O DNA recombinante PGI-Tb /pBSKS⁺ foi inserido em bactérias competentes *E. coli* DH5 α .

2.2.1.1) Inserção do DNA Recombinante PGI-Tb/pBSKS⁺ em Bactérias *Escherichia coli* DH5 α

O plasmídeo recombinante PGI-Tb/pBSKS⁺ foi inserido em bactérias competentes *Escherichia coli* cepa DH5 α . A metodologia para a transformação de bactérias, utilizada neste experimento, baseia-se no choque térmico [Ausubel et al., 1995]. Nesse experimento, células bacterianas competentes foram colocadas em contato com 10 μL do produto de reação de ligação apresentada na tabela 2.3. A solução composta pelas células competentes e pela mistura de ligação foi submetida a choque térmico.

A metodologia utilizada para selecionar as células transformadas com o plasmídeo recombinante PGI-Tb/pBSKS⁺ é apresentada a seguir.

2.2.1.2) Seleção das Bactérias *Escherichia coli* DH5 α Transformada com o DNA Recombinante PGI-Tb/pBSKS⁺

A utilização do vetor de clonagem pBluescript permite fazer a seleção das células transformantes através da resistência ao antibiótico ampicilina e, também, pela diferença de coloração apresentada pelas colônias na placa de meio de cultura. A seleção, em meio de cultura contendo ampicilina, aponta as células que receberam o plasmídeo, mas não fornece informação a respeito da presença do inserto.

A seleção por diferença de coloração das colônias está baseada no fato do vetor pBSKS⁺ apresentar um gene que codifica para a proteína β -galactosidase (β -gal). A expressão de β -gal permite a bactéria, através de um sistema denominado β complementação, decompor o bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidase (Xgal) colocado no meio de cultura. A decomposição do Xgal libera um composto que faz com que a colônia bacteriana apresente cor azul. O gene β -gal está posicionado estrategicamente no vetor de modo que, quando um inserto é clonado, cause a interrupção da expressão da proteína β -gal. Dessa forma, devido à presença ou ausência de β -gal, podem ser diferenciadas colônias brancas e azuis no meio de cultura. As colônias azuis são formadas por bactérias que receberam o plasmídeo selvagem (sem o inserto). Colônias brancas indicam a perda da função β -gal, indicando que as bactérias devem ter recebido o inserto [Stansfid, 1996].

As bactérias *E coli* DH5 α transformadas com o plasmídeo recombinante foram selecionadas pela incubação em meio de cultura LB sólido, contendo antibiótico ampicilina a 100 $\mu\text{g/mL}$ e bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidase (Xgal) a 80 $\mu\text{g/mL}$. Foram selecionadas várias colônias após um período de incubação de 12 horas em repouso, a 37°C. Entre as colônias selecionadas estavam as 10 colônias brancas e 2 colônias azuis.

Para confirmar a presença do inserto (gene PGI-Tb), todas as 12 colônias selecionadas foram crescidas em meio de cultura 2 xYT líquido contendo o antibiótico ampicilina a 100 $\mu\text{g/mL}$. As condições experimentais foram: 18 horas a 37° C, sob agitação a 300 rpm. O DNA plasmidial foi extraído pelo método de ruptura alcalina. O plasmídeo recombinante PGI-Tb/pBSKS⁺ foi submetido à clivagem com as enzimas de restrição *Pst* I e *Sal* I. A reação de clivagem foi realizada em duas etapas: a primeira se deu com a enzima *Pst* I durante 1 hora, e a segunda com a enzima *Sal* I durante 16 horas. Ambas as reações se realizaram a 37°C. As tabelas 2.4 e 2.5 apresentam os reagentes utilizados em cada etapa.

TABELA 2.4 - Reagentes utilizados na clivagem do plasmídeo recombinante PGI-Tb/pBSKS⁺ utilizando-se a enzima *Pst* I.

| Reagentes | Volume (μL) | Concentração |
|---------------------------|--------------------------|---------------------|
| PGI-Tb/pBSKS ⁺ | 30 | 10 U/ μL |
| React 2 buffer (10 x) | 4 | |
| <i>Pst</i> I | 2 | |
| H ₂ O | 4 | |
| Volume Total | 40 | |

TABELA 2.5 - Reagentes utilizados na clivagem do plasmídeo recombinante PGI-Tb/pBSKS⁺ utilizando-se a enzima *Sal* I.

| <i>Reagentes</i> | <i>Volume (μL)</i> | <i>Concentração</i> |
|---------------------------|--------------------|---------------------|
| PGI-Tb/pBSKS ⁺ | 30 | 10 U/μL |
| React 10 buffer (10 x) | 4 | |
| <i>Sal</i> I | 2 | |
| H ₂ O | 4 | |
| Volume Total | 40 | |

Após as reações, utilizando-se cada uma das enzimas, procedeu-se a purificação do incerto e a análise da clivagem por gel-eletroforese (1%Agarose/1X TAE, pH8.3, dados não apresentados).

2.2.2) Subclonagem do gene PGI-Tb no vetor pGEM-T

2.2.2.1) Amplificação do Gene PGI-Tb (PCR)

Após a confirmação da montagem do gene PGI-Tb no vetor pBluescript, procedeu-se a amplificação do gene, utilizando a técnica de reação de PCR. A solução para a reação de PCR é apresentada na tabela 2.6; as condições reacionais de amplificação do gene são apresentadas na figura 2.6. Para a amplificação foram utilizados dois oligonucleotídeos complementares às regiões terminais do gene PGI-Tb. Os óligos apresentados na figura 2.5 foram sintetizados pela empresa Imprint do Brasil e apresentam sítios para a clivagem com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Pst* I, além da introdução do sítio de reconhecimento para o Fator Xa, (Ile, Glu, Gly e Arg).

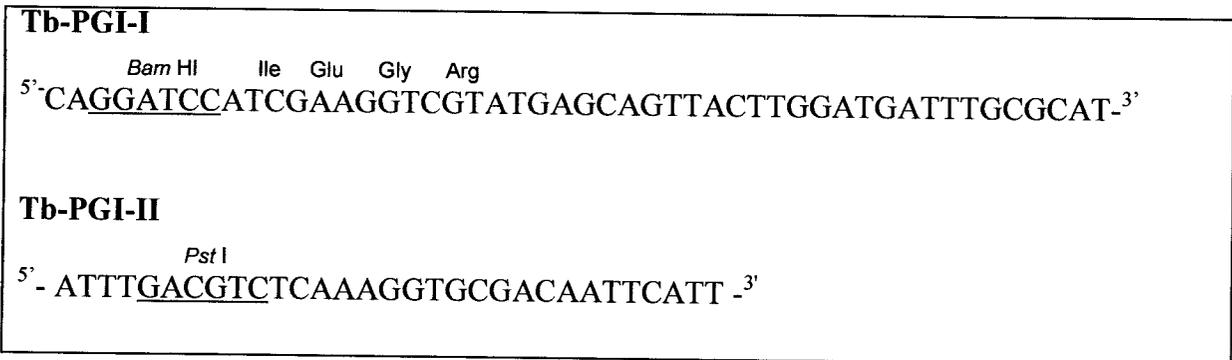


FIGURA 2.5 - Seqüência de bases dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene PGI-Tb em reação de PCR. As seqüências sublinhadas referem-se ao sítio de ligação das enzimas *Bam* HI e *Pst* I, respectivamente. A seqüência destacada em azul refere-se aos aminoácidos Ile, Glu, Gly e Arg.; os códons em vermelho são iniciadores e terminadores da tradução.

TABELA 2.6 - Reagentes utilizados na amplificação do gene PGI-Tb em reação de PCR

| Reagente | Volume (µL) | Concentração |
|-----------------------|-------------|--------------|
| 10x PCR "buffer" | 5 | |
| Mg Cl ₂ | 2,5 | 50mM |
| dNTPs | 1 | 10 nM |
| Oligonucleotídeo 1 | 1 | 100 pM |
| Oligonucleotídeo 2 | 1 | 100pM |
| H ₂ O | 37,5 | |
| Taq. DNA. Pol. | 1 | 5 U/µL |
| DNA genômico (PGI-Tb) | 1 | |
| Volume Final | 50 | |

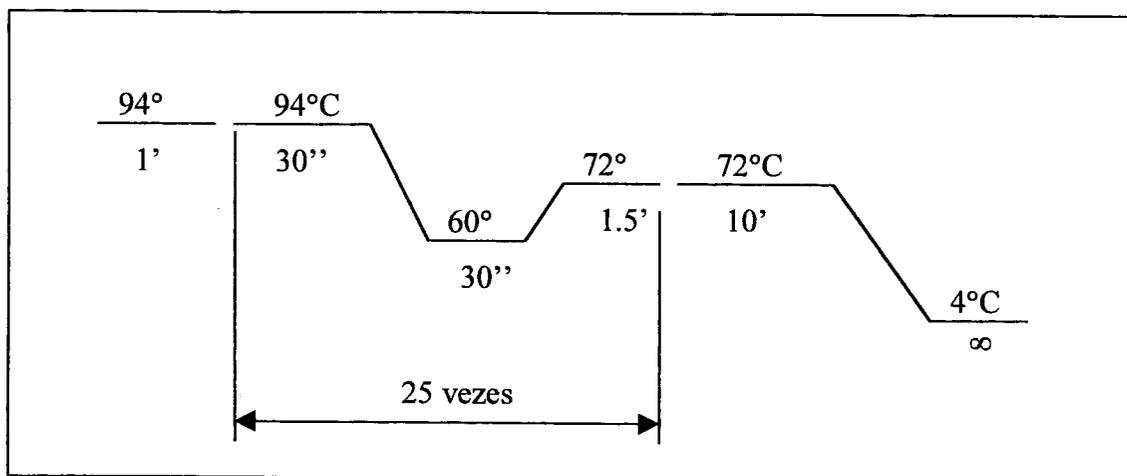


FIGURA 2.6 – Condições experimentais utilizadas durante os vários ciclos necessários para a reação de PCR

Concluída a reação de PCR, 5 μ L do produto final foi analisado através de eletroforese em gel de agarose (1% Agarose/1X TAE, pH8.3). Esse experimento permitiu comprovar o sucesso da amplificação, apresentando um inserto localizado entre 1500 e 2000 pb. Esse resultado condiz com o valor esperado para o gene de PGI de 1821pb. Os 45 μ L restantes da reação de PCR contendo o gene amplificado foram utilizados durante o processo de purificação.

2.2.2.2) Purificação do Gene PGI-Tb

O produto de PCR (gene de PGI-Tb), foi purificado com a técnica de NaI – sílica [Ausubel et al., 1995]. Essa técnica envolve dois passos: no primeiro, o gel de agarose contendo o gene de interesse é solubilizado pela ação de NaI (Iodeto de sódio). Posteriormente, coloca-se o gel solubilizado em contato com sílica. O DNA adere à sílica, da qual é retirado com água. No caso específico da purificação do gene PGI-Tb, o

DNA foi retirado com 20 µL de água. O resultado da purificação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose (dados não apresentados).

2.2.2.3) Subclonagem do inserto no vetor pGEM-T.

Como pode ser visto na representação esquemática da figura 2.7, a clonagem de um gene em vetor pGEM-T se vale da presença de resíduos de adenina adicionados pela Taq DNA polimerase nas extremidades do gene durante a amplificação em reação de PCR amplificados. As adeninas são ligadas a resíduos de timina não pareados, existentes no sítio de clonagem do vetor. Assim sendo, a clonagem de genes em pGEM-T independe da existência de sítios de restrição no fragmento de PCR [pGEM-T system manual, 2001].

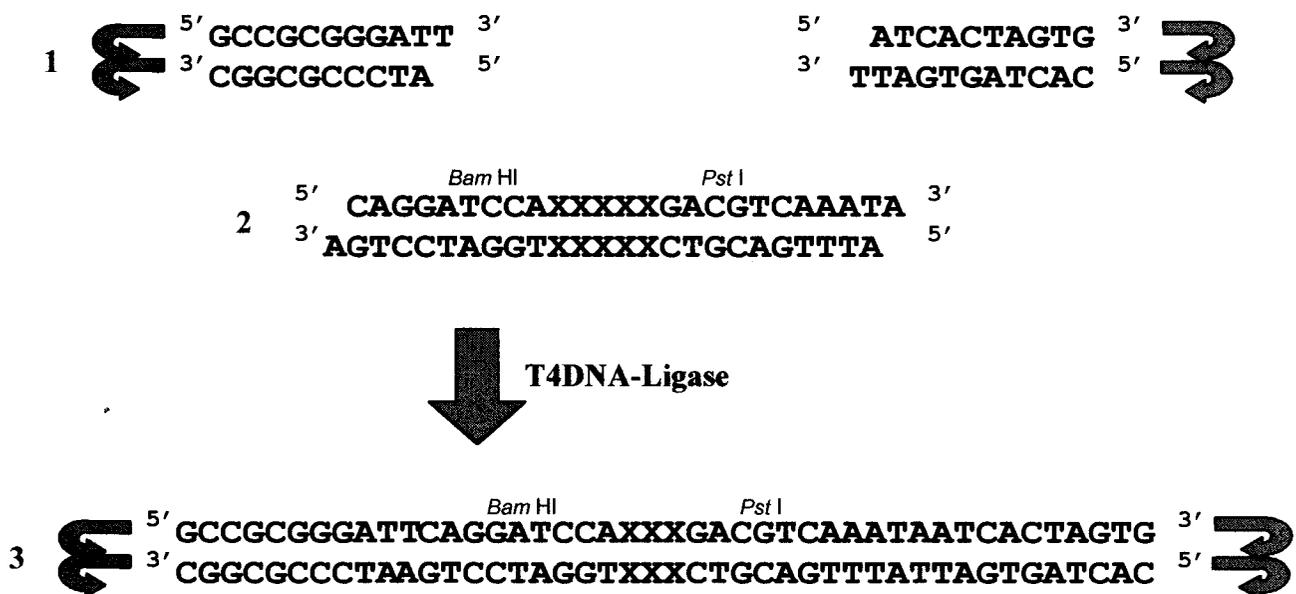


FIGURA 2.7 - Representação esquemática da clonagem no vetor pGEM-T: 1 - seqüência de bases do vetor com a presença de timinas nas extremidades destacadas em vermelho; 2 – Extremidades do gene de PGI-Tb amplificado com Taq DNA polimerase, destacadas em vermelho as adeninas adicionadas durante o PCR; 3 - DNA recombinante proveniente da junção do vetor com o gene de interesse promovida pela ação da enzima T4 DNA ligase. As letras X fazem referência à seqüência de bases localizadas entre as extremidades do gene de PGI-Tb. As flechas indicam a continuidade do DNA do vetor.

O plasmídeo recombinante PGI-Tb/pGEM foi obtido através da inserção do gene PGI-Tb purificado no vetor de clonagem pGEM-T, de forma similar a apresentada na figura anterior. Os reagentes utilizados na reação de ligação são apresentados na tabela 2.7. As condições experimentais foram: 24 horas a 4° C em repouso.

TABELA 2.7 - Reagentes utilizados na ligação do gene de PGI-Tb no vetor pGEM-T

| <i>Reagente</i> | <i>Volume (μL)</i> | <i>Concentração</i> |
|----------------------------|--------------------|---------------------|
| pGEM-T | 1 | 50 ng/μL |
| Gene de PGI-Tb(purificado) | 3 | |
| T4 DNA-polimerase | 1 | 1 U/μL |
| 2x ligase buffer | 5 | |
| Volume Final | 10 | |

O DNA recombinante PGI-Tb/pGEM foi inserido em bactérias *E. coli* da linhagem DH5α competentes. A metodologia para a transformação de bactérias deu-se através de choque térmico, já citado anteriormente. A seleção de bactérias foi realizada através da introdução de ampicilina no meio de cultura sólido e através de coloração baseado na expressão da proteína β-galactosidase, métodos já citados anteriormente. O sucesso da clonagem pode ser comprovado através de eletroforese em gel de agarose.

2.2.3) Subclonagem do inserto no vetor de expressão pQE-30

O gene PGI-Tb, após a purificação, foi inserido no vetor de expressão pQE-30 (pesquisa realizada em janeiro de 2001). O vetor de expressão usado (figura 2.2) apresenta um códon de início da transcrição, uma região responsável pela tradução de

seis resíduos de histidina. Em seguida, o vetor apresenta a região MCS possuindo vários sítios de clivagem colocados de forma adjacente para enzimas de restrição, entre elas *Bam* HI e *Pst* I. O gene de interesse possui regiões de clivagem para as mesmas enzimas em suas extremidades (figura 2.5). Sendo assim, a estratégia adotada foi inserir o gene no vetor pQE-30, após a sua clivagem e do inserto com as enzimas mencionadas. A clivagem do gene de PGI-Tb se deu a 37°C por 12 horas. A tabela 2.8 apresenta os reagentes usados durante a reação.

TABELA 2.8 - Reagentes utilizados na clivagem do inserto PGI-Tb, com as enzimas *Pst* I e *Bam* HI

| <i>Reagentes</i> | <i>Volume (μL)</i> | <i>Concentração</i> |
|-------------------|--------------------|---------------------|
| Inserto de PGI-Tb | 2 | 300 ng/μL |
| React I (10 x) | 5 | |
| <i>Pst</i> I | 3 | 10 U/μL |
| <i>Bam</i> HI | 3 | 10 U/μL |
| H ₂ O | 37 | |
| Volume Total | 50 | |

A clivagem do plasmídeo se deu a 37°C por 12 horas, utilizando os mesmos reagentes citados na tabela 2.8. O produto de reação de clivagem foi submetido a eletrofose em gel de agarose e posterior purificação. Em seguida, procedeu-se com a ligação do inserto ao vetor através da T4DNA-ligase. A reação de ligação foi realizada a 4°C durante 12 horas. A tabela 2.9 a seguir apresenta os reagentes usados na reação de ligação.

TABELA 2.9 – Reagentes usados na reação de ligação do gene PGI-Tb no vetor de expressão pQE-30

| Reagentes | Volume (μL) | Concentração |
|---------------------------|--------------------------|-----------------------|
| pQE-30 | 2 | 200 ng/ μL |
| Inserto de PGI-Tb | 5 | |
| T4 DNA-ligase | 1 | 1 U/ μL |
| Buffer T4 DNA ligase (5x) | 2 | |
| Volume total | 10 | |

A confirmação da ligação do inserto ao vetor e, conseqüentemente, a formação do DNA recombinante PGI-Tb/pQE-30 foi confirmada através da eletroforese em gel de agarose. Em seguida, o produto de ligação foi purificado e inserido em Bactérias *E. coli* através de choque térmico [Ausubel, 1995]. 100 μL de células competentes SG13009 foram colocados na presença de 2 μL do produto de ligação do inserto ao vetor (Tabela 2.9) sendo, em seguida, submetidos a choque térmico. 100 μL desse produto foi plaqueado em meio LB sólido contendo ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 12 horas a 37°C verificou-se a presença de seis colônias.

2.2.4) Expressão da enzima PGI-Tb

Três colônias foram testadas em relação à expressão de enzima PGI-Tb. Uma pequena amostra de cada colônia de bactérias *E. coli* transformada com vetor de expressão pQE-30 foi retirada e adicionada em 2 mL um meio de cultura 2 xYT contendo 100µg/mL de ampicilina. Esse meio de cultura permaneceu a 37°C a 300 rpm. Uma alíquota de 1 mL foi separada e, o restante, utilizado para fazer a indução com 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG). Após a indução, a cultura permaneceu sob agitação a 260 rpm por 2 horas. Em seguida, as alíquotas foram transferidas para tubos eppendorffs, e a separação das células do meio deu-se após a centrifugação por 1 minuto. As células foram ressuspensas em 600 µL de tampão de lise (8 M de uréia; 100 mM de fosfato de potássio em pH 8.0). Procedeu-se em seguida com a homogeneização da amostra e posterior rompimento da membrana celular, utilizando-se 2 pulsos de ondas de ultra-som de 25 segundos cada. A amostra foi centrifugada por 10 segundos e em seguida separou-se 50 µL do sobrenadante para a eletroforese. Os 450 µL restantes foram misturados com 50 µL de resina de níquel (Superflow – Qiagen). A amostra foi novamente submetida a centrifugação e posterior adição de 450µL de tampão de lise, juntamente com a adição de 50 mM de EDTA. 20µL do sobrenadante foram utilizados para eletroforese em gel de poliacrilamida, cujo resultado é mostrado na figura 2.8.

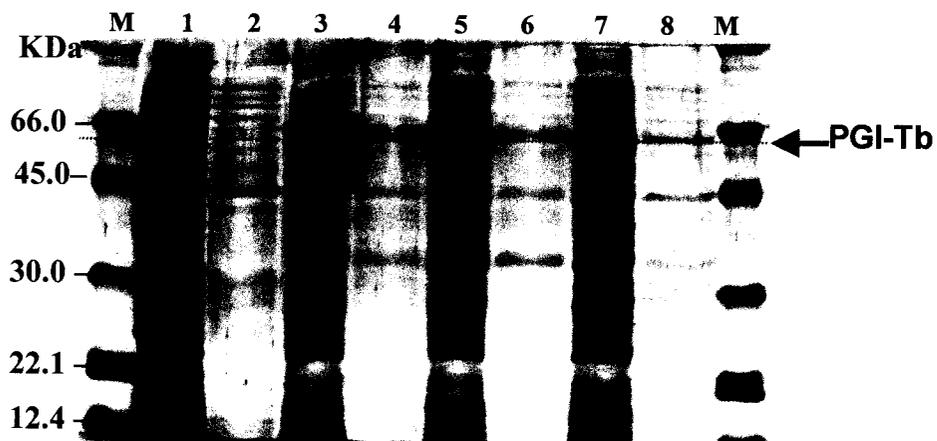


FIGURA 2.8 - Eletroforese em gel de poli-acrilamida 15%. M-Padrão de peso molecular; Poços ímpares referem-se ao sobrenadante (extrato bruto) logo após o rompimento da membrana celular e posterior centrifugação; poços pares referem-se às amostras eluídas da resina de níquel com o tampão de lise contendo EDTA; poço 1 e 2 é o controle. A flecha indica a posição da enzima PGI-Tb.

O resultado da eletroforese revelou a presença de bandas intensas referente à enzima PGI-Tb, próxima a 66 KDa. Os poços 3 a 8 são referentes às três colônias mencionadas inicialmente, sendo que os poços 3, 5 e 7 referem-se ao extrato bruto coletado logo após o rompimento da membrana celular e posterior centrifugação. Observa-se também a sua presença, em proporções bem menores, nos poços 4, 6 e 8, referentes às amostras eluídas da resina de níquel. Os poços 1 e 2 referem-se às colônias que não foram induzidas com IPTG.

Com a presença da banda em torno de 66 KDa, confirma-se a expressão da enzima em questão de forma solúvel fato necessário para os experimentos posteriores, embora a sua ligação à resina de níquel não tenha ocorrida da maneira esperada. Para o momento, a expressão da enzima já é um excelente resultado, restando a otimização das condições de expressão e posterior purificação.

2.2.4.1) Otimização do tempo de crescimento de bactérias

Após a confirmação da expressão de PGI-Tb nas três colônias analisadas, escolheu-se uma delas e iniciou-se a expressão da enzima em quantidades maiores, objetivando-se otimizar alguns parâmetros e encontrar as condições em que as bactérias transformadas expressem o máximo de PGI-Tb de forma solúvel e ativa. O primeiro parâmetro a ser considerado foi o tempo de indução. Para tal, 250 µL de pré inóculo crescido em meio de cultura LB por 12 horas, foi utilizado para inocular 100 mL de meio 2 xYT. Esse meio de cultura permaneceu no agitador a 260 rpm e 37 °C, até que a leitura de densidade óptica, lida a 600 nm, atingisse o valor 0.7. Em seguida, o meio de cultura foi dividido em dois frascos, sendo um deles induzido com 50 µM de IPTG, permanecendo nas mesmas condições por mais 4 horas. A cada intervalo, de aproximadamente 30 minutos, pequenas alíquotas eram submetidas à leitura da densidade óptica no mesmo comprimento de onda, podendo, em seguida, analisar o crescimento da cultura em função do tempo. O gráfico da figura 2.9 apresenta a curva de crescimento de células induzidas com IPTG em preto, e, sem ser induzida, em vermelho.

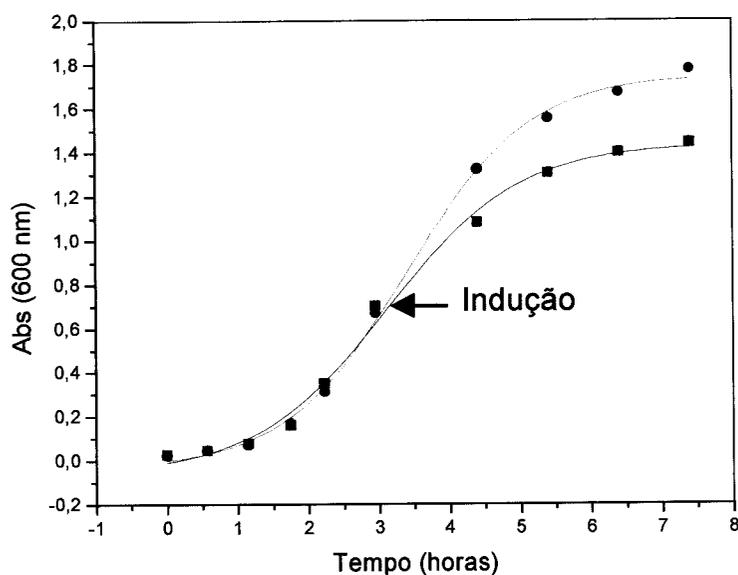


FIGURA 2.9 - Curva de crescimento de células induzidas com IPTG (em preto) e sem ser induzidas (em vermelho)

As curvas representadas são características de curva de crescimento de colônias bacterianas; a curva em vermelho representa as células crescidas sem serem induzidas. (observa-se claramente o aumento de sua população com o passar do tempo). A adição de IPTG no meio de cultura possibilita a produção de proteína recombinante em grandes quantidades, pois, ao ser induzida em aproximadamente 3 horas, grande parte do metabolismo celular é direcionado na produção da proteína em questão, resultando numa diferença significativa nos valores de absorção apresentados no gráfico. Já o comportamento da colônia não induzida tende a crescer, uma vez que se encontra em condições ótimas para isso, obedecendo uma relação sigmoidal com o tempo.

O tempo de indução escolhido foi 4 horas, supões-se que após esse período não exista um aumento significativo na colônia bacteriana como é sugerido pelo gráfico apresentado na figura 2.9.

2.2.4.2) Otimização da lise celular

Um outro parâmetro a ser otimizado foram os pulsos de ultra-som aplicados na amostra, necessários para promover o rompimento da membrana celular. Para tal, 250mL de meio de cultura 2 xYT foram preparados como mencionado anteriormente, e, após a separação das bactérias do meio de cultura por centrifugação a 4000 g a 4°C, as mesmas foram ressuspendidas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8 e 300 mM de NaCl. Após a completa homogeinização da amostra, a mesma foi submetida a vários pulsos de ondas de ultra-som em banho de gelo, utilizando-se um sonicador (550 Sonic Dismembrator). Os pulsos aplicados tinham a duração de 1 minuto, sendo que no final desse período, uma alíquota de 50 µL era retirada. Ao término do experimento as várias alíquotas foram centrifugadas e 10 µL do sobrenadante era submetido a ensaio de atividade (ensaio detalhado no capítulo 3). A figura 2.10 apresenta a curva representando os resultados obtidos.

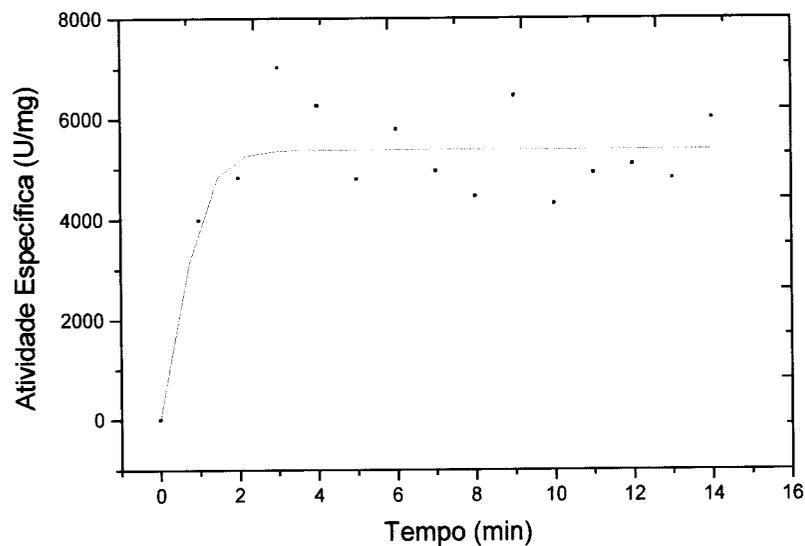


FIGURA 2.10 - Curva de atividade específica para a PGI-Tb em diferentes tempos de sonicação.

Claramente observa-se um aumento na atividade de isomerização catalisada pela enzima PGI-Tb. Esse comportamento já era esperado, uma vez que a cada pulso de ultra-som maiores quantidades de células são rompidas, resultando num aumento da quantidade de PGI-Tb presente no meio reacional. A figura 2.10 apresenta uma atividade máxima no final de 3 minutos. Sendo assim, fica evidente que 3 aplicações de ondas de ultra-som com 1 minuto de duração cada são suficientes para que haja a maior quantidade de enzima presente no meio reacional, dispensando outras aplicações de ondas de ultra-som.

Esse experimento é de grande importância uma vez que, ao serem aplicados os pulsos de ultra-som, a ponteira em contato com a amostra fica muito aquecida, podendo refletir de forma negativa na atividade da enzima. No caso da enzima em questão, não se observa uma queda na atividade enzimática decorrente desse fato.

2.2.4.3) Otimização da concentração de IPTG

A concentração de isopropil- β -D-tiogalactopiranosida (IPTG) também foi otimizada com o mesmo propósito. Para tal, 250 mL de meio de cultura 2 xYT foram inoculados nas condições já mencionadas. Quando a cultura atingiu 0.7 de densidade óptica lida a 600 nm, 5 mL de meio foram induzidas com 50, 100, 200, 500 e 1000 μ M de IPTG, em diferentes frascos. Utilizaram-se dois tempos de indução: 4 e 8 horas. Ao final do experimento realizou-se o rompimento da parede celular. Em seguida, submeteram-se as várias amostras ao ensaio de atividade. A figura 2.11 abaixo apresenta os resultados obtidos.

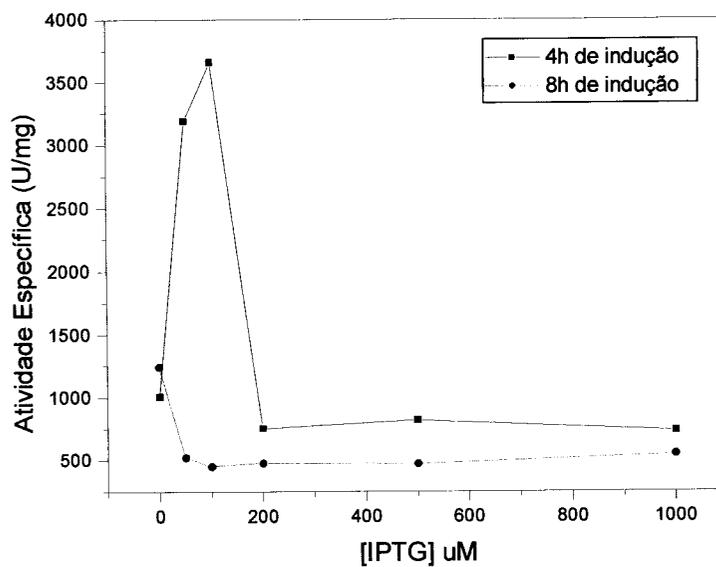


FIGURA 2.11 - Curva de atividade específica versus concentração de IPTG para 4 e 8 horas de indução

Com os resultados obtidos é possível observar que a atividade específica tem um valor de aproximadamente 1000 U/mg quando a concentração de IPTG é zero, para quatro horas de indução. A atividade específica tende a aumentar, atingindo seu valor máximo quando a concentração do indutor é 100 μ M. A partir daí, a atividade cai bruscamente, sugerindo que a proteína recombinante atingiu altos níveis de concentração, resultando na sua precipitação, denominado corpúsculos de inclusão [manual QIAexpressionist].

Com os resultados apresentados pelo gráfico, 8 horas de indução são inviáveis, uma vez que, nessas condições, mesmo a baixas concentrações do indutor a enzima expressa já está colocada em corpúsculo de inclusão.

2.3) Conclusões

Os resultados experimentais obtidos até aqui nos levaram a concluir que:

- A clonagem dos fragmentos inseridos nos vetores Tb-p7 e Tb-p22 em bactérias *E. coli* DH5 α foi realizada com sucesso, possibilitando a montagem do gene no vetor pBluescript;
- A subclonagem do gene no vetor pGEM-T e, posteriormente, no vetor de expressão pQE-30, foi realizada com sucesso;
- A expressão da enzima PGI-Tb se deu de forma satisfatória;
- Com a enzima sendo expressa, parâmetros como: tempo de indução, tempo de aplicação de ondas de ultra-som e concentração de IPTG puderam ser otimizados;
- A possibilidade de medir a atividade de isomerase no extrato bruto permite concluir que a enzima está sendo expressa de forma solúvel e ativa nas condições mencionadas.

2.4) Referências Bibliográficas

- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E. **Short protocols in molecular biology**. 2.ed. New York 1995
- HOWE, C. **Gene cloning and manipulation**. Cambrig Cambrig University Press 1985
- pGEM-T System Manual.
- STANSFID, W.D. **Molecular and cell biology**. New York, McGraw Hill, 1996
- THE QIAEXPRESSIONIST. **A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins**. 3.ed. 1997.

Capítulo – 3

O processo de purificação da

Enzima phosphoglucose isomerase

As proteínas, de modo geral, desempenham muitas funções biológicas nos organismos da qual fazem parte, como exemplo a catálise e transporte. Essas funções estão diretamente relacionadas com a estrutura de cada molécula. Uma mudança significativa na forma estrutural pode significar uma diminuição drástica ou até mesmo uma total perda da sua atividade. Portanto, os trabalhos envolvendo estudos estruturais, e mesmo trabalhos com enfoques bioquímicos como determinação das seqüências de aminoácidos que compõem a proteína ou constantes catalíticas, necessitam obter a solução protéica com alto grau de pureza. As três abordagens para a purificação de proteínas são a cromatografia, a eletroforese e a ultracentrifugação. Nessa parte da dissertação será apresentada a estratégia de purificação adotada para a PGI-Tb.

3.1) Cromatografia Líquida de Afinidade

A cromatografia é um método físico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fase fixa de grande área superficial denominada fase estacionária, e a outra um fluido que percola através dela, sendo, por isto, denominada fase móvel. A descoberta da cromatografia como técnica analítica é atribuída ao botânico russo M.Tswett, o qual, no início deste século, conseguiu separar pigmentos de cloroplastos contidos em folhas verdes de plantas, utilizando um tubo de vidro cheio com carbonato de cálcio. A partir da década de 60, com toda a base teórica estabelecida, deu-se início à informatização do sistema, com a introdução de computadores para monitorar parâmetros experimentais. A cromatografia pode ser classificada de acordo com a fase móvel usada: se a fase móvel for um gás, é dito cromatografia gasosa; se um líquido, cromatografia líquida; se um fluido no estado supercrítico, como cromatografia com fluido supercrítico [Lanças, 1993].

O processo de purificação que foi desenvolvido para a phosphoglucose isomerase é uma variação do método de cromatografia de afinidade, baseado na força de interação criado por uma seqüência de seis resíduos de histidina consecutivos, inseridos no segmento N-terminal da proteína, e uma resina de níquel coordenada com o ácido nitrilo triacético, (figura 3.1).

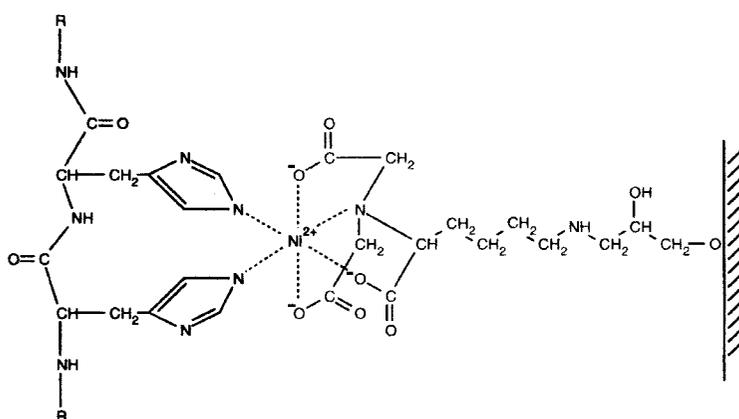


FIGURA 3.1 - Cromatografia de afinidade envolvendo a interação entre o níquel coordenado com a resina ligada na coluna e os resíduos de histidina inseridos no N-terminal da PGI-Tb.

Para se ter uma idéia da eficácia desse método, as proteínas contendo um ou mais resíduos de histidinas no N ou C-terminal da proteína se ligam aos grupos Ni-NTA da resina com uma afinidade muito superior àquela encontrada em complexos antígeno-anticorpo e proteína-substrato. A interação formada com a resina não depende da estrutura tridimensional da proteína, contudo a força de interação irá depender do número de resíduos da proteína ligados à resina de níquel [manual QIAexpressionist].

Na prática, a ligação poderá ocorrer por um método de banho, se a resina é apenas incubada na presença da solução de proteína; ou então, em uma coluna convencional. A lavagem ocorre sempre em coluna, utilizando-se uma solução tampão com valor de pH não inferior a 6.3, ou contendo uma baixa concentração de imidazol a fim de reduzir-se quaisquer interações mais fracas estabelecidas entre proteínas bacterianas e a resina. A eluição da proteína da coluna também ocorre adicionando-se imidazol no tampão ou, alternativamente, diminuindo-se o valor de pH para menos de 6.0. Em condições na qual o pH do tampão é reduzido, os resíduos de histidina, com um

valor de pKa de aproximadamente 6.5, se tornarão protonados e irão se dissociar da coluna. Similarmente, quando a concentração de imidazol aumenta até determinados níveis, as proteínas irão se desligar da resina, pois elas não podem mais competir pelo sítio de ligação na resina. A figura 3.2 abaixo apresenta as etapas de purificação usadas para a PGI-Tb, bem como a estrutura do resíduo de histidina e o imidazol.

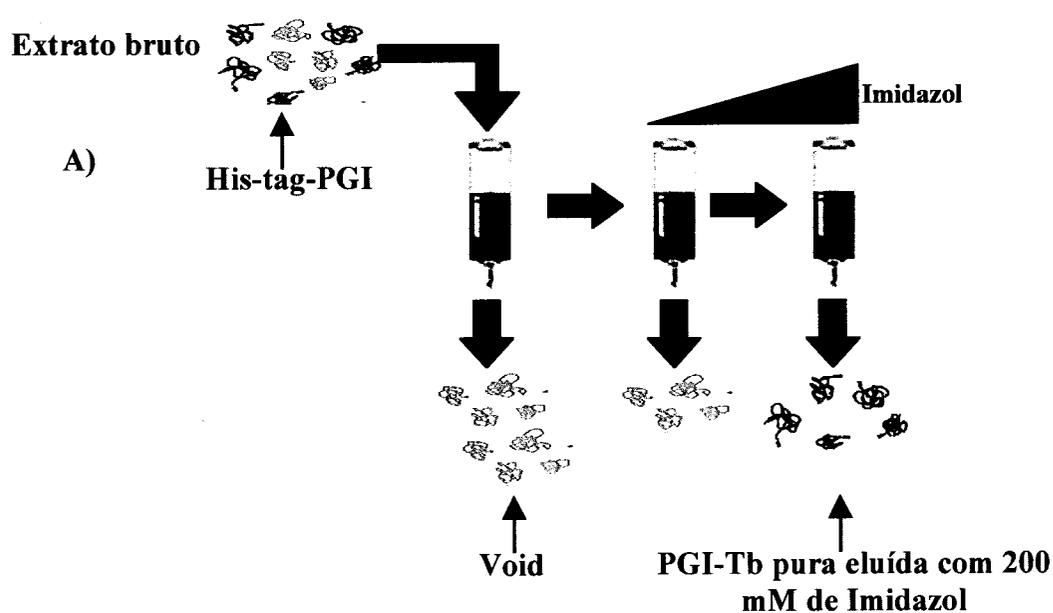


FIGURA 3.2A – Estratégia de purificação adotada para a PGI-Tb. O extrato bruto contendo PGI ligadas aos resíduos de histidinas (em vermelho) é adicionado na coluna contendo resina ligadas ao níquel. As várias proteínas ligadas na coluna são eluídas após a sua lavagem com baixas concentrações de imidazol. A PGI-Tb é eluída após um acréscimo de imidazol no tampão de lavagem.

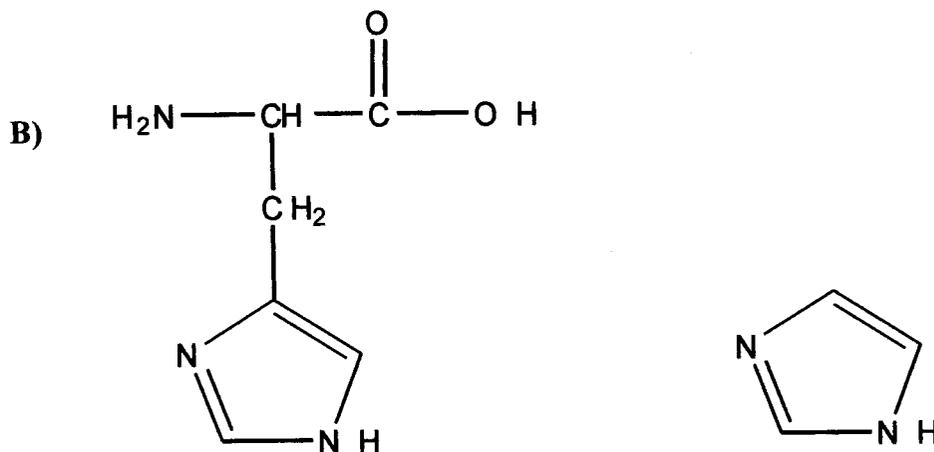


FIGURA 3.2B – Fórmula estrutural da histidina adicionada estrategicamente no segmento N-terminal da PGI-Tb e do imidazol usado durante a eluição da enzima em questão

3.2) Cromatografia líquida de exclusão por tamanho

Um segundo método de purificação, também utilizado para a PGI-Tb, é a cromatografia de exclusão por tamanho, também conhecida por cromatografia em filtração a gel. Essa técnica tem como princípio a separação das proteínas ou outras macromoléculas biológicas, tendo como bases seus diferentes tamanhos.

A fase sólida da matriz consiste de poros variando entre 100 e 250 μm , que são empacotados dentro de uma coluna, ficando em contato com um líquido, geralmente um tampão que percola toda a matriz [Doonan, 1996].

A separação pode ser visualizada em diferentes volumes de eluição, sendo que as moléculas maiores permanecem fora da matriz, uma vez que seus tamanhos impedem o seu acesso. Como consequência, estas deixarão a coluna mais rapidamente. As

macromoléculas menores terão acesso ao interior das matrizes sendo, portanto retardadas em relação às maiores. A figura 3.3 abaixo representa a purificação de proteínas, usando-se cromatografia de exclusão por tamanho.

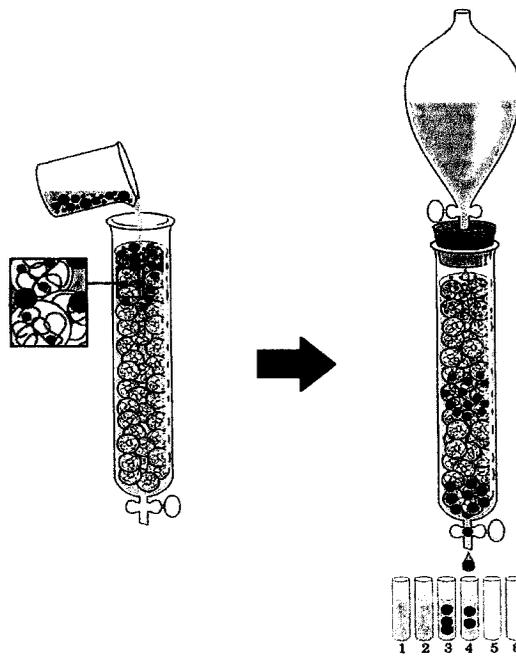


FIGURA 3.3 – Cromatografia de exclusão por tamanho usado para purificação da PGI-Tb. Nesse tipo de separação, as macromoléculas são retardadas umas em relação às outras devido a seus diferentes tamanhos.

Nesse tipo de cromatografia, as macromoléculas não são fisicamente retidas diferenciando-se da cromatografia de afinidade. Entretanto, as diferentes proteínas serão eluídas em diferentes volumes de retenção.

A proteína de menor tamanho define o limite de exclusão. Moléculas com massas moleculares menores que o limite de exclusão serão eluídas da resina de acordo com a ordem de suas massas moleculares, sendo que as maiores dentre elas serão eluídas primeiro.

3.3) Materiais e Métodos

3.3.1) Estabelecimento do Protocolo de Purificação utilizando coluna de afinidade

No capítulo anterior foram apresentados alguns ensaios que tinham como objetivo otimizar as condições de expressão da enzima PGI-Tb. Após essa otimização, se faz necessário estabelecer o protocolo de purificação da enzima, que é uma etapa de grande importância no trabalho. A partir de agora estaremos abordando em detalhes a formulação desse protocolo.

Após a confirmação da expressão de PGI-Tb nos três diferentes clones apresentados anteriormente (capítulo 2), um deles foi escolhido aleatoriamente. Em seguida, uma parte desse clone foi adicionado em meio de cultura LB sólido na presença de 100 µg/mL de ampicilina, e deixado a 37°C por 12 horas. Após esse período retirou-se uma parte da colônia com o auxílio de uma espátula estéril e adicionou-a em 5 mL de meio de cultura LB líquido denominado pré inóculo. 250 µL desse pré inóculo foram utilizados para inocular 100 mL de meio de cultura 2 xYT, cultivados até que a densidade óptica a 600 nm atingisse o valor de 0.7, sendo, em seguida induzidos com 100 µM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG). Tanto o pré inóculo como o inóculo foram cultivados a 37°C, com o auxílio de um agitador, sob agitação constante a 260 rpm, utilizando ampicilina como antibiótico. Sendo o pré inóculo cultivado por 12 horas e o inóculo por 4.

As bactérias cultivadas em 100 mL de meio de cultura foram separadas após a centrifugação a 4000 g, a 4°C de temperatura. Em seguida utilizou-se 3 mL do tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 8.0 contendo 300 mM de NaCl, 5 mM de imidazol e os seguintes

inibidores de proteases 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), 1 μ M Pepstatina, 1 μ M Leupeptina) para ressuspender as células.

O rompimento da parede celular foi realizado utilizando-se choque térmico e ondas de ultra-som. A solução foi congelada a -196°C em nitrogênio líquido e descongelada em banho térmico a 37°C durante 7 vezes na presença de 5 mg de lisozima. Em seguida, foram aplicados três pulsos de um minuto cada de ultra-som (50 mA de corrente). Adicionou-se 556 U de benzonase para auxiliar a quebra do DNA celular.

Uma pré-clarificação foi realizada utilizando-se uma centrífuga refrigerada (Sorval) ajustada para 10.000g; 4°C; 25 min. O sobrenadante foi recuperado e aplicado na coluna de níquel previamente equilibrada com 25 mL do tampão A. A coluna foi lavada com um gradiente descontínuo de imidazol de 5 a 95 mM com passos de 5 mM. A cada lavagem uma alíquota de 15 μ L da amostra era retirada e analisada por SDS-PAGE 15% em condições desnaturantes. A figura 3.4 apresenta o resultado da eletroforese.

3.3.2) Clivagem com o Fator-Xa

A clivagem da PGI-Tb foi realizada incubando a enzima com o Fator-Xa. A reação se deu em tubos eppendorf a 4°C, durante 4 dias. O meio reacional foi composto dos seguintes reagentes: 2 mL de PGI-Tb a 4 mg/mL em tampão Tris-HCl 50 mM contendo 150 mM de NaCl e 26 μ g de Fator Xa (New England Biolabs). A cada intervalo de 24 horas alíquotas de 20 μ L da amostra eram retiradas e analisadas por

SDS-PAGE 15% em condições desnaturantes. A figura 3.9 apresenta o resultado da eletroforese.

3.3.3) Protocolo de Purificação utilizando-se coluna de exclusão por tamanho Superdex-200

Após a clivagem da enzima necessitou-se fazer a separação dos resíduos de histidinas da enzima PGI-Tb nativa. Para isso, submeteu-se a amostra resultante da clivagem a uma cromatografia de exclusão por tamanho.

O sistema de purificação utilizado nessa segunda etapa foi uma coluna superdex 200 de 115mL de volume acoplada a um sistema FPLC automatizado (Pharmacia). A amostra protéica foi concentrada em centriprep 30. Após sua eluição em coluna de resina de níquel e incubada por 4 dias com Fator Xa, cuidou-se para que o volume final após a concentração não ultrapassasse 1% do volume da coluna superdex 200 (~1mL). Esse volume foi aplicado na coluna após esta ter sido equilibrada com 460 mL do tampão Tris-HCl 50 mM pH 8.0 contendo 150 mM de NaCl (~ 4 volumes de coluna), sob um fluxo constante de 1 mL/min. O andamento da purificação foi monitorado a 280nm (dados não apresentados).

3.3.4) Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Durante as etapas de purificação é necessário avaliar o andamento do processo. O método utilizado para fazer essa avaliação foi eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes pelo método de Laemmli [Laemmli, 1970]. O gel foi revelado com 0.010% de Comassie brilhant blue G-250.

3.3.5) Determinação da Concentração de PGI-Tb

A concentração da enzima foi determinada pelo método de Bradford [Bradford, 1976]. O corante comassie brilliant blue G-250 liga-se à proteína. Essa interação provoca uma mudança no máximo de absorção do corante passando de 465 a 595 nm onde é monitorada. Esse ensaio é muito reproduzível, sendo que a interação do corante com a proteína é completada em dois minutos, permanecendo estável por aproximadamente uma hora.

3.3.6) Determinação de Massa molecular da PGI-Tb

Neste experimento utilizou-se uma coluna Superose 12 e um sistema HPLC AKTA Explorer System (Pharmacia Biotech). A coluna Superose 12 é empacotada com resina de agarose, e é usada para separações analíticas na faixa de 1 a 300 KDa de massa molecular. O volume de resina da coluna superose 12 é de 24 mL.

O método utilizado em todas as análises cromatográficas nesta coluna foi o mesmo:

Tampão: Tris 50 mM pH 8.0 com 150 mM de NaCl;

Fluxo: 0,3 mL / minuto

Volume de amostras: 200 µL.

A tabela 3.1 apresenta os padrões de massa molecular utilizados neste experimento juntamente com seus respectivos volumes de eluição e a figura 3.5 a seguir apresenta o cromatograma referente ao experimento.

3.4) Resultados e Discussões

As proteínas que interagem com os grupos Ni-NTA podem ser eluídos da matriz através de um decréscimo do pH para valores menores que 6.3 ou, alternativamente, através da adição de imidazol no tampão. O pH ou a concentração ótima de imidazol para a eluição é distinta para cada caso e devem ser determinados empiricamente [manual QIAexpressionist].

Portanto, para determinar a concentração ótima de imidazol necessário para eluir a PGI-Tb, a coluna de níquel foi lavada com um gradiente descontínuo de 5 a 85mM de imidazol, com acréscimos de 5 mM. A figura 3.4 abaixo apresenta gel obtido no intervalo de 45 a 85 mM de imidazol.

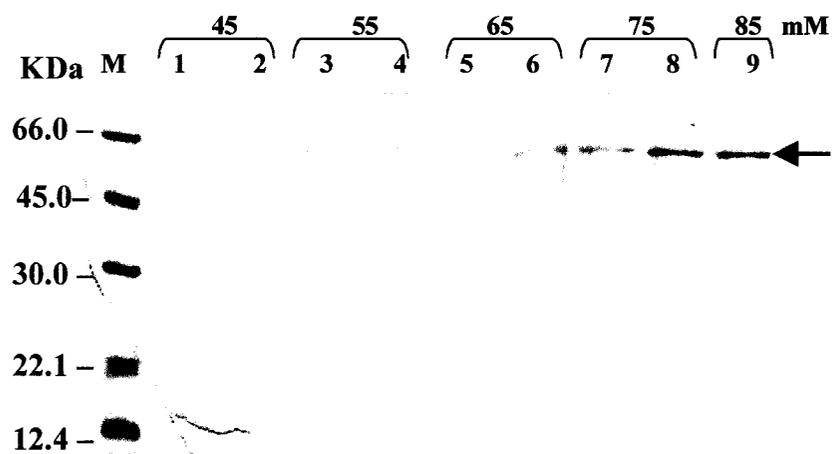


FIGURA 3.4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturante. M – Padrão de massa molecular; Poços 1 a 9 referem-se a amostras obtidas do gradiente descontínuo de 45 a 85 mM de imidazol.

Foi observado no gel (resultados não apresentados) que eluição com 5 a 35 mM de imidazol a PGI-Tb ainda mantém-se ligada ao grupo Ni-NTA da resina, sendo que esta começará a ser eluída quando a concentração de imidazol no tampão de lavagem gire em torno de 75 mM observado no poço 6 do gel. Entretanto observa-se que há uma banda mais intensa no poço 8 e 9 onde a concentração de imidazol é de 75 e 85 mM respectivamente.

Portanto ao lavar a coluna com uma concentração no tampão menor que 65mM, não será suficiente para eluir a PGI-Tb.

As PGIs de alguns organismos têm sido grandemente estudadas. Marchand apresenta a proteína de *T. brucei* como sendo um polipeptídeo de duas subunidades com 606 aminoácidos cada e com Mr de 67280 Da [Marchand et al., 1989]. Já os resultados publicados por Misset para o mesmo organismo apresentou-a com Mr de 62400 Da para a subunidade [Misset et al., 1986]. Esses valores diferem um pouco do resultado publicado por Nyame para a PGI de *Leishmania mexicana* com valor de 65KDa para cada subunidade sugerindo a mesma como sendo homodimérica [Nyame et al., 1994]. A PGI de *Lactococcus lactis* também foi reportada com Mr de 50 KDa. Esta, porém, possui uma identidade seqüencial muito baixa entre os resíduos que fazem parte da seqüência N-terminal quando comparada com PGIs de outros organismos. A exceção é a PGI de *Bacillus stearothermophilus* [Nomura et al., 1997].

Estudos realizados por Concepcion [Concepcion et al., 1999] com a PGI glicossomal e citosólica de *T. cruzi* revelaram que a enzima apresenta-se na forma trimérica com Mr de 186 ± 9 KDa com subunidades de 63 KDa indicando a mesma como sendo um homotrímico. Entretanto, é importante salientar que PGIs de outras fontes,

incluindo protozoários parasitas, apresentam-se na forma dimérica com Mr variando entre 53 e 67 KDa.

O resultado da eletroforese em condições desnaturantes apresentado na figura 3.4 apresenta o monômero de PGI-Tb com uma massa molecular comparável à massa do monômero da albumina de soro bovina 66 KDa, porém com valor um pouco inferior a esta.

Para se determinar o valor da massa da PGI-Tb e, possivelmente, confirmar um dos valores citados acima, uma pequena amostra da enzima previamente purificada através da coluna de afinidade foi cromatografada, utilizando-se a coluna gel filtração superose 12. A tabela 3.1 apresenta os padrões de massa molecular utilizados, e a figura 3.5 apresenta o perfil cromatográfico obtido.

TABELA 3.1 - Padrão de massa molecular utilizado na coluna superose 12 e seus respectivos volumes de eluição

| Padrões de MW | MW (Da) | Log MW | Ve (mL) |
|----------------------|---------|--------|---------|
| Amilase | 200.000 | 5,301 | 10,685 |
| Álcool desidrogenase | 150.000 | 5,176 | 11,291 |
| Albumina | 66.000 | 4,82 | 11,79 |
| Anidrase Carbônica | 29.000 | 4,462 | 13,672 |
| Citocromo C | 12.400 | 4,093 | 15,499 |

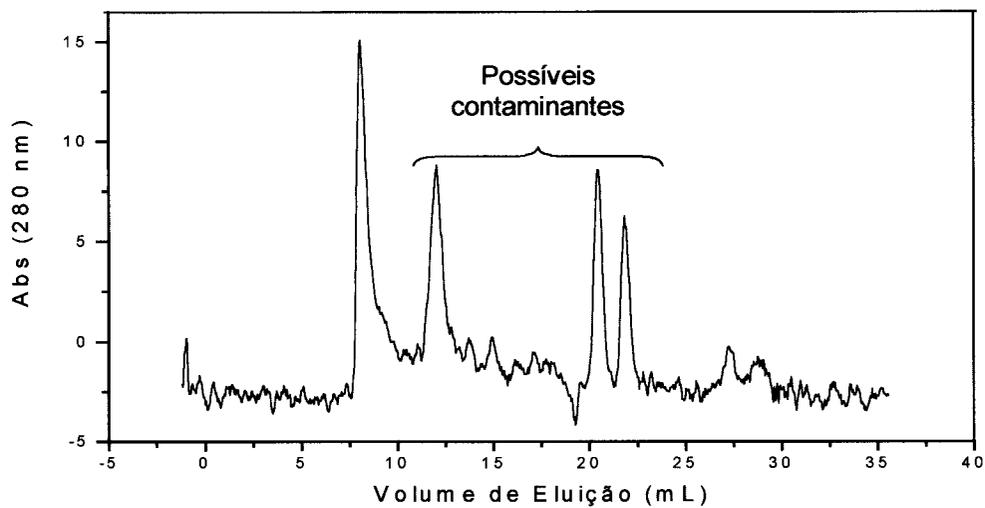


FIGURA 3.5 – Perfil cromatográfico da eluição da PGI-Tb na coluna superose 12. O pico mais alto apresentou atividade de isomerização.

Após a obtenção do Volume de eluição (V_e) para cada proteína padrão obtida separadamente e utilizando-se o programa Origin foi possível construir o gráfico mostrado na figura 3.6. A equação que descreve o comportamento apresentado pela curva é $\text{Log MW} = 8,0 - 0,25 \times V_e$.

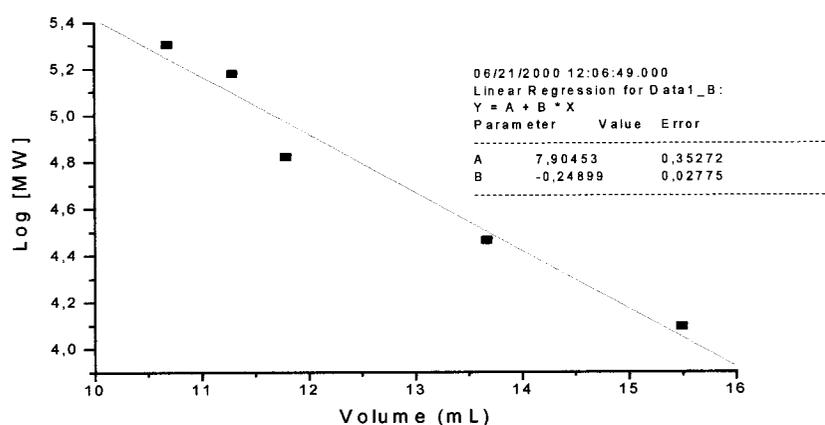


FIGURA 3.6 – Curva de calibração da coluna superose 12, utilizando-se proteínas com massa molecular conhecidos. $\text{Log MW} = 8,0 - 0,25 \times V_e$

O perfil de eluição da PGI-Tb apresentou quatro picos, uma vez que o sistema é muito sensível e capaz de detectar contaminantes, mesmo que em pequenas proporções (figura 3.5). Portanto para se determinar qual é o pico que corresponde à enzima em questão, realizaram-se testes de atividade em cada fração. Dos picos analisados frente a atividade de isomerase, apenas uma das frações apresentou resultado positivo. Seu volume de eluição foi 8 mL. Observando-se o gráfico da figura 3.6, é possível concluir que a PGI-Tb nessas condições apresenta-se com uma massa molecular maior que 200KDa (Amilase). Caso a curva seja extrapolada, a massa molecular correspondente a 8 mL é de 790 KDa.

Considerando o resultado de 65 KDa publicado por Nyame, esse valor corresponde a 12 monômeros da enzima. Uma possível justificativa para esse tipo de comportamento seria a presença dos resíduos de histidinas que estariam de alguma forma favorecendo a aglomeração das moléculas.

Portanto, para determinar a massa do monômero da PGI-Tb utilizou-se o programa 'Proteína' [Gill; Von Hippel, 1989]. Este programa utiliza a seqüência de aminoácidos que compõe a proteína em questão e calcula os seguintes parâmetros: número total de aminoácidos, a composição de aminoácidos, o coeficiente de extinção e a concentração teórica da enzima através do valor da absorção a 280 nm. Para calcular a massa, o programa faz a somatória das massas moleculares de cada aminoácido da seqüência fornecida. Para a PGI-Tb, o valor encontrado foi de 67466 Da para o monômero. Esse valor estaria de acordo com o resultado apresentado por Marchand [Marchand et al., 1989] de 67280 e com aqueles publicados por Nyame [Nyame et al. 1994] de 67113. Entretanto esse valor difere um pouco do resultado obtido eletroforicamente, porém deve ser ressaltado que a banda correspondente a PGI-Tb está em uma região não linear da curva que descreve o comportamento entre a massa molecular da proteína e sua distância percorrida no gel ($\text{LogMW} \times \text{distancia}$).

O monômero da PGI-Tb apresenta-se com uma massa molecular de 67 KDa, calculado através do programa 'Proteína'.

Deu-se início à purificação de PGI-Tb em grandes quantidades, seguindo o protocolo descrito em materiais e métodos. A figura 3.7 apresenta o gel referente à etapa de purificação em coluna de níquel.

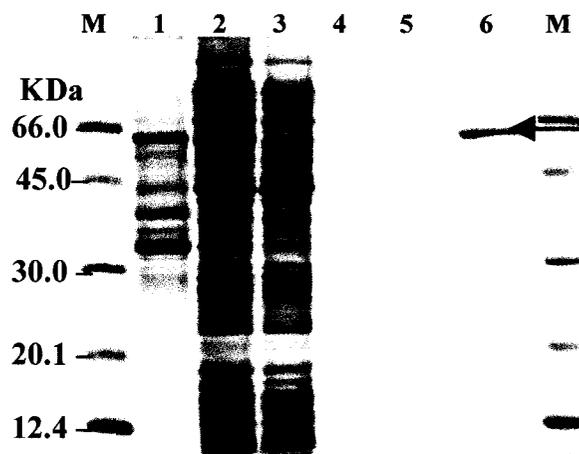


FIGURA 3.7 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (15%) das frações referentes à purificação da PGI-Tb através da coluna de níquel Ni-NTA. A seta aponta a banda referente à enzima com alto grau de pureza. O poço M refere-se ao padrão de massa molecular; 1-Pellet após a quebra da membrana celular e centrifugação; 2-Sobrenadante extrato bruto aplicado na coluna; 3 a 5 Lavagem com 60 mM de imidazol; 6-Eluição da PGI-Tb.

Nessas condições observa-se claramente que a resina contendo os grupos Ni-NTA comporta-se de forma muito satisfatória. A eficiência da mesma é observada comparando-se os resultados dos poços 2, 3 e 4. Observa-se, comparando os poços 2 e 3, que o extrato bruto passa quase que totalmente pela coluna, interagindo muito pouco com a resina. Isso provavelmente se deve ao fato da expressão estar sendo realizada em procarioto. Em eucarioto a probabilidade de proteínas contendo resíduos de histidinas vizinhos é maior, o que poderia interagir com uma afinidade um pouco maior com a resina, dificultando a purificação, pois a intensidade de interação leva em conta o número de resíduos que se liga à resina. Um cuidado de equilibrar a resina com o tampão já contendo 5 mM de imidazol deve ser tomado, evitando assim interações inespecíficas, [manual QIAexpressionist].

A enzima expressa mostrada no poço 6 do gel possui um alto grau de pureza, necessário para dar andamento nos experimentos que virão a seguir. O rendimento obtido girou em torno de 8 mg de enzima pura / litro de meio de cultura 2 xYT. Esse rendimento se mostra satisfatório para os experimentos mencionados nas etapas seguintes. Entretanto, é possível observar que uma parte relativamente significativa é perdida na forma insolúvel poço 1 do gel. Essa perda, denominada corpúsculo de inclusão, pode ser atribuída devido à grande produção da enzima recombinante, o que favorece ao aparecimento da enzima em forma insolúvel [manual QIAexpressionist].

3.4.1) Clivagem com o Fator-Xa

Para a obtenção da PGI-Tb em condições nativas, a mesma foi separada da cauda de histidinas através da incubação com o fator-Xa, uma protease que reconhece a seqüência dos resíduos Ile, Glu, Gly e Arg e realiza a clivagem após a Arg. A seqüência de His juntamente com o sítio de reconhecimento do Fator-Xa, e a enzima PGI-Tb estão representados na figura 3.8, e, em seguida (figura 3.9), a eletroforese, mostrando o andamento da reação nos quatro dias de incubação.

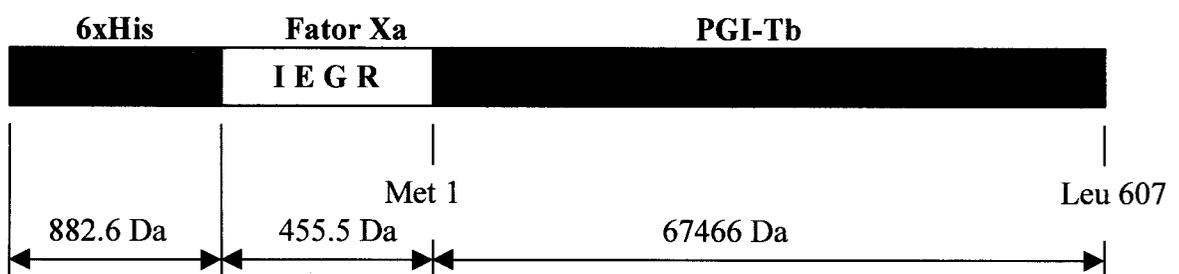


FIGURA 3.8 - Representação esquemática da enzima PGI-Tb, o sítio de Reconhecimento do Fator Xa e os resíduos de histidinas.

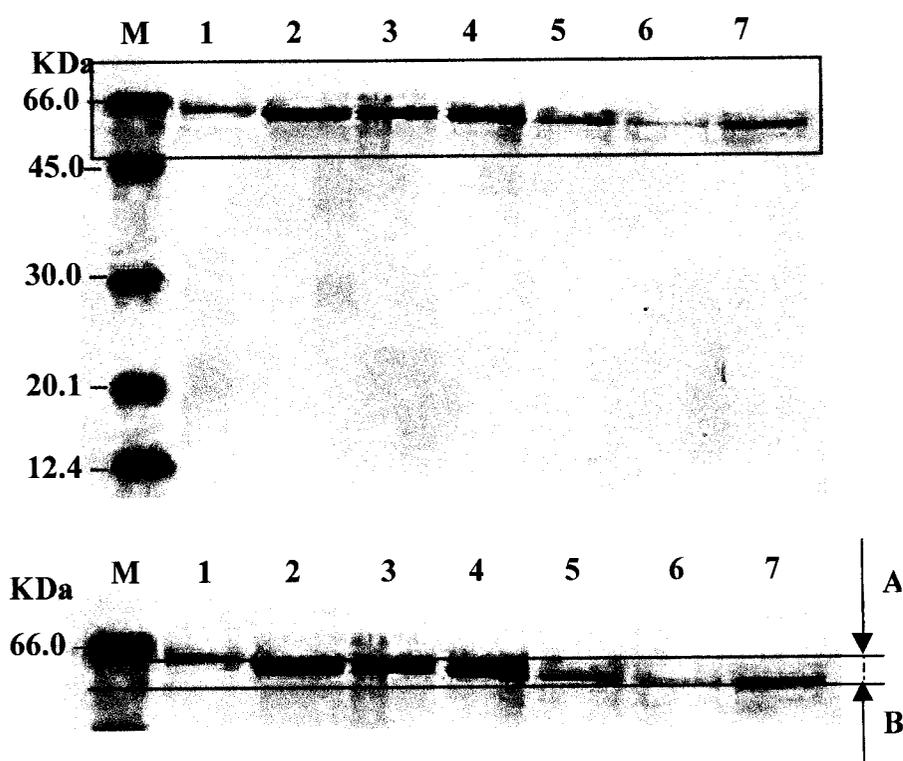


FIGURA 3.9 - Resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida 15% após a incubação com o Fator-Xa por quatro dias, destacando a região na altura de 66 Kda. Poço M padrões de massa molecular. Poço 1 controle da reação. Poços 2, 3, 4 e 5 correspondem aos tempos de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas respectivamente. Poço 6 e 7 amostras eluídas da superdex 200. A – PGI-Tb antes da incubação com Fator-Xa. B – Após a incubação com Fator Xa.

No poço 1 observa-se a banda referente à enzima, ligada aos resíduos de His, que serviu de referência durante o andamento da clivagem. É possível observar no poço 2 que a banda torna-se um pouco mais larga, indicando a presença da molécula com uma massa molecular ligeiramente menor que o controle. Esse efeito tende a ser repetido em 48 horas de reação (poço 3). A partir do poço 4 observa-se que a banda referente a enzima sem os resíduos de His e o sítio de clivagem é mais intensa, indicando sua presença em maior quantidade. A partir de 96 horas de incubação (poço 5), não se observa a banda referente à enzima com os resíduos de His, sugerindo que praticamente

toda a enzima presente foi clivada pelo Fator Xa. A diferença entre a enzima clivada e não clivada obtida teoricamente é de 1338.1 Da, que corresponde aos 6 resíduos His e ao sítio de reconhecimento do Fator-Xa, dez resíduos no total (figura 3.8).

O tempo de clivagem poderia ser diminuído utilizando-se maiores concentrações da protease. Entretanto, como a estabilidade da enzima é muito boa (o resultado de estabilidade será mostrado adiante), decidiu-se inserir no protocolo de purificação quatro dias de clivagem com o Fator Xa, e, logo em seguida, submeter o produto da clivagem a uma coluna de filtração em gel.

3.4.2) Protocolo de Purificação utilizando-se coluna de exclusão por tamanho Superdex-200

O cromatograma obtido nessa purificação apresentou um pico muito largo (resultado não apresentado). Todas as frações referentes a essa banda foram reunidas e submetidas a uma eletroforese utilizando-se o mesmo gel apresentado na figura-3.9, poço 6 e 7, com a finalidade de compará-los. As amostras, após terem sido reunidas, apresentaram atividade de isomerase, sendo, em seguida concentradas em centriprep até 6mg/mL e submetidas a experimentos de cristalização, utilizando-se o fatorial crystal screen e crystal screen (II) da Hampton Research.

3.5) Conclusões

- Foi possível expressar a enzima PGI-Tb no vetor pQE-30 com seis resíduos de histidinas, e estabelecer seu protocolo de purificação;
- A enzima expressa possui um alto grau de pureza necessário para os estudos de cristalização e caracterização, apresentando um rendimento médio em torno de 8mg / litro de meio de cultura 2 xYT;
- Os resultados obtidos indicam que a enzima apresenta-se com aproximadamente 67 KDa para o monômero.
- A clivagem com o Fator-Xa mostrou-se muito satisfatória, clivando a enzima somente no sítio específico, permitindo a obtenção da enzima em forma nativa.

3.6) Referências Bibliográficas

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** v.72, p.248-254, 1976.
- CONCEPCION, J.; CHATAING, B.; DUBOURDIEU, M. Purification and properties of phosphoglucose isomerase of *Trypanosoma cruzi* **Comparative Biochemistry and Physiology Part B** v.122, p.211-222, 1999
- DOONAN, S. **Protein purification protocols** Totowa 1996
- GILL, S.C.; VON HIPPEL, P.H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data **Analytical Biochemistry** v.182 p.319-326 1989
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 **Nature** v.227, p.680-685, 1970
- LANÇAS, F.M. **Cromatografia em fase gasosa** São Carlos 1993
- MARCHAND, M.; KOOYSTRA, U. WIERENGA, R.K.; LAMBEIR, A.M.; BEEUMEN, J.; OPOERDOES, F.R.; MICHELS, P.A. Glucosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* Cloning and characterization of the gene and analysis of the enzyme **Eur. J. Biochem.** v.184, p.455-464, 1989.
- MISSET, O; BOS, J.M.; OPPERDOES, F. Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei* Simultaneous purification, intraglycosomal concentrations and physical properties **Eur. J. Biochem.** v.157, p.441-453, 1986.
- NOMURA, M.; NAKAJIMA, I.; MATSUZAKI, M.; KIMOTO, H.; SUZUKI, I.; ASO, H. The N-terminal sequence of *Lactococcus lactis* Phosphoglucose Isomerase purified by affinity chromatography differs from the other species **Archives of biochemistry and Biophysics** v.341, p.315-320, 1997.
- NYAME, K.; DO-THI, C.; OPOERDOES, F.R.; MICHELS, P.A Subcellular distribution and characterization of glucosephosphate isomerase in *Leishmania mexicana mexicana* **Molecular and Biochemical Parasitology** v.67, p.269-279, 1994
- THE QIAEXPRESSIONIST. **A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.** 3.ed. 1997.

Capítulo – 4

Determinação das constantes

Catalíticas da Enzima phosphoglucose isomerase

A enzima phosphoglucose isomerase foi submetida a vários experimentos que culminaram na sua caracterização enzimática. Os valores das constantes (K_m , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_m) foram determinadas e comparadas com outras PGIs. Experimentos de atividade foram utilizados para determinar a estabilidade da enzima, bem como seu comportamento em diferentes valores de pH. Inibidores da PGI de levedura, músculo de coelho e *Bacillus stearothermophilus* foram utilizados para a determinação dos valores de IC_{50} da enzima. Além disso, foi possível determinar o valor de pI da enzima. Os vários tópicos mencionados serão abordados nesse capítulo.

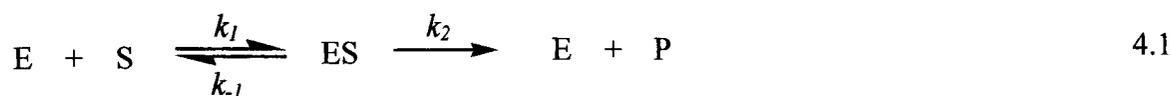
4.1) Cinética Enzimática

No presente contexto, cinética está relacionada com a variação na quantidade de substrato consumido ou de produto formado ao longo do tempo. Entretanto, informações sobre o mecanismo de reação, afinidade da enzima pelo substrato, interação da enzima pelo cofator e o tipo de interação da enzima com substrato podem ser extraídas em estudos de cinética enzimática.

O estudo de cinética começou em 1902, quando Adrian Brown investigou a taxa da hidrólise da sacarose catalisada pela enzima invertase (conhecida atualmente por β -fructofuranosidase) [Voet; Voet,1995].

Em concentrações fixas da enzima, a velocidade de catálise V , definida como o número de mols de produto formado por minuto, varia de diferentes formas em função da concentração de substrato S . Em baixas concentrações de substrato V mantém uma relação linear com a concentração de S ; em altas concentrações V , praticamente independe da concentração de S .

Em 1913 Leonor Michaelis e Maud Menten propuseram um modelo simples para explicar as características cinéticas. O aspecto crítico de seu tratamento é que um complexo ES específico é um intermediário necessário na catálise. O modelo proposto que dá conta das propriedades cinéticas de muitas enzimas é representado pela reação 4.1.



A enzima E combina-se com o substrato S para formar o complexo ES com uma constante catalítica k_1 . O complexo tem dois possíveis destinos: ele pode dissociar-se para E e S com uma constante de velocidade k_{-1} ; ou pode prosseguir e formar o produto P, com uma constante de velocidade k_2 . Presume-se que quase nada do produto reverte ao substrato inicial uma condição verídica na etapa inicial da reação.

De acordo com esse modelo, quando a concentração de substrato é alta o suficiente para converter toda a enzima presente no complexo ES, o segundo passo torna-se o limitante, e a taxa da reação global fica insensível a aumentos na concentração de substrato.

A velocidade em função da concentração de substrato pode ser expresso pela equação 4.1 abaixo:

$$v = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (4.1)$$

Onde $k_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ é conhecida como constante de Michaelis-Menten.

Em baixas concentração de substrato, o denominador da equação 4.1 aproxima-se do valor da constante K_M , proporcionado uma relação linear entre a velocidade e a concentração de substrato. Em altas concentrações de substrato a relação entre a velocidade e a concentração de substrato não obedece uma relação linear.

A inversão da equação 4.1, básica em estudos de cinética, permite facilmente o cálculo de K_M e V_{max} através do cálculo da velocidade específica em diferentes concentrações do substrato. É conveniente transformar a curva obtida, referente à equação 4.1 em uma reta, tomando-se a dupla recíproca em ambos os lados da equação. Essa reta, denominada duplo recíproco de Linweaver-Burk, corta o eixo X, correspondente a $1/[S]$ em $-1/K_M$, e o eixo dos Y, correspondente a $1/V$ em $1/V_{max}$.

O K_M é a concentração de substrato para a qual velocidade de reação corresponde à metade da velocidade máxima e varia largamente de uma enzima para outra, sendo também função do pH e da temperatura. O valor de K_M diminui com o aumento da afinidade da enzima pelo substrato.

O parâmetro V_{max} está relacionado com a eficiência catalítica da enzima, podendo ser expresso pela equação 4.2 abaixo:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_T} \quad (4.2)$$

que corresponde ao número de reações que cada sítio ativo catalisa por unidade de tempo. A razão k_{cat}/K_M é uma medida da eficiência catalítica da enzima.

4.2) Materiais e Métodos

4.2.1) Medidas da Atividade Enzimática e sua relação com o tempo e pH

Princípio: A atividade enzimática pode ser medida no sentido da reação direta ou inversa, monitorando a oxidação do NADPH ou a redução do NADP, espectrofotometricamente. A atividade de isomerase é mais convenientemente medida no sentido da formação da glicose-6-fosfato a partir da frutose-6-fosfato (reação 4.2), e em seguida, a redução do NADP⁺ (reação 4.3), como mostrado abaixo [Gracy; Tilley, 1973].



A mistura reacional foi realizada usando-se soluções contendo 100 mM de tampão trietanolamina pH 7.6, 1.2 mM frutose-6-fosfato, 7 mM MgCl₂.6H₂O, 0.4 mM NADP⁺ e 5µg glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) num volume total de 1.0 mL. A reação foi realizada em uma cubeta de quartzo de 1 cm de espessura a 22 °C, durante 1 minuto.

Durante esse período, a glicose-6-fosfato formada é oxidada e o NADP⁺ é reduzido. Essa transformação é iniciada pela adição da 150 ng de da enzima PGI-Tb em tampão Tris 50mM pH 8.0 e 300 mM NaCl. A formação de NADPH pode então ser acompanhada pela alteração na absorbância a 340 nm. O resultado da variação na absorbância por minuto é dividido por 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (coeficiente de extinção molar do

NADPH), resultando na quantidade de frutose-6-fosfato consumida (μmol), por minuto, por massa (mg) de enzima (PGI-Tb). A equação 4.3 abaixo foi usada para o cálculo da atividade específica.

$$AE = \frac{(\Delta Abs)_{NADPH} \times V_T}{(\epsilon)_{NADPH} \times (V \times C)_{PGI - Tb}} \quad (4.3)$$

Sendo: AE - Atividade Específica (U/mg)

ΔAbs - Variação de absorvância por minuto a 340 nm

V_T - Volume total de reação em μL

ϵ - Coeficiente de extinção molar do NADPH produzido = $6.22 (\text{cm} \times \text{mM})^{-1}$

V - Volume de PGI adicionada no ensaio em μL

C - Concentração de PGI-Tb em mg / mL

Foram realizados vários experimentos que possibilitaram calcular os parâmetros de estabilidade da enzima, a variação da atividade em função do pH.

Uma unidade de atividade foi definida como sendo 1 μmol de substrato (frutose-6-fosfato) convertida por minuto.

Antes de determinar a atividade dos vários produtos de purificação, realizaram-se vários testes de atividade usando a PGI de levedura (Sigma), com o propósito de determinar a quantidade ideal da PGI, na reação. Conhecendo-se o valor ideal de concentração de PGI deu-se continuidade aos demais experimentos. Para determinar a

estabilidade da PGI-Tb, duas alíquotas (0.5 mg/mL) foram mantidas a 4°C e 24°C respectivamente. Em intervalos de aproximadamente 10 dias foram realizados testes de atividade com essas amostras.

Realizaram-se novos experimentos objetivando determinar o pH em que a enzima recombinante apresente maior atividade específica. Para isso, amostras de PGI-Tb foram dialisadas em tampões a 50 mM contendo 50 mM NaCl. Os tampões utilizados cobriram um intervalo entre 4 e 10 com variações de uma unidade de pH. Em seguida, a atividade específica foi medida em cada tampão.

4.2.2) Determinação das constantes catalíticas da enzima phosphoglucose isomerase (K_m , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_m)

O procedimento usado para determinar as constantes catalíticas foi igual ao empregado para a determinação da atividade específica, baseado na formação do NADPH a partir de $NADP^+$. Foram usadas seis concentrações diferentes do substrato frutose-6-fosfato (1300, 650, 325, 162.5, 81.25, 40.63 μ M) e 150 ng de PGI-Tb. O resultado foi convertido em unidades de velocidade, dividindo-se a variação de absorbância a 340 nm obtida em cada ensaio pelo coeficiente de extinção molar do NADPH, que é $6.22 \text{ (cm} \times \text{mM)}^{-1}$. Com os resultados obtidos foi possível traçar a curva velocidade de reação em função da concentração do substrato, juntamente com seu duplo recíproco, possibilitando a determinação das constantes K_m , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_m (figura 4.3).

4.2.3) Determinação de IC₅₀

Hardré e colaboradores [Hardré et al., 1998 e 1999] sintetizaram e estudaram quatro inibidores: D-Arabinonhydroximate-5-phosphate (5PAH), D-Arabinonate-5-phosphate (5PAA), D-Arabinonamide-5-phosphate (5PAAm) e D-Arabinonhydrazide-5-phosphate (5PAHz) de PGI. Seus estudos revelaram que estes compostos têm a propriedade de inibir as PGIs de levedura, músculo de coelho e *Bacillus stearothermophilus*. A atividade de isomerase para a PGI-Tb foi medida na presença de cada um desses inibidores, e observou-se uma diminuição na atividade específica em cada um deles. Resolveu-se, portanto, determinar o valor IC₅₀ para a PGI-Tb frente a cada um desses compostos.

A mistura reacional foi preparada usando-se soluções nas mesmas concentrações utilizadas para a determinação da atividade específica, acrescentando diferentes concentrações de cada um dos inibidores. A tabela 4.3 apresenta as concentrações de cada inibidor usado durante os experimentos. A reação foi realizada em cubeta de quartzo de 1 cm de espessura a 22 °C durante 1 minuto, mantendo um volume final de 1 mL.

Como a relação entre a concentração de NADPH formado obedece uma relação linear com o tempo, o cálculo do IC₅₀ baseou-se no coeficiente angular medido. Calculou-se o coeficiente angular da reta formada na ausência e na presença de cada um dos inibidores em suas diferentes concentrações. Aumentando-se a concentração do inibidor, o coeficiente angular da reta diminui e o valor de IC₅₀ coincidirá com a metade do valor do coeficiente obtido na ausência desses compostos.

4.2.4) Focalização Isoelétrica da enzima

Focalização Isoelétrica é o procedimento usado para determinar o ponto isoelétrico (pI) de uma proteína. Um gradiente de pH é estabelecido ao longo de um gel à base de uma mistura de compostos orgânicos de baixa massa molecular denominados de anfólitos. Esses anfólitos (anfóteros) têm a propriedade de agir como ácidos (doadores de próton) ou bases (aceptores de prótons).

Quando uma mistura protéica é aplicada ao gel, cada proteína migra sobre ele até que o pH coincida com o valor do pI. Proteínas com diferentes pIs são então distribuídas de diferentes formas sobre o gel [Nelson; Cox, 2000].

Utilizou-se o sistema PhastSystem (Pharmacia) para determinar o pI da PGI-Tb recombinante. Após a purificação da enzima, através de coluna de afinidade (protocolo já estabelecido), a PGI-Tb foi dializada com tampão Tris 1 mM pH 8.0 contendo 50 mM de NaCl. Nesse experimento, alíquotas 5 e 6 μ L a 6 mg / mL foram aplicadas nos géis PhastGel IEF 3-9 e PhastGel IEF 5-8, os quais permitem a determinação do pI situado no intervalo de pH 3 a 9 e 5 a 8 respectivamente. A determinação do pI da PGI-Tb foi realizada sob condições padrão do equipamento e a coloração foi realizada com coomassie blue (R-250).

4.3) Resultados e Discussões

4.3.1) Medidas da Atividade Enzimática e sua relação com o tempo e pH

A metodologia utilizada nos experimentos de cinética enzimática foi o proposto por Gracy e Tilley. Esse método baseia-se na medida do NADPH formado a partir do NADP⁺ presente no meio reacional.

Foram calculados os valores da atividade específica para PGI de *T. brucei* e levedura (Sigma) utilizada para padronizar o método. A padronização do método consistiu em realizar experimentos variando-se a concentração da enzima e mantendo-se constante as concentrações dos demais reagentes. O objetivo era determinar qual a melhor concentração da enzima PGI-Tb que deveria ser utilizada nos experimentos, de tal maneira que o produto formado obedecesse uma relação linear com o tempo. O melhor resultado encontrado foi 15 µg/mL. Padronizou-se, portanto, utilizar 10 µL da enzima a 15 µg/mL, que corresponde a 150 ng da enzima.

A reação é iniciada pela adição de PGI-Tb, podendo, dessa forma, acompanhar a formação de NADPH ao longo de um minuto. A tabela 4.1 resume os valores de atividade para as PGIs, em U/mg de *T. brucei* e levedura.

TABELA 4.1 – Valores de atividade específica em (U/mg) para a PGI de levedura (Sigma) usada para padronizar o método e de *T. brucei*.

| Atividade Específica de PGI (U/mg) | |
|------------------------------------|---------------------------|
| Levedura | <i>Trypanosoma brucei</i> |
| 255 | 290 |

Como pode ser observado pela tabela 4.1, a enzima mostrou-se ativa com valor de atividade, comparada à atividade da mesma enzima em levedura.

A estabilidade da enzima PGI-Tb foi determinada através da medida de sua atividade específica em intervalos de tempo de, aproximadamente sete a dez dias. As amostras estocadas eram diluídas e sua atividade determinada. A figura 4.1 apresenta a variação da atividade específica ao longo do tempo.

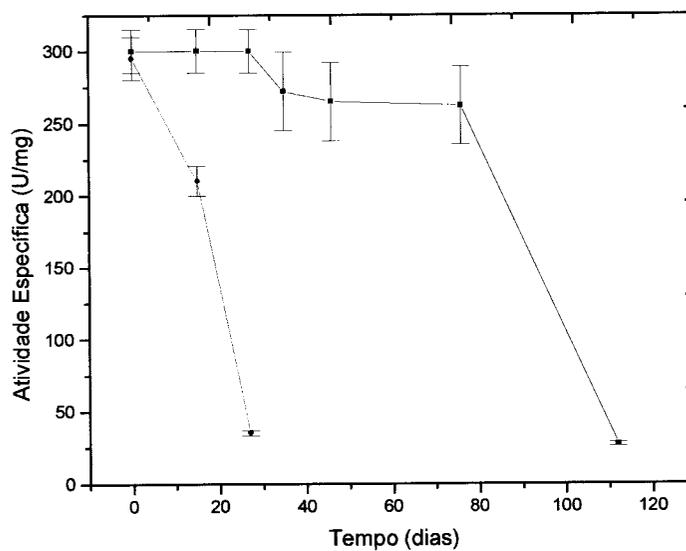


FIGURA 4.1 - Atividade Específica medida em intervalos de aproximadamente dez dias. A curva em preto representa a enzima estocada a 4°C e a vermelha a 25°C.

Através dos dados da curva apresentada, claramente observa-se que a enzima mantém-se ativa por um longo período de tempo, sendo que sua atividade mantém-se constante por aproximadamente 30 dias, com uma pequena queda após esse período chegando-se a 87% da atividade inicial a 4°C. Em seguida, a atividade mantém-se

constante por mais 45 dias. A partir daí observa-se uma queda brusca da mesma, chegando a 10% da atividade inicial em aproximadamente 30 dias.

O mesmo comportamento não se observa para a enzima estocada a 25°C. Uma queda constante é observada nessas condições, sendo que a atividade enzimática atinge 13% da atividade inicial em aproximadamente 30 dias. Entretanto observou-se (dados não apresentados) que a atividade enzimática atinge 70% da atividade inicial em 22 dias quando a enzima é estocada a 15 ng/μL a 4°C, que corresponde à concentração utilizada nos ensaios de atividade. Esses dados sugerem que enzima PGI-Tb é estável, mantendo-se ativa por um longo período de tempo. Essa estabilidade é dependente da concentração.

Esse comportamento é interessante, uma vez que experimentos de cristalização são demorados e a manutenção da atividade nesses casos é importante.

O pH em que a enzima possui maior atividade também foi determinado após a medida da atividade nos diversos pH já citados. A curva que descreve o comportamento da atividade específica em função do pH é apresentada na figura 4.2

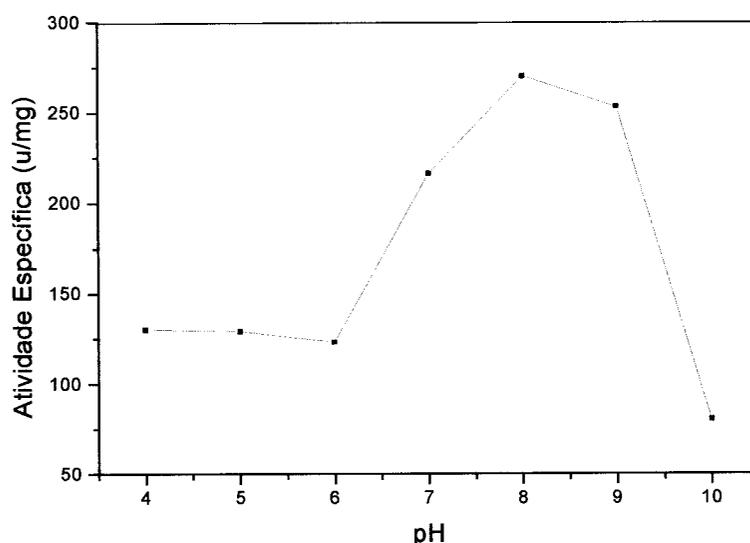


FIGURA 4.2 – Curva de atividade específica da PGI-Tb em função do pH, a atividade é máxima quando a enzima é diluída no tampão Tris-HCl pH 8.

A atividade específica da enzima em pH 4, 5 e 6 corresponde a 55 % da atividade obtida quando a enzima encontra-se em pH 8. A partir desses valores, a atividade específica tende a aumentar até atingir seu valor máximo em pH 8 e então novamente tende a decrescer (figura 4.2).

Esse comportamento é coerente com o mecanismo de reação proposto por Jeffery [Jeffery et al., 2000], para a reação catalisada pela PGI de músculo de coelho. O mecanismo de isomerização envolve uma catálise do tipo ácido / base com a transferência de um próton e a formação de intermediário cis-enediol. Dois resíduos são considerados durante o processo: a His-388 e a Lys-518.

Para que ocorra a reação, a histidina, com pKa de 6.7, deverá estar desprotonada, o que não acontece em pHs menores que 6.7. Nestas condições, os prótons deverão competir com o nitrogênio dos resíduos de histidina, dificultando ou

mesmo impedindo a abstração de um próton do substrato necessário para a reação. O gráfico mencionado anteriormente descreve esse comportamento.

Da mesma forma a lisina com pKa de 9.4 deverá estar protonada para o andamento da reação. Portanto, em situações aonde o pH for maior que 9.4, a lisina estará desprotonada, dificultando o término da reação. Esse comportamento é coerente com o observado na figura 4.2. Portanto, a região ótima para a reação de isomerização corresponde ao pH intermediário entre 6.7 e 9.4 (figura 4.2), e esse resultado está de acordo com o trabalho publicado por Concepcion [Concepcion et al., 1999] para a PGI de *T. cruzi*.

4.3.2) Determinação das constantes catalíticas da enzima phosphoglucose isomerase

Para as medidas de cinética enzimática utilizaram-se os mesmos reagentes nas suas devidas concentrações, já descritas. Apenas a concentração de substrato variou de 1.3mM a 40.63 μ M. Essas diluições foram realizadas utilizando-se as mesmas pipetas e sempre se retirando o mesmo volume de substrato e do solvente. Esse procedimento resultou numa grande diminuição dos erros envolvidos, resultando em curvas bem ajustadas com os dados experimentais. A figura 4.3 a seguir apresenta a relação entre a velocidade de reação em função da concentração do substrato frutose-6-fosfato para a PGI de *Leishmania mexicana* e *T. brucei*, juntamente com seus respectivos duplo recíproco.

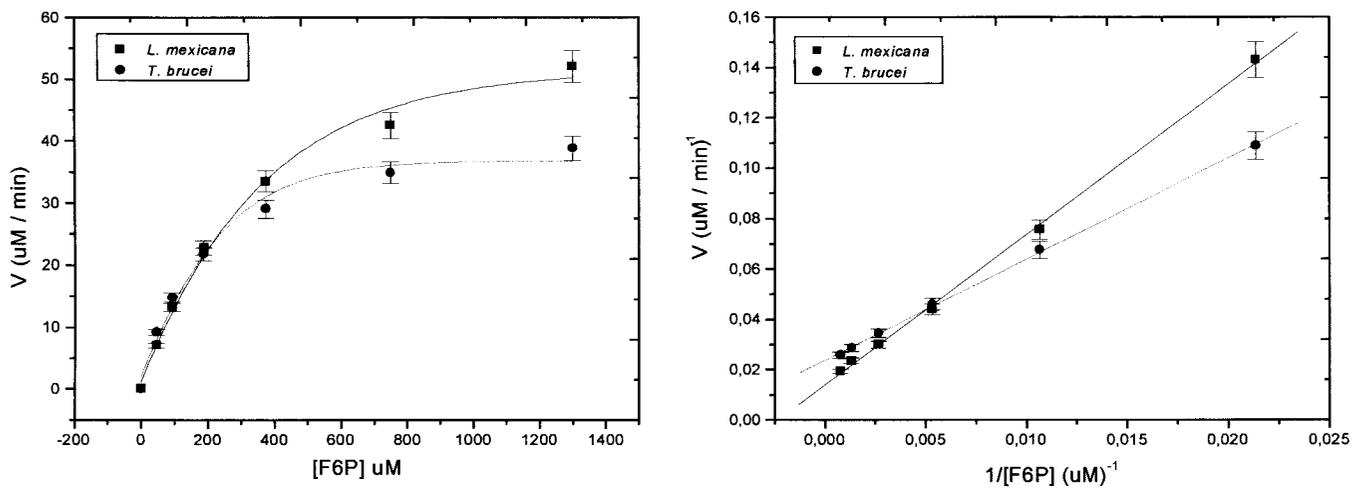


FIGURA 4.3 – Curva mostrando a dependência da velocidade em relação à concentração de substrato (frutose-6-fosfato), juntamente com a curva de Michaelis-Menten para a isomerização catalisado pela PGI de *L. mexicana* e *T. brucei*. A partir das equações ($Y = 0.014 + 6.0 X$) e ($Y = 0.0238 + 3.48 X$) foram obtidos os valores de K_m e V_{max}

A tabela 4.2 apresenta os valores das constantes catalíticas calculados e de algumas constantes encontradas na literatura.

TABELA 4.2 – Valores de V_{max} , k_{cat} , K_m , e k_{cat}/K_m para a PGI de *T. brucei*, *L. mexicana* e *T. cruzi* citosólica e glicossomal para o substrato frutose-6-fosfato

| Constantes Catalíticas | | | | |
|------------------------|--|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| | V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$) | k_{cat} (s^{-1}) | K_m (M) | k_{cat}/K_m (s M^{-1}) |
| <i>T. brucei</i> | 42,02 | 630 | $146,22 \times 10^{-6}$ | $4,31 \times 10^6$ |
| <i>L. mexicana</i> | 72,4 | 1070 | $428,6 \times 10^{-6}$ | $2,50 \times 10^6$ |
| <i>T. cruzi</i> | | | | |
| Citosólica | - | - | 800×10^{-6} | - |
| glicossomal | - | - | 125×10^{-6} | - |

O K_m da PGI-Tb recombinante foi de 146 μM . Esse valor está de acordo com o encontrado na literatura de 122 μM [Marchand et al., 1989] para o mesmo substrato frutose-6-fosfato. Segundo Cox; Nelson (2000) os valores de K_m estão relacionados com a disponibilidade de substrato para a reação. Uma enzima que catalisa um substrato em baixas concentrações deverá apresentar um menor valor de K_m . Segundo essas considerações, os resultados publicados por Concepcion revelam que o substrato está disponível em maior quantidade no citosol do que no glicossoma de *Trypanosoma cruzi*, organismo do mesmo gênero do *Trypanosoma brucei* [Concepcion et al., 1998]. Entretanto, a concentração de substrato (F6P) glicossomal para ambos são relativamente similares, pois seus valores de K_m são 146 e 125 μM para a PGI de *T. brucei* e *T. cruzi*, respectivamente.

A eficiência catalítica para a PGI-Lm e PGI-Tb pôde ser analisada comparando-se seus valores de K_{cat} . O valor encontrado para a PGI-Lm é aproximadamente 1.7 vezes maior que o K_{cat} para a PGI-Tb, significando que a PGI-Lm possui maior eficiência de catálise quando comparada com a PGI-Tb.

4.3.3) Determinação de IC_{50}

Os inibidores de PGI de levedura, *Bacillus stearothermophilus* e músculo de coelho usados para calcular o IC_{50} da PGI-Tb são mostrados na figura 4.4, bem como o intermediário da reação catalisada pela PGI.

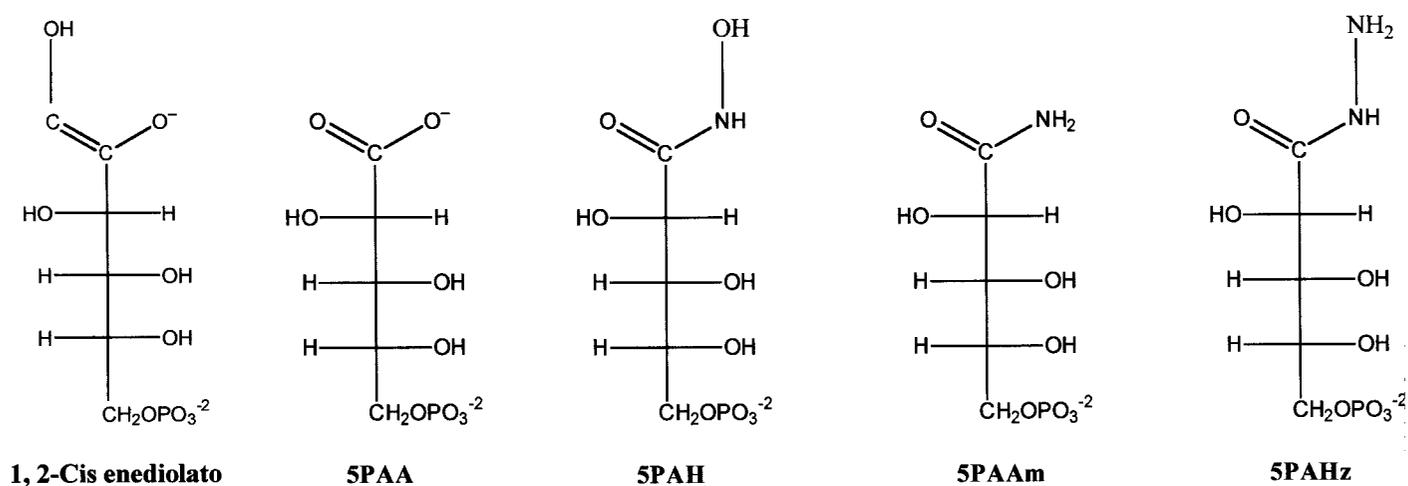


FIGURA 4.4 – Inibidores de PGI de levedura, *Bacillus stearothermophilus* e músculo de coelho D-Arabinonate-5-phosphate (5PAA), D-Arabinonhydroximate-5-phosphate (5PAH), D-Arabinonamide-5-phosphate (5PAAm), D-Arabinonhydrazide-5-phosphate (5PAHz) e o intermediário da reação catalisada pela PGI 1,2-Cis enediolato.

A concentração estoque de cada um dos inibidores era de 100 mM. Pequenas alíquotas, variando entre 1 e 10 μ L, eram adicionadas no meio reacional, diluindo-as para valores de concentração conhecidos, cuidando-se para que o volume final fosse constante e igual a 1 mL.

Três ensaios de atividades foram realizados com a enzima na ausência de qualquer inibidor. As retas obtidas foram usadas para calcular o coeficiente angular médio, sendo este tomado como padrão. Em seguida três novos ensaios foram realizados na presença do primeiro inibidor, calculando-se o coeficiente angular médio; esse passo

foi sucessivamente repetido a cada nova concentração do inibidor. Esse procedimento foi tomado para cada um dos compostos mencionados. Com os dados obtidos foi possível estabelecer a relação entre a concentração de inibidor e o coeficiente angular, mostrado na figura 4.5, para cada composto analisado. A tabela 4.3 abaixo apresenta os dados obtidos durante cada experimento.

TABELA 4.3 – Valores do coeficiente angular médio para as diferentes concentrações dos inibidores analisados, usados para calcular o valor de IC_{50} .

| [SPAA] (μM) | Coef. Angul (min^{-1}) | [SPAHz] (μM) | Coef. Angular (min^{-1}) |
|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| 0 | 0.325 | 0 | 0.325 |
| 12.5 | 0.131 | 20 | 0.16118 |
| 50 | 0.05536 | 50 | 0.13518 |
| 75 | 0.04554 | 100 | 0.104 |
| 100 | 0.02821 | 200 | 0.07482 |
| [SPAHz] (μM) | Coef. Angul (min^{-1}) | [SPAAm] (μM) | Coef. Angular (min^{-1}) |
| 0 | 0.316 | 0 | 0.325 |
| 25 | 0.133 | 100 | 0.14 |
| 50 | 0.0871 | 200 | 0.09786 |
| 75 | 0.0630 | 400 | 0.0725 |
| 100 | 0.0433 | 1000 | 0.05625 |

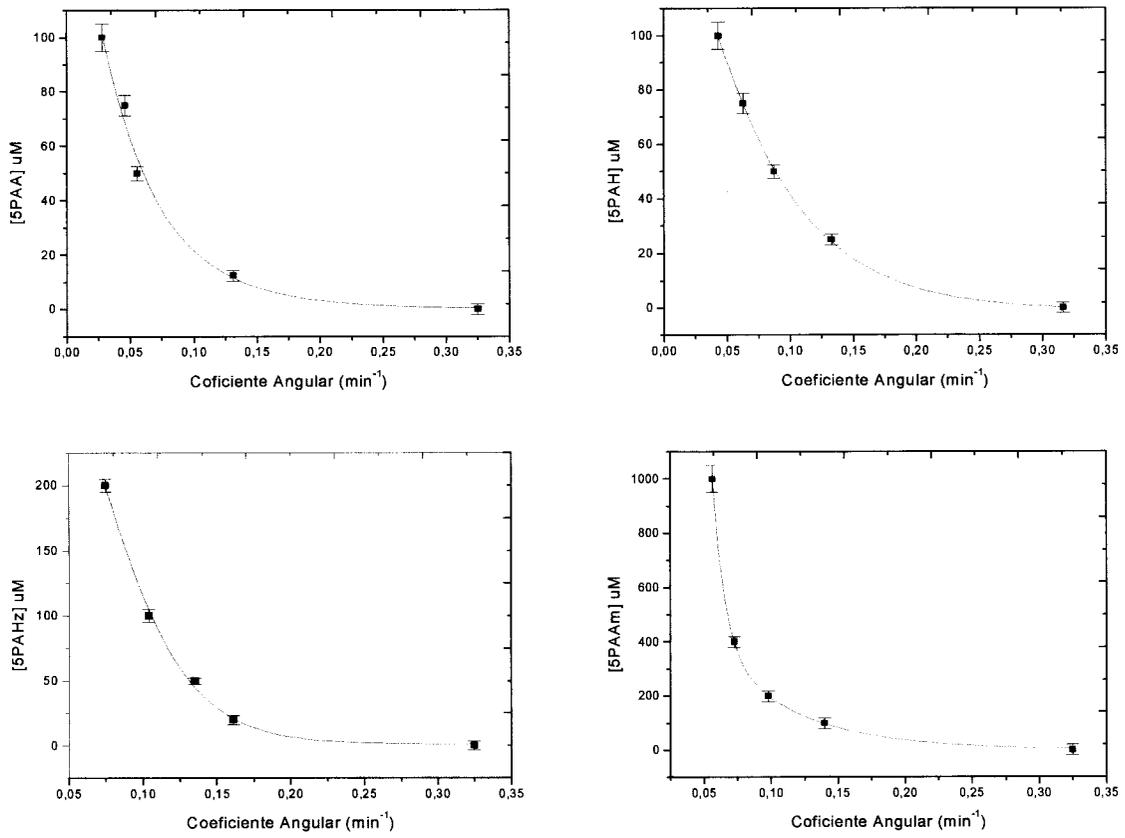


FIGURA 4.5 – Curva mostrando a relação entre a concentração de inibidor e o coeficiente angular, usados para calcular o IC_{50} .

Os valores de IC_{50} obtido para cada inibidor analisado são apresentados na tabela 4.4.

TABELA 4.4 – Valores de IC_{50} determinados para a PGI-Tb frente aos compostos: D-Arabinonate-5-phosphate (5PAA), D-Arabinonhydroximate-5-phosphate (5PAH), D-Arabinonhydrazide-5-phosphate (5PAHz) e D-Arabinonamide-5-phosphate (5PAAm).

| Inibidores | IC_{50} (μ M) |
|------------|----------------------|
| 5PAA | 6.4 |
| 5PAH | 15.3 |
| 5PAHz | 19.9 |
| 5PAAm | 66.7 |

O valor de IC_{50} corresponde à concentração de inibidor que é necessária para que a atividade específica da enzima tenha metade de seu valor medido na ausência do mesmo. Portanto, quanto menor for esse valor, melhor será a ação inibitória do composto em questão.

Nossos resultados, portanto, sugerem o 5PAA como sendo o composto com maior atividade inibitória, seguido de 5PAH, 5PAHz, e 5PAAm, como é apresentado na tabela 4.4.

Analisando-se a figura 4.4, é possível observar que o oxigênio do grupo carboxilato do 5PAA é substituído por um grupo NH_2 em 5PAAm. Essa mudança resulta na perda da carga negativa característica do grupo carboxilato. Estudos estruturais de PGI de coelho [Jeffery et al., 2000], revelaram que a arginina 272 faz parte do sítio ativo, e acredita-se que sua função é estabilizar a carga negativa que aparece no estado de transição durante a catálise. Essa função é semelhante à da lisina 12 na triose-fosfato isomerase (EC5.3.1.1) [Joseph-McCarthy et al., 1993]. É importante salientar que existem apenas três PGIs com estrutura resolvida; PGI de *Bacillus stearothermophilus*, PGI de músculo de porco e músculo de coelho. Como a estrutura de

coelho possui uma identidade seqüencial de 57 % com a PGI-Tb, as considerações feitas para a PGI-Tb serão baseadas na estrutura de coelho, resolvida a 2,5 Å de resolução.

Os resultados de IC_{50} para a 5PAA e 5PAAm estão, nesse aspecto, de acordo com a estrutura apresentada por Jeffery, uma vez que a carga negativa do grupo carboxilato do 5PAA provavelmente está interagindo com a arginina carregada positivamente situada no sítio ativo da PGI-Tb e conservada em PGIs de *T. cruzi*, *Leishmania mexicana*, *E. coli*, *Bacillus stearothermophilus* e *Vimbrião colare*. Além disso, o resíduo mencionado possui um grupo NH_2^+ fazendo parte da cadeia lateral, e encontra-se a 3,43 Å do grupo carboxilato do inibidor 6 fosfogluconato na estrutura de PGI de coelho, resolvida em complexo.

Os valores de IC_{50} para 5PAH e 5PAHz são ligeiramente diferentes, sugerindo que a substituição de um grupo OH^- por NH_2 não influencia significativamente sua interação com o sítio ativo da enzima.

Os resultados de IC_{50} para 5PAH e 5PAAm apresentaram diferenças significativas. Analisando-se suas fórmulas estruturais pode-se observar que a única diferença é a adição de um grupo hidroxila, localizado no nitrogênio em 5PAH. Essa pequena diferença foi capaz de deixar o valor de IC_{50} do 5PAH 4 vezes menor em relação IC_{50} do 5PAAm, um resultado que sugere que o grupo hidroxila desempenha um papel de relevada importância na inibição desse composto.

Resultados com o objetivo de determinar o percentual de atividade específica remanescente devido à presença de inibidor para a PGI humana revelaram que o inibidor 5PAA é responsável pelo decréscimo de 35% da atividade específica. Os inibidores 5PAH, 5PAHz e 5PAAm diminuíram a atividade específica em 28,5, 5,0 e 2,5%,

respectivamente [Cordeiro, 2001]. Esses resultados sugerem que o sítio ativo para a PGI humana e de *T. brucei* são muito parecidos, e as interações feitas com os inibidores provavelmente são as mesmas em ambas.

Num contexto mais amplo, os compostos estudados por Hardré e colaboradores mostraram-se muito eficientes para inibir a PGI-Tb. Esse resultado já era esperado, pois os mesmos mostraram-se muito eficientes para inibir a mesma enzima em levedura, músculo de coelho e *Bacillus stearothermophilus*, uma vez que nessas proteínas, os resíduos que fazem parte do sítio ativo, bem como os resíduos responsáveis pela especificidade do substrato, são bem conservados. Essas considerações serão abordadas no próximo capítulo.

A explicação para a alta eficiência inibitória desses compostos é o fato de que os mesmos foram sintetizados objetivando obter um composto estruturalmente semelhante ao composto 1,2-cis-enediolato, que corresponde ao intermediário da reação catalisada pela PGI (figura 4.4).

4.3.4) Focalização Isoelétrica da PGI-Tb

A figura 4.6 abaixo mostra os resultados de focalização isoeletrica da PGI-Tb. Os géis A e B apresentam os resultados da focalização isoeletrica nos intervalos de pI de 3 a 9 e 5 a 8, respectivamente. O poço 1 dos géis apresenta os padrões de pI e o poço 2 apresenta o resultado da focalização isoeletrica para a PGI-Tb.

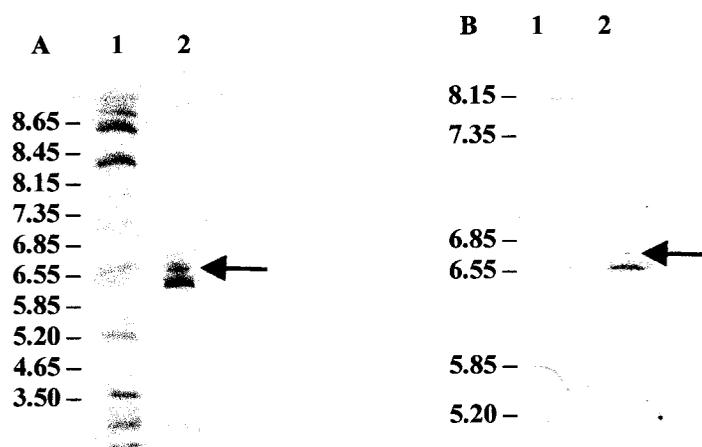


FIGURA 4.6 - Focalização isoeétrica da enzima PGI-Tb obtida pelo sistema PhastSystem. A seta vermelha indica a banda referente a PGI-Tb.

| | Gel A (IEF 3-9) | | Gel B (IEF 5-8) |
|----------|--------------------|----------|--------------------|
| Linha 1: | Padrão de pI | Linha 1: | Padrão de pI |
| Linha 2: | Alíquota de PGI-Tb | Linha 2: | Alíquota de PGI-Tb |

A amostra de PGI-Tb pura foi aplicada próxima ao centro de gel e observou-se que parte dela migrou em direção à mioglobina ácida pI 6,85 (gel A), sendo que o remanescente permaneceu no ponto de aplicação da amostra. A princípio, poderia se estimar que o pI da PGI-Tb esteja entre 6.55 e 6,85. Entretanto, para ter-se um valor mais preciso, foi realizado uma nova focalização isoeétrica no intervalo de pI de 5 a 8 (gel B). É possível observar que uma pequena parte da banda referente à enzima desloca-se em direção à mioglobina ácida de cavalo (pI 6,85), sendo que a maior parte permaneceu no local de aplicação, confirmando o resultado obtido anteriormente.

Em virtude da pouca definição no gel B resolveu-se utilizar o programa ExPASy (<http://www.expasy.ch>) para determinar o valor do pI teórico. O programa apresentou como resultado teórico o valor de pI de 6,85, sugerindo a confirmação do resultado apresentado nos dois géis. Esses resultados sugerem o valor de 6,85 como sendo o pI da enzima PGI-Tb.

4.4) Conclusões

Os experimentos realizados com a PGI-Tb, baseados nos ensaios de atividade enzimática permitiram concluir que:

- A enzima mostra-se ativa com atividade específica comparável a PGI de levedura, mantendo-se ativa por um longo período de tempo. A atividade específica é ótima no pH 8;
- Determinaram-se as constantes catalíticas para a PGI-Tb; seus resultados são comparáveis aos valores encontrados na literatura;
- Determinaram-se os valores de IC_{50} da enzima frente a quatro inibidores de PGI testados em outros organismos. Os mesmos mostraram-se bastante eficientes para inibir a PGI-Tb, sendo que o composto 5PAA apresentou um valor de IC_{50} de $6,40\mu M$, mostrando-se, portanto, um ótimo inibidor para a PGI-Tb.
- O ponto isoelétrico da PGI-Tb determinado experimentalmente através do método automatizado PhastSystem é de 6,85, e está de acordo com valores teóricos determinados através do programa ExPASy.

4.5) Referências Bibliográficas

- CORDEIRO, Artur Torres **Determinação da estrutura cristalográfica por difração de raios-X da enzima glicose-6-fosfato isomerase humana** São Carlos, 2001. p.75 Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo
- CONCEPCION, J.; CHATAING, B.; DUBOURDIEU, M. Purification and properties of phosphoglucose isomerase of *Trypanosoma cruzi* **Comparative Biochemistry and Physiology Part B** v.122, p.211-222, 1999
- COX, M.M.; NELSON, D.L. **Lehninger Principles of Biochemistry** New York 2000
- GRACY, R. W.; TILLEY, B.E.; Phosphoglucose Isomerase of Human Erythrocyte and Cardiac Tissue **Methods Enzymol.** v.41, p.392-400, 1973.
- HARDRÉ, R.; SALMON, L.; Competitive inhibitors of yeast phosphoglucose isomerase: synthesis and evaluation of new types of phosphorylated sugars from the D-arabinonolactone-5-phosphate. **Carbohydrate Research** v.318, p.110-115, 1999.
- HARDRÉ, R.; BONNETTE, C.; SALMON, L.; GAUDEMER A. Synthesis and evaluation of phosphoglucose isomerase: the enediolate analogue 5-phospho-D-arabinohydroxamate **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v.8, p.3435-3438, 1998.
- JEFFERY, C.; BAHNSON, B.; CHIEN, W.; RINGE, D.; PETSKO, G.; Crystal Structure of Rabbit Phosphoglucose Isomerase, a glycolytic enzyme that moonlights as neuroleukin, autocrine motility factor, and differentiation mediator **Biochemistry** v.39, p.955-964, 2000.
- JOSEPH, D.; LOLIS, E.; KOMIVES, E.; PETSKO, G. Crystal Structure of the .K12M/G15A Triosephosphate Isomerase double mutant and electrostatic analysis of the active site **Biochemistry** v.33, p.2815-2823, 1994.
- MARCHAND, M.; KOOYSTR, U. WIERENGA, R.K.; LAMBEIR, A.M.; BEEUMEN, J.; OPOERDOES, F.R.; MICHELS, P.A. Glucoseophosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* Cloning and characterization of the gene and analysis of the enzyme **Eur. J. Biochem.** v.184, p.455-464, 1989.
- VOET, D; VOET, J.G. **Biochemistry** 2ed USA John Wiley & Sons Inc., 1995

Capítulo – 5

Modelagem molecular por homologia

da Enzima phosphoglucose isomerase de *T. brucei*

Atualmente são disponíveis seis estruturas cristalográficas de PGI, provenientes de três diferentes organismos, sendo eles: músculo de porco, músculo de coelho e *Bacillus stearothermophilus*. A enzima de porco foi resolvida a 3.5 Å, depositadas apenas as coordenadas dos carbonos alfas. Em contrapartida as estruturas provenientes de *Bacillus stearothermophilus*, quatro no total, possuem uma identidade seqüencial muito baixa quando alinhada com a PGI-Tb (em torno de 21%). Com o objetivo de conhecer a estrutura tridimensional da enzima PGI-Tb, vários ensaios de cristalização foram realizados, perfazendo um total de, aproximadamente, 500 condições de cristalização. Foram exploradas duas temperaturas: 4 e 18°C. Até o momento não foi possível obter um cristal de proteínas e dar início aos estudos estruturais. Diante desse quadro, optou-se por realizar estudos estruturais da PGI-Tb através da técnica de modelagem molecular por homologia. Essa técnica fundamenta-se na construção de modelos tridimensionais baseados em estruturas homólogas resolvidas experimentalmente. Para a construção de modelos de PGI-Tb utilizou-se como molde a estrutura de PGI de músculo de coelho, que possui 58% identidade seqüencial. O objetivo principal é conhecer o sítio ativo da enzima e sugerir compostos que interagissem seletivamente com ele, mantendo a enzima do hospedeiro levemente afetada. Os estudos estruturais por modelagem, realizada com a PGI-Tb, serão apresentados no capítulo que hora se inicia.

5.1) Modelagem por homologia

Nas últimas décadas, o estudo de estruturas de proteínas tem sido cada vez mais intenso. Isso porque detalhes atômicos de enzimas consideradas chaves tem permitido o entendimento de seu funcionamento. Esse conhecimento permite o desenvolvimento de compostos que podem interagir com a enzima de modo a diminuir sua atividade ou mesmo inativá-la. A cristalografia tem sido a técnica mais utilizada para a determinação de estruturas tridimensionais de proteínas [Babu et al., 1995], seguida pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Porém, a técnica mais utilizada ainda esbarra na obtenção de cristais, sendo considerada um dos passos cruciais na determinação de estruturas. Os cristais de proteínas são arranjos ordenados e periódicos de átomos nas três dimensões. A cristalização de moléculas a partir de uma solução é um fenômeno de equilíbrio reversível, cujos parâmetros termodinâmicos e cinéticos dependem de propriedades físico-químicas do soluto e do solvente envolvido. Sabe-se que, sob condições de supersaturação, o sistema é guiado para um estado de equilíbrio, no qual o soluto é dividido entre as fases líquida e sólida. As moléculas perdem liberdade rotacional e translacional, diminuindo a entropia do sistema. Em soluções extremamente concentradas, onde não há moléculas de água suficientes para manter a hidratação, as moléculas do soluto saem da condição solúvel e passam para o estado sólido, podendo agregarem-se em um precipitado amorfo ou em um cristal [McPherson, 1982]. Um precipitado amorfo corresponde a um mínimo de energia local e freqüentemente ocorre, quando a agregação se dá muito rapidamente. Sendo assim, a estratégia usada para induzir a cristalização de macromoléculas é conduzir o sistema lentamente para um

estado de solubilidade mínima, e, deste modo, atingir o grau desejado de supersaturação. Os parâmetros envolvidos na cristalização de proteínas são: força iônica, pH, temperatura, concentração de proteína e agentes precipitantes, pureza da amostra, tempo, difusão e convecção, volume da amostra, densidade e viscosidade, campo elétrico e magnético, vibração e sons, seqüência de eventos e outros [Ducruix, 1992]. Com tantas variáveis envolvidas, o processo de obtenção de cristais é referido por alguns autores como sendo uma arte propriamente dita.

Como o processo na obtenção de cristais é empírico e com tantas variáveis nem sempre controladas, isso limita o processo de obtenção de cristais necessário para a obtenção experimental da estrutura de macromoléculas biológicas. Nesse contexto a técnica de modelagem molecular por homologia vem apoiando as duas principais formas experimentais de obtenção de estruturas, que são a difração de raios-X por monocristal e a Ressonância Magnética Nuclear, no sentido de predizer a estrutura tridimensional de proteínas biológicas.

Dentre os métodos teóricos de obtenção de estruturas listam-se os métodos físicos e os métodos empíricos. Os métodos físicos baseiam-se nas interações entre átomos, utilizando as teorias de dinâmica molecular e minimização de energia entre outras, enquanto que os métodos empíricos, onde se enquadram a técnica de modelagem por homologia, dependem de informação de estruturas já determinadas experimentalmente [Makino, 2000].

A técnica de modelagem molecular nem sempre tem a intenção de substituir as técnicas experimentais, entretanto sua contribuição pode ser muito grande, uma vez que novos e rápidos programas têm sido elaborados. Métodos de avaliação cada vez mais

rigorosos têm sido implementados, resultando em modelos confiáveis e no fornecimento de informações úteis, que podem ser usadas para explicar observações experimentais e planejar novos experimentos. Essa técnica tem sido útil, pois a velocidade em que seqüências de proteínas são depositadas é cerca de dez vezes maior que a velocidade com que são depositadas estruturas resolvidas experimentalmente [Sternberg, 1996]. A praticidade da técnica reside no fato de que estruturas tridimensionais podem ser preditas, baseadas apenas na similaridade desta com proteínas com estruturas já determinadas experimentalmente.

O princípio do método baseia-se no fato de que haverá pouca alteração na estrutura tridimensional de uma proteína quando sua seqüência primária é levemente alterada [Sali; Blundell, 1993]. Os métodos de modelagem molecular por homologia consistem em quatro passos seqüenciais. O primeiro passo é identificar as proteínas com estruturas resolvidas que são homólogas com a seqüência alvo. O segundo é alinhar a seqüência alvo com a (s) seqüência (s) da (s) proteína (s) com estrutura (s) resolvida (s) experimentalmente. O terceiro é a construção de modelos tridimensionais para a seqüência alvo, dando para o programa o alinhamento e arquivo de coordenadas da proteína com estrutura resolvida. O quarto e último passo consiste na avaliação dos modelos gerados utilizando-se uma variedade de critérios.

A maior diferença entre os métodos de modelagem por homologia é como o modelo tridimensional é calculado a partir de um dado alinhamento. O método de modelagem original e, ainda o mais amplamente usado, é o de corpo rígido. Esse método permite a construção do modelo a partir de corpos rígidos que incluem regiões centrais, loops e cadeias laterais, todos obtidos de estruturas relacionadas. Outra família de

métodos é a modelagem por ajuste de segmentos, que atribui posições aproximadas para os átomos conservados nos moldes para calcular as coordenadas de outros átomos. Isso é alcançado pelo uso de um banco de dados de pequenos fragmentos de estrutura de proteínas, regras de energia ou geométrica, ou alguma combinação destes critérios. O terceiro grupo de métodos é modelagem por satisfação de restrições espaciais, que usa técnicas de otimização para satisfazer as restrições espaciais obtidas do alinhamento da seqüência alvo com os moldes homólogos de estrutura conhecida.

Uma abordagem automatizada para a modelagem molecular por homologia, baseada em restrições espaciais, foi implementado pelo programa Modeller [Sali; Blundell, 1993] (<http://guitar.rockefeller.edu>), que calcula modelos de proteínas impondo restrições espaciais obtidas de estruturas homólogas.

Este programa tem sido avaliado com sucesso nos vários encontros de *Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction* (CASP), que desde 1994 ocorre com o objetivo de avaliar métodos de predição de estrutura de proteínas.

A modelagem por homologia realizada pelo programa Modeller inicia-se com o alinhamento da seqüência alvo com a seqüência da proteína que possui estrutura determinada. O arquivo de saída, obtido sem nenhuma intervenção do usuário, contém os modelos tridimensionais, contendo todos os átomos da cadeia principal e das cadeias laterais com exceção dos átomos de hidrogênio. A etapa final consiste na avaliação dos modelos gerados. No caso particular da PGI-Tb, foram utilizados três programas, que serão brevemente considerados.

Procheck – Avalia os seguintes parâmetros estereoquímicos: ângulos torcionais Φ , ψ , e ω , planaridade das ligações peptídicas, o comprimento das ligações e os ângulos

de ligações dos átomos da cadeia principal, a geometria da ligação de hidrogênio e os ângulos diedros das cadeias laterais. Uma medida geral da qualidade (ou normalidade) de todos esses parâmetros é expressa através do fator G. Cada um dos parâmetros é comparado com o valor médio e o desvio observado em estruturas experimentais.

Quality – Através desse programa é possível avaliar o empacotamento da molécula segundo as interações átomo-átomo. Para isso, é necessário conhecer as interações típicas de cada aminoácido. Os vinte aminoácidos são divididos em oitenta fragmentos rígidos, individualmente centrados em um cubo de $16 \times 16 \times 16 \text{ \AA}$, delimitando, dessa forma, o ambiente químico de cada fragmento. Os oitenta fragmentos tem seus átomos agrupados em cinquenta e sete classes, segundo sua natureza química. Distribuições de probabilidades são calculadas a partir do número de ocorrências de cada tipo de átomo em torno de cada fragmento, utilizando um banco dados de estruturas. O resultado é composto de $80 \times 57 = 4560$ distribuições padrões que descrevem contatos atômicos típicos em proteínas, podendo ser utilizados na avaliação de um modelo. A concordância entre os contatos observados para cada fragmento rígido de cada resíduo da estrutura do modelo com as distribuições probabilísticas fornecerá o correspondente índice de qualidade dos contatos atômicos do modelo.

Verify_3D – A partir de informações de estruturas já conhecidas constrói-se uma matriz 20×18 , correspondente aos 20 tipos de aminoácidos contra 18 diferentes classes de ambiente químicos definidos segundo a estrutura secundária, exposição ao solvente e contatos com átomos polares. Cada um dos elementos S_{ij} corresponde a um ‘escore’ que indica a compatibilidade do resíduo i num ambiente j . Desta forma, a

medida da compatibilidade da seqüência do modelo com a sua estrutura é feita comparando o ambiente químico construído para cada resíduo, baseando-se na matriz.

As estratégias adotadas para a construção de modelos tridimensionais para a PGI-Tb, utilizando-se o programa modeller, podem ser resumidos nos seguintes passos:

- Pesquisa nos vários bancos de dados em busca de PGIs com e sem estrutura resolvida;
- Escolha e avaliação do molde;
- Alinhamento de seqüências primárias de várias PGIs;
- Construção e avaliação dos dez modelos preliminares;
- Tentativa de sobreposição estrutural da PGI de coelho e *Bacillus stearothermophilus*;
- Construção do dímero de PGI-Tb;
- Modificação de regiões reprovadas pelos programas Quality e Procheck;
- Avaliação do modelo final;
- Apresentação da Molécula através do programa Weblab.

5.2) Materiais e Métodos

5.2.1) O programa BLAST

O programa BLASTP [Altschul et al., 1997], derivado do algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Tool, [Altschul et al., 1990]), foi utilizado para encontrar seqüências de proteínas que possuem alta identidade seqüencial com a PGI-Tb.

A segunda parte da pesquisa consistiu em se realizar uma busca de PGIs com estruturas resolvidas. A busca foi realizada no Protein Data Bank (PDB), onde estão disponíveis 14351 estruturas de proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, carboidratos e complexos entre proteínas e ácidos nucleicos, [<http://www.rcsb.org/pdb/holdings.html> – pesquisa realizada em janeiro de 2001].

5.2.2) O Programa Multalign

O programa Multalign do pacote AMPS – Alignment of Multiple Protein Sequences (v. 2.0) [Barton; Sternberg, 1987] - foi utilizado para realizar os alinhamentos necessários para a construção dos modelos. Inicialmente, as PGIs de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* e músculo de coelho foram alinhadas com a PGI-Tb. Outros novos alinhamentos foram realizados, sendo eles:

- 1) PGI-Tb e a estrutura de músculo de coelho, código PDB (1DQR);
- 2) músculo de coelho e *Bacillus stearothermophilus*;
- 3) PGI-Tb, músculo de coelho e *Bacillus stearothermophilus*.

Baseado no algoritmo de Needleman e Wunsch [Needleman; Wunsch, 1970], o programa foi utilizado com a matriz Dayhoff com a penalidade de 8 para a ocorrência de gaps.

5.2.3) O Programa Modeller

Para a construção de modelos teóricos da PGI-Tb, foi utilizado o programa Modeller [Sali; Blundell, 1993] versão 6.0. É necessário fornecer ao programa o arquivo de coordenadas da molécula molde no formato PDB, o alinhamento da seqüência alvo e o molde no formato PIR, e, por último, um arquivo com as instruções para o funcionamento do programa no formato TOP.

O alinhamento fornecido ao programa era composto da seqüência alvo PGI-Tb junto com a seqüência primária da PGI de músculo de coelho obtido através do programa Multalign.

No arquivo de instruções foram explicitados parâmetros, como o nome das coordenadas utilizadas, o nome do alinhamento e da seqüência a ser modelada, e também foi fornecida a quantidade de modelos desejados (10 no total), além de parâmetros que controlam o protocolo de construção e refinamento do modelo, limites para a redução de restrições e outros. O valor da randomização inicial dos modelos foi de 4Å. Um outro parâmetro modificado foi o número máximo de interações de ciclos para o uso do VTFM (variable target function method), que foi aumentado de 200 para 300. Desta forma, foram realizados 300 ciclos de otimização para cada modelo construído. Os demais parâmetros fornecidos eram padrão do programa.

A seguir são apresentados os passos para a construção de modelos, utilizando o programa modeller:

- 1) Leitura e checagem do alinhamento;
- 2) Cálculo das restrições para o modelo a partir de seu alinhamento com o molde;
- 3) Cálculo do modelo que satisfaz as restrições tão bem quanto possíveis;
- 4) Para cada modelo são realizados os ciclos de otimização;
- 5) Escrita do modelo e dos arquivos de saída com os registros da modelagem.

Desta forma, foram construídos dez modelos para a PGI-Tb. O modelo com menor valor de energia e que melhor satisfaz as avaliações estereoquímicas e de contatos atômicos foi utilizado como o modelo de PGI-Tb.

5.2.4) Avaliação da estrutura da PGI de coelho e do modelo

A estrutura de PGI de músculo de coelho (1DQR) e o modelo final da PGI-Tb foi submetida a avaliações estereoquímicas, contatos atômicos e ambiente químico utilizando-se os programas Procheck [Laskowski et al., 1993] e Whatif no modo Quality [Vriend; Sander, 1993] e Verify-3D [Luthy et al., 1992].

5.2.5) O Programa ‘O’

As regiões que não apresentaram uma boa avaliação estereoquímica, como aquelas ao redor dos resíduos Thr-49, Lys-94, Ala-276 e Asp-279 que permaneceram fora da região permitida no diagrama de Ramachandran, foram substituídas por loops, utilizando para isso um banco de proteínas contidas no programa “O” [Jones et al., 1991]. Esse programa possui um banco de estruturas de proteínas resolvidas a alta resolução (maiores que 2 Å). A região da molécula a ser substituída é selecionada e usada para encontrar um loop nas várias proteínas do banco. Em seguida, são listados opções que possuem menores valores de RMS entre o loop encontrado e o loop a ser substituído. Após a escolha e substituição de loops que melhor se encaixam na região analisada, procedeu-se com a alteração dos rotâmeros e posterior avaliação estereoquímica.

Após a alteração nas regiões mencionadas acima, consideraram-se as regiões ao redor dos resíduos Asn-362, Lys-468, Gln-564 e Arg-582, que têm em comum um valor baixo de ‘score’ apontado pelo programa Quality, e, simultaneamente, apresentavam problemas estereoquímicos. Em seguida, as regiões consideradas foram aquelas que apresentaram um baixo valor de ‘score’ apontado pelo programa Quality. Após todas as alterações mencionadas, o modelo foi submetido à minimização de energia. O processo de minimização se deu através do programa INSIGHT II / Discover, utilizando o campo de força AMBER e o algoritmo STEEPEST DESCENT com 100 passos.

5.3) Resultados e Discussões

A pesquisa realizada no programa BLAST permitiu encontrar várias seqüências de PGI em diferentes bancos. A tabela 5.1 abaixo apresenta as PGIs dos diferentes organismos encontrados pelo programa, juntamente com suas respectivas identidades seqüenciais, determinadas pelo programa Multalign método pairwise.

TABELA 5.1 – PGIs provenientes de diferentes organismos e seus respectivos valores de identidade seqüencial em relação a PGI-Tb.

| Organismos | Identidade (%) |
|----------------------------|-----------------------|
| <i>Trypanosoma cruzi</i> | 75 |
| <i>Leishmania mexicana</i> | 70 |
| <i>Vibrio cholerae</i> | 60 |
| <i>Escherichia coli.</i> | 58 |
| Músculo de coelho | 57 |

As PGIs encontradas foram usadas para verificar quais resíduos entre elas são conservados. Observou-se que grande parte dos resíduos foram conservados, entre eles Ser-159, Ser-209, Lys-210, Thr-211, Thr-214, Arg-272, Gln-511 e Val-514 que, segundo Jeffery [Jeffery et al., 2000], são os resíduos que fazem contatos com o inibidor 6-fosfogluconato. Além destes, os resíduos Glu-216, His-388 e Lys-518, responsáveis pela catálise, também se conservaram. A figura 5.1 apresenta o alinhamento obtido para a seqüência da PGI de coelho e PGI-Tb, destacando os resíduos mencionados.

```

          10          20          30          40          50          60
1dqr    FQKLQQWHR-----EHGSELNLRHLFDTKERFNHFSLTNTNHGH---ILLDYSKNLVTEEVMMHLL
pgit    LTSCASWTQLQKLYEQYGDEPIKKHFEADSERGQRYSVKVSLSGSKDENFLFLDYSKSHINDEIKCALL
consvd   *      *              * * * *      *              * * * * *      *      **

          70          80          90          100         110         120         130
1dqr    DLAKSRGVEAARESMFNGEKINSTEDRAVLHVALRNRNTPIVVDGKDVMPPEVNVKVLDMKAFQQRVR
pgit    RLAEERGIRQFVQSVFRGERVNTTENRPVLHIALRNRNRPPIYVDGKDVMPAVNKVLDQMRSFSEKVR
consvd   ** **      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          140         150         160         170         180         190         200
1dqr    SGDWKGYTGKTTIDVINIGIGGSDLGPLMVTEALKPYSSGGPRVWFVSNIDGTHIAKTLACLNPESL
pgit    TGEWKGHTGKAIRHVVNIGIGGSDLGPMATEALKPFSQRDLSLHFVSNVDGTHIAEVLKSIDIEATL
consvd   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          210         220         230         240         250         260         270
1dqr    FIIASKTFTTQETITNAKTAKD---WFLLSAK--DPSTVAKHFVALSTNTAKVKEFGIDPQNMFEFWD
pgit    FIVASKTFTTQETITNALSARRALLDYLRSGIDEKGSVAKHFVALSTNNQKVKEFGIDEENMFQFWD
consvd   ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          280         290         300         310         320         330         340
1dqr    WVGGRYSLWSAIGLSIALHVGFDFNFEQLLSGAHWMDQHFRTPLEKNAPVLLAMLGWIWYINCFGCETQ
pgit    WVGGRYSMWSAIGLPIMISIGYENFVELLTGAHVIDEHFANAPPEQNVPLLLALVGVWYINFFGAVTH
consvd   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          350         360         370         380         390         400
1dqr    AVLPHYDQYLHRFAAYFQQGMESNGKYITKSGARVDHQGTGPIVWGEPTNGQHAFYQLIHQGTKMIPC
pgit    AILPHYDQYLWRLPAYLQQLDMESNGKYVTRSGKTVSTLTGPIIFGEAGTNGQHAFYQLIHQGTNLIPC
consvd   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          410         420         430         440         450         460         470
1dqr    DFLIPVQTOHPPIRKGLHKKILLANFLAQTEALMKGKSTEEARKELQAAG-KSPEDLMKLLPHKVFEGN
pgit    DFIGAIQSQNKI--GDHHKIFMSNFFAQTEALMIGKSPSEVRRELEAAGERSAEKINALLPHKTFIGG
consvd   ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          480         490         500         510         520         530         540
1dqr    RPTNSIVFTKLTFFILGALIAMYEHKIFVQGVVWDINSFDQWGVELGKQLAKKIEPELDGSSPVTSHD
pgit    RPSNTLLIKSLTPRALGAI IAMYEHKVLVQGAIWIGIDSYDQWGVELGKVLAKSILPQLRPGMRVNNHD
consvd   ** *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          550         560
1dqr    SSTNGLINFIKQOREAK
pgit    SSTNGLINMFNELSHL-
consvd   * * * * * * *

```

FIGURA 5.1- Alinhamento entre a seqüência de PGI de músculo de coelho (código PDB - 1DQR) e PGI-Tb. Os resíduos destacados em azul interagem com o inibidor 6-fosfogluconato na estrutura. Os resíduos em vermelho estão envolvidos na catálise enzimática. As estrelas apontam para os resíduos conservados nas duas seqüências.

Pesquisas realizadas no PDB revelaram que existem apenas seis estruturas de PGI provenientes de três diferentes organismos: Coelho (código PDB - 1DQR), *Sus scrofa* (código PDB - 1PGI) e *B. stearothermophilus* (código PDB - 1BOZ, 1C7Q, 1C7R, 2PGI).

Das estruturas de PGI encontradas, aquela proveniente de músculo de porco (*Sus scrofa*) resolvida a 6.0 Å, e em seguida, a 3.5 Å [Shaw et al., 1977], foi dispensada. Essa estrutura, além de ser resolvida a baixa resolução, na época não se conhecia a seqüência primária da enzima, impossibilitando o seu refinamento. Desse modo o arquivo PDB contém apenas as coordenadas dos carbonos α .

Dois critérios foram adotados para escolher a proteína molde: a identidade seqüencial e a resolução. A tabela 5.2, apresenta as estruturas encontradas no PDB, juntamente com a resolução e a identidade seqüencial em relação a PGI-Tb.

TABELA 5.2 – Valores da resolução e identidade seqüencial das PGIs de *Bacillus stearothermophilus* e músculo de coelho encontrado no PDB.

| Estrutura | Resolução (Å) | Identidade (%) |
|-----------|---------------|----------------|
| 1DQR | 2.5 | 58.70 |
| 1B0Z | 2.3 | 21.95 |
| 1C7Q | 2.3 | 21.95 |
| 2PGI | 2.3 | 21.95 |
| 1C7R | 2.5 | 21.95 |

As estruturas com códigos PDB (1B0Z, 1C7Q, 2PGI, 1C7R) são todas provenientes de *B. stearothermophilus*, e possui uma identidade seqüencial de 21.95%. Já a PGI de músculo de coelho (código PDB – 1DQR), resolvida a 2.5Å, possui 58.70 % de identidade seqüencial sendo portanto utilizada como molde na construção dos modelos de PGI-Tb.

Experiências na construção de modelos têm revelado que é importante fazer avaliação nos moldes. O programa Procheck apresentou um bom resultado na avaliação estereoquímica do molde (1DQR), apresentando um fator G global de 0.3 sendo que os valores aceitáveis devem ser maiores que - 0.5. O diagrama de Ramachandran mostra que 86.9% dos resíduos encontram-se em regiões favoráveis, 12.3 % em regiões permitidas e 0.8 % em regiões generosamente permitidas. Apenas quatro resíduos apresentaram problemas estereoquímicos: Ala 2, Asn 46, Asp 139 e Ser 175.

O módulo Quality (OLDQUA) fornece um valor final: a média de todos os índices parciais de contatos atômicos. Este é um critério de avaliação global da estrutura modelada, onde valores acima de -1.5 são considerados corretos. A estrutura 1DQR apresentou um valor de -0.78 e, portanto, correto, segundo esse critério.

A avaliação do modelo de PGI-Tb foi realizada utilizando-se os mesmos critérios. As figuras 5.2 e 5.3 mostram os resultados obtidos durante a avaliação.

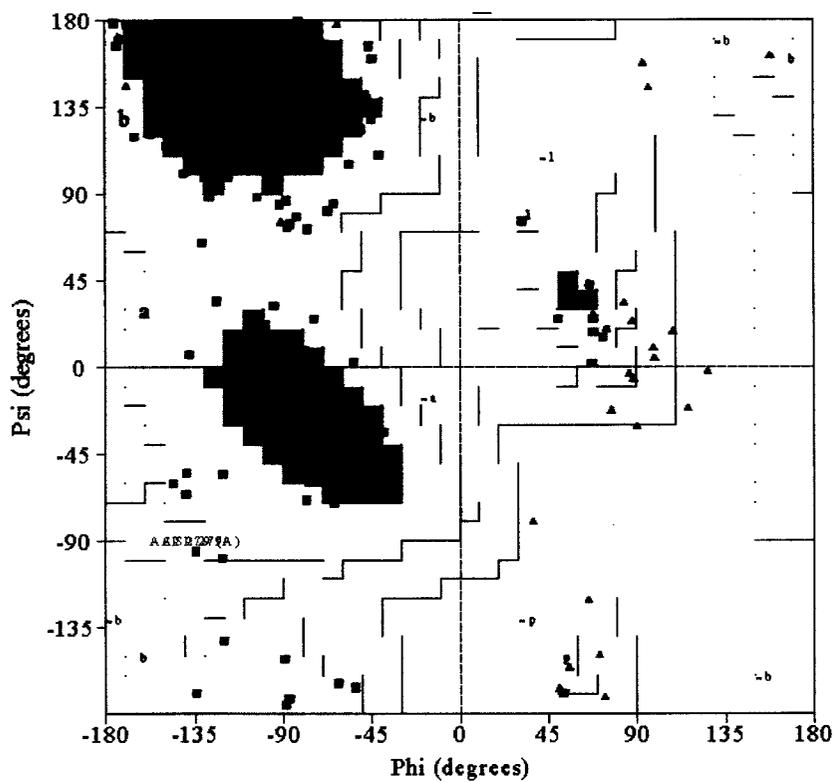


FIGURA 5.2- Diagrama de Ramachandran com a disposição dos ângulos diedros para o dímero de PGI-Tb

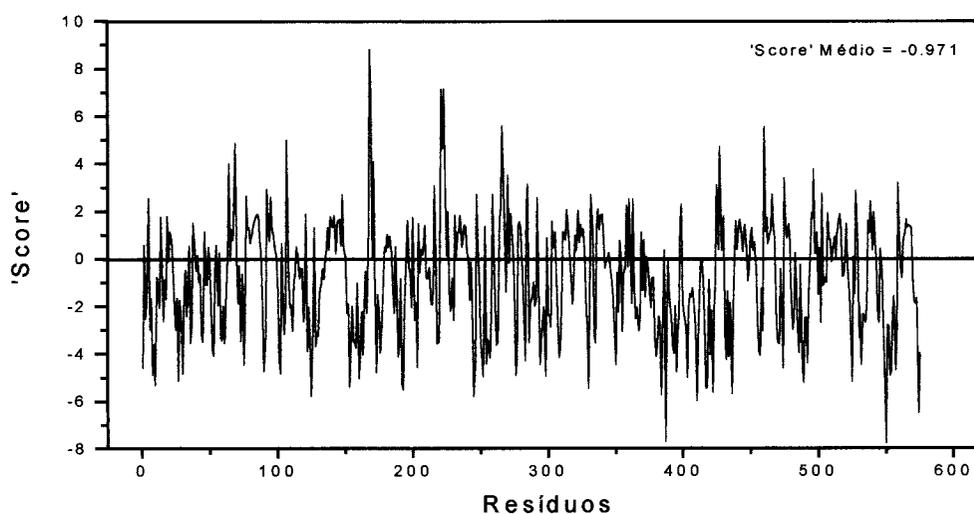


FIGURA 5.3 - Distribuição de score para o monômero do modelo de PGI-Tb avaliado pelo programa Whatif modo Quality.

O valor de 'score' maior que $-0,5$ é atribuído a um excelente modelo. Os valores contidos no intervalo $-0,5$ e $-1,0$ são referentes a um modelo de ótima qualidade; aqueles entre o intervalo $-1,0$ e $-1,5$ são atribuídos aos modelos bons, requerendo porém, alguns ajustes. Valores de 'score' menores que $-1,5$ são referentes a modelos muito pobres, que provavelmente não condizem com a realidade.

Após a obtenção dos dez modelos gerados pelo programa Modeller escolheu-se aquele que apresentava simultaneamente menor valor de energia, melhores resultados estereoquímicos e de contato atômico. O melhor modelo apresentou um diagrama de Ramachandran contendo quatro resíduos que necessitaram ser analisados. Esses resíduos, juntamente com aqueles que apresentaram um 'score' baixo segundo o programa Quality, foram substituídos por novos loops. A substituição foi realizada através do programa 'O'.

Várias regiões da enzima PGI-Tb foram analisadas segundo esse método, sendo possível obter um diagrama de Ramachandram com apenas um resíduo fora da região (figura 5.2). O resíduo mencionado trata-se de um Asp 230, que possui um ângulo Phi e Psi em torno de -135 e -90 , respectivamente. É possível observar, através do diagrama, que o mesmo encontra-se em uma região muito próxima a permitida, de tal forma que submetendo a molécula a uma minimização de energia, isso poderá ser suficiente para a inclusão do resíduo para dentro da região permitida.

Optou-se, entretanto, em manter a molécula com esses resultados de avaliação, uma vez que os mesmos mostraram-se muito satisfatórios. Os resultados, segundo os contatos atômicos, foram classificados como ótimo (score médio $-0,97$), além de apresentar uma estereoquímica excelente (Fator G = 0.1).⁴¹

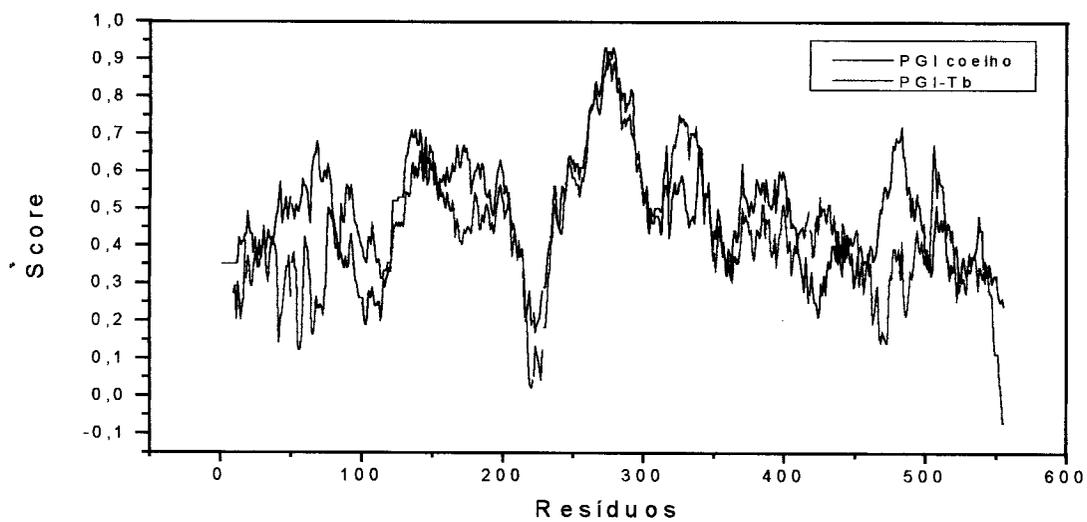
Um terceiro critério foi usado para fazer a avaliação do modelo de PGI-Tb, através do programa Verify-3D [Luthy et al., 1992]. São analisadas as compatibilidades do modelo com a seqüência de aminoácidos, utilizando o perfil 3D. Cada resíduo no modelo tridimensional é caracterizado por seu ambiente químico (são utilizados 18, baseados na estrutura secundária, contatos polares e acessibilidade do resíduo). Pode ser caracterizada a preferência estatística do ambiente para cada um dos 20 aminoácidos. O 'score' do perfil 3D para a compatibilidade do modelo com a seqüência é a soma dos 'scores' 3D para todos os resíduos da proteína. Além disso, o programa calcula o valor estatisticamente esperado para uma seqüência de aminoácidos do mesmo comprimento. A estrutura é considerada aceitável se o valor de 'score' (S) obtido for maior que 45% do valor estatisticamente esperado. Os valores dos perfis 3D para o modelo de PGI-Tb são mostrados na tabela 5.3.

TABELA 5.3 – Valores de ‘Score’ 3D obtidos através do programa Verify 3D para o modelo de PGI-Tb

| | Score obtido | Score Calculado | 45% Score Calculado |
|---------------|--------------|-----------------|---------------------|
| Modelo_PGI-Tb | 480 | 559 | 251 |

O valor de ‘score’ de 480, obtido para o modelo de PGI-Tb, é superior ao valor 251, que corresponde a 45% de ‘score’ estatisticamente esperado. Além disso, esse valor se aproxima muito do valor estatisticamente esperado, que é de 559. Portanto, o modelo demonstra uma boa qualidade, segundo os critérios de avaliação.

Além da soma de ‘score’ para os resíduos que compõem o modelo, é interessante avaliar a variação desse parâmetro ao longo da molécula, possibilitando a análise de possíveis regiões problemáticas. A figura 5.4 apresenta a variação de ‘score’ obtido para o modelo de PGI-Tb comparada com a enzima molde ao longo da sua seqüência.

**FIGURA 5.4** - Valores de score obtidos ao longo da seqüência de PGI-Tb e PGI de coelho através do programa verify 3D.

O resultado apresentado pelo programa verify 3D mostrou-se muito satisfatório, é interessante salientar que os valores de ‘score’ obtidos ao longo da molécula estão em concordância com os resultados apresentados pelo molde. As regiões que apresentaram baixos valores de ‘escores’ como aquelas entre os resíduos 40 e 80, 200 e 250 e 450 e 500 correspondem a regiões de loop, essas regiões flexíveis podem explicar o comportamento observado.

A figura 5.5 abaixo apresenta os carbonos α das PGI de coelho e humana resolvida recentemente [Cordeiro, 2001] sobrepostas ao modelo de PGI-Tb. A sobreposição dos carbonos α se dá de forma satisfatória com exceção de algumas regiões próxima ao C e N-terminal da molécula onde é observado uma pequena diferença. A PGI de coelho e o modelo PGI-Tb apresentou um RMS de sobreposição de 0.129Å para os carbonos α .

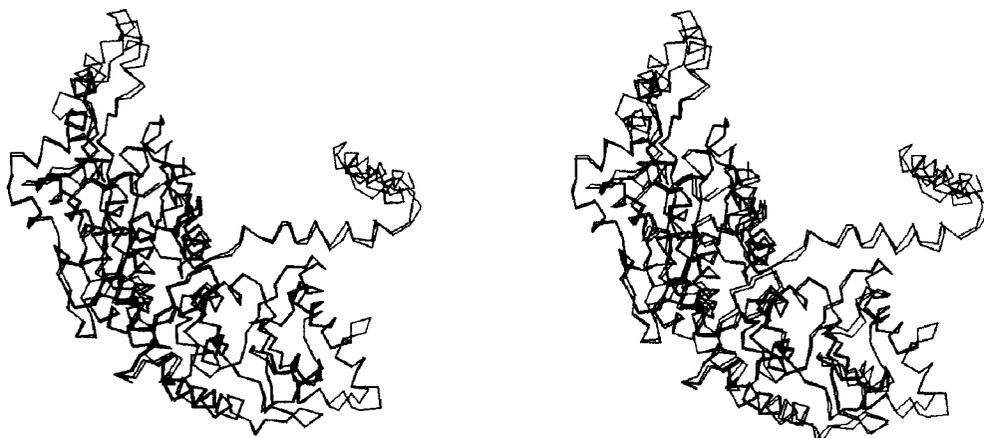


FIGURA 5.5 - Sobreposição estrutural dos carbonos α das estruturas de PGI humana (verde), PGI-coelho (azul) com o modelo de PGI-Tb (vermelho).

A reação catalisada pela PGI envolve os resíduos His, Glu e Lys. A figura 5.6 abaixo apresenta o sítio ativo para a PGI humana e de coelho sobreposta ao modelo.

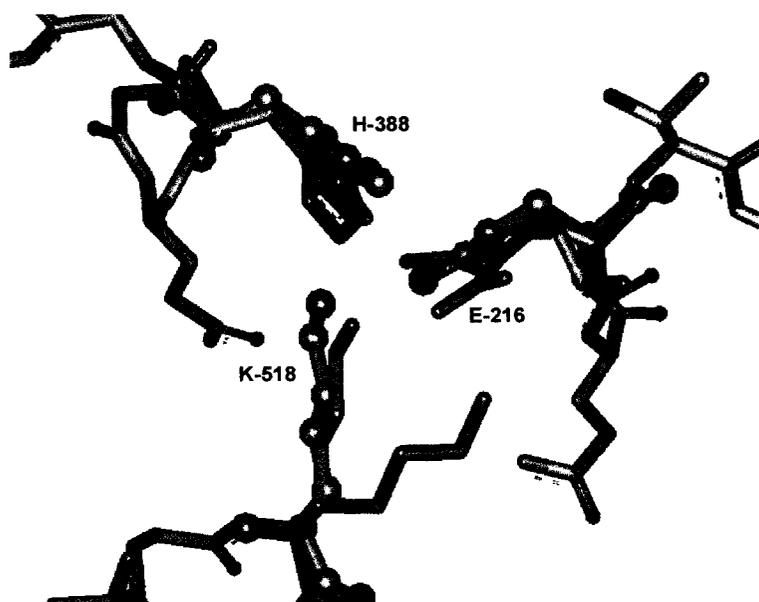


FIGURA 5.6 - Sobreposição estrutural entre as PGI humana (laranja), coelho (bastão) e PGI-Tb (bastão a bolas) na região do sítio ativo, destacando os resíduos His, Glu e Lys.

Os resíduos His, assim como o Glu, sobrepuseram-se de forma muito satisfatória para as três moléculas. Apenas a Lys, na PGI humana, apresentou uma pequena diferença, como pode ser observado claramente na figura 5.6.

Como já foi mencionado anteriormente, o modelo de PGI-Tb foi obtido utilizando-se como molde a estrutura de coelho. Essa estrutura foi obtida em complexo com o inibidor 6-fosfogluconato no sítio ativo. A interação com o inibidor provavelmente interfere na disposição dos resíduos do sítio ativo, provocando uma alteração na Lys. O programa Modeller ajustou a Lys do modelo de acordo com a estrutura molde, resultando em uma maior proximidade entre esses resíduos. A estrutura

humana, resolvida recentemente [Cordeiro, 2001], apresenta a Lys voltada para outra direção, uma vez que não existe ligante no seu sítio ativo.

Em termos gerais, os sítios ativos das moléculas são muito parecidos. Essa similaridade pode gerar uma certa dificuldade na escolha de um inibidor específico contra a enzima do parasito.

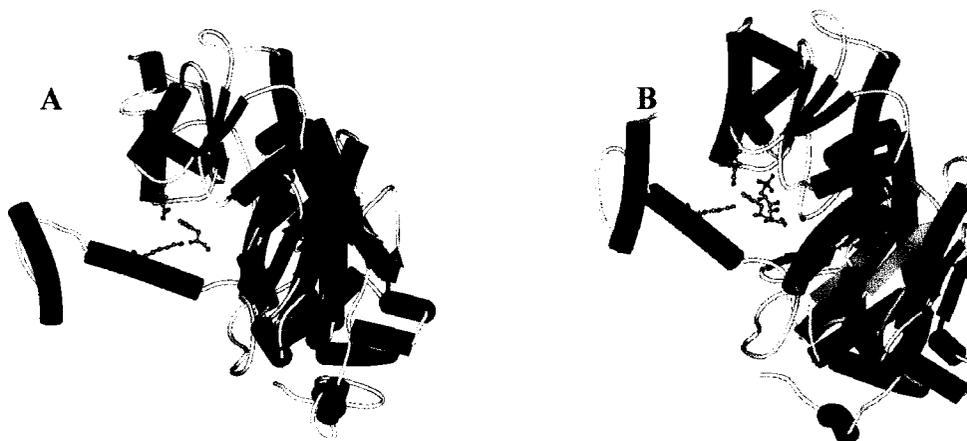


FIGURA 5.7 – A) Monômero do modelo de PGI-Tb ressaltando a tríade catalítica. B) monômero da PGI de músculo de coelho apresentando a tríade catalítica ligada ao inibidor 6-fosfogluconato.

O monômero do modelo final da PGI-Tb apresentou dois domínios. O menor deles contém 4 folhas β paralelas entre α hélices e loops formando uma estrutura tipo Sandwich, (figura 5.7). O maior contém quatro folhas β paralelas e duas antiparalelas. A região situada entre os domínios e as interfaces entre os monômeros se sobrepõe para formar a região do sítio ativo (figura 5.7).

Uma outra região interessante a ser considerada na molécula é o sítio de especificidade. Essa região é formada pelos resíduos Ser159, Ser 209, Thr 214 e Thr 217 e está localizada entre os dois domínios da subunidade. Alguns elementos de estrutura

secundária auxiliam na formação do bolsão e cada um deles consiste de resíduos de ambas subunidades do dímero, e de ambos domínios da subunidade. A figura 5.8 abaixo apresenta o sítio de especificidade do substrato localizado no monômero do modelo e a sobreposição dessa região com a PGI de coelho.

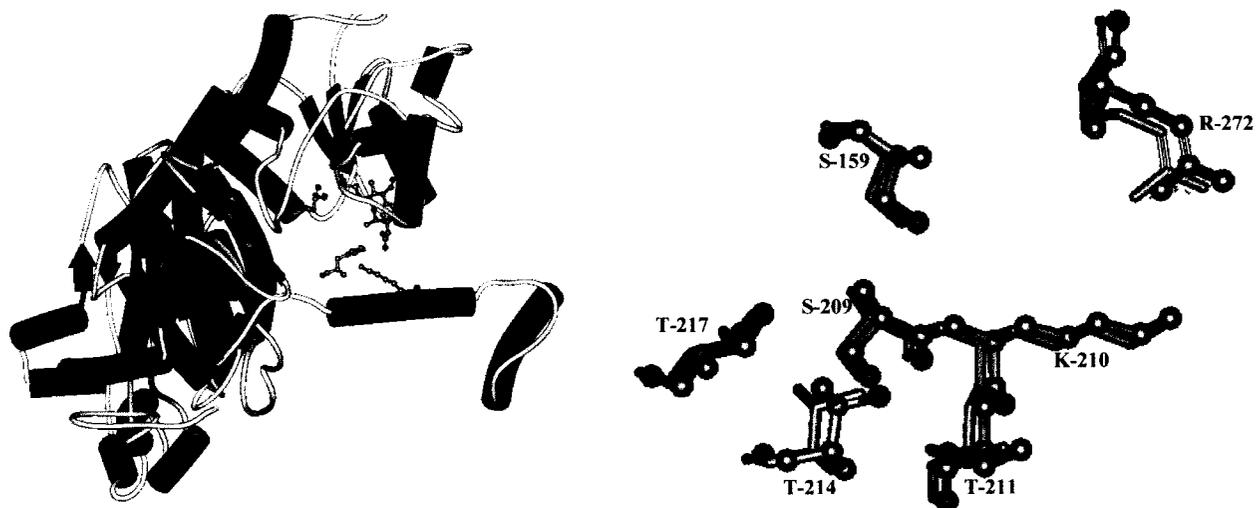


FIGURA 5.8 - Monômero do modelo de PGI-Tb ressaltando a localização do sítio de especificidade pelo substrato e a mesma região sobreposta a PGI de músculo de coelho.

Na estrutura da PGI de coelho, os resíduos Ser 159, Ser 209, Thr 211 e Thr 214 formam ligações de hidrogênio com o grupo fosfato do inibidor competitivo 6-fósfogluconato. Uma outra ligação de hidrogênio é feita entre o grupo fosfato e uma molécula de água à cadeia lateral do grupo hidroxil da Thr 217. O grupo fosfato ainda interage com o nitrogênio da cadeia principal dos resíduos Lys 210 e Thr 211. Essas interações e cargas parciais existentes explicam a especificidade da enzima por açúcares fosfatados e porque açúcares não fosfatados não são bons competitivos inibidores.

A eficiência do inibidor 5PAA provavelmente se deve pela presença de um grupo carboxilato em uma das extremidades da molécula (figura 4.4). Esse grupo provavelmente está interagindo com a Arg 272, como foi mencionado no capítulo anterior. A figura 5.9 abaixo apresenta o sítio ativo da PGI de músculo de coelho com o inibidor 6-fosfogluconato.

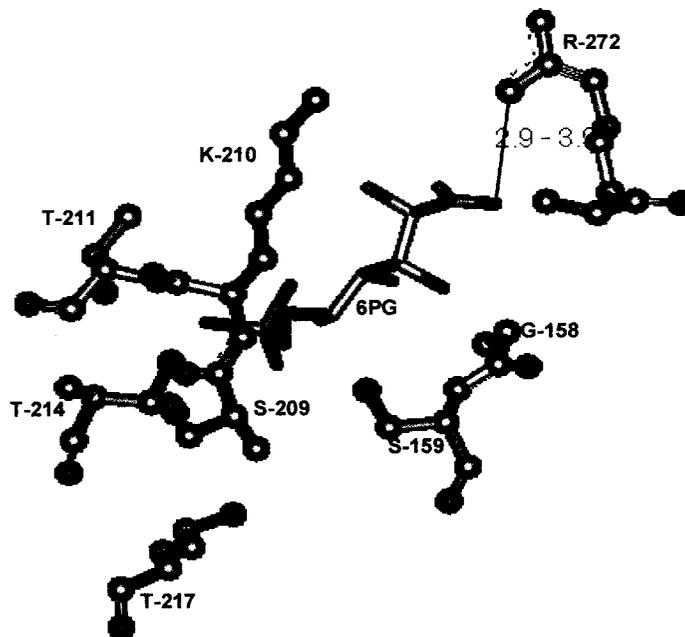


FIGURA 5.9 – Sítio ativo da PGI de coelho resolvida a 2.5 Å de resolução em complexo com o inibidor 6-fosfogluconato

É interessante salientar o favorecimento da interação entre a Arg 272 e o grupo carboxilato do inibidor, uma vez que estes possuem cargas opostas. Essa interação é comprovada pela distância de ligação de 3.42 Å, como é apresentado na figura 5.9 na estrutura de PGI de coelho. O fato desse inibidor possuir 5 carbonos em sua composição

provavelmente o coloca em destaque em relação aos inibidores com maior número de carbonos, pois existe uma distância ótima entre o fósforo e o nitrogênio da Arg272. Esse fato refletiu nos valores de K_i observados por Hardré [Hardré et al., 1998], onde o composto 5PAA (5 carbonos) apresentou um K_i de 2,1 μM , e o composto 6-fosfogluconato (6 carbonos) apresentou um K_i de 123 μM , para a PGI de levedura.

Portanto, compostos com 5 átomos de carbono que possuem um grupo fosfato em uma das extremidades e um grupo carboxilato na extremidade oposta provavelmente serão bons inibidores de PGI.

O fato do sítio ativo ser muito conservado nas várias PGIs analisadas dificulta a escolha de um inibidor específico para a PGI-Tb. Entretanto, estudos realizados com o inibidor ácido agarícico revelaram que o mesmo possui um IC_{50} de 10 μM com a PGI-Tb, sendo que as enzimas de levedura e de coelho foram pouco afetadas. A análise dos contatos desse inibidor com o sítio ativo do modelo poderá fornecer informações úteis no planejamento de um inibidor específico contra a PGI-Tb.

5.4) Conclusões

Com os resultados obtidos através da técnica de modelagem por homologia pode-se concluir que:

- Foi possível construir um bom modelo tridimensional da enzima PGI-Tb segundo os resultados apresentados pelos programas Procheck, Quality e Verify 3D;
- O modelo gerado poderá ser usado para fazer previsões de possíveis inibidores seletivos;
- O modelo possui um sítio ativo muito parecido com a PGI de músculo de coelho e Humana;
- Compostos com cinco átomos de carbono que apresentem um grupo fosfato em uma extremidade e um grupo carregado negativamente na extremidade posterior possivelmente serão bons inibidores de PGI-Tb.

5.5) Referências Bibliográficas

- ALTSCHUL, S.F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs *Nucl. Acids Res.* v.25 p.3389-3402 1997
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* v.215 p.403-410 1990
- BABU, S. Y.; EALICK, S. E.; BUGG, C. E.; MONTGOMERY, J. A.; SECRIST, J. Structure-Based Design of Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase *Acta Cryst.* v.D51 p.529-535 1995
- BARTON, G.J.; STERNBERG, M.J. A strategy for the rapid multiple alignment of protein sequences. Confidence levels from tertiary structure comparisons *J. Mol. Biol.* v.198 n. 2 p.327-337 1987
- CORDEIRO, Artur Torres **Determinação da estrutura cristalográfica por difração de raios-X da enzima glicose-6-fosfato isomerase humana** São Carlos, 2001. p.75 Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo
- DUCRUIX, A.; GIEGÉ, R. **Crystallization of Nucleic Acids and Proteins A Practical Approach** New York 1992
- HARDRÉ, R.; BONNETTE, C.; SALMON, L.; GAUDEMER A. Synthesis and evaluation of phosphoglucose isomerase: the enediolate analogue 5-phospho-D-arabinohydroxamate *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* v.8, p.3435-3438, 1998.
- JEFFERY, C.; BAHNSON, B.; CHIEN, W.; RINGE, D.; PETSKO, G.; Crystal Structure of Rabbit Phosphoglucose Isomerase, a glycolytic enzyme that moonlights as neuroleukin, autocrine motility factor, and differentiation mediator *Biochemistry* v.39, p.955-964, 2000.
- JONES, T.A.; ZON, J.Y.; CAVANS, S.W.; KJELGAARD, M. improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.*, v.47A p.110-119 1991
- LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS, D.S.; THORNTON, J.M. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, n.26 p.283-291 1993
- LUTHY, R.; BOWIE, J.U.; EISEMBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles *Nature* v.356 n.5 p.83-85 1992

- MAKINO, Débora Lika **Estudos Estruturais de DM 43: Um inibidor de metaloprotease de veneno de serpente extraído do soro do gambá *Didelphis marsupialis*** São Carlos, 2000. 151p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo
- McPHERSON, a **Preparation and analysis of Protein Crystals** New York John Wiley 1982 p.371
- NEEDLEMAN, S.B.; WUNSCH, C.D.; A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins **J. Mol. Biol.** v.48 n.3 p.443-453 1970
- SALI, A; BLUNDELL, T. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial 1993 **J. Mol. Biol.** v.234 p.779-815 1993
- SHAW, P.J.; MUIRHEAD, H. Crytallographic structure analysis of Glucose-6-Phosphate Isomerase at 3.5 Å Resolution **J. Mol. Biol.** v.109 p.475-485 1977
- STERNBERG, M.J.; Protein structure prediction, a pratical approach. Irl Press, p.298, 1996
- VRIEND, G.; SANDER, C. Quality control of protein models: directional atomic contact analysis **J. Appl. Cryst.**, n.26 p.47-60 1993

Conclusões e Perspectivas

No decorrer do programa de mestrado foi possível construir um plasmídeo de expressão contendo a seqüência codificadora para a enzima PGI-Tb, partindo de plasmídeos gentilmente cedidos pelo Dr. Paul Michels. A enzima foi expressa na forma solúvel e um protocolo de purificação foi desenvolvido, baseado em cromatografia líquida de afinidade por metal quelado. Essa etapa do trabalho é indispensável para o desenvolvimento de estudos posteriores com a enzima PGI-Tb. Ensaios de atividade realizados com a enzima recombinante apresentaram K_m de acordo com aqueles encontrados na literatura, demonstrando que a proteína recombinante está corretamente enovelada e pode ser utilizada para futuros estudos estruturais e funcionais.

Cerca de 500 condições de cristalização foram rastreada utilizando o método da gota suspensa. Em algumas gotas observou-se a formação de precipitados com um certo grau de ordenação. Entretanto, até o momento não foi observado em nenhuma delas a formação de um monocristal. O rastreamento de novas condições de cristalização será realizado com a finalidade de obter monocristais passíveis de serem utilizados para a coleta de dados de difração e estudos estruturais.

Experimentos visando a obtenção de cristais são imprevisíveis e dependentes de um grande número de variáveis, muitas vezes desconhecidas. Isso torna difícil apontar qual o principal motivo de não se obter um cristal. Entretanto julgamos que a extensão N-terminal de 32 resíduos não conservada entre a PGI-Tb e seus homólogos está contribuindo negativamente para o sucesso da cristalização. Uma proposta para resolver esse problema será a construção de novos plasmídeos para a expressão da enzima sem tais resíduos. Nesse sentido iniciamos a subclonagem de genes que expressarão a enzima em duas diferentes formas: uma sem 25 (Figura 3C) resíduos da extensão N-Terminal e outra construção sem 75 (Figura 3D) resíduos que fazem parte dessa seqüência N-terminal. Os resultados da modelagem sugerem que essa seqüência apresenta grande flexibilidade na superfície da proteína, dificultando ou até mesmo impedindo os contatos entre moléculas de PGI necessários ao empacotamento cristalino. A figura 6.1 abaixo apresenta esquematicamente as diferentes construções usadas para a expressão da PGI-Tb.

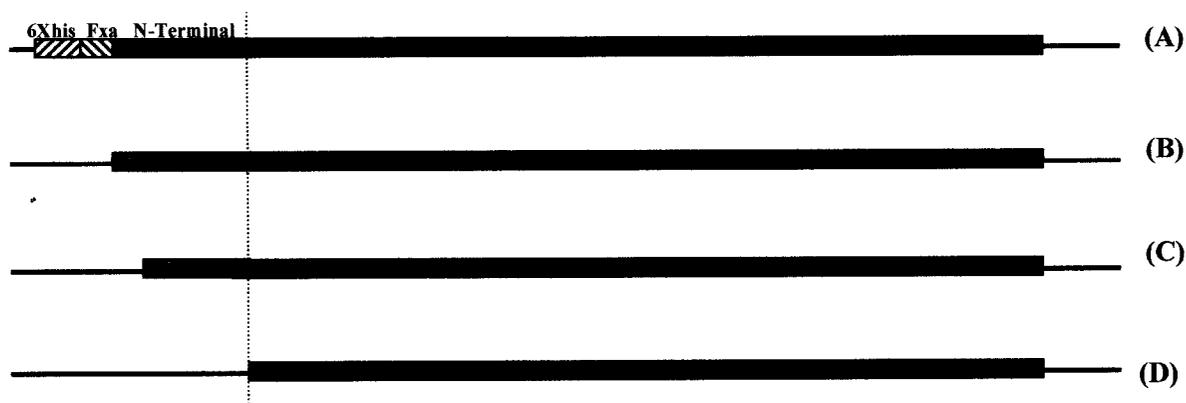


FIGURA 6.1 Representação esquemática dos diferentes genes reponsáveis pela expressão da PGI-Tb. A construção (A) representa a enzima sendo expressa com os seis resíduos de histidinas que são utilizados durante a purificação em coluna de afinidade juntamente com os resíduos que são reconhecidos pelo fator Xa. A construção (B) representa a enzima após a incubação com o fator Xa e posterior purificação utilizando-se coluna de exclusão por massa molecular. As construções (C) e (D) representam respectivamente as enzimas sendo expressas sem 25 e 75 resíduos que fazem parte da seqüência N-terminal que não apresenta alinhamento com seus homólogos.

Durante o programa de mestrado foi possível obter a enzima nas formas (A) e (B), esquematicamente representadas pela figura 6.1. Como não se obteve sucesso na cristalização, julgamos que os ensaios de cristalização envolvendo as formas (C) e (D) representadas pela figura 6.1 poderão ser bem sucedidos. Espera-se que, com essa estratégia, seja possível a formação de estruturas cristalinas de enzima capaz de difratar raios X. Porém será dada continuidade aos ensaios de cristalização com as formas A e B (Figura 6.1) em paralelo aos ensaios com as formas C e D (Figura 6.1).

Numa eventual obtenção de cristais, a co-cristalização da enzima com o inibidor SPAA seria de grande importância, uma vez que informações a respeito de sua interação com o sítio ativo da PGI-Tb pode contribuir para o planejamento de compostos mais específicos. Esse composto apresentou um IC_{50} de 6,4 μ M para a PGI-Tb, o que indica uma boa interação com o sítio ativo dessa enzima.

Uma outra parte deste projeto poderá ser dedicado a encontrar compostos extraídos de vegetais, em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Cesar Vieira (DQ-UFSCar), e animais marinhos, em colaboração com o Prof. Dr. Roberto Berlink (IQSC-USP), que possam servir como compostos de partida, fornecendo informações importantes no desenvolvimento de inibidores.

Os resultados obtidos através da técnica de modelagem por homologia, em conjunto com os resultados de IC_{50} para os inibidores estudados e aqueles que eventualmente sejam encontrados, auxiliarão na elaboração de novas propostas de inibidores específicos para a PGI-Tb. Esses compostos específicos poderão ser sintetizados em colaboração com laboratórios de síntese orgânica e, em seguida, sua capacidade inibitória poderá ser testada.

Como o sítio ativo das PGIs é bem conservado, o inibidor ácido agarílico poderá ser utilizado para a determinação do IC_{50} , utilizando a PGI-Tb e a PGI humana. Trabalhos recentes têm mostrando a afinidade do ácido agarílico pela PGI-Tb, deixando as enzimas de levedura e de coelho pouco afetadas. A interação desse composto com o sítio ativo da enzima poderá ser entendida através de análises envolvendo o modelo da PGI-Tb, utilizando-se o programa docking.

O modelo de PGI-Tb mostrou-se muito satisfatório por razões já abordadas no capítulo 5. Entretanto, novos modelos para essa enzima poderão ser construídos utilizando-se como moldes a PGI de coelho e humana. Melhores modelos poderão ser obtidos utilizando-se estratégia, contribuindo com os resultados de busca de novos inibidores por modelagem molecular.