

**ASPECTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR, ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA  
ADENINA FOSFORRIBOSILTRANSFERASE DE *Homo sapiens* E SEU  
ENVOLVIMENTO NA SÍNDROME UROLITÍASE**

**MÁRCIO SILVA**

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências: Física Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann

OK

USP/IFSC/SBI



8-2-001701

São Carlos - 2005

**IFSC-USP** SERVIÇO DE BIBLIOTECA  
INFORMAÇÃO

|                     |
|---------------------|
| IFSC - SBI          |
| CLASS. Te 1401      |
| CUTTER.....         |
| TOMBO... 1401 ..... |

Silva, Márcio

**“ASPECTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR, ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA ADENINA FOSFORRIBOSILTRANSFERASE DE *Homo sapiens* E SEU ENVOLVIMENTO NA SÍNDROME UROLITÍASE”** Marcio Silva – São Carlos, 2005

Tese (Doutorado) – Área de Física da Universidade de São Paulo, 2005  
Páginas: 80

Orientador: Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann

1. Biologia Molecular, 2. Cristalografia de Proteínas

I. Título



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE MÁRCIO SILVA  
APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO, EM 03/06/2005.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann (Orientador e Presidente) – IFSC/USP

Prof. Dr. Fábio Geneviva Lacerda de Almeida – UFRJ

Dr. Francisco Javier Medrano Martin – LNLS

Prof. Dr. Luis Fernando Delboni – PUC/MG

Prof. Dr. Javier Alcides Ellena – IFSC/USP

# DEDICATÓRIA

À Adriana, Débora, Flávia e Márcio.

**IFSC-USP** SERVIÇO DE BIBLIOTECA E  
INFORMAÇÃO

## AGRADECIMENTOS

- Ao prof. Otávio Henrique Thiemann
- Ao prof. Gláucius Oliva
- Ao prof. Jorge Iulek
- A todos os demais professores
- Aos técnicos e demais funcionários
- A todos os colegas de pós-graduação
- A toda minha família que, mesmo a distância, sempre me apoiou
- A FAPESP pelo apoio financeiro

# SUMÁRIO

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| LISTA DE FIGURAS.....      | I   |
| LISTA DE TABELAS.....      | IV  |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | V   |
| RESUMO.....                | VI  |
| ABSTRACT.....              | VII |

## 1. INTRODUÇÃO

|                                                             |   |
|-------------------------------------------------------------|---|
| 1.1. Vias de Obtenção de Purino Nucleotídeos.....           | 1 |
| 1.2. Fosforribosil Transferase (PRTases).....               | 2 |
| 1.3. Adenina Fosforribosiltransferase (APRT).....           | 5 |
| 1.4. Relevância do Estudo da APRT em Relação a Doenças..... | 5 |
| 1.4.1. <i>Dihidroxiadenina Urolitase</i> .....              | 5 |
| 1.4.2. <i>Leishmaniose</i> .....                            | 7 |

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1. Clonagem, expressão, purificação e caracterização da enzima Adenina Fosforribosil transferase (APRT) de <i>Homo sapiens</i> ..... | 9  |
| 2.2. Cristalização, coleta de dados de difração de raios-X, elucidação e refinamento da estrutura da hAPRT.....                        | 13 |
| 2.3. Comparação da estrutura da hAPRT com outras PRTases.....                                                                          | 14 |
| 2.4. Mutações sítio dirigidas na hAPRT.....                                                                                            | 14 |
| 2.5. Conclusão do refinamento da estrutural tridimensional da APRT de <i>Leishmania tarentolae</i> .....                               | 17 |

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6. Seleção de inibidores das PRTases (APRT; HGPRT e XPRT) de leishmania.....                                                                                                | 18 |
| 2.7. Testes de inibidores de PRTases em culturas de <i>Leishmania major</i> promastigota.....                                                                                 | 19 |
| <br>                                                                                                                                                                          |    |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES                                                                                                                                                    |    |
| 3.1. Clonagem, expressão, purificação e caracterização da enzima Adenina Fosforribosil transferase (APRT) de <i>Homo sapiens</i> .....                                        | 20 |
| 3.2. Cristalização, coleta de dados de difração de raios-X, elucidação da estrutura e validação do modelo da hAPRT.....                                                       | 24 |
| 3.3. Análise da estrutura da hAPRT e comparações com estruturas de outras PRTases.....                                                                                        | 31 |
| 3.4. Mutações sítio dirigidas na hAPRT.....                                                                                                                                   | 38 |
| 3.5. Conclusão do refinamento da estrutura tridimensional da APRT de <i>Leishmania tarentolae</i> (lAPRT).....                                                                | 48 |
| 3.6. Seleção de inibidores da APRT de <i>L. tarentolae</i> e efeito dos compostos bioativos sobre o crescimento de <i>Leishmania major</i> promastigota <i>in vitro</i> ..... | 51 |
| <br>                                                                                                                                                                          |    |
| 4. CONCLUSÃO.....                                                                                                                                                             | 59 |
| <br>                                                                                                                                                                          |    |
| 5. PERSPECTIVAS.....                                                                                                                                                          | 62 |
| <br>                                                                                                                                                                          |    |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                                                                            | 64 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Fluxograma do metabolismo de purinas em células de mamífero.                                                                                  | 1  |
| Figura 2: Representação das vias de recuperação de purinas.                                                                                             | 2  |
| Figura 3: Exemplos de reações de reutilização de purinas catalisadas por PRTases.                                                                       | 4  |
| Figura 4: Alinhamento das seqüências primárias das PRTases.                                                                                             | 4  |
| Figura 5: Papel da adenina fosforribosiltransferase (APRT) no metabolismo de adenina em humanos.                                                        | 6  |
| Figura 6: Distribuição de casos de Leishmania Visceral segundo município no ano de 2002.                                                                | 8  |
| Figura 7: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação gene da Adenina Fosforribosil Transferase (APRT) de <i>Homo sapiens</i> por PCR.                 | 11 |
| Figura 8: Oligonucleotídeos utilizados nas mutações sítio dirigidas da hAPRT.                                                                           | 15 |
| Figura 9: Etapas da clonagem do gene da APRT de <i>H. sapiens</i> por PCR.                                                                              | 21 |
| Figura 10: Géis de poliacrilamida comparando os níveis de expressão da hAPRT nas formas solúvel e insolúvel obtidos a partir da clonagem em bactérias.  | 22 |
| Figura 11: Gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata, mostrando a purificação da hAPRT.                                                        | 23 |
| Figura 12: Cristais de hAPRT obtidos em três diferentes condições de cristalização.                                                                     | 25 |
| Figura 13: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das APRTs de <i>Leishmania tarentolae</i> e de <i>Homo sapiens</i> .                               | 26 |
| Figura 14: Mapa de densidade eletrônica $2 F_o - F_c $ (2.1 Å de resolução e contorno de $2\sigma$ ) de parte do sítio ativo do modelo final de h-APRT. | 28 |
| Figura 15: Diagrama de Ramachandran calculado para a estrutura da APRT de <i>H. sapiens</i> .                                                           | 30 |



|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 16: Diagrama da análise do enovelamento da estrutura da APRT de <i>Homo sapiens</i> .                                                  | 30 |
| Figura 17: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da h-APRT com outras PRTases com estruturas tridimensionais conhecidas.                  | 32 |
| Figura 18: Estrutura quaternária da APRT de <i>Homo sapiens</i> .                                                                             | 33 |
| Figura 19: Motivo estrutural incomum encontrado na superfície de dimerização no modelo da APRT de <i>Homo sapiens</i> .                       | 34 |
| Figura 20: Motivo                                                                                                                             | 35 |
| Figura 21: Motivo                                                                                                                             | 36 |
| Figura 22: Estrutura da região do sítio catalítico da h-APRT                                                                                  | 38 |
| Figura 23: Mutações da APRT de <i>Homo sapiens</i> relacionadas com alterações na atividade enzimática.                                       | 39 |
| Figura 24: Gel da poli-acrilamida representando a expressão da h-APRT nas quatro formas mutantes.                                             | 40 |
| Figura 25: Análise dos efeitos da mutação Asp65Val na estrutura da proteína APRT de <i>Homo sapiens</i> .                                     | 42 |
| Figura 26: Análise dos efeitos da mutação Leu110Pro na estrutura da proteína APRT de <i>Homo sapiens</i> .                                    | 43 |
| Figura 27: Análise dos efeitos da mutação Met136Thr na estrutura da proteína APRT de <i>Homo sapiens</i> .                                    | 45 |
| Figura 28: Análise dos efeitos da mutação Phe173Del na estrutura da proteína APRT de <i>Homo sapiens</i> .                                    | 47 |
| Figura 29: Mapa de densidade eletrônica do sítio ativo da APRT de <i>Leishmania tarentolae</i> ligada a uma molécula de AMP e um íon fosfato. | 49 |

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 30: Estrutura tridimensional da APRT de <i>Leishmania tarentolae</i> representada na forma de fitas.           | 50 |
| Figura 31: Estrutura química de quatro inibidores da APRT de <i>Leishmania tarentolae</i> selecionados em bioensaios. | 53 |
| Figura 32: Efeito inibitório de três alcalóides e uma cumarina em testes enzimáticos com PRTases.                     | 53 |
| Figura 33: Efeito dos inibidores em culturas de <i>Leishmania major</i> promastigota.                                 | 55 |
| Figura 34: Interações entre o inibidor esquimianina e as PRTases de <i>Leishmania</i> , obtidas com o programa GOLD.  | 58 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Estruturas de PRTases disponíveis no PDB...                                | 3  |
| Tabela 2: Parâmetros utilizados na coleta de dados de difração de raios-X...         | 25 |
| Tabela 3: Estatística do conjunto de dados da APRT de <i>Homo sapiens</i> ...        | 26 |
| Tabela 4: Matriz de rotação e vetor de translação...                                 | 27 |
| Tabela 5: Dados estatísticos do refinamento da APRT de <i>H. sapien</i> ...          | 31 |
| Tabela 6: Dados estatísticos do refinamento da APRT de <i>L. tarentola</i> ...       | 49 |
| Tabela 7: Efeito dos inibidores frente as PRTases de Leishmania...                   | 54 |
| Tabela 8: Recuperação do crescimento de culturas de <i>L. major</i> promastigotas... | 56 |

## LISTA DE ABREVIATURA

|           |                                                                   |
|-----------|-------------------------------------------------------------------|
| AMP       | Adenosina monofosfato                                             |
| APRT      | Adenina-fosforribosil-transferase                                 |
| DNA       | Ácido Desoxirribonucléico (ADN)                                   |
| GMP       | Guanosina monofosfato                                             |
| hAPRT     | Adenina-fosforribosil-transferase de <i>Homo sapiens</i> .        |
| HGPRT     | Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase                     |
| IMP       | Inosina-5- monofosfato                                            |
| IPTG      | Isipropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo                       |
| IAPRT     | Adenina-fosforribosil-transferase de <i>Leishmania tarentolae</i> |
| LNLS      | Laboratório Nacional de Luz Síncrotron                            |
| Mops/NaOH | Tampão 3-(N-morpholino) propanesulphonic, pH ajustado com NaOH    |
| MPD       | 2-metil-2-4-pentanodiol                                           |
| OMS       | Organização Mundial da Saúde                                      |
| OPRT      | Orotato-fosforribosil-transferase                                 |
| PCR       | Reação de polimerização em cadeia                                 |
| PDB       | Protein Data Bank                                                 |
| PMSF      | Fluoreto de fenilmetilsulfonil                                    |
| PPi       | Pirofosfato                                                       |
| PRPP      | 5-fosforribosil-1-pirofosfato                                     |
| PRTases   | Fosforribosil-transferases                                        |
| RMN       | Ressonância Magnética Nuclear                                     |
| RNA       | Ácido Ribonucléico (ARN)                                          |
| SFM       | Sistema fagocítico mononuclear                                    |
| SIDA      | Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida                           |
| Tris-HCl  | Tris (hidroxometil)metilamina, pH ajustado com HCl                |
| UPRT      | Uridina-fosforribosil-transferase                                 |
| Xgal      | Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosidase                 |
| XDH       | Xantina dehidrogenase                                             |
| XMP       | Xantina monofosfato                                               |
| XPRT      | Xantina-fosforribosil-transferase                                 |

## RESUMO

Esta tese apresenta em sua introdução uma revisão bibliográfica sobre a importância das enzimas Fosforribosil-transferases (PRTases) para a homeostase tanto em células de mamíferos como em células de protozoários Kinetoplastidas. É ressaltada a estreita relação entre mutações pontuais encontradas no gene da enzima Adenina Fosforribosiltransferase (APRT) e a doença humana Dihidroxiadenina Urolitase. A doença leishmaniose, causada por Kinetoplastidas do gênero *Leishmania*, é descrita indicando a possível utilização das enzimas da via de recuperação de purinas como alvos para o desenvolvimento de novos medicamentos contra leishmaniose.

Os experimentos descritos nesta tese visam a produção heteróloga da enzima (APRT) de *Homo sapiens*, elucidação da estrutura cristalográfica e análise estrutural das mutações encontradas em pacientes com Dihidroxiadenina Urolitase. A proteína homóloga de *Leishmania terentolae* também foi objetivo de estudo. Com essa APRT, os experimentos descritos nesta tese visam a elucidação da estrutura tridimensional e a utilização da enzima na busca de novos inibidores de PRTases.

Os resultados apresentados nesta tese mostram que os objetivos do estudo foram alcançados. A elucidação da estrutura da APRT de *H. sapiens* possibilitou discutir as prováveis alterações estruturais provocadas pelas mutações pontuais do gene da APRT. Novos inibidores de PRTases de *Leishmania* foram obtidos. Adicionalmente, os inibidores das enzimas foram testados em culturas de *Leishmania major* promastigota e promoveram inibição do crescimento do parasita.

## ABSTRACT

This thesis in its introduction presents a brief bibliographic revision about the importance of the phosphoribosyltransferase enzymes (PRTases) to cellular homeostasis, both in mammalian cells as well as in the protozoa Kinetoplastida. It is emphasized the close relation between point mutations found in the gene coding for Adenine phosphoribosyltransferase (APRT) and the disease Dihydroxiadenine Urolitiasis. The diseases leishmaniasis, caused by Kinetoplastidae belonging to the *Leishmania* genera, is described indicating the possible use of these enzymes of the purine salvage pathway (PRTases) as targets for the future development of novel drugs against leishmaniasis.

The experiments described in this thesis aim at the heterologous production of the enzyme APRT of *Homo sapiens*, its crystallographic structure elucidation and structural analysis of mutations found in patients with Dihydroxiadenine Urolitiasis. The *Leishmania tarentolae* homologue was also the aim of this work. With this APRT the experiments described in this thesis aim at the structural resolution of the enzyme and its use in the screening for novel PRTase inhibitors.

The results presented in this thesis show that the objectives of the work have been achieved. The structural elucidation of the human APRT allowed the discussion of the potential modifications caused by the point mutations in the APRT gene. Novel inhibitors of PRTases of *Leishmania major* promastigote cultures and promoted the growth inhibition of this parasite.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Vias de Obtenção de Purino Nucleotídeos

Os purino nucleotídeos (purinas) são as bases nitrogenadas imprescindíveis para a formação do Ácido Desoxirribonucléico (ADN) e do Ácido Ribonucléico (ADR). Em células de mamíferos os nucleotídeos podem ser obtidos a partir de duas vias metabólicas distintas conhecidas como via “*de novo*” e via “*de recuperação*” [1] (Figura 1).

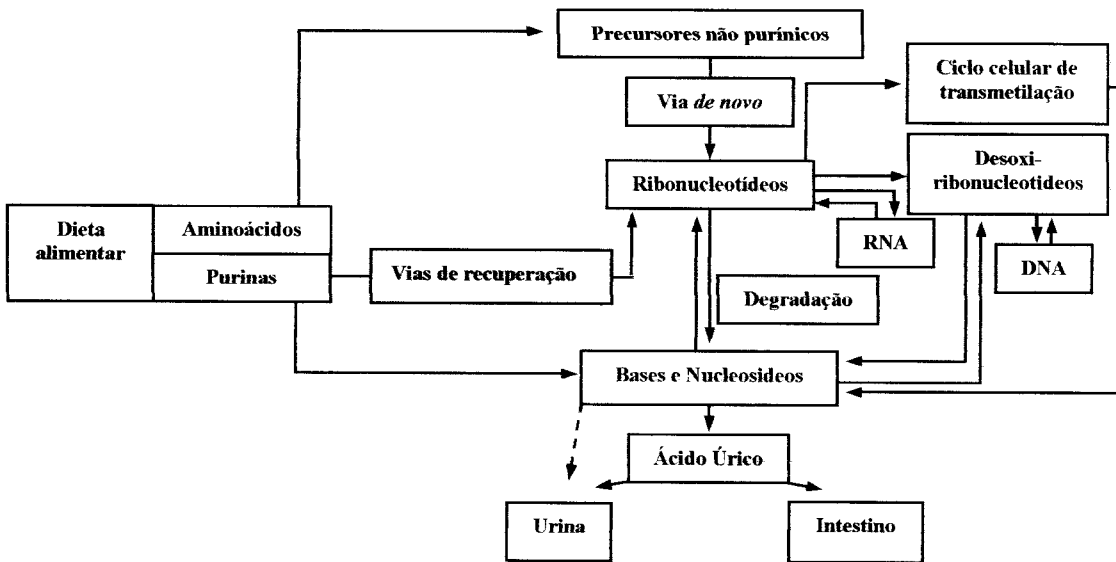


Figura 1: Fluxograma do metabolismo de purinas em células de mamíferos. Há dois caminhos para a obtenção de purino ribonucleotídeos em mamíferos: *Via de novo*, onde são utilizados precursores não purínicos; *Via de recuperação* onde bases purínicas e nucleosídeos são reutilizadas para a formação de ribonucleotídeos. Os ribonucleotídeos formados podem ser utilizados em processos metabólicos ou sofrer degradação e serem eliminados.

A rota da síntese “*de novo*” é composta por onze reações enzimáticas sequenciais nas quais o anel purínico é construído passo a passo. O açúcar D-Ribose-5-fosfato é utilizado como esqueleto de sustentação sobre o qual o anel purínico é formado, originando o inosina-5-monofosfato (IMP). O IMP, por sua vez, é convertido em adenosina monofosfato (AMP) e guanósina monofosfato (GMP) [1]. A segunda cadeia metabólica constitui a *via de recuperação* [2-4]. Essa via permite a eficiente reutilização de purinas livres provenientes de dieta alimentar e da degradação de ácidos nucleicos (Figura 2).

Existem várias enzimas que participam nas vias de recuperação de purinas. A adenina-fosforribosil-transferase (APRT), proteína alvo do presente estudo, pertence a uma classe de enzimas recicladoras denominada fosforribosil-transferases (PRTases).

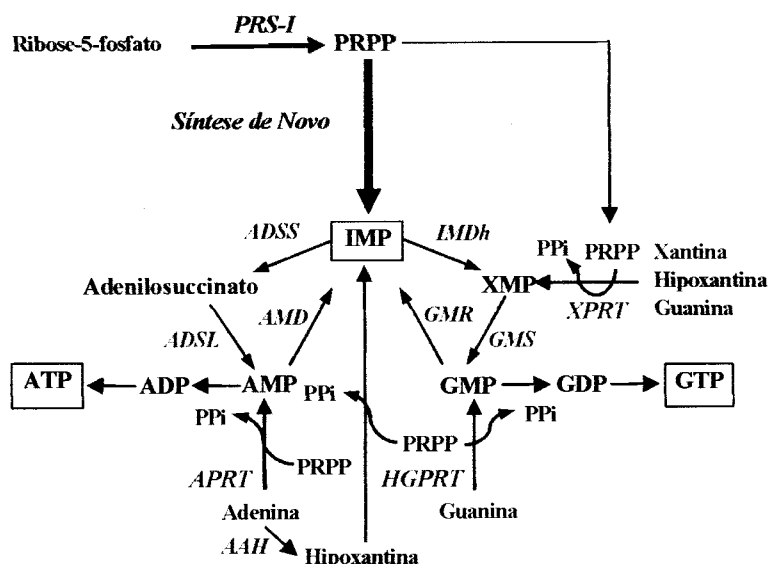


Figura 2: Representação das vias de recuperação de purinas. As reações catalisadas pelas PRTases: APRT (adenina-fosforribosil-transferase); HGPRT (hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase) e XPRT (xantina-guanina-hipoxantina-fosforribosil-transferase) são apresentadas pelas setas vermelhas. Outras enzimas que participam nas vias de recuperação são apresentadas em verde. Os substratos e os produtos das reações estão apresentados em preto. Todas as reações mostradas estão ocorrendo no sentido indicado pelas setas. As setas azuis mostram a liberação do pirofosfato (PP<sub>i</sub>) nas reações catalisadas por PRTases. A via *de novo* (quadro azul) não ocorre em protozoários da ordem Kinetoplastida. A enzima XPRT (quadro amarelo) é exclusiva de Kinetoplastidas.

## 1.2. Fosforribosil-transferases (PRTases)

As PRTases constituem um grupo de enzimas que catalisam reações envolvendo purinas livres, íons magnésio e o 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP). Os produtos da reação são um ribonucleotídeo e um pirofosfato (PP<sub>i</sub>) livre [5]. Alguns exemplos de reações catalisadas por PRTases são representados na figura 3.

Com base em particularidades estruturais as PRTases são subdivididas em dois tipos. O *tipo I*, cujas estruturas conhecidas estão relacionadas na *tabela 1* e figura 4, é identificado pela presença de um motivo estrutural conservado (enovelamento  $\alpha/\beta$ ), que forma o sítio de



ligação do PRPP [6]. Esse grupo também apresenta uma volta (loop) flexível e uma região central formada por ao menos cinco fitas  $\beta$  paralelas cercadas por três ou mais hélices [5,6]. O sítio de ligação da base se encontra numa região estruturalmente variável, chamada de subdomínio “hood”, que está relacionada com a especificidade pelas diferentes purinas utilizadas como substrato [5,6].

O tipo II não apresenta o enovelamento  $\alpha / \beta$  formando o sítio de ligação do PRPP. Até o presente momento, a quinolinato fosforribosiltransferase (QPRT) de *Salmonella typhimurium* é a única PRTase do tipo II com estrutura tridimensional conhecida [7].

Tabela 1: Estruturas de fosforribosiltransferases (PRTases) disponíveis no Protein data bank (PDB)

| PRTase * | Organismo de origem             | Códigos PDB                   |
|----------|---------------------------------|-------------------------------|
| APRT     | <i>Homo sapiens</i>             | 1ORE                          |
| APRT     | <i>Leishmania tarentolae</i>    | 1MZV                          |
| APRT     | <i>Leishmania. donovani</i>     | 1QB7, 1QB8, 1QCC e 1QCD       |
| APRT     | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 1G2P e 1G2Q                   |
| APRT     | <i>Giardia lamblia</i>          | 1L1Q e 1L1R                   |
| UPRT     | <i>Toxoplasma gondii</i>        | 1BD4                          |
| XPRT     | <i>Escherichia Coli</i>         | 1A95, 1A96, 1A97 e 1A98       |
| OPRT     | <i>Escherichia Coli</i>         | 1ORO                          |
| HGPRT    | <i>Trypanosoma cruzi</i>        | 1TC2                          |
| HGPRT    | <i>Homo sapiens</i>             | 1HMP, 1BZY e 1D6N             |
| HGXPRT   | <i>Trichomonas foetus</i>       | 1HGX                          |
| HGXPRT   | <i>Toxoplasma gondii</i>        | 1DBR, 1FSG, 1QK3, 1QK4 e 1QK5 |

\* Adenina fosforribosiltransferase (APRT), Uridina fosforribosiltransferase (UPRT), Xantina fosforribosiltransferase (XPRT), Orotato fosforribosiltransferase (OPRT), Hipoxantina Guanina fosforribosiltransferase (HGPRT) e Hipoxantina Guanina Xantina fosforribosiltransferase (HGXPRT).

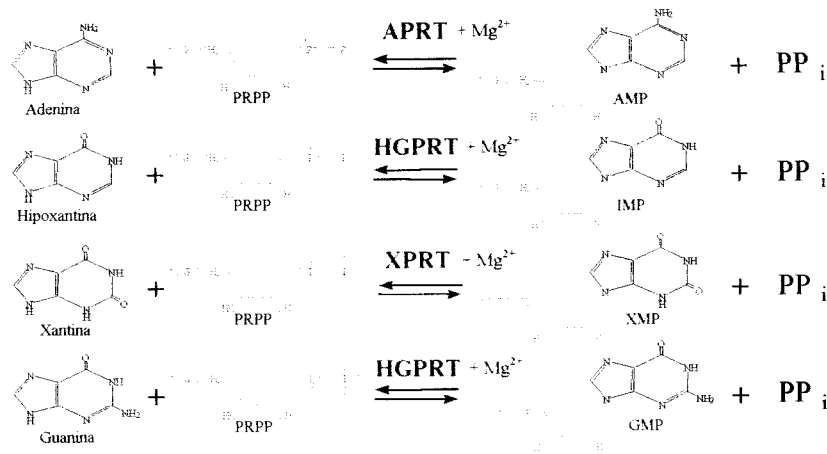


Figura 3: Exemplos de reações de reutilização de purinas catalisadas por PRTases. Nota-se que a partir de bases nitrogenadas livres, PRPP e ion magnésio, as PRTases catalisam a formação de: adenosina monofosfato (AMP); guanosina monofosfato (GMP); inosina monofosfato (IMP) e xantina monofosfato (XMP). O P<sub>Pi</sub> é o outro produto das reações catalisadas.

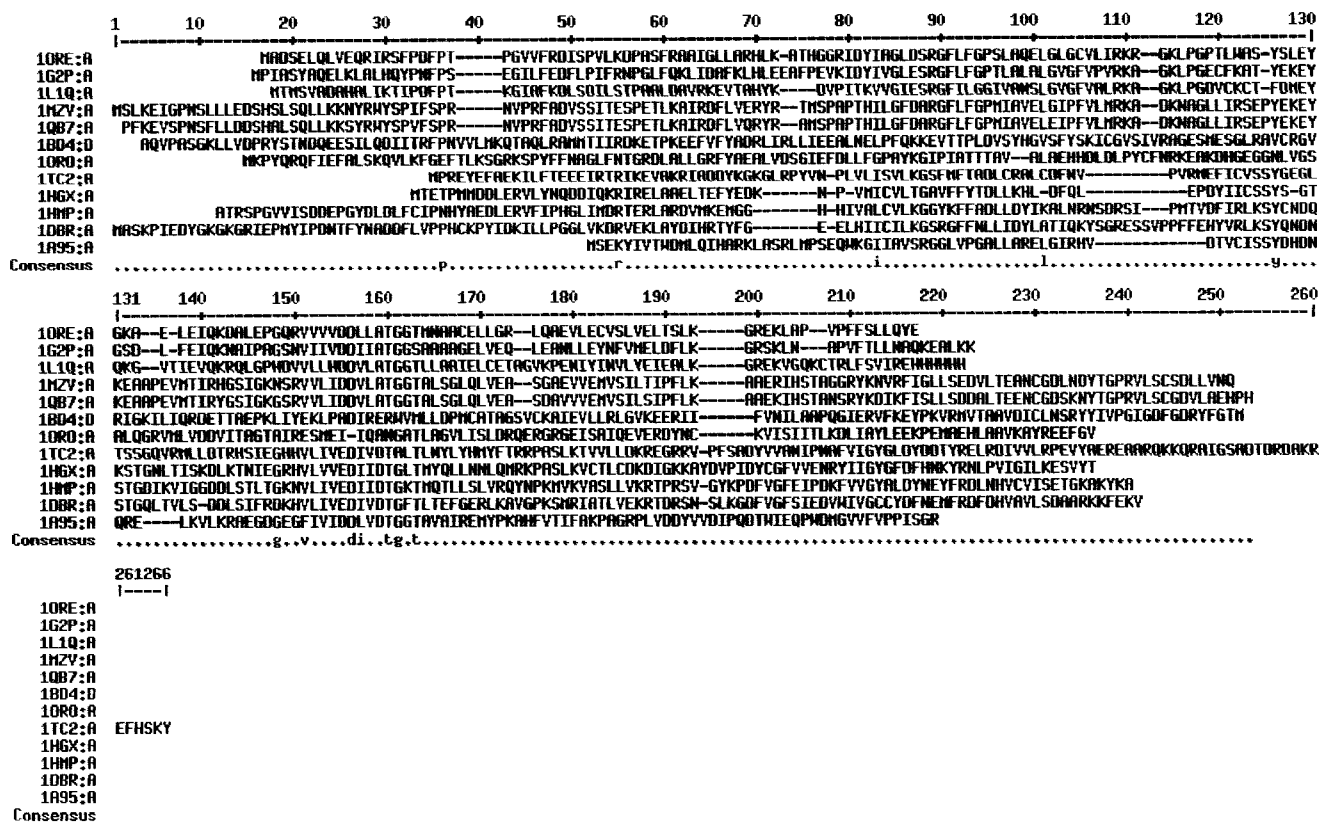


Figura 4: Alinhamento das seqüências primárias de todas as fosforribosiltransferases (PRTases) com estruturas tridimensionais elucidadas. 10RE (APRT de *H. sapiens*); 1G2P (APRT de *S. cerevisiae*); 1L1Q (APRT de *G. lamblia*); 1MZY (APRT de *L. tarentolae*); 1QB7 (APRT de *L. donovani*); 1BD4 (UPRT de *T. gondii*); 1OR0 (OPRT de *E. coli*); 1TC2 (HGPRT de *T. cruzi*); 1HGX (HGXPRT de *T. foetus*); 1HMP (HGPRT de *H. sapiens*); 1DBR (HGXPRT de *T. gondii*); 1A95 (XPRT de *E. coli*). Alinhamento obtido com o programa Multaline

### 1.3. Adenina Fosforribosiltransferase (APRT)

As APRTs (EC 2.4.2.7), são PRTases do *tipo I* e catalisam a conversão de adenina e PRPP em AMP, através de uma reação dependente de um íon magnésio. O mecanismo da reação catalisada pela APRT não é totalmente conhecido, mas foi proposto que o átomo de oxigênio da ribose do PRPP deve atacar o próton do nitrogênio (N9) da adenina levando a sua desprotonação. Posteriormente, este átomo do anel transfere diretamente o seu próton para o oxigênio do pirofosfato do PRPP que está ligado diretamente ao carbono C1 da ribose. O ataque nucleofílico, feito pela purina em um átomo do carbono 1 (C<sub>1</sub>) da ribose do PRPP leva a liberação do PP<sub>i</sub> e posterior liberação do nucleosídeo (AMP) [8].

Em humanos a APRT é codificada por genes alelos localizados no cromossomo 16. O gene normal apresenta vinte e oito mil pares de bases (2,8 kb) e contém cinco éxons. Essa enzima está presente em todas as células de mamíferos, com maior concentração em células nucleadas, constituindo-se no único mecanismo conhecido para a recuperação de adenina [1].

## 1.4. Relevância do Estudo da APRT em Relação à Doenças

### 1.4.1. Dihidroxiadenina Urolitíase

No organismo humano, a principal função metabólica da APRT é remover o excesso de adenina proveniente da bio-síntese de poliamina ou da dieta alimentar [1]. Quando a APRT apresenta deficiência na atividade, ocorre acúmulo de adenina, pois não existe nenhuma via metabólica alternativa significativa. Conforme está representado na figura 5, a adenina em excesso é oxidada pela xantina desidrogenase (XDH) formando o 2,8-dihidroxiadenina (2,8-DHA), substância extremamente insolúvel que pode se acumular nos rins e no trato urinário, causando a Dihidroxiadenina Urolitíase (DHA-Urolitíase).

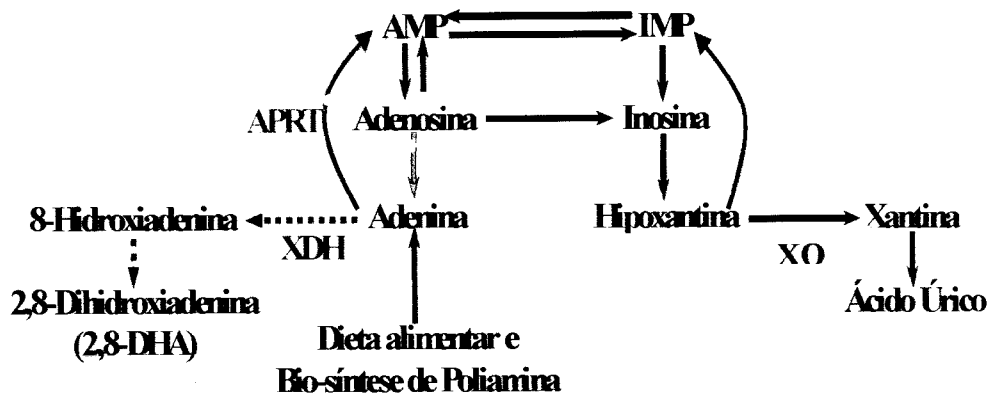


Figura 5: Papel da adenina fosforribosiltransferase (APRT) no metabolismo de adenina em humanos. Provavelmente a principal forma de obtenção de adenina *in vivo* é via bio-síntese de poliamina. Adenina também é obtida dos alimentos e pequena quantidade pela conversão de adenosina feita pela enzima s-adenosilhomocisteína hidrolase (SAHH) (em cinza). Em condições fisiológicas normais a APRT (em verde) catalisa a formação de adenosina monofosfato (AMP) a partir de adenina. Deficiência catalítica da APRT provoca o acúmulo de adenina. A adenina em excesso é convertida pela xantina-dehidrogenase (XDH) a 2,8-dihidroxiadenina (2,8-DHA) via 2-dihidroxiadenina conforme é mostrado pelas setas pontilhadas. Xantina oxidase (XO).

A DHA-Urolitíase foi inicialmente diagnosticada em crianças. Atualmente encontram-se descritos casos em indivíduos com faixa etária entre cinco meses a setenta e quatro anos, sendo 25,1 anos a idade média dos pacientes. Os sintomas clínicos são: cólicas renais, infecções no trato urinário e perda de sangue na urina. Essas manifestações clínicas são provenientes da formação de pedras e cristais de 2,8-DHA. Alguns indivíduos permanecem assintomáticos, enquanto outros desenvolvem a doença da forma mais grave chegando à falência renal.

Dois tipos de deficiência na APRT, diferenciados pela atividade enzimática, estão relacionados a DHA-Urolitíase. Na deficiência *tipo I*, não há atividade detectável da APRT em células intactas ou extratos celulares. O *tipo II*, também não apresenta atividade em células intactas, mas extratos celulares apresentam atividade parcial, entre 5 a 25 por cento do tipo selvagem.

A deficiência na APRT é uma doença hereditária autossomal recessiva. As desordens genéticas que levam a deficiência *tipo I* já foram encontradas em pacientes de 19 países,

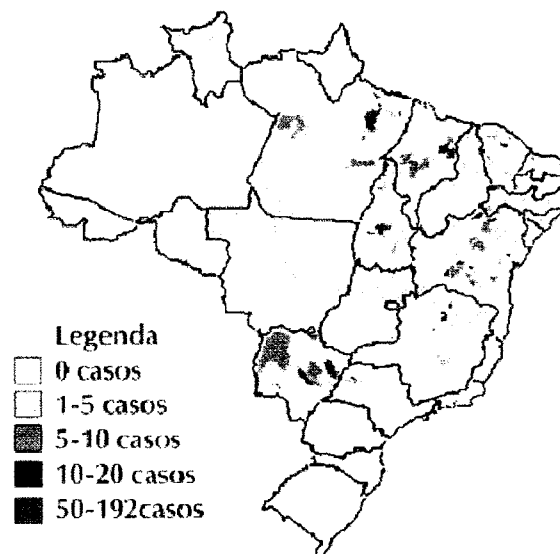
sendo a etnia caucasiana a mais atingida. A deficiência *tipo II* parece ser exclusiva de povos asiáticos, sendo os japoneses os mais afetados. Até o presente momento, vinte e três mutações foram encontradas em pacientes com alterações no funcionamento da adenina fosforribosil transferase de humano (hAPRT) [9,10]. Dessas mutações apenas oito são “missense”, levando a produção de variantes da hAPRT com atividades catalíticas alteradas. A mutação mais comum leva a substituição de um resíduo de metionina por um resíduo de treonina na posição 136 da seqüência polipeptídica. Essa mutação é encontrada em 79% dos pacientes japoneses com deficiência em APRT, assim como em aproximadamente 50% de todos os pacientes portadores dessa anomalia em outros países [11]. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo é elucidar a estrutura tridimensional da hAPRT nativa e propor eventuais explicações estruturais para a perda de atividade enzimática observada nas formas mutantes. Adicionalmente, as informações estruturais da hAPRT poderão ser usadas na seleção de substâncias bioativas com maior seletividade pela APRT de organismos patogênicos como *Leishmania* sp.

#### **1.4.2. Leishmaniose**

O primeiro registro oficial de leishmaniose foi feito em 1898 pelo pesquisador russo Borovsky, apesar de existirem indícios fósseis da ocorrência dessa doença em civilizações antigas da América Latina [12]. O agente etiológico foi identificado somente em 1903 por Leishman e Donovan. Esses pesquisadores isolaram o protozoário causador do calazar em estudos independentes realizados com pacientes provenientes da Índia. Em homenagem aos descobridores do parasita, a Doença se tornou conhecida como leishmaniose e o agente causador foi denominado de *Leishmania donovani*. Atualmente, o termo Leishmaniose engloba um conjunto de doenças causadas por mais de 17 espécies do gênero *Leishmania*, mas clinicamente classificadas em apenas três tipos: leishmaniose visceral (LV), cutânea (LC) e mucocutânea (LMC). A localização do parasita em macrófagos do sistema fagocitário

mononuclear, da derme e das mucosas das vias respiratórias, é o que caracteriza os quadros de LV, LC e LMC, respectivamente. [13,14].

No Brasil, a leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea são agrupadas em uma única doença denominada leishmaniose tegumentar americana (LTA) sendo registrados 388.155 casos entre os anos de 1985 a 1999 [15]. A distribuição geográfica da LV tem apresentado mudanças importantes; inicialmente restrita a áreas rurais, e atualmente presente em grandes centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (BH), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS) e Campo Grande (MS), entre outros. Na década de 90, aproximadamente 90 % dos casos notificados de LV ocorreram na região Nordeste. À medida que a doença se expande para outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, a prevalência se modifica no território nacional. A Figura 6 representa a distribuição da leishmaniose no Brasil no ano de 2002.



Fonte: SINAN - COVEV/CCDT/DEVEP/SVS/MS

Figura 6: Distribuição de casos de Leishmania Visceral segundo município no ano de 2002. (Figura adaptada do Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde).

As leishmanias, assim como os demais protozoários parasitas, são auxotróficos para purino-nucleotídeos. Portanto sua sobrevivência depende da via de recuperação de purinas

(Figura 2) provenientes do hospedeiro [2,3]. A *via de recuperação* em *Leishmania* e *Trypanosoma* constitui a base para a suscetibilidade destes microrganismos a análogos de purino-nucleotídios [2,3], como o alopurinol (4-hidroxipirazol (3,4) pirimidina) que tem sido explorado clinicamente no tratamento de leishmaniose cutânea e Doença de Chagas [16,17]. As reações de recuperação de purino-nucleotídeos catalisadas pelas PRTases são independentes entre si (Figura 2). A utilização dessa via metabólica como alvo para o desenvolvimento racional de fármacos é dependente de estudos físico-químicos aprofundados das três PRTases envolvidas (APRT, HGPRT e XPRT). Nessa direção, o presente trabalho tem como objetivo explorar a enzima APRT de *Leishmania tarentolae* em estudos bioquímicos e estruturais visando descobrir novos compostos bioativos, que eventualmente possam ser utilizados como compostos de partida para o desenvolvimento de quimioterápicos contra leishmaniose.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Clonagem, expressão, purificação e caracterização da enzima Adenina Fosforribosil transferase (APRT) de *Homo sapiens*

O gene da APRT de *H. sapiens* (hAPRT) foi amplificado pela técnica da *reação em cadeia da polimerase* (PCR) a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro de feto humano (Invitrogen). Dois oligonucleotídeos para amplificação por PCR foram sintetizados com base na seqüência do gene de hAPRT disponível no “gene bank” (número de acesso NM\_000485.1). Sítios para clivagem com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* foram introduzidos nos oligonucleotídeos (Figura 7), para facilitar a inserção do gene no vetor de expressão pET29a(+) (Novagen). A reação de amplificação continha: 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 50 ng de cDNA de cérebro de feto humano, 5 U de Taq DNA polimerase (Promega), 25 mM MgCl<sub>2</sub> e 5 nM de dNTPs. O experimento foi realizado em um

termociclador “GeneAMP 2400” (Perkin-Elmer CETUS). A mistura de reação foi submetida a 2 minutos de desnaturação a 94°C, seguida por 25 ciclos de desnaturação a 94°C, intercalados por períodos de anelamento a 54°C por 0,5 minutos e períodos de extensão de 1 minuto a 72 °C. Ao final do vigésimo quinto ciclo a reação foi resfriada a 4 °C. A análise da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídeo (1% Agarose TAE pH 8,3). A banda com aproximadamente 550 pares de base (pb) de comprimento foi purificada do gel de agarose pela técnica de NaI-sílica [18]. O DNA purificado foi então inserido em vetor pGEM-T (Promega), de acordo com as instruções do fabricante [19]. A clonagem de um gene em vetor pGEM-T se vale da presença de resíduos de adenina adicionados pela Taq DNA polimerase às extremidades do gene durante a amplificação por PCR. 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 [19].

O vetor contendo o gene foi utilizado para transformar células competentes *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (*F deoRrecAendAlhsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>,m<sub>k</sub><sup>+</sup>)supE44 $\chi$  tha - lgyrA96relA1*) por choque térmico. O plasmídeo recombinante foi extraído de uma cultura de *E. coli* DH5 $\alpha$  e purificado por lise alcalina [18]. A seqüência correta de nucleotídeos no gene da hAPRT foi confirmada por análise em seqüenciador tipo ABI377 DNA. Um clone sem mutações foi digerido com as enzimas de restrição *Nde*I e *Xho*I e o gene da hAPRT foi inserido em plasmídeo de expressão pET29a(+), previamente clivado com as mesmas enzimas. O vetor contendo o gene foi então introduzido, por choque térmico, em bactérias competentes *E. coli* BL21 (DE3) (*ompT<sup>3</sup>lon<sup>9</sup>dcm<sup>17</sup>*). A seleção dos clones foi feita em placas de Petri com 20 mL de meio LB sólido suplementado com Kanamicina a 30  $\mu$ g/mL (concentração final).



5' - GCACGCGCATATGGCCGACTCCGAGCTGCA-3'  
5' - AGGCTCGAGGGTCACTCATACTGCAGGAG -3'

Figura 7: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação gene da Adenina Fosforribosil Transferase (APRT) de *Homo sapiens* por PCR. Os sítios para clivagem com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* estão destacados em vermelho e azul, respectivamente.

Para a expressão da hAPRT recombinante, uma única colônia de *E. coli* BL21(DE3), contendo o vetor pET29a(+) foi cultivada em 5 mL de meio LB líquido (pré-inóculo) a 37 °C, acrescido de 30 µg/mL de Kanamicina e mantido sob agitação constante de 250 rpm durante 12 horas. O pré-inóculo foi utilizado pra inocular 500 mL de meio 2xYT contendo Kanamicina em concentração final de 30 µg/mL. As condições de crescimento bacteriano foram às mesmas utilizadas no pré-inóculo. Ao atingir a densidade ótica de 0,6 ( $D.O_{600\text{ nm}} = 0,6$ ), a cultura foi induzida a produzir a proteína alvo pela adição de 0,1 mM, concentração final, de isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). O crescimento da cultura induzida foi mantido por 6 horas nas condições previamente descritas.

A purificação da proteína recombinante foi realizada em dois passos cromatográficos. Inicialmente a cultura de *E. coli* contendo a proteína alvo foi centrifugada a 6000 g por 10 min a 4° C para separar o meio de cultura. As células do “pellet” foram recolocadas em suspensão pela adição de 10 mL do tampão A (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Nessa condição as células foram rompidas por 5 pulsos de ultra-som (Fisher Scientific model Sonic Dismembrator 550). O experimento foi realizado sob banho de gelo mantendo-se cada pulso de 1 minuto intercalado por igual período de repouso. O extrato de células foi clarificado por centrifugação a 20.000 g por 30 minuto a 4°C. A fração solúvel foi aplicada em uma coluna de 10 mL de AMP-agarose (SIGMA A3019), previamente equilibrada com tampão A. A coluna foi lavada com 40 mL de tampão A mantendo-se o fluxo de 0,7 mL/min e a temperatura de 4°C. A hAPRT foi removida da coluna pela aplicação de 20 mL de tampão B (tampão A suplementado de 2 mM AMP). A proteína recombinante parcialmente purificada foi então aplicada em coluna de exclusão molecular Superose-12 com 25 mL de resina

(Pharmacia Biotech), previamente equilibrada com tampão A. A cromatografia foi realizada mantendo-se o fluxo de 0,5 mL/min. A purificação foi acompanhada por gel eletroforese (15% SDS-PAGE).

A massa molecular aparente da proteína recombinante, em condições não desnaturantes, foi determinada por cromatografia em coluna Superose-12. Foram utilizadas as proteínas Soroalbumina bovina (peso molecular 67 kda), Anidrase Carbônica (30 kda) e Citocromo C (13,7 kda), como referências de massas moleculares. A cromatografia foi realizada com tampão 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM MgCl<sub>2</sub> a 25°C, mantendo-se o fluxo de 0,5 mL/min.

O ponto isoeletrico da hAPRT foi determinado experimentalmente em gel de focalização isoeletrica (PHAST system Pharmacia Biotech). Para o seqüenciamento do N-terminal, a hAPRT purificada foi concentrada a 8 mg/mL e transferida para uma membrana de PVDF (Sequi-Blot PVDF Membrane Bio-Rad). A seqüência de aminoácidos foi então analisada pelo método de degradação de Edman [20].

Os valores de  $K_m$  para os substratos PRPP e adenina foram medidos de acordo com o método descrito por Tuttle *et al.* a 25°C [21]. O volume final de reação utilizado foi 500  $\mu$ L. Cada experimento foi iniciado pela adição de 20 nM de hAPRT e monitorado a 259 nm por 30 segundos. Para determinar o  $K_m$  para o PRPP, a concentração de adenina foi mantida constante; variando-se a concentração de PRPP entre 2,5 a 80  $\mu$ M. O valor de  $K_m$  para adenina foi obtido mantendo-se constante a concentração de PRPP em 25  $\mu$ M e variando-se a concentração de adenina entre 1 a 10  $\mu$ M.

## 2.2. Cristalização, coleta de dados de difração de raios-X, elucidação e refinamento da estrutura da hAPRT

Os ensaios de cristalização foram realizados pelo método de difusão de vapor com "gota dependurada" [22]. Foram utilizadas placas de cristalização contendo 24 poços cada (Hampton Research). Os melhores resultados foram obtidos a 18°C utilizando-se a hAPRT a 6 mg/mL. A proteína, no próprio tampão da purificação, foi concentrada por ultrafiltração em dispositivos Centriprep e Centricon 10 (Millipore). A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford [23]. Gotas de cristalização foram montadas misturando-se 5 µL da hAPRT concentrada a 6 mg/mL com 5 µL da solução de cristalização. Os testes de cristalização preliminares foram realizados com as soluções dos fatoriais incompletos da Hampton Research (Fatoriais I, II, Cryo, PEG). Os melhores cristais foram obtidos em glicerol 15,0 % (V/V), polietileno glicol 4000 25,5% (m/V), acetado de sódio 0,17 mol/L e tampão Tris-HCl 0,085 mol/L pH 8,5.

A coleta de dados de difração de raios X foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS-Campinas) em comprimento de onda de 1,45Å. Um cristal foi retirado da gota com uma alça de nylon (Hampton Research) e rapidamente congelado em nitrogênio líquido a 100 K (Oxford Cryosystems). Com o cristal alinhado a 200 mm do detector foram coletadas 70 imagens com 1° de oscilação cada. O conjunto de dados foi processado com os programas MOSFLM [24] e SCALA [25].

A estrutura da hAPRT foi elucidada pelo método de substituição molecular através do pacote de programas AMoRE [26]. A Estrutura da APRT de *L. tarentolae* [27], na forma apo e sem moléculas de água, foi empregada como modelo de busca para a determinação das fases iniciais. A matriz de rotação e o vetor de translação foram encontrados impondo-se os limites de resolução de 18,3 a 3,5 Å. O modelo inicial foi refinado a resolução máxima de 2,1 Å através do programa CNS [28]. Após cada ciclo do refinamento o modelo foi inspecionado

visualmente com o programa gráfico O [29]. Ajustes "manuais" no modelo foram feitos com base em mapas de densidade eletrônica tipo  $|F_o|-|F_c|$  e  $2|F_o|-|F_c|$ . As moléculas de água foram incorporadas ao modelo com o programa Arp\_waters [30]. O refinamento foi concluído quando não se obtinha mais variações significativas nos valores de  $R_{\text{trabalho}}$  e  $R_{\text{livre}}$  e não se observavam evidências na densidade eletrônica para mais átomos estruturados. A avaliação da qualidade do modelo final foi feita com os programas PROCHECK [31] e SFCHECK [32], antes da deposição do modelo no Protein Data Bank (PDB) sob o código 1ORE.

### **2.3. Comparação da estrutura da hAPRT com outras PRTases**

A estrutura da hAPRT, recém elucidada, foi comparada às demais estruturas de fosforribosiltransferases (PRTases) disponíveis no PDB (Tabela 1). Todas as estruturas foram sobrepostas com o programa SWISS-PDBviewer [33]. Nesse procedimento utilizam-se como referência os carbonos alfa ( $C_\alpha$ ) do "loop" de ligação do PRPP (resíduos 147-151 da hAPRT), que é conservado na família das PRTases [34]. A visualização e análise das estruturas sobrepostas foram feitas com o programa gráfico O [29]. As PRTases contendo AMP ligado ao sítio ativo (códigos PDB 1MZV, 1QB8) foram também sobrepostas a hAPRT com base nas coordenadas do  $C_\alpha$  das estruturas completas.

### **2.4. Mutações sítio dirigidas na hAPRT**

Quatro mutações sítio dirigidas foram feitas no gene da hAPRT inserido em vetor de expressão pET-29a(+) (Novagen #69259-3) [35]. Cada mutação foi realizada em experimento de PCR, empregando-se a técnica "QuikChange site-directed mutagenesis" [36]. Nesse procedimento foi utilizado o "kit" para mutações pontuais Stratagene 200518 [37]. Inicialmente foram sintetizados dois oligonucleotídeos complementares para cada uma das

quatro mutações. As seqüências de bases dos oligonucleotídeos utilizados estão representadas na Figura 8.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 5'-catcgcaggcct <b>agtct</b> ccccgaggc-3'<br>ctacatcgcaggcct <b>agact</b> ccccgaggcttcc<br>gatgtagcgtccggatctgagggctccgaagg ) bases gene nativo<br>3'-gtagcgtccggatc <b>ag</b> agggctccg-5'<br>Y I A G L <b>D</b> S R G F L<br>60 <span style="margin-left: 100px;"><i>V</i></span> 70                                                        | D65 V primer-1<br>D65 V primer-2       |
| 5'gggaaggctgag <b>ccg</b> gagattcag-3'<br>gggaaggctgag <b>ctg</b> gagattcagaa ) bases gene nativo<br>cccttcgactcgacctctaagtctt )<br>3'-cccttcgactcg <b>g</b> cctctaagtc-5'<br>Y G K A E <b>L</b> E I Q K D<br>105 <span style="margin-left: 100px;"><i>F</i></span> 115                                                                       | L110 P primer-1<br>L110 P primer-2     |
| 5'-actggtggaacc <b>acg</b> aacgctgcc-3'<br>gccactggtggaacc <b>atg</b> aacgctgcctg ) bases gene nativo<br>cggtgaccaccttgg <b>t</b> acttgcgacggac )<br>3'-tgaccaccttgg <b>t</b> gcttgcgacgg-5'<br>A T G G T <b>M</b> N A A C<br>131 <span style="margin-left: 100px;"><i>T</i></span> 135 <span style="margin-left: 100px;"><i>T</i></span> 140 | M136 T primer-1<br>M136 T primer-2     |
| 5'-gcacctgtacc---ttctct-3'<br>ctggcacctgtacc <b>cttctct</b> ) bases gene nativo<br>gaccgtggacatgggaagaagaga )<br>3'-cgtggacatggg---aagaga-5'<br>L A P V P <b>F</b> F S<br>170 <span style="margin-left: 100px;"><i>Del</i></span> 175                                                                                                         | F173 Del primer-1<br>F173 Del primer-2 |

Figura 8: Oligonucleotídeos utilizados nas mutações sítio dirigidas da hAPRT. Cada retângulo representa uma mutação. Em azul estão marcados os oligonucleotídeos utilizados. As mutações estão marcadas em vermelho. Em marrom e verde são representados respectivamente os resíduos originais e os mutados. As seqüências de nucleotídeos e resíduos originais estão representadas em preto. As posições na seqüência de aminoácidos em que houveram mutações estão representadas em *italico*. Em preto está representada a seqüência gênica nativa. Del, indica a remoção do resíduo.

Os oligonucleotídeos foram previamente purificados em gel de poliacrilamida. Cada reação para mutagenese continha 150 ng de ambos os oligonucleotídeos complementares, 50 ng de DNA pET-29a(+)/ gene hAPRT, 2,5 U/ $\mu$ L de Pfu-turbo DNA polimerase (Stratagene), 5 nM de dNTPs. As mutações foram feitas em termociclador "GeneAMP 2400" (Perkin-Elmer CETUS) ajustado para 1 minuto de desnaturação a 95°C, seguido por 12 ciclos de desnaturações a 95°C por 0,5 minuto, intercalados por períodos de anelamentos a 55°C por 1 minuto e períodos de extensão de 6 minutos a 68°C. Ao final do décimo segundo ciclo a reação foi mantida por 10 minutos a 68°C e posteriormente resfriada a 4°C.

O produto do PCR foi digerido com a enzima *Dpn I* (Stratagene) para eliminação do DNA parental. Na digestão foram utilizados 10 µL do produto do PCR e 1 µL de enzima a 10U/µL, cautelosamente homogeneizada, e mantidos em repouso a 37°C por 1 hora. O DNA linear foi introduzido em bactéria competente XL1-Blue (Stratagene). Foram utilizados 50 µL de células competentes descongeladas cuidadosamente em banho de gelo e 5 µL do DNA produzido por PCR. A “mistura” foi cautelosamente homogeneizada com pipetador e deixada em repouso por 30 minutos no gelo. Após esse tempo foi realizado choque térmico (75 segundos a 42°C e 3 minutos no gelo) seguido do acréscimo de 450 µL de meio de cultura SOC, previamente aquecido a 37°C. As células cresceram por 1 hora sob agitação de 225rpm. Parte da cultura (50 µL) foi transferida para placa de Petri contendo 25 mL de meio de cultura LB sólido, suplementado com tetraciclina (5 µg/mL) e canamicina (30 µg/mL). A placa assim preparada foi mantida a 37°C por 24 horas. Três clones de cada uma das quatro mutações foram analisados em seqüenciador tipo ABI377 DNA. Na amplificação do gene hAPRT foram utilizados os oligonucleotídeos T7 “forward” e T7 “reverse”, indicados para o seqüenciamento de genes clonados em vetor pET [35]. As seqüências obtidas foram analisadas com o programa Generun, e comparadas à seqüência parental com o programa Multalin [38].

Os mutantes selecionados pelo seqüenciamento foram introduzidos em bactérias competentes *Escherichia coli* BL21 (DE 3). Os protocolos para transformação da *E. coli* e expressão das formas mutantes foram rigorosamente os mesmos utilizados para a hAPRT nativa (item 2.1). Para a purificação, as células foram centrifugadas a 6000 g por 10 minutos a 4°C e resuspendidas em 5 mL de tampão C (200 mM fosfato de sódio, pH 7,4). As células foram rompidas através de seis ciclos de congelamento em N<sub>2</sub> líquido e descongelamento a 42°C. O extrato foi clarificado por centrifugação a 20.000 g por 30 minutos a 4°C. A fração solúvel foi diluída dez vezes em água e aplicada em alíquotas de 20 mL em coluna de 50 mL

de Hydroxyapatite ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}_2$ ), previamente equilibrada com tampão C 20 mM. A coluna foi inicialmente lavada com 250 mL de tampão C 20 mM mantendo-se o fluxo de 2,0 mL/min a temperatura ambiente. A retirada das proteínas que permaneceram ligadas à coluna foi realizada por gradiente isocrático de 100 ml com tampão D (mesmo tampão C com 0,5 M NaCl). As frações (2mL cada) correspondentes à proteína mutante foram coletadas durante a lavagem inicial da coluna. A purificação foi acompanhada em gel eletroforese (15% SDS-PAGE). A atividade específica de cada uma das formas mutantes da hAPRT foi analisada em espectrofotômetro de acordo com Tuttle *et al.* a 25 °C. [21].

A proteína hAPRT contendo a mutação F173Del não foi produzida na forma solúvel. Com o propósito de investigar as alterações estruturais que esta mutação pode causar no enovelamento da proteína; foi feito um modelo do mutante F173Del. A modelagem foi feita com o programa Modler [39] usando a estrutura da hAPRT nativa como modelo inicial.

## **2.5. Conclusão do refinamento da estrutural tridimensional da APRT de *Leishmania tarentolae*.**

Cristais de APRT de *Leishmania tarentolae* (lAPRT), foram obtidos e dados de difração de raios-X foram coletados conforme é apresentado na dissertação de mestrado [40]. A estrutura da adenina fosforribosil transferase de *Leishmania tarentolae* (lAPRT), foi elucidada pelo método de substituição molecular através do pacote de programas AMoRE [26]. A Estrutura da APRT de *L. donovani* (código PDB: 1QB7) [8], na forma apo e sem moléculas de água, foi empregada como modelo de busca para a determinação das fases iniciais. As matrizes de rotação e translação foram encontradas impondo-se os limites de resolução de 30,0 a 2,2 Å. O modelo inicial foi refinado a resolução máxima de 2,2 Å através do programa CNS [28]. Após cada ciclo do refinamento o modelo foi inspecionado

visualmente com o programa gráfico O [29]. Ajustes "manuais" no modelo foram feitos com base em mapas de densidade eletrônica tipo  $|F_o|-|F_c|$  e  $2|F_o|-|F_c|$ . As moléculas de água foram incorporadas ao modelo com o programa Arp\_waters [30]. O refinamento foi concluído quando não se obtinha mais variações significativas nos valores de  $R_{\text{trabalho}}$  e  $R_{\text{livre}}$  e não se observavam evidências na densidade eletrônica para mais átomos estruturados. A avaliação da qualidade do modelo final foi feita com os programas PROCHECK [31] e SFCHECK [32] antes da deposição do modelo no Protein Data Bank (PDB) sob o código 1MZV.

## **2.6. Seleção de inibidores das PRTases (APRT; HGPRT e XPRT) de leishmania**

Para a pesquisa de inibidores, as enzimas recombinantes APRT, HGPRT e XPRT, purificadas de acordo com protocolos previamente descritos [27,41,42] foram estocadas a 1 mg/mL a  $-80^{\circ}\text{C}$  em tampão (Tris-HCl 100 mM, pH 7.4,  $\text{MgCl}_2$  5 mM e glicerina 10% (v/v)).

Os testes de inibição foram feitos em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 259, 255 e 254 nm para APRT, HGPRT e XPRT, respectivamente. Esses testes permitem explorar a variação de absorbância promovida pela conversão dos substratos em produtos, conforme descrito por Tuttle *et al.* [21]. As reações foram feitas em volume final de 500  $\mu\text{L}$  de soluções. APRT: 100 mM Tris-HCl pH 7,4, 100  $\mu\text{M}$  PRPP, 50  $\mu\text{M}$  Adenina, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ . HGPRT: 100 mM Tris-HCl pH 7,4, 100  $\mu\text{M}$  PRPP, 40  $\mu\text{M}$  guanina, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ . XPRT: 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 100  $\mu\text{M}$  PRPP, 50  $\mu\text{M}$  xantina. Todos os ensaios foram feitos a  $25^{\circ}\text{C}$  e monitorados por 1 minuto (APRT e HGPRT) ou 0,5 minuto (XPRT). Soluções estoques de extratos de *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae), foram preparadas a 1mg/mL em dimetil sulfoxido (DMSO). A concentração máxima de DMSO a ser utilizada nos experimentos foi determinada experimentalmente. Em todos os testes de inibição a concentração de DMSO utilizada foi de 5% (v/v). Os testes iniciais foram feitos apenas com a APRT mantendo-se os extratos a concentração final de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A atividade inibitória foi



obtida pela comparação da quantidade de produto formado na presença ou ausência da substância teste. Os extratos com atividade inibitória foram fracionados para purificação dos inibidores conforme descrito nas referências [43-46]. Os inibidores puros foram testados em ensaios com a IAPRT, IHGPRT e IXPRT para determinação da concentração capaz de inibir a atividade enzimática em 50 por cento (IC<sub>50</sub>).

## **2.7. Testes de inibidores de PRTases em culturas de *Leishmania major* promastigota**

Os inibidores com atividade nas três PRTases de *Leishmania* (APRT, HGPRT e XPRT) foram analisados quanto à capacidade leishmanicida em cultura de *L. major* promastigota. Soluções estoque dos inibidores a 5,0 mg/mL em DMSO, serviram como base para diluições feitas diretamente no meio de cultura no momento do uso. Em todos os testes a concentração do DMSO foi mantida inferior a 0,5 % v/v, condição atóxica para *L. major* promastigota [47]. As células na forma promastigota foram cultivadas até a concentração de  $1,5 \times 10^4$  célula/mL em meio M199 (Gibco Laboratories, New York, NY, USA) suplementado com 10 % v/v soro fetal bovino, 10 mM adenina, 10 mg/mL penicilina, 10 mg/mL estreptomicina, 0,25 % v/v cloreto de himina, 0,1 % v/v biotina e 1,0M hepes pH 7,5. As culturas do parasita foram feitas na presença e na ausência de inibidor. Foram testadas concentrações finais de inibidor entre 50 e 1 µg/mL. O efeito inibitório foi monitorado em uma câmara de Newbauer pela contagem das células vivas após 48 horas de incubação, em estufa de CO<sub>2</sub> a 26° C.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1. Clonagem, expressão, purificação e caracterização da enzima Adenina Fosforribosil transferase (APRT) de *Homo sapiens*

A amplificação do gene de hAPRT foi confirmada pela presença de uma banda com aproximadamente 550 pares de bases (pb) em gel de agarose (Figura 9A). Após a amplificação, o gene foi clonado em vetor pGEM-T e inserido em bactérias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ . As células bacterianas foram plaqueadas em meio LB sólido e foi observado o crescimento de 27 colônias referentes à transformação pGEM-T / hAPRT. No controle negativo não ocorreu crescimento bacteriano. Três colônias, escolhidas aleatoriamente tiveram o vetor extraído e digerido com as enzimas de restrição *Nde I* e *XhoI*. A presença do inserto em uma das colônias foi confirmada em gel de agarose (Figura 9B). O clone positivo foi subclonado em vetor pET29a(+) e inserido em bactérias competentes *E. coli* BL21 (DE3). As células foram cultivadas em meio LB sólido, o DNA plasmidial de uma colônia foi extraído e digerido com as enzimas *Nde I* e *XhoI* confirmando a presença do inserto (Figura 9C). Após a clivagem pode-se distinguir uma banda com aproximadamente 5 kb, que corresponde ao vetor pET29a(+) e uma banda correspondente ao inserto. O gene de hAPRT, no vetor de expressão, foi completamente seqüenciado e não foram detectadas mutações.

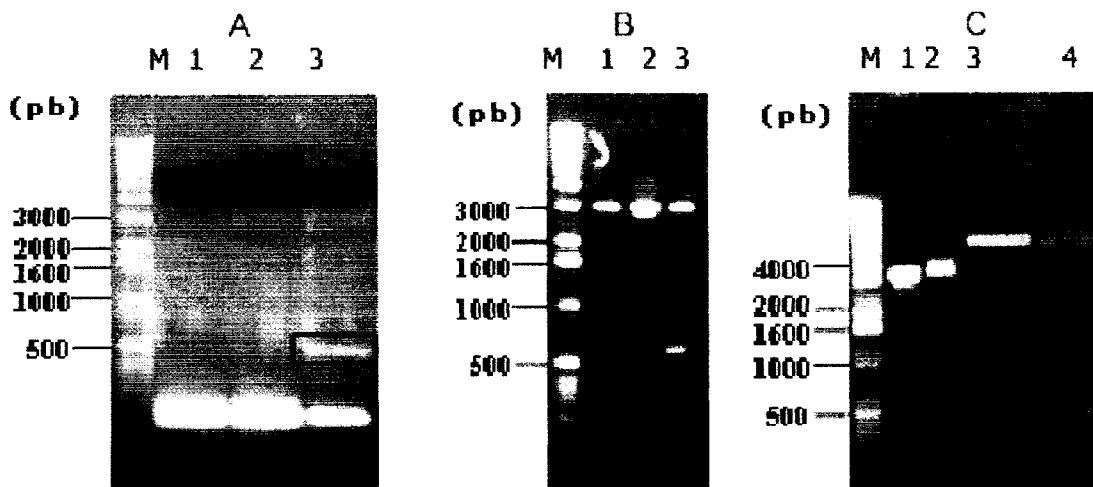


Figura 9: Etapas da clonagem do gene da APRT de *H. sapiens* por PCR. A-Amplificação do gene a partir de uma biblioteca de c-DNA de cérebro de feto humano. M-Marcador de DNA. 1 a 3. diferentes tentativas de amplificação do gene 3, gene hAPRT amplificado. B-Análise da presença do gene hAPRT em 4 clones de *E. coli* DH5 $\alpha$ , após a clivagem com as enzimas de restrição *Nde I-Xho I*. C-1 a 4 análise da presença do gene hAPRT em 4 clones de *E. coli* BL21 (DE3), após a clivagem com as enzimas de restrição *Nde I-Xho I*. O clone 4 apresentou o padrão de bandas esperado (clone positivo). Os retângulos vermelhos destacam as bandas com aproximadamente 550 pares de bases, tamanho esperado para o gene de hAPRT.

O vetor pET29a(+) apresenta uma região operadora *lac*, um promotor específico para T7 RNA polimerase do bacteriófago  $\lambda$  e um gene de resistência a canamicina. Com essa construção, o vetor necessita que a bactéria produza a T7 RNA polimerase do bacteriófago  $\lambda$  para que possa ocorrer a transcrição dos genes associados a seu operador *lac*. Um teste rápido de expressão da hAPRT, em *E. coli* BL21 (DE3), induzido com 1 mM de IPTG durante 4 horas, confirmou a Expressão da proteína de interesse na colônia isolada. O protocolo para maximizar a produção da proteína na forma solúvel foi determinado experimentalmente. A concentração adequada de IPTG para a expressão da hAPRT recombinante é 100  $\mu$ M, pois concentrações superiores levam a produção da proteína na forma insolúvel (Figura 10A). Depois de determinar a concentração apropriada do agente indutor, foi estabelecido o tempo ideal de expressão. A Figura 10B representa o aumento da quantidade de hAPRT solúvel em relação ao tempo de expressão. Nota-se que após 6 horas de indução não ocorre aumento significativo da proteína de interesse.

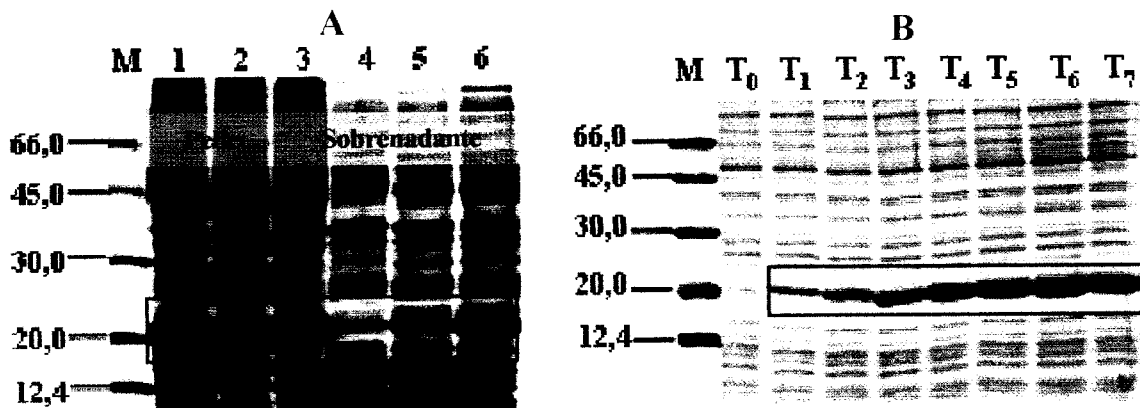


Figura 10: Géis de poliacrilamida comparando os níveis de expressão da hAPRT nas formas solúvel e insolúvel obtidos a partir da clonagem em bactérias *E. coli* BL21DE(3). A- M-Padrão de peso molecular (kda). Poços 1, 2, 3 proteína insolúvel. 4, 5, 6 proteína solúvel. 1 e 4 induzido com IPTG 1mM. 2 e 5 induzido com IPTG 0,5mM. 3 e 6 induzido com IPTG 0,1mM. O retângulo vermelho destaca a região do gel em que a hAPRT é encontrada por apresentar aproximadamente 20 kda quando está desnaturada. Note que a maior quantidade de hAPRT solúvel foi obtida com o clone *E. coli* BL21DE(3) induzido com 0,1 mM de IPTG. B- M-Padrão de peso molecular (kda). T-Tempos de expressão em horas, mantendo-se a concentração de IPTG em 0,1 mM. Nota-se, no retângulo vermelho, que após 6 horas não ocorre mais aumento na quantidade de hAPRT solúvel.

Os diversos ajustes no protocolo de expressão possibilitaram a produção de hAPRT solúvel, apesar da grande perda de proteína na forma insolúvel. Experimentos de expressão mudando a temperatura de 37°C para 20°C mostram resultados semelhantes aos apresentados na Figura 10. Assim optou-se por manter a temperatura de expressão em 37°C. A purificação da hAPRT foi facilitada pela utilização de cromatografia de afinidade em coluna de AMP agarose. Após a cromatografia de afinidade foram observados poucos contaminantes em quantidades significativas (Figura 11). O passo final de purificação foi realizado em cromatografia de exclusão molecular. A pureza da amostra foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida. Conforme o esperado [48] a hAPRT recombinante migrou como uma banda única com peso molecular aproximado de 25 kDa (Figura 11).

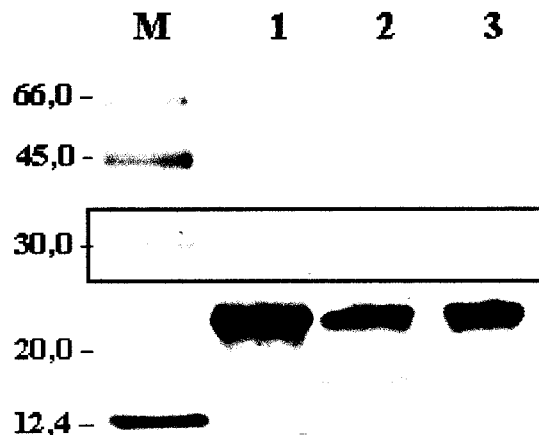


Figura 11: Gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata, mostrando os resultados da purificação da hAPRT. M-Padrão de peso molecular (kDa). 1- Proteína total solúvel antes da purificação. 2- hAPRT parcialmente purificada na coluna de afinidade AMP-agarose. Essa proteína foi aplicada na coluna de gel filtração superose 12. 3- hAPRT pura eluída da superose 12. O retângulo vermelho destaca as bandas com aproximadamente 25 kDa correspondentes a hAPRT.

A atividade catalítica da proteína recombinante foi comparada à proteína nativa em termos dos valores de  $K_m$  para ambos os substratos. Os valores de  $K_m$  obtidos experimentalmente, pela metodologia descrita por Tuttle *et al.* [21], foram  $4,0 \mu\text{M}$  e  $8,9 \mu\text{M}$  respectivamente para adenina e PRPP. Estes valores são consistentes com os previamente descritos para hAPRT e outras APRTs de outros mamíferos [49,50].

A massa molecular aparente da hAPRT purificada, determinada por cromatografia de exclusão molecular, foi  $46,5 \text{ kDa}$ . O valor obtido é consistente com o esperado para o homodímero fisiológico da hAPRT nativa [48]. O ponto isoelétrico ( $P_i$ ), determinado experimentalmente para a proteína recombinante, foi  $5,4$ , próximo ao  $P_i$  teórico de  $5,8$  calculado com o programa ProtParam [51] usando a seqüência de aminoácidos. O  $P_i$  obtido experimentalmente também é similar aos valores de  $4,78$  e  $4,55$  previamente reportados para a proteína nativa [48,49].

A pureza da proteína é um dos fatores mais importantes para a cristalização dessas macromoléculas [52]. Assim, o estabelecimento de um protocolo eficiente de purificação da

hAPRT representou a conclusão de uma importante etapa do trabalho. A proteína recombinante purificada apresentou propriedades bioquímicas equivalentes à proteína nativa validando o sistema de expressão utilizado.

### **3.2. Cristalização, coleta de dados de difração de raios-X, elucidação da estrutura e validação do modelo da hAPRT**

Foram realizadas diversas tentativas de cristalização da hAPRT utilizando os fatoriais de cristalização disponíveis no laboratório de cristalografia do IFSC. As condições testadas, que resultaram em indícios de cristais, foram refinadas a partir do preparo de novas soluções de cristalização. Nas novas soluções foram testadas variações sutis (0,2) de pH, concentração de agente precipitante, concentração da proteína na gota de cristalização e presença de aditivos. Ao final do refinamento das condições de cristalização, foram obtidos cristais em três condições diferentes (Figura 12). Testes preliminares de difração de raios-X, realizados no laboratório de cristalografia de proteínas do IFSC, demonstraram que apenas os cristais crescidos na condição: 0,085 M Tris-HCl, pH 8,5, 0,17 M Acetato Trihidratado de Sódio, 25,5% m/v Polietileno Glycol 4000 e 15% v/v Glicerol anidro, produziam dados processáveis com os programas MOSFLM ou HKL [24,53]. Novos cristais foram obtidos nessa condição e utilizados em coletas de dados difração de raios-X realizada no LNLS. Para a coleta de dados o cristal, representado na figura 12 A, foi montado em “loop” de “nylon<sup>®</sup>” (HAMPTON) e submetidos a fluxo contínuo de N<sub>2</sub> (g) a 100K. Nesse procedimento não houve a necessidade de transferir o cristal para outra solução uma vez que a condição de cristalização já era crio protetora. Os parâmetros utilizados para a coleta dos dados de difração de raios-X, no LNLS, são descritos na *tabela 2*.

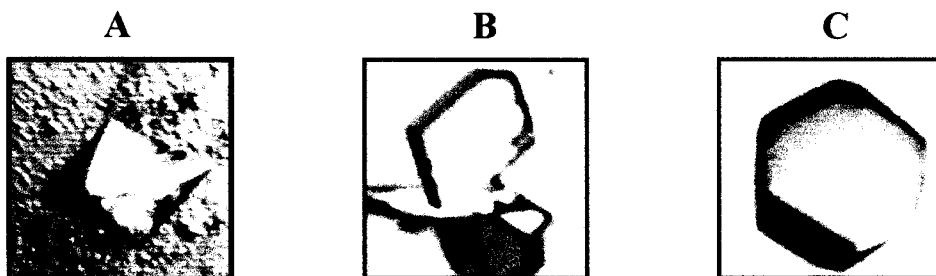


Figura 12: Cristais de hAPRT obtidos em três diferentes condições de cristalização. A-tampão: 0,085 M Tris-HCl, pH 8,5, 0,17 M Acetato Trihidratado de Sódio, precipitante: 25,5% m/v Polietileno Glycol 4000 e 15% v/v Glicerol anidro. B-tampão: 0,085 M Cacodilato de Sódio, pH 6,5, sal: 0,17 M Acetato de Sódio trihidratado precipitante: 25,5% m/v Polietileno Glycol 8000 e 15% v/v Glicerol anidro. C-tampão: 0,075 M HEPES-Na, pH 7,5. Precipitante: 0,6 M Fosfato de Sódio dihidratado e 25% v/v glicerol anidro. Todas as fotos foram feitas com a mesma ampliação. O cristal representado em “A” apresenta as seguintes dimensões aproximadas: 0.20 x 0.15 x 0.20 mm.

Tabela 2: Parâmetros utilizados na coleta de dados de difração de raios-X da proteína APRT de *Homo sapiens* realizada no LNLS (Campinas)

|                                        |                          |
|----------------------------------------|--------------------------|
| Fonte de raios-X                       | Síncrotron (CPr03, LNLS) |
| Comprimento de onda ( $\lambda$ ) (Å)  | 1,5450                   |
| Detector                               | MARCCD                   |
| Número de imagens                      | 70                       |
| Oscilação por imagens                  | 1,0°                     |
| Distância entre o cristal e o detector | 175 mm                   |
| Temperatura do cristal                 | 100 K                    |

As imagens contendo os padrões de difração foram processadas com resolução máxima de 2,1 Å com os programas MOSFLM [24] e SKALA [25]. Os dados coletados mostravam que o cristal pertencia ao sistema cristalino tetragonal, com parâmetros de cela  $a = b = 58,31$  Å e  $c = 109,54$  Å. As estatísticas do processamento dos dados são representadas na tabela 3.

O conjunto de dados obtidos no LNLS apresentou boa qualidade, então foi iniciada a determinação da estrutura pela busca de fases iniciais por Substituição Molecular. Um monomero da APRT de *L. tarentolae*, sem ligantes e sem moléculas de água [27] foi utilizado com modelo inicial de busca. A identidade entre a enzima de humano e de leishmania em

termos das seqüências de aminoácidos é de 25,5 % (Figura 13). Outros modelos de APRT poderiam ter sido utilizados na substituição molecular. A opção pela APRT de *L. tarentole* foi motivada por se tratar de uma estrutura elucidada em nosso trabalho anterior [27].

*Tabela 3:* Estatística do conjunto de dados da APRT de *Homo sapiens* coletados no LNLS (Campinas)

|                                                         |                                  |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Grupo Espacial                                          | P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 |
| Parâmetros da Cella Unitária: a , c (Å)                 | 58,31, 109,54                    |
| Resolução (Å)                                           | 40,0 – 2,10                      |
| Número de Reflexões Observadas                          | 95.875                           |
| Número de Reflexões Únicas                              | 11.527                           |
| Mosaicidade (°)                                         | 0,307                            |
| Completeza total (%)                                    | 99,3                             |
| Completeza na última faixa de resolução (2.2-2.1 Å) (%) | 97,0                             |
| R_merge total (%)                                       | 4,0                              |
| R_merge na última faixa de resolução (2.2-2.1 Å) (%)    | 11,2                             |
| I/σ (I) média do conjunto completo de dados             | 12,2                             |

|        |                                                            |                                                  |            |                     |     |     |
|--------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------|---------------------|-----|-----|
|        | 10                                                         | 20                                               | 30         | 40                  | 50  | 60  |
| l_APRT |                                                            |                                                  |            |                     |     |     |
| h_APRT | MPFKEVSPNSFLLDDSHALSQLLKKSYPVFS                            | PRNVPRFADVSSITESPETLKAIRD                        |            |                     |     |     |
| l_APRT | -----MADSEL--                                              | QLVEQIRISFPDFPT                                  | PGVV--     | FRDISPVLKDPASFRAAIG |     |     |
| h_APRT | 70                                                         | 80                                               | 90         | 100                 | 110 | 120 |
| l_APRT |                                                            |                                                  |            |                     |     |     |
| h_APRT | FLVQRYRAMSPAPT-HILGFDARGFLFGPMIAVELEI                      | PFVLMRKADKNAGLLIRSEPYEK                          |            |                     |     |     |
| l_APRT | LLARHLKATHGGRIDYIAGLDSRGLFGPSLAQELGLGCVLIRKRGKLP           | GPLWAS-YSL                                       |            |                     |     |     |
| h_APRT | 130                                                        | 140                                              | 150        | 160                 | 170 | 180 |
| l_APRT |                                                            |                                                  |            |                     |     |     |
| h_APRT | EYKEAAPEVMTIRYGSIGKGSRVVLIDDVLATGGTALSGLQVEASDAVVEMVSILSIP |                                                  |            |                     |     |     |
| l_APRT | EYGKAELE---                                                | IQKDALEPGQRVVVDDLLATGGTMNAACELLGRLQAEVLECVSLVELT |            |                     |     |     |
| h_APRT | 190                                                        | 200                                              | 210        | 220                 | 230 |     |
| l_APRT |                                                            |                                                  |            |                     |     |     |
| h_APRT | FLKAAEKIHSTANSRYKDIKFISLLSDDALTEENC                        | GDSKNYTGPRVLS                                    | CGDVLAEHPH |                     |     |     |
| l_APRT | SLKGREKL-----                                              | APVPFFSLLQYE-----                                |            |                     |     |     |
| h_APRT |                                                            |                                                  |            |                     |     |     |

Figura 13: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das APRTs de *Leishmania tarentolae* e de *Homo sapiens*. Em vermelho são destacados os resíduos de aminoácidos idênticos nas duas seqüências. Nota-se que existem 25,5 % de identidade seqüencial nos alinhamentos entre as duas proteínas.

O pacote de programas AMoRE [54], foi utilizado na tentativa de encontrar a matriz



de rotação e o vetor de translação entre os mapas de Patterson do modelo e do gerado com as intensidades coletadas. Nesse procedimento foram utilizados os limites de busca entre 18 e 3,5 Å de resolução. O grande contraste observado entre os coeficientes de correlação apresentados na *tabela 4*, aponta a solução 1 como a mais favorável a ser utilizada na substituição molecular da APRT de *H. sapiens*. Os parâmetros de rotação e translação foram aplicados ao modelo APRT de *L. tarentolae* e suas novas coordenadas foram usadas para o refinamento de corpo rígido com o programa Fiting. Esse procura minimizar a diferença entre os valores de  $F_{obs}$  e  $F_{calc}$  [26]. Após esse procedimento o coeficiente de correlação passou para 39,8 %, indicando que a solução encontrada pelo AMoRE estava correta. Dessa forma, a molécula modelo foi orientada na cela cristalina da APRT de *H. sapiens* e, um modelo inicial para a estrutura tridimensional da proteína hAPRT foi obtido.

*Tabela 4:* Matriz de rotação e vetor de translação propostos pelo programa AMoRe para substituição molecular da proteína APRT de *Homo sapiens*

| Soluções encontradas | Vetores de rotação |             |              | Vetores de translação |        |        | Coeficiente de correlação (%) |
|----------------------|--------------------|-------------|--------------|-----------------------|--------|--------|-------------------------------|
|                      | $\alpha$ (°)       | $\beta$ (°) | $\gamma$ (°) | (X)                   | (Y)    | (Z)    |                               |
| 1                    | 41,40              | 65,45       | 203,86       | 0,3370                | 0,4571 | 0,1977 | 26,4                          |
| 2                    | 44,56              | 75,09       | 215,28       | 0,1859                | 0,5393 | 0,4023 | 16,7                          |
| 3                    | 77,45              | 57,83       | 245,98       | 0,1738                | 0,3529 | 0,0697 | 18,3                          |

O modelo inicial foi refinado com o programa CNS [28] com resolução máxima de 2,1 Å. Nesse procedimento, mapas de densidade eletrônica  $2|F_o|-|F_c|$  e  $|F_o|-|F_c|$  foram calculados e inspecionados visualmente com o programa O versão 8 [29]. Vários ajustes no modelo foram feitos em diversos ciclos de refinamento.

O modelo final da hAPRT é composto por um homodímero. Cada monômero compreende 179 resíduos de aminoácidos (numerados de 2-180), 206 moléculas de água, 1 molécula de AMP e 1 íon cloreto.

A cadeia polipeptídica, em geral, é perfeitamente descrita pela densidade eletrônica. A densidade eletrônica do ligante AMP também é claramente identificada (Figura 14). Os resíduos de alanina e de aspartato, respectivamente 2 e 3 da cadeia polipeptídica, foram modelados com dificuldade devido a pobre densidade eletrônica local.

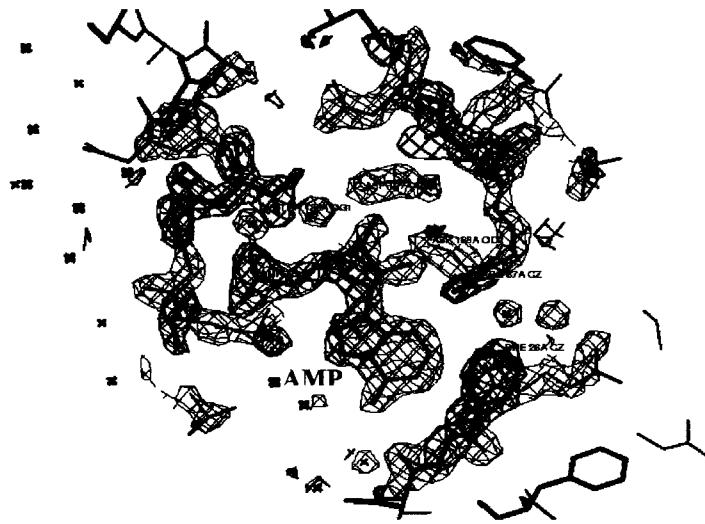


Figura 14: Mapa de densidade eletrônica  $2|F_o|-|F_c|$  (2,1 Å de resolução e contorno de  $2\sigma$ ) de parte do sítio ativo do modelo final de hAPRT. Nota-se que a molécula de AMP, no centro da Figura, é perfeitamente englobada pela densidade eletrônica.

Todas as estruturas de APRTs ligadas a AMP previamente reportadas [8,27], apresentam um íon magnésio ligado ao sítio ativo. Isso se deve ao importante papel desse íon no mecanismo catalítico das PRTases [5]. Análises preliminares na estrutura da hAPRT, feitas pela inspeção da densidade eletrônica, não revelaram a presença de íon  $Mg^{2+}$ . Buscas minuciosas, por possíveis coordenações do íon, feitas com os programas WASP [55] e Xpand [56], foram igualmente improdutivas e o modelo final da hAPRT foi construído sem íon  $Mg^{2+}$ . Por outro lado, a densidade eletrônica apontou para a presença de um íon cloreto próximo à cadeia lateral do resíduo R87. Tentativas de refinamento com uma molécula de água ou com dupla conformação da cadeia lateral do R87 na posição do íon não foram bem

sucedidas. Os valores dos fatores R aumentaram e a densidade eletrônica local piorou em relação ao refinamento feito com íon cloreto. O íon cloreto, incorporado ao modelo, provavelmente advém da solução tampão utilizada na purificação da proteína e, como era esperado, não está fazendo nenhuma interação relevante no sítio catalítico da hAPRT.

A validação do modelo final foi feita com os programas Procheck, Quality e Verify-3D [57-59]. Pelo diagrama de Ramachandran, calculado com o programa Procheck, nenhum dos resíduos de estrutura da hAPRT apresenta os ângulos diédricos  $\Psi$  e  $\phi$  desfavoráveis (Figura 15). A cadeia polipeptídica do modelo da hAPRT é composta por 179 resíduos. Os valores ideal e mínimo aceitável, propostos pelo programa Verify-3D para esse modelo, foram respectivamente 105,2 e 47,3. O índice da qualidade, calculado pelo Verify-3D para o modelo da hAPRT foi 101,1, portanto, bem próximo ao valor ideal proposto pelo programa. A análise do enovelamento do modelo da hAPRT feita com o programa Verify-3D está representada na Figura 16. Os dados mais relevantes do refinamento da estrutura da hAPRT são representados na *tabela 5*.

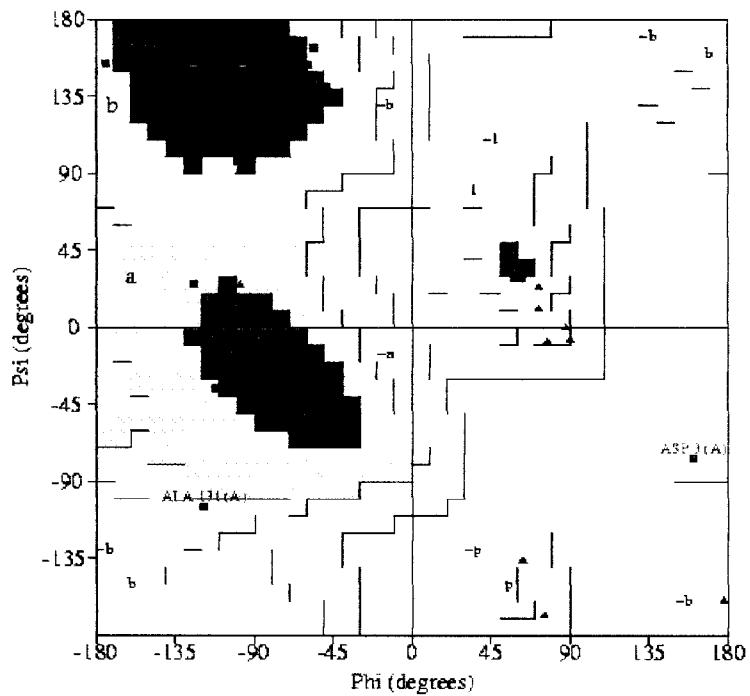


Figura 15: Diagrama de Ramachandran determinado da estrutura da APRT de *Homo sapiens*. Observa-se 94,0% dos resíduos nas regiões mais favoráveis do diagrama (vermelha) e 6,0% em outras regiões permitidas ou generosamente permitidas (amarela). Não ocorre nenhum resíduo nas regiões não permitidas do diagrama.

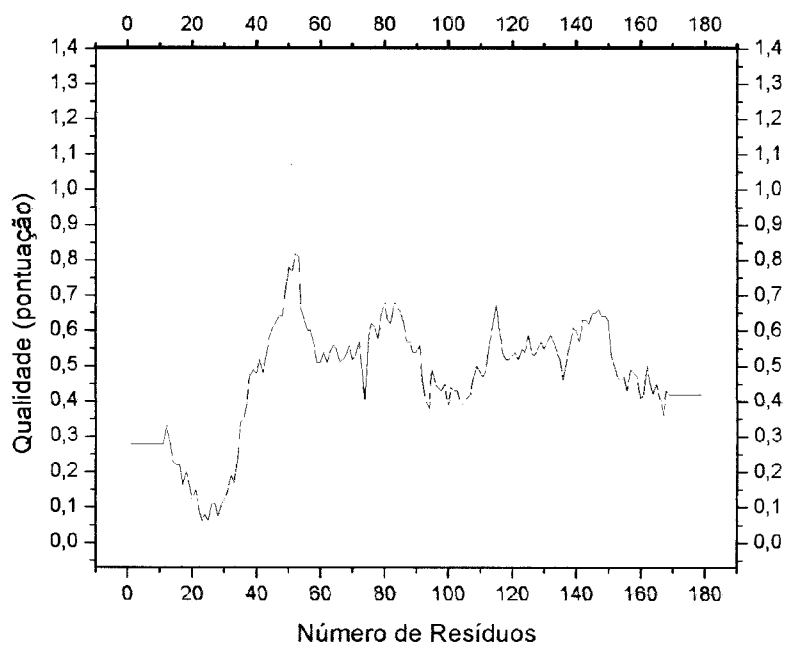


Figura 16: Gráfico da análise do enovelamento da estrutura da APRT de *Homo sapiens* determinado com o programa Verify-3D.

Tabela 5: Dados estatísticos do refinamento da estrutura cristalográfica da APRT de *Homo sapiens*

|                                                               |       |
|---------------------------------------------------------------|-------|
| Resíduos nas Regiões mais Favoráveis (Ramachandran) (%)       | 94.0  |
| Resíduos em Regiões Adicionalmente Permitidas (%)             | 4.7   |
| Resíduos em Regiões Generosamente Permitidas (%)              | 1.3   |
| Resíduos em Regiões não Permitidas (%)                        | 0.0   |
| R_trabalho_final                                              | 13.3  |
| R_livre_final                                                 | 17.6  |
| R_trabalho_faixa de resolução mais alta                       | 13.4  |
| R_livre_faixa de resolução mais alta                          | 25.7  |
| RMS Desvio dos Valores Ideais dos Comprimentos de Ligação (Å) | 0.016 |
| RMS Desvio dos Valores Ideais dos ângulos de Ligação (deg.)   | 1.618 |
| Fator B médio da Cadeia Protéica (Å <sup>2</sup> )            | 19    |
| Fator B médio das Moléculas de Água (Å <sup>2</sup> )         | 24    |
| Fator B médio do Ligante (AMP) (Å <sup>2</sup> )              | 29    |
| Número Total de Resíduos Incluídos no Refinamento (dímero)    | 358   |
| Número Total de Moléculas de Água Incluídas no Refinamento    | 206   |

### 3.3. Análise da estrutura da hAPRT e comparações com estruturas de outras PRTases

A hAPRT apresenta moderada identidade de aminoácidos com as outras APRTs com estruturas elucidadas [5,8,10,27]. Alinhamentos das seqüências de aminoácidos da hAPRT com as APRTs de *S. cerevisiae* (1G2P), *G. lamblia* (1L1Q) e *Leishmania* (1MZV, 1QB7) mostram respectivamente os seguintes valores de identidade: 44,7%, 36,6% e 27,5% (figura 17). Apesar da considerável diferença nas seqüências primárias, a estrutura tridimensional da hAPRT é similar as APRTs previamente descritas, contendo AMP no sítio ativo (1MZV e 1QB7) [8,27]. Quando essas estruturas são sobrepostas, considerando-se todos os resíduos de

amino-ácidos, observa-se o RMS de 1,25 Å. As diferenças estruturais são ainda menores quando apenas as regiões dos sítios ativos dessas estruturas são consideradas e o RMS cai para 0,5 Å.

```

                10      20      30      40
10RE  -----MADSELQVLRIRSFDFPTPGVV--FRDISPVLKDPASFRAAIG
1G2P  -----MPIASYAQELKLALHQYPNFPSEGIL--FEDFLPIFRNPGLFQKLI
1MZV  MSLKEIGPNSLLEDSDHSLSQLLKKNYRWYSPIFSFRNVPRFADVSSITESPETLKAIRD
1QBB  -PFKEVSPNSFLDDSHALSQLLKKSRYRWYSPVFSFRNVPRFADVSSITESPETLKAIRD

                50      60      70      80      90      100
10RE  LLARHLK-ATHGGRIDYIAGLDSRGFLFGPSLAQELGLGCVLIRKRGKLPGPTLWAS-YE
1G2P  AFKLHLEELFPEVKIDYIVGLESRGFLFGPTLALALGVGFVPRKAGKLPGECKAT-YE
1MZV  FLVERYRTMSPAPT--HILGFDARGFLFGPMIAVELGIPFVLMRKADKNAGLLIRSEPYE
1QBB  FLVQRYRAMSPAPT--HILGFDARGFLFGPMIAVELEIPFVLMRKADKNAGLLIRSEPYE

                110      120      130      140      150
10RE  LEYGKAELE---IQKDALEPGQRRVVVDDLLATGGTMNAACELLGRQLQAEVLECVSLVEL
1G2P  KEYGSDLFE---IQKNAIPAGSNVVIIVDDIIATGGSAAAAGELVEQLEANLLEYNFVMEI
1MZV  KEYKAAPEVMTIRHGSIGKNSRVVLIIDDVLTATGGTALSGLQLVEASGAEVVENVSILTI
1QBB  KEYKAAPEVMTIRYGSIGKNSRVVLIIDDVLTATGGTALSGLQLVEASDAVVVENVSILSI

                160      170      180      190      200      210
10RE  TSLKGREKLAPVFFSLLQYE-----
1G2P  DFLKGRSKLN-APVFTLLNAQKEALKK-----
1MZV  PFLKAAERIHSTAGGRYKNVRF IGLLEDVLTAEANCGDLNDYTGPRVLSGSDLLVNO--
1QBB  PFLKAAEKIHSTANSRYKDIKFISLLSDDALTEENCGDSKNYTGPRVLSGSDVLAEPH

```

Figura 17: Alinhamentos das seqüências de aminoácidos da adenina fosforribosiltransferase de *homo sapiens* (10RE) com as demais APRTases com estruturas tridimensionais conhecidas: APRT de *S. cerevisiae* (1G2P), APRT de *G. lamblia* (1L1Q) e APRT de *Leishmania* (1MZV, 1QB7). Resíduos conservados em 100% dos casos estão representados em vermelho ou azul.

A APRT de *H. sapiens* (hAPRT), em sua forma biologicamente ativa, é composta por um homodímero [48,49] (Figura 18A). Cada monômero apresenta nove fitas  $\beta$  e seis hélices  $\alpha$ , distribuídas em três regiões denominadas como: central (resíduos 33-169); capuz (resíduos

5-32) “loop” flexível (resíduos 95-113). O domínio central forma uma folha  $\beta$  com cinco fitas  $\beta$  paralelas (S3, resíduos 59-65; S4, resíduos 82-88; S7, resíduos 122-128; S8, resíduos 141-156 e S9, resíduos 171-176). Este domínio, conservado em todas as PRTases do tipo I [7,60], é cercado por quatro hélices- $\alpha$  identificadas como H3, H4, H5 e H6 (Figura 18 B). As hélices H3 e H4 (resíduos 36-53 e 68-79, respectivamente) localizam-se em um dos lados da folha  $\beta$  enquanto as hélices H5 e H6 (resíduos 134-146 e 163-169, respectivamente) localizam-se do lado oposto. A região do capuz contém duas  $\alpha$  hélices (H1, resíduos 12-18 e H2, resíduos 30-35) e duas fitas  $\beta$  (S1, resíduos 13-17 e S2, resíduos 24-29). A volta flexível formada por duas fitas  $\beta$  (S5, resíduos 95-103 e S6, resíduos 106-113), está na conformação aberta na estrutura da hAPRT recém elucidada (Figura 18 B).

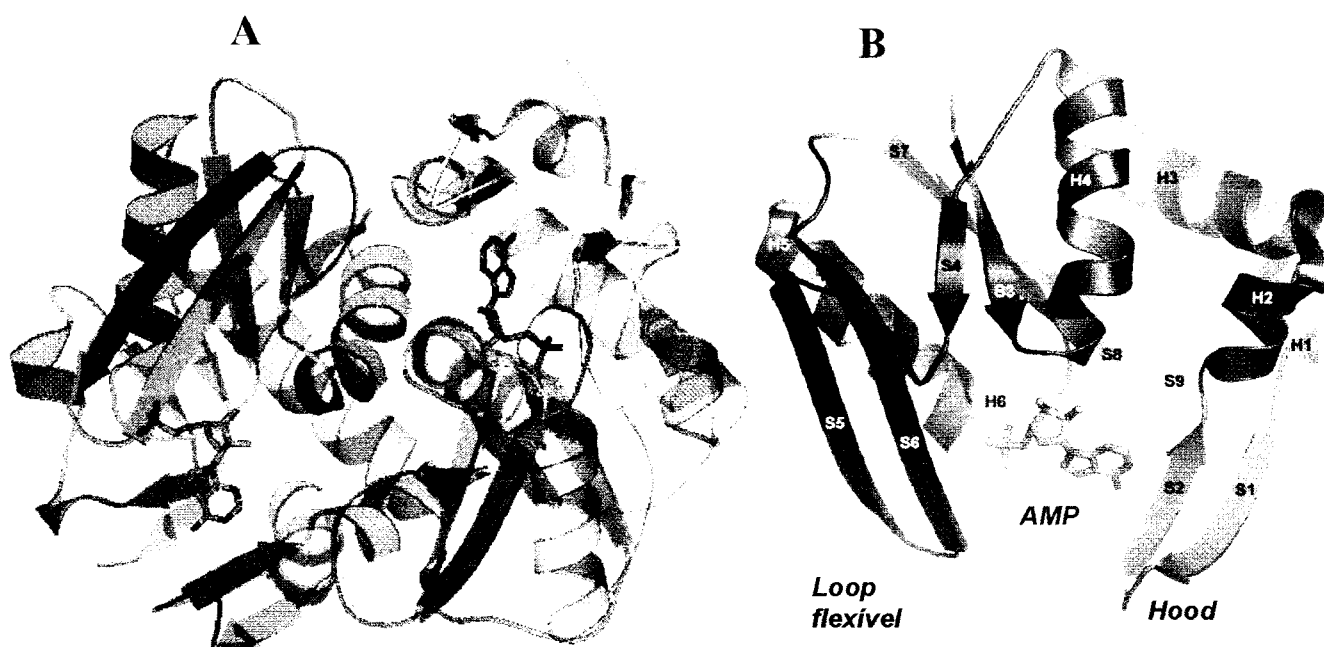


Figura 18: Estrutura quaternária da APRT de *Homo sapiens*. (A) Estrutura do dímero representada na forma de fitas. Um dos monômeros está representado em azul e o outro em vermelho. Os AMPs ligados a região do sítio catalítico estão coloridos por átomos. O íon cloreto está representado em amarelo. (B) Estrutura de um monômero da APRT. As fitas  $\beta$  estão identificadas com a letra S e as  $\alpha$  hélices com a letra H. O loop flexível (S5 e S6), responsável por proteger os substratos do solvente, está na conformação aberta.

Durante o refinamento da estrutura da hAPRT notou-se a existência de um motivo estrutural peculiar em forma de “cálice”. Este cálice é formado por três resíduos de fenil

alanina (F16, F19 e F26) de uma das cadeias polipeptídicas e está posicionado na interface de dimerização. Um resíduo de prolina (P93) da cadeia adjacente ocupa a região central do “cálice” (Figura 19). Conformações similares a esta foram pesquisadas sem sucesso através do servidor SPASM [61] sugerindo que o arranjo encontrado é incomum, portanto deve desempenhar papel relevante sobretudo na estabilização da estrutura dimérica da hAPRT.

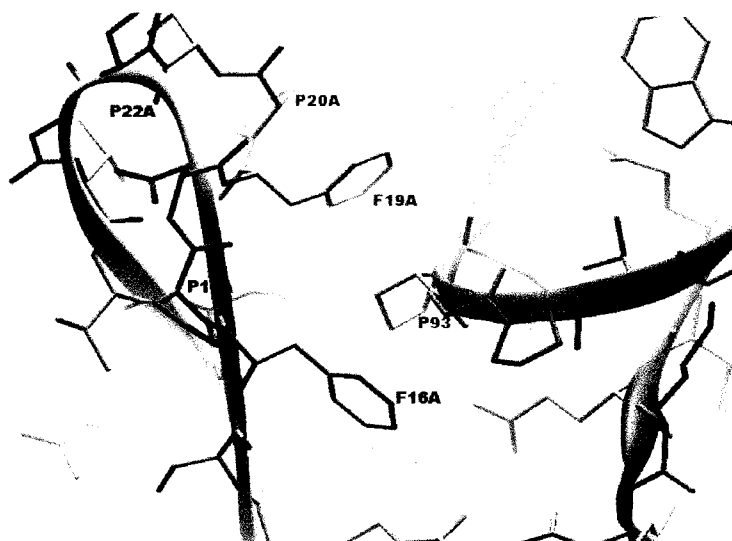


Figura 19: Motivo estrutural incomum encontrado na superfície de dimerização no modelo da APRT de *Homo sapiens*. A estrutura em forma de cálice é formada pelos resíduos F19, F26 e F16 de um monômero (mostrado em cinza) e interage com um resíduo de prolina (P93) do outro monômero (mostrado em verde).

Vários resíduos conservados em PRTases do *tipo I* desempenham papel importante durante a catálise. Esses incluem o subdomínio capuz de todas as PRTases conhecidas [5,8,10,34,60,62-67]. Apesar das diferenças estruturais entre as PRTases, o capuz sempre contém um ou dois resíduos conservados. Esses resíduos são responsáveis por determinar qual purina ou pirimidina terá afinidade para ligar-se ao sítio catalítico. Além disso existe, no subdomínio capuz, um resíduo aromático altamente conservado envolvido no correto posicionamento da base no sítio ativo. No caso da hAPRT esse papel é desempenhado pelo resíduo Phe26. Na estrutura da hAPRT, o oxigênio da carbonila da Val25 forma uma ligação de hidrogênio com o átomo N6 da adenina; e o nitrogênio do grupo amino do resíduo Arg27



forma ligação de hidrogênio com o átomo N1 da purina (Figura 20A). Em APRT de *S. cerevisiae* os contatos com a base, equivalentes aos encontrados na hAPRT, devem ser formados pelos resíduos Leu26 e Glu28. Esses resíduos ocupam as posições correspondentes a Val25 e Arg27 da estrutura da hAPRT. Na APRT de *L. tarentolae* o resíduo de Phe42 ajuda a estabilizar o AMP no sítio catalítico, conforme é representado na figura 20 A. Em contraste, na estrutura de HGPRT de *T. cruzi* complexada com o análogo de hipoxantina, 7-hidroxi[4,3-*d*]pirazolpirimidine (Figura 20 B), os átomos correspondentes responsáveis pela ligação da base são o nitrogênio e o oxigênio do resíduo Val165 [7]. Esta diferença pode estar envolvida na acomodação do oxigênio ligado ao anel purínico da hipoxantina, em vez do grupo amino correspondente da adenina.

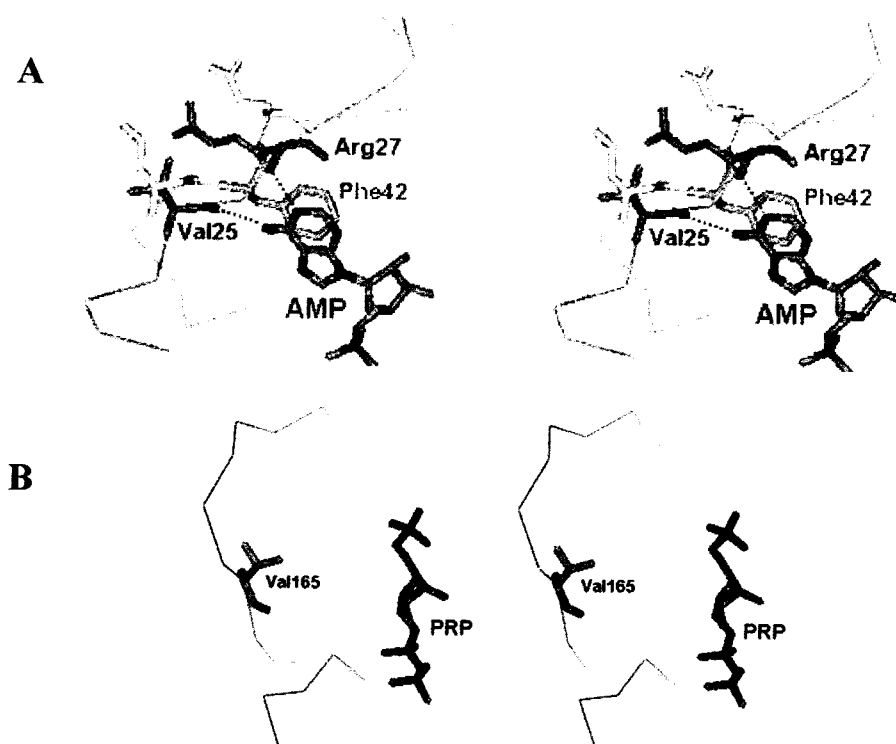


Figura 20: Stereoview da sobreposição da região do sítio de ligação da base nitrogenada nas PRTases. A: sobreposição de três APRT *H. sapiens* (em azul); *L. tarentolae* (marrom) e *S. cerevisiae* (amarelo). B: da região do sítio de ligação da base nitrogenada na estrutura da HGPRT de *T. cruzi* complexada com o análogo de hipoxantina, 7-hidroxi[4,3-*d*]pirazolpirimidine (PRP).

Devido a grande variabilidade estrutural observada no subdomínio capuz, acredita-se que esse subdomínio pode não ser suficiente para determinar a especificidade pela base [5,7,8,34,60]. Com base na estrutura recém elucidada da hAPRT nós sugerimos que, em virtude das interações hidrofóbicas, os resíduos Leu159 e Ala131 podem contribuir para seleção da adenina entre as diferentes purinas (Figura 21). De acordo com esta hipótese, Denessiouk e Johnson identificaram um motivo estrutural comum para a ligação da adenina no qual estão envolvidas interações polares e hidrofóbicas entre a proteína e o ligante [68]. Da mesma forma, Nobeli *et al.* observaram que o complexo proteína-adenina apresenta interações hidrofóbicas abaixo e acima do anel purínico [69]. Guaninas, ao contrário, são menos expostas ao solvente que adeninas e interagem com resíduos ácidos (glutâmico e aspártico) [70].

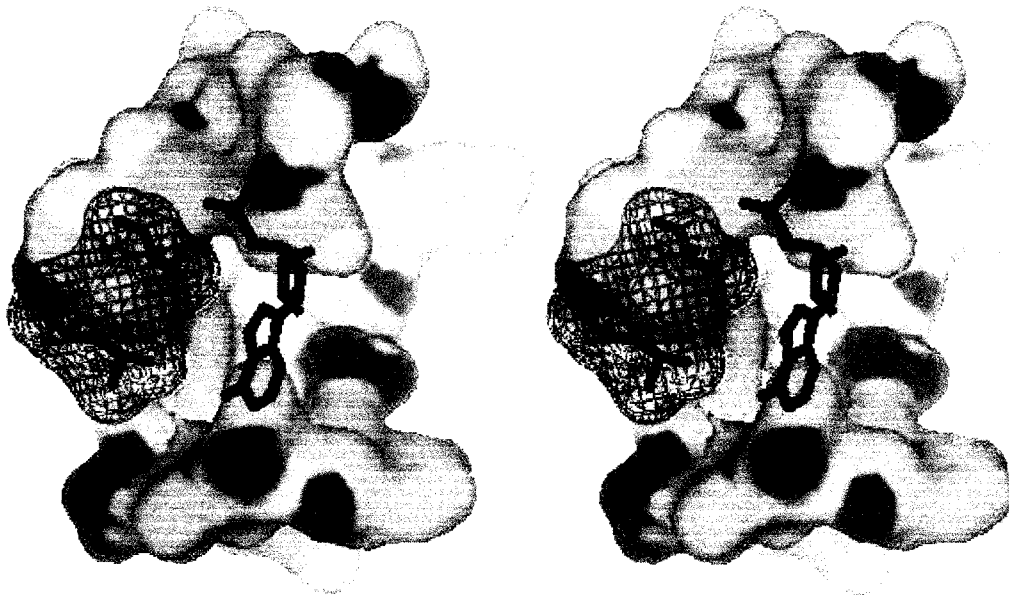


Figura 21: Stereoview do sítio ativo da APRT *H. sapiens*. Os resíduos Leu159 e Ala131, representados dentro da malha cinza, contribuem para a ligação da adenina devido a interações hidrofóbicas. Esses resíduos podem ser fundamentais para a seleção da base adenina uma vez que guanina interage com resíduos ácidos.

Na estrutura da hAPRT, o resíduo conservado Arg67 interage com a adenina. Além

disso, as PRTases que ligam hipoxantina, xantina ou guanina, possuem resíduos de lisina em contato direto com a base. Esta lisina está localizada em posição equivalente ao resíduo Leu159, da estrutura da hAPRT. Esta posição em adenina fosforibosiltransferases é sempre ocupada por um resíduo hidrofóbico de isoleucina ou leucina [10,71,72]. É interessante citar que a mudança de um único resíduo (Lis134Ser) na Hipoxantina Guanina Xantina fosforibosiltransferase (HGXPRT) de *T. foetus*, inviabiliza a ligação de adenina nesta PRTase (53). O resíduo hidrofóbico Ala131 observado na estrutura da hAPRT é conservado em todas as APRTases já estudadas [10]. Na estrutura da Uridina fosforibosiltransferase de *T. gondii* também foi observada uma alanina em posição equivalente. Adicionalmente todas as estruturas de OPRT já estudadas contém um resíduo de treonina em posição equivalente [70,73,74]. Por outro lado, PRTases que ligam hipoxantina, xantina ou guanina, apresentam um resíduo de ácido aspártico nesta posição, o qual está em contato direto com a base [7,60,64,65,68,69]. Essas considerações sugerem que, além dos contatos feitos pela cadeia principal, os resíduos localizados nas posições correspondentes a Leu159 e Ala131 na estrutura da hAPRT, explicam a especificidade pelas diferentes bases nitrogenadas observadas em PRTases do tipo I (Figura 22).

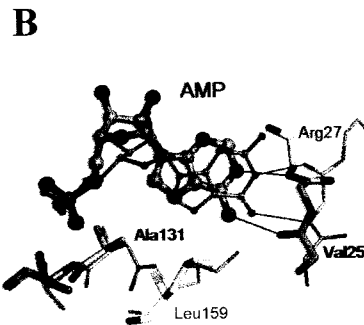


Figura 22: Estrutura da região do sítio catalítico da hAPRT representada na forma de fitas sugerindo a especificidade da base nitrogenada adenina. (A) Os resíduos do sítio ativo que interagem com o AMP (recoberto pela representação de superfície de carga) estão representados em verde. Os resíduos, Ala131 e Leu159, associados com a especificidade pela base, estão representados em amarelo. (B) Sobreposição dos resíduos do sítio catalítico das PRTases, APRT e HGPRT de *H. sapiens*. Os resíduos Leu159 e Ala131 na hAPRT (mostrado na forma de cilindros) explicam a diferença de especificidade pela base nitrogenada observada entre as PRTases do tipo I.

### 3.4. Mutações sítio dirigidas na hAPRT

Conforme apresentado no item 1.4.1, a deficiência catalítica da APRT em humanos, leva ao aumento da oxidação de adenina pela xantina-dehidrogenase (XDH), resultando no acúmulo de 2,8-dihidroxiadenina (DHA), um composto insolúvel que se acumula nos rins levando a urolitíase e falência renal.

Até o presente momento, sete mutações pontuais e uma deleção são relacionadas a alterações no funcionamento da hAPRT [9,10]. Estas mutações, de ocorrência espontânea no genoma humano, estão distribuídas na cadeia polipeptídica conforme é representado na Figura 23.



Figura 23: Mutações da APRT de *Homo sapiens* relacionadas com alterações na atividade enzimática. Homodímero da hAPRT, cada monômero está representado em uma cor. As esferas representam as posições das mutações na estrutura tridimensional. Cada cor indica uma mutação pontual. Os números representam as seguintes mutações: (1) F173Del, (2) C153R, (3) M136T, (4) R67Q, (5) D65V, (6) L110P, (7) I112F e (8) R89Q.

As mutações pontuais, representadas pelos números 1, 3, 5 e 6 (Figura 23), foram reproduzidas no laboratório de biologia molecular estrutural do IFSC. Os mutantes foram seqüenciados e a mutação desejada em cada um dos casos foi confirmada. Os quatro mutantes foram clonados em *E. coli* BL21(DE3) e submetidos a experimentos de expressão protéica pelo acréscimo de IPTG, conforme o protocolo apresentado no item 2.4. Os resultados da expressão são representados na figura 24. Os mutantes M136T, D65V e L110P, foram produzidas na forma solúvel. A mutação F173Del tornou inviável a expressão da proteína heteróloga solúvel, no sistema de expressão padrão (item 2.1). Variações na quantidade de IPTG, na temperatura e na cepa bacteriana utilizada para a expressão, também se mostraram ineficientes na produção solúvel desse mutante.

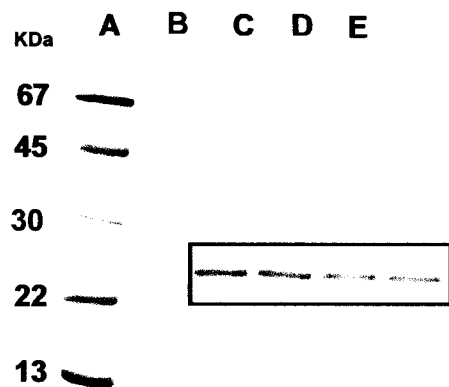


Figura 24: Gel de poliacrilamida representando a expressão da h-APRT nas quatro formas mutantes (A) Marcador de peso molecular em kDa. (B) Cultura não induzida. (C-F) Proteína total dos mutantes induzidos com 0,1 mM IPTG por 5 horas. (C) mutante L110P. (D) mutante F173DEL. (E) M136T. (F) mutante D65V. Considerando-se o total de proteínas nota-se que foram conseguidas expressões equivalentes nas quatro formas mutantes de h-APRT. O retângulo indica as bandas das h-APRT mutadas.

Os mutantes M136T, D65V e L110P foram purificados segundo protocolo apresentado no item 4.2. O procedimento com coluna de hidroxiapatita permitiu purificar, em média, 5 mg de proteína por litro de cultura de cada mutante. Os mutantes purificados foram analisados quanto a atividade enzimática específica, conforme a metodologia proposta por Tuttle *et al.* [21]. Os valores obtidos para cada um dos três mutantes foram comparados à atividade da proteína nativa. O mutante D65V apresentou 12 % de atividade, enquanto os mutantes M136T e L110P apresentaram 65% e 80% respectivamente. Esses valores são próximos aos previamente descritos [75-77].

A estrutura da hAPRT foi utilizada para propor possíveis explicações estruturais que justificam as alterações catalíticas ou insolubilidade da hAPRT devido à presença das mutações pontuais: D65V, L110P, M136T e F173Del [75-77].

A mutação D65V [75] em hAPRT, está próxima ao sítio de ligação do PRPP. Phillips *et al.* [8], já observaram que o grupo carboxílico do resíduo equivalente (Asp80), em *L. donovani* forma ligações de hidrogênio com os átomos  $N_{\epsilon}$  e  $N_{\eta 2}$  da Arg102 conservada. Este mesmo resíduo, Arg102, interage com a outra subunidade do dímero através do fosfato  $\beta$  do

PRPP. Também foi observado na estrutura da APRT de *L. donovani* que o Asp80 ajuda a estabilizar o resíduo Ala81 em conformação *cis*. A Ala81, por sua vez, ajuda a estabilizar o Glu61-Ser62-Arg63, também em posição *cis* [8]. Esta seqüência de resíduos de aminoácidos em conformação *cis* é conservada em todas as APRTases já estudadas e, aparentemente, é essencial para a ligação do pirofosfato do PRPP [5]. De acordo com essa possibilidade, cabe notar que variações de conformação *cis* e *trans* do segmento Glu61-Ser62-Arg63 foi observada em PRTases do tipo I com o sítio de ligação do PRPP vazio [5]. Além disso, nunca foi observada a ocorrência de conformação *trans* deste segmento em complexo da proteína ligada ao PRPP [34,60,70].

Na estrutura de APRT de humano, o segmento Asp65-Ser66-Arg67 está em conformação *cis* e a cadeia lateral do Asp65 forma uma ligação de hidrogênio com o N<sub>η</sub> da *cis*-Lys88 e com o N<sub>ε</sub> do resíduo conservado lys91 [10] (Figura 21). A Arg87 (Arg102 em *L. tarentolae* e Arg89 em *S. cerevisiae* APRTs) não está ligada ao resíduo de ácido aspártico, reforçando a importância da conformação *cis* para a ligação do pirofosfato do PRPP (Figura 25).

A mutação D65V pode permitir que a cadeia lateral da Val65 se aproxime do microambiente hidrofóbico gerado pela Leu110, posição ocupada por um resíduo hidrofóbico em todas as APRTases. Esse posicionamento da Val65 poderá permitir que os resíduos adjacentes Ser66-Arg67 adotem a conformação *trans*, impedindo a ligação do PRPP.

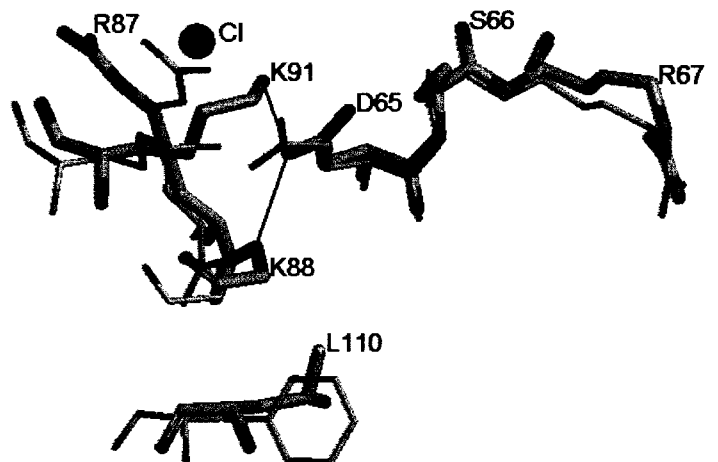


Figura 25: Análise dos efeitos da mutação D65V na estrutura da proteína APRT de *H. sapiens*. Na estrutura da hAPRT (resíduos numerados e representados na forma de cilindros grossos), o seguimento Asp65-Ser66-Arg67 está na conformação *cis* e a cadeia lateral do Asp65 forma ligação de hidrogênio (mostrada em linha finas) com o N $\eta$  da cadeia principal da *cis*-Lys88 e com o N $\zeta$  da Lys91. Nota-se também que na estrutura da hAPRT a Arg87 não interage com o Asp65 como ocorre na estrutura da proteína homóloga de *S. cerevisiae*.

A mutação L110P [76] está associada à disfunção renal em humanos. A análise da estrutura da hAPRT não mostra uma correlação clara entre esta mutação e a deficiência na atividade enzimática que leva a disfunção clínica [8]. Apesar disso, é importante notar que o resíduo Leu110 é conservado em todas as APRTs. Na estrutura da hAPRT a Leu110 interage com os resíduos Leu64, Ile86, Ala 139 e Met136 gerando um micro ambiente hidrofóbico, que aparentemente é importante na orientação correta do grupo hidroxila do resíduo Thr135. A correta orientação da cadeia lateral desse resíduo permite a interação com fosfato 5' do PRPP ou AMP. Na estrutura da hAPRT, o grupo hidroxila do Thr135 forma uma ligação de hidrogênio com fosfato do AMP, conforme a figura 26.

Com base no banco de rotâmeros do programa O versão 8 [29], o Thr135 pode adotar apenas três conformações. Entre essas, apenas uma permite a orientação do grupo hidroxila voltado para o fosfato 5' do AMP. Nossa hipótese é que os outros dois rotâmeros do Thr135 são desfavoráveis na ausência da mutação L110P. A presença do resíduo Leu110 pode



favorecer outro rotâmero do resíduo Thr135, assim o carbono gama ficaria voltado para o sítio de ligação do PRPP, atrapalhando a ligação desse substrato.

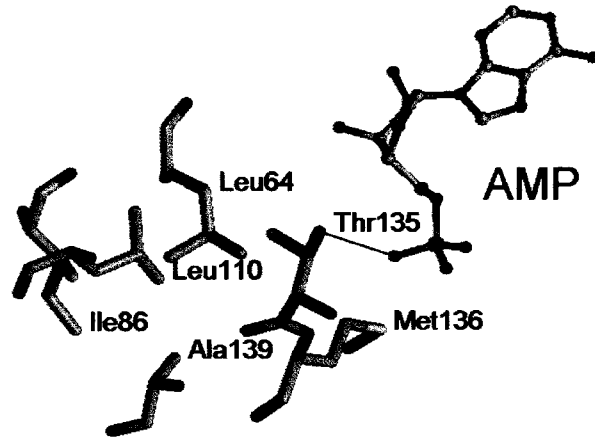


Figura 26: Análise dos efeitos da mutação L110P na estrutura da proteína APRT de *H. sapiens*. Os resíduos hidrofóbicos conservados Leu110 e Leu64 intergem com o átomo de CG do resíduo Thr135, que está inserido em um ambiente hidrofóbico formado pelos resíduos Ile86, Ala 139 e Met136. Assim, o grupo hidroxila do Thr135 é orientado em direção ao 5'-fosfato do PRPP ou AMP. Na estrutura da hAPRT a linha representa a ligação de hidrogênio entre o grupo Thr135 e o fosfato do AMP.

A terceira mutação da hAPRT analisada a partir da estrutura cristalográfica foi a M136T. Esta mutação é a mais comum em humanos e está localizada no “loop” de ligação do PRPP [77]. Na estrutura da hAPRT a Met136 está em um micro ambiente similar ao resíduo equivalente (Ala155) na proteína homóloga de *L. donovani* [8]. Um arranjo similar também foi observado nas estruturas de APRT de *G. lamblia* e *S. cerevisiae* [5,10]. Philips *et al.* [8] sugeriram que a mutação M136T pode desestabilizar a conformação do segmento Ala131-Thr135 do “loop” de ligação do PRPP e, assim, interferir na atividade catalítica da enzima.

Sobrepondo a estrutura da hAPRT com as outras estruturas de APRT conhecidas [5,8,10,27], encontramos duas moléculas de água cujas posições são conservadas em todos os casos. Na estrutura da hAPRT essas moléculas de água (água 1 e água 2, Figura 27A), participam de uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo o fosfato 5' do AMP, o nitrogênio da cadeia principal da Met136 e o oxigênio delta do resíduo conservado Asp127 (Figura 27A). Foi sugerido pela que a molécula de água 1 pode ser um importante elemento

para a ligação do PRPP e que a mutação M136T [77] favorece a competição do grupo hidroxila com o nitrogênio da cadeia principal do Thr136, deslocando a molécula de água 1. Aparentemente, a mudança na posição da molécula de água 1 dificulta a ligação do fosfato 5' do PRPP, resultando na redução da atividade da hAPRT portadora da mutação M136T. As estruturas de APRT de *G. lamblia* e *S. cerevisiae* tem, respectivamente, um resíduo de leucina e um resíduo de alanina em posição equivalente a Met136 da hAPRT [5,10]. Apesar da presença de diferentes resíduos a conformação do "loop" de ligação do fosfato 5', em ambos os casos, é muito similar a observada na hAPRT. É interessante notar que na estrutura da APRT de *S. cerevisiae* [10], que não possui PRPP nem AMP ligados no sítio ativo, a água 516, correspondente a água1 da hAPRT, faz ligação de hidrogênio com o resíduo Ser137, equivalente ao resíduo Thr135 da estrutura da hAPRT. Também, na estrutura de APRT de *S. cerevisiae*, observa-se que a molécula de água 505, correspondente a água 7 da hAPRT, está deslocada comparando-se à posição das moléculas de água equivalentes nas outras estruturas de APRT conhecidas (Figura 27B).

Nossa proposta de que a mutação M136T provoca apenas desarranjo na rede de moléculas de água, que ajudam a estabilizar o PRPP no sítio catalítico, está de acordo com a modesta perda de atividade (10,3% menor) descrita para hAPRT portadora desta mutação [77].

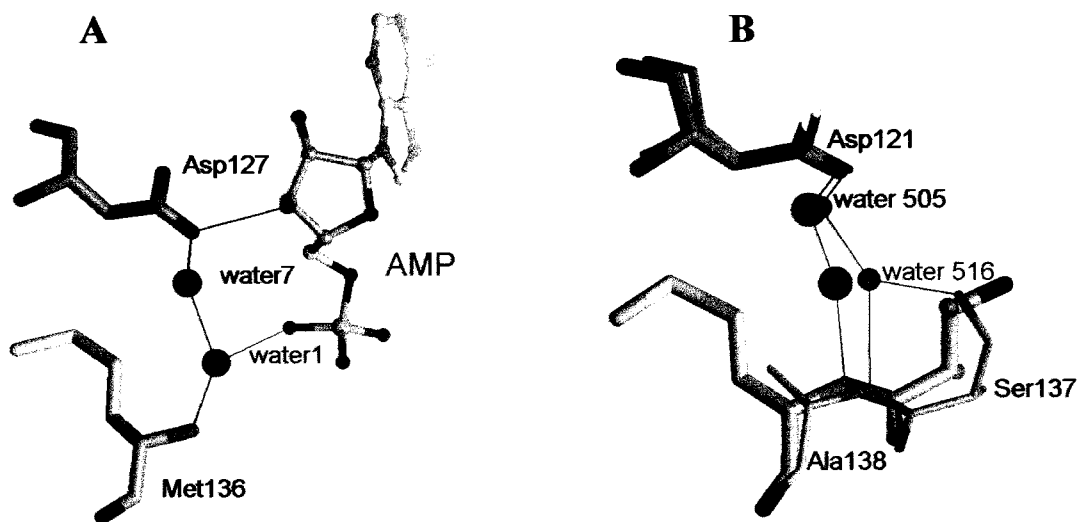


Figura 27: Análise dos efeitos da mutação M136T na estrutura da proteína APRT de *H.sapiens*. As moléculas de água 1 e 7 da estrutura da hAPRT participam de uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos Met136 e Asp127. A posição da água 1 estabilizada pelo resíduo Met136 é um elemento importante para a ligação do substrato PRPP. (B)-Representação da região do sítio catalítico da APRT de *S. cerevisiae* que não contém AMP nem PRPP. Nota-se que a água 516, equivalente a água 1 na estrutura da hAPRT, forma ligação de hidrogênio com a Ser137 (equivalente ao resíduo Thr135) mudando de posição na ausência de ligante. A água 505, correspondente a água 7 na estrutura da hAPRT, se mantém em posição equivalente mesmo na ausência de ligante. Todas as ligações de hidrogênio estão representadas por finas.

A quarta mutação da APRT analisada a partir da estrutura cristalográfica envolve a deleção do resíduo F173. Essa mutação impossibilita a obtenção da proteína solúvel no sistema de expressão heterólogo utilizado, conforme descrito anteriormente (item 3.4).

As análises da estrutura da hAPRT apontaram as possíveis causas da insolubilidade protéica. O encurtamento da cadeia polipeptídica, provocado pela retirada do resíduo de F173, pode desestabilizar a região C-terminal devido ao menor número de ligações de hidrogênio entre as 2 fitas  $\beta$  (resíduos 150 a 161 e resíduos 172 a 180). Essa situação pode expor ao solvente os resíduos hidrofóbicos: L177, L176, L159, V157, L156, V154, L151 e V150. Conforme pode ser visto na figura 28A, o resíduo F174 é fundamental na interação entre a fita  $\beta$  do C-terminal com a  $\alpha$ -hélice adjacente (resíduos 36 a 54). A deleção do F173 provoca a perda da interação F174 H49, deixando a hélice- $\alpha$  com maior liberdade. Na posição 173 da seqüência polipeptídica, para a qual é deslocado com a mutação, o resíduo de fenilalanina fica

distante do resíduo H49. Além disso, devido ao micro ambiente hidrofóbico formado próximo a cadeia lateral do F173, esse resíduo tende a ficar voltado para o interior da estrutura, conforme pode ser visto na figura 28B. Com a deleção da F173, o resíduo que passa a ocupar a posição 174 da seqüência polipeptídica é uma serina. Esse resíduo não interage com a H49, conforme é representado na figura 28C. Outras interações importantes são perdidas na região C-terminal da estrutura. As figuras 28 D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, mostram a perda das ligações de hidrogênio entre os resíduos E158, R165e S175. Nós propomos que as perdas das interações que ocorrem devido a deleção do resíduo F173, provocam a desestabilidade da cadeia polipeptídica como um todo levando a insolubilidade. Essa proposta pode justificar a insolubilidade do mutante F173Del no sistema heterólogo utilizado em nossos estudos. Adicionalmente, pode também justificar a ausência de atividade enzimática da hAPRT em pacientes com essa mutação [78]. Os estudos feitos por Hidaka, com linfócitos de pacientes com a mutação F173Del, mostraram atividade de APRTase inferior a 1% e ausência total da proteína em testes imunológicos [78]. Esses resultados sugerem que, em pacientes com a mutação F173Del, a hAPRT é produzida em pequena quantidade ou é rapidamente degradada após a síntese.

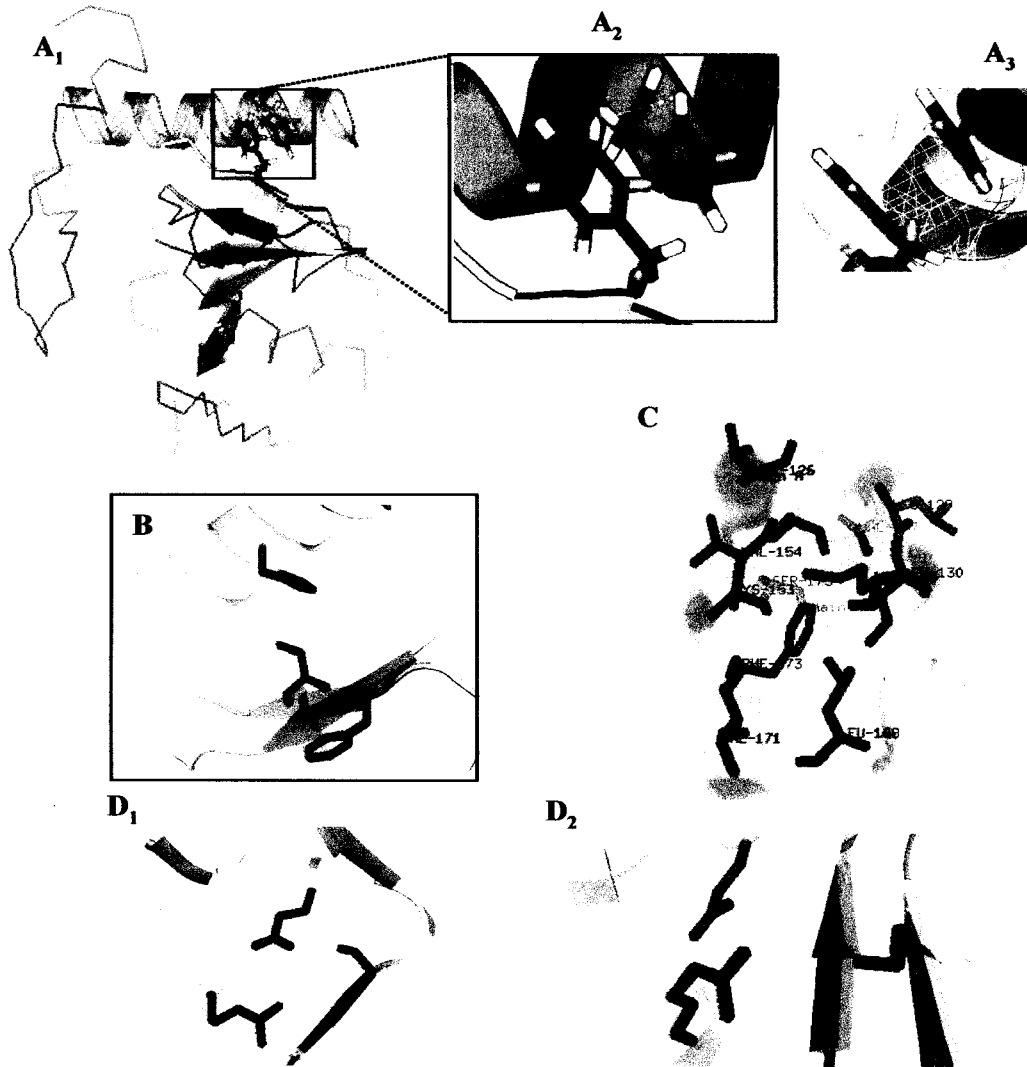


Figura 28: Análise dos efeitos da mutação F173Del na estrutura da proteína APRT de *H. sapiens*. (A<sub>1</sub>) Monômero da hAPRT mostrando que a fita do C-terminal faz parte de uma folha que ocupa a região central da proteína. (A<sub>2</sub>) Detalhe da interação entre os resíduos F174 e H49 estabilizando a hélice adjacente. (A<sub>3</sub>) Detalhe das ligações de hidrogênio formadas entre os resíduos 174 e 49. (B) Detalhe da estrutura da hAPRT com a mutação pontual F173Del. Nota-se que o resíduo Ser174 não interage com o H49. (C) Ambiente hidrofóbico formado internamente na estrutura da hAPRT na posição do resíduo F173. (D<sub>1</sub>) Detalhe da estrutura da hAPRT nativa mostrando as ligações de hidrogênio que correm entre os resíduos Glu158, Arg165 e Ser175. (D<sub>2</sub>). A mesma região mostrada em D<sub>1</sub>, porém na proteína mutada na posição 173. Nota-se que as interações mostradas em D<sub>1</sub> foram perdidas.

### 3.5. Conclusão do refinamento da estrutura tridimensional da APRT de *Leishmania tarentolae* (IAPRT).

Durante o desenvolvimento do trabalho de mestrado a proteína adenina fosforribosiltransferase (APRT) de *L. tarentolae* foi clonada, purificada, cristalizada e a estrutura foi elucidada por substituição molecular [39]. Devido a baixa qualidade dos dados cristalográficos coletado no LNLS, o refinamento da estrutura foi bastante trabalhoso e não pode ser concluído durante o mestrado [39]. O refinamento dessa estrutura foi levado a termo durante o doutoramento. Devido a anisotropia dos dados cristalográficos os ajustes finais no modelo só foram obtidos com o uso da ferramenta TLS [79]. Esta ferramenta ajudou a esclarecer a desordem do empacotamento ao longo do eixo z.

O modelo final da IAPRT, refinado a 2,2 Å de resolução, é composto por 216 resíduos de aminoácidos (numerados de 2-217), 234 moléculas de água, uma molécula de AMP e um íon fosfato. Os dados estatísticos do refinamento da IAPRT são mostrados na *tabela 6*.

Em geral, a densidade eletrônica da cadeia polipeptídica, assim como a dos ligantes é claramente interpretável (Figura 29). A região do C-terminal, formada pelos resíduos 217 a 235, foi omitida do modelo final devido a ausência de densidade eletrônica local. Porém, Philips *et al.* [8] modelaram a região correspondente a essa (resíduos 217-237) da estrutura da proteína homóloga de *L. donovani*. Nos estudos de Philips o segmento, composto pelos resíduos 217-237, forma uma estrutura alongada e flexível que ajuda a manter a estabilidade do homodímero [8]. O resíduo de metionina, na posição 1, foi omitido do modelo final da IAPRT considerando-se a completa falta de densidade eletrônica. A ausência da primeira metionina no N-terminal é comum em proteínas recombinantes produzidas em bactérias, devido à clivagem pós-traducional [8].

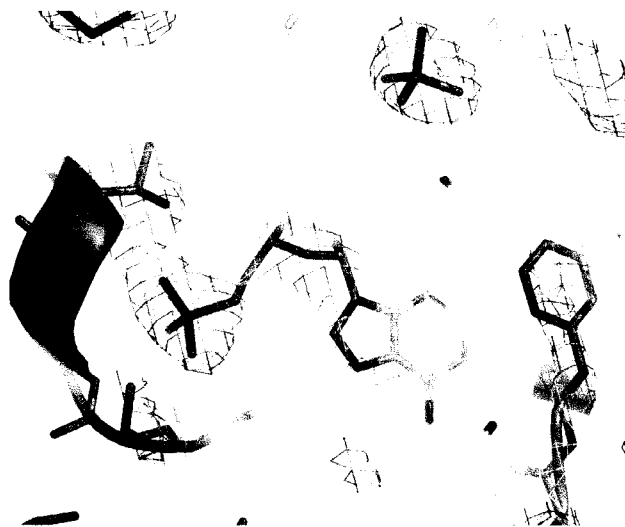


Figura 29: Mapa de densidade eletrônica do sítio ativo da APRT de *Leishmania tarentolae* ligada a uma molécula de AMP e um íon fosfato. Estão representados os resíduos de aminoácidos situados dentro de uma esfera de 10 Å de diâmetro, centralizada no átomo N3 da adenina. Mapa tipo 2|Fo|-|Fc| a 2,2 Å de resolução com nível de contorno de 2,0  $\sigma$ .

|                                                              |        |
|--------------------------------------------------------------|--------|
| Resíduos nas Regiões mais Favoráveis (Ramachandran)          | 91,9%  |
| Resíduos em Regiões Adicionalmente Permitidas                | 6,5%   |
| Resíduos em Regiões Generosamente Permitidas                 | 1,6%   |
| Resíduos em Regiões não Permitidas                           | 0,0%   |
| R_trabalho_final                                             | 18,09% |
| R_livre_final                                                | 21,78% |
| R_trabalho_faixa de resolução mais alta                      | 22,90% |
| R_livre_faixa de resolução mais alta                         | 27,80% |
| RMS Desvio dos Valores Ideais dos Comprimentos de Ligação(A) | 0,014  |
| RMS Desvio dos Valores Ideais dos ângulos de Ligação (^o)    | 1.494  |
| Fator B médio da Cadeia Protéica (Å <sup>2</sup> )           | 25     |
| Fator B médio das Moléculas de Água (Å <sup>2</sup> )        | 34     |
| Fator B médio do Ligante (AMP) (Å <sup>2</sup> )             | 37     |
| Número Total de Resíduos Incluídos no Refinamento            | 216    |
| Número Total de Moléculas de Água Incluídas no Refinamento   | 241    |

A estrutura de APRT de *L. tarentolae* é composta por onze fitas  $\beta$  e cinco hélices  $\alpha$  e pode ser subdividida em três regiões: central (resíduos 49-191), capuz (resíduos 18-50) e loop flexível (110-132), conforme é representado na figura 30A. A região central compreende cinco fitas  $\beta$  paralelas (S5, resíduos 74-80; S6, resíduos 96-103; S9, resíduos 140-149; S10, resíduos 167-178 e S11, resíduos 199-204), que corresponde ao enovelamento característico das PRTaes tipo I [5,6]. As fitas  $\beta$  centrais são seguidas por duas fitas  $\beta$  antiparalelas do N-terminal (S1, resíduos 4-7 e S2, resíduos 10-13), flanqueadas por quatro hélices  $\alpha$  (H2, resíduos 52-69; H3, resíduos 82-94; H4, resíduos 153-165 e H5, resíduos 182-190). As hélices H2 e H3 localizam-se em um dos lados da folha  $\beta$  central, enquanto as hélices H4 e H5 localizam-se do lado oposto. A região do capuz da estrutura da IAPRT inclui duas hélices  $\alpha$  (H1, resíduos 17-26) e duas fitas  $\beta$  (S3, resíduos 27-31 e S4, resíduos 38-42). Na estrutura da IAPRT, o loop flexível é formado por duas fitas  $\beta$  (S7, resíduos 110-117 e S8, resíduos 122-132) e está na conformação aberta (Figura 30B).

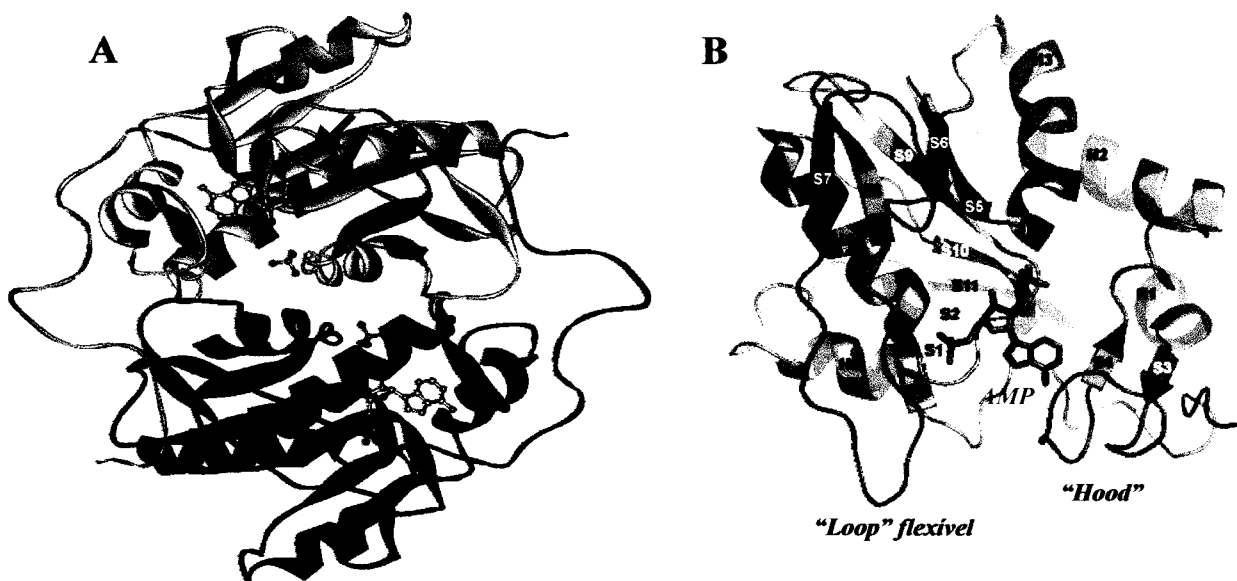


Figura 30: Estrutura tridimensional da APRT de *Leishmania tarentolae* representada na forma de fitas. (A) Estrutura do dímero. Um dos monômeros está representado em azul e o outro em cinza. As setas verdes indicam as moléculas de AMPs ligados a região do sítio catalítico. (B) Estrutura de um monômero. As fitas  $\beta$  estão identificadas com a letra S e as  $\alpha$  hélices com a letra H. O “loop” flexível (S7 e S8), responsável por proteger os substratos do solvente, está na conformação aberta. É possível notar que o domínio “Hood”, responsável pela especificidade pela purina, não está interagindo com o loop flexível.



O sítio ativo de cada um dos monômeros da IAPRT apresenta uma molécula de AMP e um íon fosfato. A presença de ambos se deve à condição de cristalização em que tanto AMP como fosfato estavam presentes. O íon fosfato ocupa a posição do sítio ativo correspondente ao fosfato  $\beta$  do PRPP [5,6]. A posição ocupada pelo AMP é muito próxima a descrita por Phillips *et al.* [8]; porém, o anel da ribose na estrutura da IAPRT adota uma *anti* conformação com o C4' do anel da ribose. Na estrutura da APRT de *L. donovani* contendo AMP ligado, observa-se o C2' em *anti* conformação [8]. Essa diferença se deve provavelmente à molécula de citrato ligada no sítio ativo da APRT de *L. donovani* [8].

A análise final da qualidade do modelo, feita com o programa PROCHECK [31], mostrou que 91,9% dos resíduos de aminoácidos estão nas regiões mais favoráveis do diagrama de Ramachandram. O restante dos resíduos está nas regiões permitidas do diagrama, não ocorrendo resíduos em regiões desfavoráveis. O modelo final apresentou os valores de 18,9% e 21,7% para  $R_{\text{trabalho}}$  e  $R_{\text{livre}}$  respectivamente. Esse modelo encontra-se depositado no PDB com o código 1MZV (<http://www.rcsb.org>).

### **3.6. Seleção de inibidores da APRT de *L. tarentolae* e efeito dos compostos bioativos sobre o crescimento de *Leishmania major* promastigota *in vitro***

No passado, as plantas medicinais serviram de base na busca de medicamentos. Compostos isolados a partir de inúmeras plantas foram avaliados em laboratórios devido a seus potenciais como agentes antiparasíticos contra malária, tripanossomíase e leishmaniose [80]. Nos últimos anos, um grande número de estudos com plantas, usadas no tratamento de leishmaniose, tem sido feito na Espanha, Sudão e Guiné-Bissau. Os resultados desses estudos estão confirmando a importância de muitas espécies de plantas como novas fontes de compostos bioativos [81]. A busca por moléculas bioativas normalmente começa com a

análise de um grande número de extratos, seguindo-se do isolamento das frações bioativas e, quando possível, a identificação de cada molécula em particular [82].

Muitos estudos destinados à identificação de princípios ativos contra leishmania, são feitos usando a forma promastigota do parasita devido a facilidade de cultivo *in vitro* em laboratório [81]. Apesar disso, um ponto crítico nas pesquisas de moléculas bioativas contra leishmaniose, a partir de plantas, consiste na carência de um método rápido para testar um grande número de extratos [83]. Nesse contexto, a utilização de testes enzimáticos para guiar o fracionamento de extratos pode representar uma grande economia de tempo. As enzimas da via de recuperação de purinas têm sido apontadas em vários estudos como alvo apropriado para a busca de moléculas com atividade leishmanicida [2,84-86]. Porém, devido às características da via de recuperação de purinas em *Leishmania sp* (Figura 2), um inibidor eficiente teria que agir nas três PRTases envolvidas: APRT, HGPRT e XPRT.

A APRT recombinante de *L. tarentolae* foi usada em nossos estudos para guiar a purificação de novos inibidores de PRTases a partir de extratos de plantas nativas do Brasil [87]. No total foram testados 1.126 extratos e os resultados mais promissores foram obtidos com a planta *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae). Os quatro melhores inibidores da IAPRT, isolados da *Adiscanthus fusciflorus*, são representados na figura 31. Esses inibidores tiveram a atividade analisada também em estudos com as enzimas HGPRT e XPRT de leishmania. Os quatro inibidores apresentam uma relação clara entre concentração e efeito inibitório, sugerindo que essas moléculas se ligam de maneira reversível as PRTases estudadas (Figura 32).

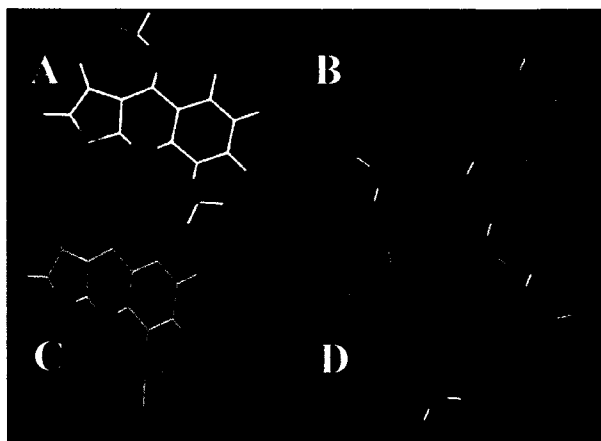


Figura 31: Estrutura química de quatro inibidores da APRT de *Leishmania tarentolae*, selecionados em bioensaios. (A)  $\gamma$ -fagarina; (B) Dictamina, (C) esquimianina e (D) isopimpinellina.

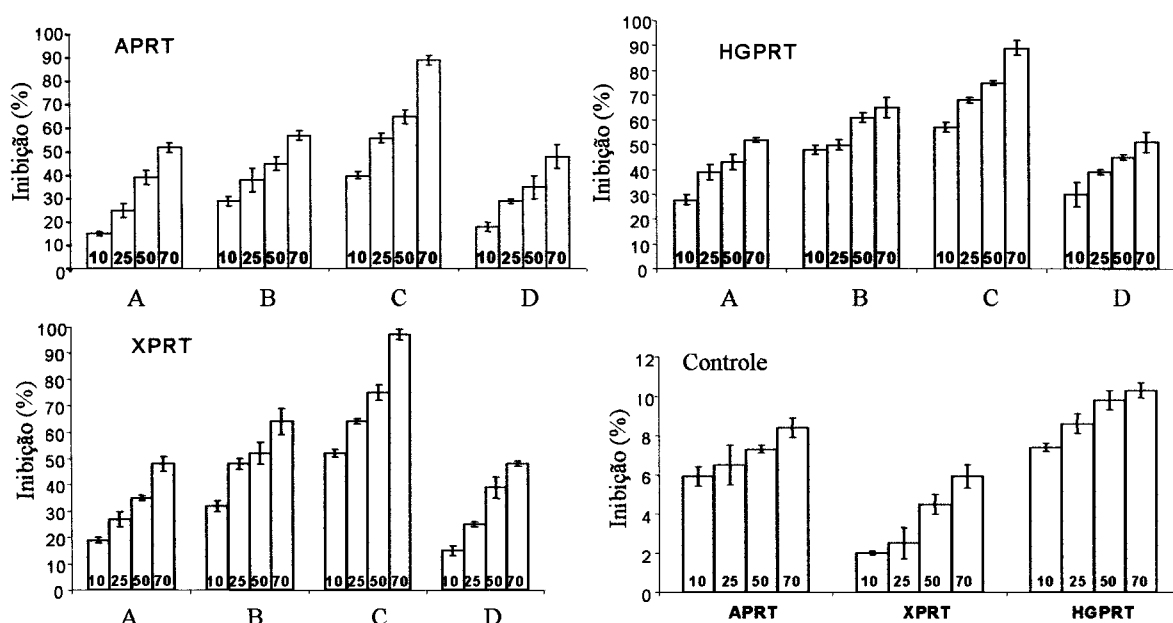


Figura 32: Efeito inibitório de três alcalóides (A,B,C) e uma cumarina (D) em testes enzimáticos com PRTases. (A) Dictamina, (B)  $\gamma$ -Fagarina, (C) Esquimianina e (D) Isopimpinellina. Os resultados foram obtidos a partir de seis experimentos em triplicata e são apresentados em porcentagem de inibição. As linhas verticais representam o desvio padrão obtido nas análises estatísticas dos resultados. Controle DMSO: Experimento para analisar o efeito do DMSO sobre as atividades enzimáticas das PRTases. Observa-se um efeito reduzido até a concentração de 70  $\mu$ M. Os números em cada barra representam as concentrações testadas, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 70  $\mu$ M.

Para as substâncias; dictiamina, isopimpinellina e  $\gamma$ -fagarina, os efeitos inibitórios nas PRTases são bastante similares (*tabela 7*). Para esses compostos, os valores de  $IC_{50}$  variam entre 260 $\mu$ M, para dictiamina em relação a APRT, e 80 $\mu$ M, para  $\gamma$ -fagarina nos testes com

HGPRT. Por outro lado, o inibidor esquimianina apresenta uma considerável seletividade para as enzimas XPRT e HGPRT (1  $\mu$ M e 2  $\mu$ M, respectivamente) em relação a inibição da APRT (142  $\mu$ M). Nota-se (*tabela 7*) que o composto esquimianina apresenta atividade 100 vezes maior para as enzimas HGPRT e XPRT quando comparadas à APRT. Todos os outros compostos apresentam atividades inibitórias semelhantes em todos os testes com PRTases, refletindo a baixa seletividade dessas moléculas para uma PRTase em particular.

*Tabela 7:* Efeito dos inibidores dictamina,  $\gamma$ -fagarina, esquimianina e isopimpineline frente as PRTases de leishmania, cultura de *L. major* promastigota, cultura de células de *H. sapiens*. Interações entre as PRTases e os quatro inibidores obtidos com o programa GOLD 2.1.

| Inibidores         | Enzimas<br>IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |      |       | Enzimas Gold-Score |       |       | Cultura de Células<br>LD <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |                              |
|--------------------|----------------------------------------|------|-------|--------------------|-------|-------|---------------------------------------------------|------------------------------|
|                    | APRT                                   | XPRT | HGPRT | APRT               | XPRT  | HGPRT | <sup>b</sup> <i>H. sapiens</i>                    | <sup>c</sup> <i>L. major</i> |
| Dictamina          | 262                                    | 199  | 250   | 42,42              | 42,61 | 34,93 | 90                                                | 90                           |
| Isopimpineline     | 142                                    | 196  | 142   | 45,97              | 46,76 | 35,64 | 25                                                | 20                           |
| Equimianina        | 142                                    | 1    | 2     | 46,11              | 49,95 | 37,91 | 245                                               | 98                           |
| $\gamma$ -fagarina | 151                                    | 120  | 82    | 44,28              | 43,18 | 35,02 | 70                                                | 69                           |

<sup>a</sup> Os resultados de inibição enzimática foram obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicata

<sup>b</sup> Os resultados de inibição *in-vitro* de células de mamífero foram obtidos a partir de dois experimentos independentes em triplicata e contados em câmara de Neubauer.

<sup>c</sup> Os resultados de inibição *in-vitro* de *L. major* promastigotas foram obtidos a partir de seis experimentos independentes em triplicata e contados em câmara de Neubauer.

Os quatro inibidores de PRTases selecionados foram testados em experimentos de inibição do crescimento de culturas de *L. major* promastigota. Os experimentos revelaram uma clara relação entre a concentração do inibidor e atividade inibitória (Figura 33). Todos os compostos apresentaram significativa atividade inibitória até concentrações de 20  $\mu$ g/mL.

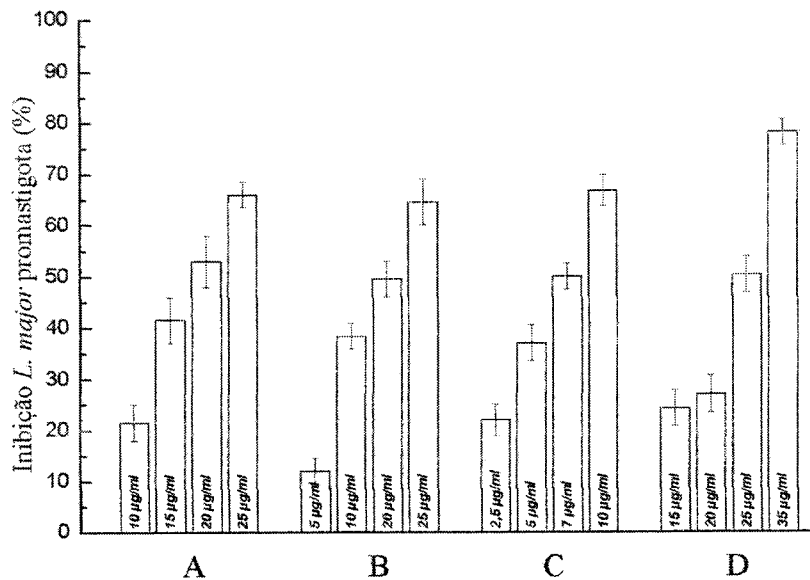


Figura 33: Efeito dos inibidores dictamina (A),  $\gamma$ -fagarina (B), esquimianina (C) e isopimpinellina (D) em culturas de *L. major* promastigota. A cultura de protozoário ( $1,5 \times 10^4$  células/mL) foi incubada na presença dos inibidores por 48 horas. Os resultados apresentados foram obtidos a partir de seis experimentos independentes em triplicata e representam a porcentagem de inibição da cultura. As linhas verticais representam a amplitude do desvio padrão.

A seletividade apresentada pela esquimianina nos testes bioquímicos também foi observada, embora em menor grau, nos testes *in vitro* com *L. major* promastigota e células promyelocite de *H. sapiens*. Enquanto a esquimianina inibiu a cultura de *L. major* promastigotas com LD<sub>50</sub> de 98  $\mu$ M e células de humano com LD<sub>50</sub> de 245  $\mu$ M, os outros três compostos não apresentaram seletividade (tabela 7). Este resultado não significa que a esquimianina está interagindo especificamente com as PRTases *in vivo*, mas representa mais um indício de que esse pode ser um bom composto de partida para o desenvolvimento de um novo fármaco contra leishmaniose.

Os dados de inibição enzimática e os efeitos dos compostos em culturas de células são difíceis de serem correlacionados. Na tentativa de encontrar indícios de que os novos inibidores de PRTases estão, de alguma forma, afetando a recuperação de purinonucleotídeos em cultura de *L. major*, foi enriquecido o meio de cultura com purinas (adenina, guanina, hypoxantina e xantina). Esse experimento poderia apontar a maior resistência dos parasitas

frente aos inibidores, assim como, mostrar a recuperação do crescimento da cultura em virtude do acréscimo de purinas. A *tabela 8* mostra as variações no crescimento das culturas de *L. major* na presença dos inibidores (em % de inibição) em virtude da variação da concentração de purinas. Exceto para a dictamina, os outros alcalóides (esquimianina e  $\gamma$ -fagarina) e a cumarina (isopimpineline), afetam menos o crescimento da cultura do parasita. Esses dados são preliminares mais relevam uma interessante tendência.

*Tabela 8:* Recuperação do crescimento de culturas de *L. major* promastigotas pela adição de purinas (adenina, guanina, hipoxantina e xantina) na presença dos inibidores  $\gamma$ -fagarina, esquimianina e isopimpineline.

| Purinas ( $\mu$ M) | Esquimianina | Isopimpineline | $\gamma$ -Fagarina | Dictamina |
|--------------------|--------------|----------------|--------------------|-----------|
| 0                  | 0            | 0              | 0                  | 0         |
| 50                 | -8           | -55            | -220               | 7,4       |
| 500                | -650         | -122           | -80                | 0         |

Os resultados são apresentados em % de inibição do crescimento da cultura de *L. major* promastigotas padrão, comparada com o crescimento da cultura após o acréscimo de purinas. Os números negativos representam estimulação do crescimento da cultura.

Os resultados obtidos com as enzimas (APRT, HGPRT e XPRT) levaram ao isolamento de três alcalóides e uma cumarina. Essas substâncias apresentam a mesma estrutura básica do mais importante grupo de compostos com atividade leishmanicida [80]. Assim, os quatro compostos selecionados podem ser considerados como eventuais pontos de partida para o desenvolvimento racional de novos fármacos contra leishmaniose. Nesse contexto, é imprescindível conhecer as interações entre a enzima alvo e o inibidor em nível molecular. Nessa direção foi realizado, em colaboração com o Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula Silva, um estudo de “Docking” molecular com as três PRTases (APRT, HGPRT e XPRT) e os quatro inibidores selecionados. Em geral, os resultados do “docking”, obtidos com o programa GOLD 2.1 [88], estão de acordo com a inibição enzimática, conforme é representado na *tabela 7*. Com relação a APRT, os inibidores esquimianina e isopimpineline apresentaram valores similares de IC<sub>50</sub>. Apesar de baixas, as inibições obtidas por esses

compostos foram maiores do que as apresentadas pelos compostos  $\gamma$ -fagarina e dictiamina; esse último inibidor mostrou a menor capacidade inibitória entre os inibidores estudados. De acordo com a *tabela 7*, existe uma boa correlação entre a classificação apresentada pelo programa GOLD e os resultados de inibição obtidos experimentalmente. O ajuste obtido pelo GOLD para a esquimianina (46,11) e para a isopimpineline (45,97) apresentou valores muito próximos, assim como, os valores de  $IC_{50}$  obtidos para esses dois compostos. Já, os inibidores  $\gamma$ -fagarina e dictiamina apresentaram respectivamente os valores 44,28 e 42,42, sugerindo menor afinidade pelo sítio ativo da APRT, conforme mostraram os resultados de  $IC_{50}$ . As análises visuais da melhor solução apresentadas pelo GOLD, para cada um dos quatro compostos, revelaram que a dictiamina é a única molécula que não forma ligação de hidrogênio com os resíduos do sítio ativo. Por outro lado, o inibidor esquimianina está ligado por ligações de hidrogênio a resíduos conservados Lys102 and Lys105 (Figura 34A). Da mesma forma, a isopimpineline está ligada ao sítio ativo por ligações de hidrogênio, formadas com as cadeias laterais dos resíduos Arg316 e Lys102. Já, os resultados obtidos com o inibidor  $\gamma$ -fagarina sugerem que esse composto forma apenas ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo Lys102 do sítio ativo.

Com relação a HGPRT, os resultados de  $IC_{50}$  (*tabela 8*) mostram que a esquimianina e a dictiamina são, respectivamente o melhor e o pior inibidor. Os resultados teóricos, obtidos com o programa GOLD (*tabela 7*), estão de acordo com os resultados bioquímicos, sugerindo que a esquimianina é o composto com maior afinidade pelo sítio ativo da enzima. Conforme é representado na Figura 34B esse inibidor está ligado por ligação de hidrogênio ao átomo de nitrogênio da cadeia principal do resíduo Asp129 e a cadeia lateral do resíduo de Lys 157. Por outro lado, o inibidor dictioamina apresentou o pior resultado nos estudos feitos com o programa GOLD. Assim, teoricamente, a dictiamina poderia ser apontada como o pior entre os quatro inibidores testados. Esse resultado corrobora com os dados de  $IC_{50}$  obtidos.

Com relação a enzima XPRT, os resultados de “docking” (*tabela 7*) sugerem a esquimianina como o melhor inibidor. De fato, os resultados experimentais de IC<sub>50</sub> para esse alcalóide é bem melhor em relação aos outros três inibidores (*tabela 7*). As análises visuais da melhor solução apresentada pelo programa GOLD em relação a XPRT e a esquimianina sugerem uma forte ligação de hidrogênio com a distância de 2,3 Å, entre o átomo de nitrogênio da cadeia principal do Asp123 do sítio ativo (Figura 34C). Os resultados apresentados pelo programa GOLD com relação a XPRT devem ser analisados com certa precaução porque o modelo utilizado nos estudos foi construído por homologia [42] e não determinado por cristalografia.

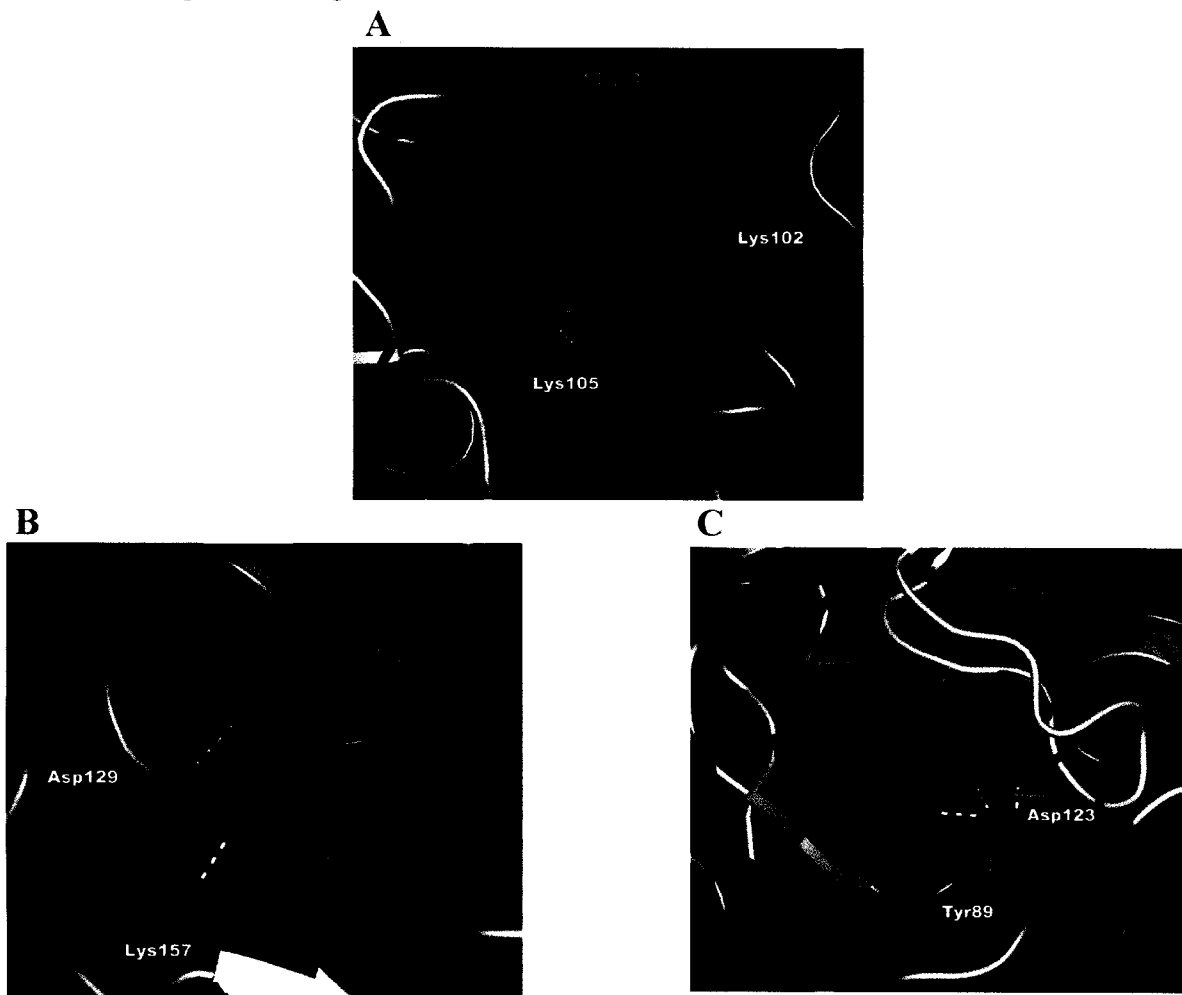


Figura 34: Interações entre o inibidor esquimianina e as PRTases de leishmania, obtidas com o programa GOLD. (A) Complexo esquimianina-APRT, (B) Complexo esquimianina-HGPRT e (C) Complexo esquimianina-XPRT. Nos três complexos são representados resíduos selecionados do sítio ativo. Os resíduos que interagem com o inibidor estão identificados. As ligações de hidrogênio formadas entre o inibidor e cada uma das três PRTases são representadas por linhas pontilhadas amarelas.



## 4. Conclusão

A estratégia de clonagem utilizada para produzir a enzima hAPRT recombinante na forma solúvel em *E. coli* BL21(DE3) foi bem sucedida. Foi estabelecido um protocolo para purificação da proteína nativa constituído de duas etapas de cromatografia: coluna de afinidade AMP-agarose, seguida de cromatografia de exclusão molecular Superose-12. A proteína purificada foi caracterizada bioquimicamente quanto a constante catalítica  $K_m$  para ambos os substratos e os valores obtidos foram próximos aos previamente descritos na literatura [49,50]. A massa molecular aparente, assim como, o ponto isoelétrico ( $P_i$ ) obtido experimentalmente para proteína recombinante também são consistentes com valores previamente descritos [48,49,51].

A estrutura cristalográfica da hAPRT em complexo com AMP foi elucidada por cristalografia de raio-X em resolução de 2,1 Å, tornando-se a primeira PRTase do *tipo I* com estrutura conhecida em humano. Várias comparações entre a estrutura da hAPRT e outras PRTases foram realizadas revelando detalhes que possibilitaram propor que os resíduos correspondentes a Leu159 e Ala131 na estrutura da hAPRT são responsáveis pela especificidade de bases em PRTases do *tipo I*.

Três mutações na hAPRT, associadas com sérias disfunções renais em DHA-uroliase, foram analisadas com base na estrutura da hAPRT e estruturas de outras APRT já elucidadas. Os estudos comparativos entre as APRTs possibilitaram propor que a molécula de água (identificada com 1 na estrutura da hAPRT) é um elemento importante para a ligação do PRPP. A mutação D65V dificulta a aproximação do resíduo de Val em relação ao resíduo Leu110, posição sempre ocupada por um resíduo hidrofóbico em todas as APRTases. A mutação D65V possibilita que o segmento Val65-Ser66-Arg67 adote a conformação *trans*, dificultando a ligação do PRPP. Com relação à mutação, M136T, foi proposto que tal evento favorece a aproximação entre a molécula de água (identificada como 1 na estrutura

cristalografia da hAPRT) e o nitrogênio da cadeia principal do resíduo Thr136. Essa mudança na posição da molécula de água pode desfavorecer a ligação do grupo 5'-fosfato do PRPP ocasionando a menor atividade catalítica da hAPRT portadora da mutação M136T. A mutação L110P também interfere na ligação do PRPP no sítio ativo. A interação entre o resíduo Leu110 e o resíduo Thr137, orienta o grupo hidroxila deste resíduo voltado para o grupo 5'-fosfato do PRPP ou AMP nas APRTases.

Três dos quatro mutantes da hAPRT, obtidos em laboratório, demonstraram atividades catalíticas coerentes com as formas mutantes estudadas em pacientes humanos. A quarta mutação (F173Del) levou a insolubilidade da hAPRT no sistema de expressão utilizado. Também em humanos, portadores dessa mutação, a atividade catalítica da hAPRT não é detectada [78]. Análises na estrutura da hAPRT sugeriram que a ausência da F173 provoca a desestruturação da proteína levando a insolubilidade.

A estrutura cristalográfica da lAPRT, em complexo com AMP, foi refinada a resolução de 2,2 Å. Essa estrutura representa uma contribuição adicional às estruturas de APRT já descritas. A estrutura da lAPRT foi utilizada em análises comparativas com outras estruturas de PRTases do *tipo I*. Esse estudo possibilitou propor que o papel do íon divalente, necessário para a atividade catalíticas das PRTases do *tipo I*, está diretamente relacionado com a neutralização da carga negativa do grupo pirofosfato do PRPP para favorecer a subsequente ligação da adenina.

A APRT de *Leishmania tarentolae* foi utilizada em um amplo rastreamento bioquímico para a seleção de inibidores a partir de extratos de plantas. Três alcalóides e uma cumarina com atividades inibitórias relevantes foram isolados. Posteriormente, os quatro inibidores também foram testados nas enzimas hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT) e xantina-guanina-hipoxantina-fosforribosil-transferase (XPRT) de *L. donovani*. Em geral os resultados de inibição enzimática obtidos para as três PRTases foram similares.

Os quatro compostos também foram ativos em testes com *L. major* promastigota em cultura, mas também foram tóxicos em culturas de células de humano. Uma correlação inicial entre os dados bioquímicos e o efeito parasitológico foi estabelecida pela recuperação do crescimento da cultura com o acréscimo de purinas. As possíveis interações, em nível molecular, entre as PRTases (APRT, HGPRT e XPRT) e cada um dos quatro inibidores, foram analisadas por docking molecular. Os resultados apontaram elementos estruturais envolvidos na seletividade e ligação dos inibidores.

A inibição simultânea das três PRTases é uma característica importante dos compostos isolados, apesar destes não apresentarem seletividade e inibirem também a APRT de humano. Os resultados de inibição do crescimento da cultura de *L. major* promastigota, apresentado pelos quatro novos compostos, são similares aos apresentados pelo Pentostam, um leishmanicida comercial [47]. Apesar disso, a inibição do crescimento da cultura de *L. major*, apresentada neste trabalho é classificada como moderada [81].

Os resultados apresentados nesta tese foram reunidos nas seguintes publicações:

Marcio Silva, Carlos H. T. P. Silva, Jorge Iulek, Otavio H. Thiemann, "Human Adenine Phosphoribosyltransferase Three Dimensional Structure Solution and its relation to DHA-Urolithiasis", *Biochemistry*, v.43, p.7663-7671 (2004).

Roberto G. S. Berlinck, Eduardo Hajdu, Rosana M. da Rocha, Jaíne H. H. L. de Oliveira, Isara L. C. Hernández, Mirna H. R. Selegim, Ana Cláudia Granato, Érika V.R. de Almeida, Cecília V. Nuñez, Guilherme Muricy, Solange Peixinho, Cláudia O. Pessoa, Manoel O. Moraes, Bruno C. Cavalcanti, Gislene G. F. Nascimento, Otavio Thiemann, Marcio Silva, Ana O. Souza and Paulo R. R. Minarini "Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil", *Journal of Natural Products*, v. 67, p.510-522 (2004).

M. Silva, C.H.T.P. Silva, J. Iulek, G. Oliva, O.H. Thiemann, "Crystal structure of adenine phosphoribosyltransferase from *Leishmania tarentolae*: potential implications for APRT catalytic mechanism", *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1696, p. 31–39 (2004).

H.B. Napolitano, M. Silva, J. Ellena, B.D.G. Rodrigues, A.L.C. Almeida, P.C. Vieira G. Oliva and O.H. Thiemann "A novel coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, (2004).

H. B. Napolitano, M. Silva, J. Ellena, W. C. Rocha, P. C. Vieira, O. H. Thiemann and G. Oliva, "Redetermination of skimmianine: a new inhibitor against the *Leishmania* APRT enzyme", *Acta Cryst. Section E*, v.59, p. o1503 – o1505 (2003).

M. Silva, H. B. Napolitano, J. Ellena, W. C. Rocha, P. C. Vieira, G. Oliva and O. H. Thiemann, "3-(5,7-Dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-benzo[b]-pyran-6-yl)propionic acid: a potential inhibitor against *Leishmania*", *Acta Cryst. Section E*, v.59, p. o1575–o1577 (2003).

H. B. Napolitano, M. Silva, J. Ellena, W. C. Rocha, P. C. Vieira, O. H. Thiemann and G. Oliva, "Redetermination and comparative structural study of isopimpinellin: a new inhibitor against the *Leishmania* APRT enzyme", *Acta Cryst. Section E*, v. 59 p. o1506–o1508 (2003).

Silva, M., Silva, C.H.T.P. Iulek, J., Oliva, G. and Thiemann, O.H. "Structure determination of the Human Adenine Phosphoribosyltransferase" *Activity Report of Brazilian Synchrotron Light Laboratory*, v. 1 p.299-300 (2003).

## 5. Perspectivas

Os estudos cristalográficos da hAPRT nativa possibilitam propor possíveis explicações para as alterações catalíticas dessa enzima. As formas mutantes D65V, L110P, M136T purificadas, serão utilizadas em experimentos de cristalização. Os cristais obtidos serão utilizados para a determinação das estruturas tridimensionais. As informações obtidas serão confrontadas com as hipóteses criadas a partir da proteína nativa. O mutante F173Del não foi produzido na forma solúvel. Como o resíduo de número 174 da seqüência polipeptídica da hAPRT também é uma fenil-alanina, na prática, a mutação feita na posição 173 é corrigida pelo resíduo Phe 174. A mutação efetiva ocorre na posição 174, onde a Phe é substituída pela serina subsequente. A importância da fenil-alanina na posição 174 será investigada pela produção de um novo mutante contendo um resíduo de serina na posição 173. A serina servirá como espaçador restabelecendo a posição dos demais resíduos do C-terminal. Caso o novo mutante origine proteína solúvel, ficará evidenciado que a deleção na posição 173, observada em humanos, pode causar instabilidade da proteína devido à perda de interações em resíduos posteriores a posição da mutação. Como informação adicional poderá ser observado que a cadeia lateral do resíduo fenil-alanina, na posição 173, não é fundamental para a estabilidade da proteína.

Os inibidores da APRT de leishmania (Dictamina,  $\gamma$ -fagarina, isopimpinellina e esquimianina) serão utilizados em ensaios de co-cristalização com a enzima APRT de *Leishmania tarentolae*. As informações obtidas poderão ser utilizadas na continuidade do trabalho visando novos compostos de partida que possam, eventualmente, originar novos quimioterápicos contra leishmaniose.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sahota, A.S., Tischfield, J.A., Kamatani, N. e Simmonds, H.A. (2001). Adenine phosphoribosyltransferase and 2,8-dihydroxyadenine lithiasis. Em: Scriver, C.R., Beaudet, W.S., Sly, W.S. e Valle, D. (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, N.Y.; 2571-2583.
2. Berens, R.L., Drug, E.C., Marr, J.J. (1995). *Biochemistry of Parasitic Organisms and its Molecular Foundations* (J.J. Marr, M. Muller, eds), London, 89-117.
3. McGreevy, P.B., Marsden, P.D., Campbell, W.C., Rew, R.S. (1986). *Chemoterapy of Parasitic Diseases*. Plenum Press, New York, 115-127.
4. Hochstadt, J. (1978). *Methods Enzymol.* Academic Press, New York, 549.
5. Shi, W., Sarver, A.E., Wang, C.C., Tanaka, K.S.E., Almo, S.C., Schramm, V.L. (2002). Closed site complexes of adenine phosphoribosyltransferase from *Giardia lamblia* reveal a mechanism of ribosyl migration, *J. Biol. Chem.* **277**, 39981– 39988.
6. Vos, S., Oarry, R.J., Burns, M.R., Jersey, J, Martin, J.L. (1998). Structures of free and complexed forms of *Escherichia coli* xanthine-guanine phosphoribosyltransferase, *J. Mol. Biol.* **282**, 875–889.
7. Shi, W., Li, C.M., Tyler, P.C., Furneaux, R.H., Grubmeyer, C., Schramm, V.L., Almo, S.C. (1999). The 2.0 Å Structure of Human Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase in Complex with a Transition State Inhibitor, *Nat. Struct. Biol.* **6**, 588- 593.
8. Phillips, C.L., Ullman, B., Brennan, R.G., Hill, P.C. (1999). Crystal Structures of Adenine Phosphoribosyltransferase from *Leishmania Donovanii*, *J. EMBO*, **18**, 3533–3545.
9. Thomas, C. B., Arnold, W. J., and Kellyey, W. N. (1973) Human Adenine Phosphoribosyltransferase. Purification, subunit structure, and substrate specificity, *J. Biol. Chem.* **248**, 2529-2535.
10. Shi, W., Tanaka, K.S.E., Crother, T.R., Taylor, M.W., Almo, S.C., Schramm, V.L. (2001). Structural Analysis of Adenine Phosphoribosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry*, **40**, 10800-10809.
11. Kamatani, N., Kuroshima, S., Yamanaka, H., Nakashe, S., Take, H., Hakoda, M. (1990). Identification of a compound heterozygote for adenine phosphoribosyltransferase deficiency (APRT\*J/APRT\*Q0) leading to 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis. *Hum. Genet.* **85**, 500-504.
12. Rey, L., (2001). *Parasitologia Ed. Guanabara Koogan S.A*, **3**. Rio de Janeiro.
13. Davies, C.R., Kaye, P. Croft, S.L., Sundar, S. (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. *B.M.J.* **326**, 377-382.

14. Herwaldt, B.L. (1999). Leishmaniasis. *The Lancet*, **354**, 1191-1199.
15. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Fund. Nacional. de Saúde. (2000), Brasília/DF.
16. Gallerano, R.H., Sosa, R.R., Marr, J.J. (1990). *J. Trop. Med.* **43**, 159-166.
17. Martinez, S., Marr, J.J. (1992) *N. Engl. J. Med.* **326**, 741-744.
18. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E. (1995). Short protocols in molecular biology. **2**.
19. pGEN-T System Manual. <http://www.promega.com> (Março 2001).
20. Allen, G. (1989) Sequencing of proteins and peptides. Elsevier, 2 Ed.
21. Tuttle, J.V., Krenitsky, T.A. (1980) Purine phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani*, *J. Biol. Chem.* **255**, 909-916.
22. Blundell, T.L., Johnson, L.N. (1976). Protein crystallography. Academic Press, London, **66**.
23. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
24. Del Sol, F.G., Ramoân - Maiques, S., Santos, C. F., Grangeiro, T. B., Nagano, C. S., Farias, C. M. S. A., Cavada, B. S., Calvete, J. J. (2002). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the seed lectin from *Parkia platycephala*, *Acta Crystallogr.* **D58**, 167-169.
25. Chang, G., Lewis, M. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr.*, **D50**, 760-763.
26. Navaza, J. (1994). AMoRE. an automated package for molecular replacement, *Acta Crystallogr.* **A50**, 157-163.
27. Silva, M., Silva, C.H.T.P., Iulek, J., Oliva G., Thiemann, O.H. (2004). Crystal structure of adenine phosphoribosyltransferase from *Leishmania tarentolae*: potential implications for APRT catalytic mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1696**, 31-39.
28. Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., Delano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination, *Acta Crystallogr.* **54**, 905-921.

29. Jones, T. A., Zon, J.Y., Cowan, S. W., Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron-density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.* **A47**, 110-119.
30. Perrakis, A., Morris, R.J.H., Lamzin, V.S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement, *Nat. Struct. Biol.* **6**, 458-463.
31. Laskowski, R., Moss, D. Thornton, J. (1993). Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J.M.B.* **231**, 1049-1067.
32. Vaguine, A., Richelle, J. Wodak, S. (1999). SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **55**, 191-205.
33. Guex, N. Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
34. Focia, P.J., Craig, S.P., Eakin, A.E.A. (1998). Approaching the Transition State in the Crystal Structure of a Phosphoribosyltransferase, *Biochemistry* **37**, 17120-17127.
35. Novagen 4. pET - System Manual. (1994).
36. Papworth, C., Bauer, J.C., Braman, J., Wright, D.A. (1996) *Strategies* **9** (3), 3-4.
37. Stratagene - Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit - Manual (2002).
38. Corpet, F., (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, *Nucl. Acids Res.*, **16** (22), 10881-10890,1988.
39. Marti-Ranom, M.A., Stuart, A., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., Sali, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Ver. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 291-325, 2000.
40. Silva, Márcio. (2003). Estudos de Biologia Molecular e Estrutural da Enzima Adenina Fosforribosiltransferase (APRT) de *Leishmania tarentolae*. Tese (Mestrado).
41. Monzani, P.S., Alfonzo, J.D., Simpson, L., Oliva, G., Thiemann, O.H. (2002). Cloning, characterization and preliminary crystallographic analysis of *Leishmania* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, *Biochimica et Biophysica Act.* **1598**, 3-9.
42. Castilho, Marcelo Santos (2004). Planejamento racional de drogas contra tripanossomatídeos: gGAPDH de *Trypanosoma cruzi* e XPRT de *Leishmania major*. Tese (Doutorado).
43. Napolitano, H.B., Silva, M., Ellena, J., Rocha, W.C., Vieira, P.C., Thiemann, O.H. Oliva, G. (2003). Redetermination of skimmianine: a new inhibitor against the *Leishmania* APRT enzyme, *Acta Crystallographica.* **E59**, 1503-5.



44. Napolitano, H.B., Silva, M., Ellena, J., Rocha, W.C., Vieira, P.C., Thiemann, O.H., Oliva, G. (2003). Redetermination and comparative structural study of isopimpinellin: a new inhibitor against the *Leishmania* APRT enzyme, *Acta Crystallographica*. **E59**, 1506–8.
45. Silva, M., Napolitano, H.B., Ellena, J., Rocha, W.C., Vieira, P.C., Oliva G., Thiemann, O.H. (2003). 3-(5,7-Dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-benzo[b]pyran-6-yl) propionic acid: a potential inhibitor against *Leishmania*. *Acta Cryst.* (2003). **E59**, 1575–1577
46. Napolitano, H.B., Silva, M., Ellena, J., Guedes, B.D., Almeida, A.L.C., Vieira, P.C., Oliva, G., Thiemann, O.H. (2005). A novel coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. *Submetido*.
47. Zhai, L., Chen, M., Blom, J., Theander, T.G., Christensen, S.B., Kharazmi, A. (1999). The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. *J. of Antimicrobial Chemotherapy* **43**, 793-803
48. Thomas, C.B., Arnold, W.J., Kellyey, W.N. (1973). Human Adenine Phosphoribosyltransferase. Purification, subunit structure, and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **248**, 2529-2535.
49. Holden, J.A., Meredith, G.S., Kelley, W.N. (1979). Human adenine phosphoribosyltransferase. Affinity purification, subunit structure, amino acid composition, and peptide mapping. *J. Biol.Chem.* **254**, 6951-6955.
50. Okoda, G., Kaneko, I., Koyama, H. (1986). Purification and characterization of adenine phosphoribosyltransferase from mouse mammary carcinoma FM3A cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta*, **884**, 304-310.
51. Appel, R.D., Bairoch, A., Hochstrasser, D. F. (1994). A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW Server. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 258-260.
52. Dhenh, J. (1994). *Principles os Protein X-ray Crystallography*. New York, Springer, **3**.
53. Otwinowski, Z., Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* **276**, 307– 326.
54. Navaza, J., Saludjian, P. (1997) AMoRe: an automated molecular replacement program package. *Methods Enzymology*, **276**, 581-594.
55. Nayal, M., Di Cera, E. (1996). Valence Screening of Water in Protein Crystals Reveals Potential Na<sup>+</sup> Binding Sites, *J. Mol. Biol.* **256**, 228-234.
56. Kleywegt, G.J., Zou, J.Y., Kjeldgaard, M., Jones, T.A. (2001). in *International Table for Crystallography* (Rossmann, M. G., Arnold, E., Eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 353-356

57. Laskowski, R.A., Mac Arthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M. (1992). Procheck, versão 2.0, Inglaterra.
58. Vriend, G., Sander, C., (1993). Whatif. *J. Apply. Cryst.* **26**, 47-60.
59. Engberg, P., Millqvist, E., Pohl, G. (1995). Verify-3D. *Arch. Biochem. Biophys.* **241**, 628-638.
60. Vos, S., Parry, R.J., Burns, M.R., de Jersey, J., Martin, J.L. (1998). Structures of Free and Complexed Forms of *Escherichia coli* Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase, *J. Mol. Biol.* **282**, 875-889.
61. Kleywegt, G.J. (1999). Recognition of spatial motifs in protein structures, *J. Mol. Biol.* **285**, 1887-1897.
62. Williams-Ashman, H.G., Seidenfeld, J., Galletti, P. (1982) Trends in the biochemical pharmacology of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine, *Biochem. Pharmacol.* **31**, 277-288.
63. Greenwood, M.C., Dillon, M.J., Simmonds, H.A., Barratt, T.M., Pincott, J.R., Metreweli, C. (1982). Renal failure due to 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis, *Eur. J. Pediatr.* **138**, 346-349.
64. Kamatani, N., Hakoda, M., Otsuka, S., Yoshikawa, H., Kashiwazaki, S. (1992). Only three mutations account for almost all defective alleles causing adenine phosphoribosyltransferase deficiency in Japanese patients, *J. Clin. In Vest.* **90**, 130-136.
65. Stone, T.W., Simmonds, H.A. (1991). in *Purines: Basic and Clinical Aspects* (Kluwer, Ed.) Academic Press, London.
66. Wyngaarden, J.B., and Dunn, J.T. (1957). 8-Hydroxyadenine as the Intermediate in the Oxidation of Adenine to 2,8-Dihydroxyadenine by Xanthine Oxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* **70**, 150-156.
67. De Vries, A., Sperling, O. (1977). Implications of Disorders of Purine Metabolism for the Kidney and the Urinary Tract, *Ciba Found. Symp.* **48**, 179-206.
68. Denessiouk, K.A., Johnson, M.S. (2000). A Common Structural Framework for Adenine and AMP Binding in 13 Unrelated Protein Families, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **38**, 310-326.
69. Nobeli, I., Laskowski, R.A., Valdar, W.S.J., Thornton, J.M. (2001). On the Molecular Discrimination between Adenine and Guanine in Proteins, *Nucleic Acids Res.* **29**, 4294-4309.
70. Scapin, G., Ozturk, D.H., Grubmeyer, C., Sacchettini, J.C. (1995). The Crystal Structure of the Orotate Phosphoribosyltransferase Complexed with Orotate and R-D-5-Phosphoribosyl-1- pyrophosphate, *Biochemistry* **34**, 10744-10754.

71. Eads, J.C., Scapin, G., Xu, Y., Grubmeyer, C., Sacchettini, J.C. (1994). The crystal Structure of Human Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase with Bound GMP, *Cell* **78**, 325-334.
72. Somoza, J.R., Chin, M.S., Focia, P.J., Wang, C.C., Fletterick, R.J. (1996). Crystal Structure of the Hypoxanthine-Guanine-Xanthine Phosphoribosyltransferase from the Protozoan Parasite *Tritrichomonas foetus*, *Biochemistry* **35**, 7032-7040.
73. Henriksen, A., Aghajari, N., Jensen, K.F., Galhede, M. (1996). A Flexible Loop at the Dimer Interface is a Part of the Active Site of the Adjacent Monomer of *Escherichia coli* Orotate Phosphoribosyltransferase, *Biochemistry* **35**, 3803-3809.
74. Schumacher, M.A., Carter, D., Scott, D.M., Roos, D.S., Ullman, B., Brennan, R.G. (1998). Crystal structures of *Toxoplasma gondii* uracil phosphoribosyltransferase reveal the atomic structure of pyrimidine discrimination and prodrug binding, *EMBO J.* **18**, 3219-3232.
75. Chen, J., Sahota, A., Laxdal, T., Stambrook, P.J., Tischfield, J.A. (1990). Demonstration of a Common Mutation at the Adenine Phosphoribosyltransferase (APRT) Locus in the Icelandic Population, *Am. J. Hum. Genet.* **47** (Suppl.), A152.
76. Sahota, A., Chen, J., Boyadijev, S.A., Gault, M.H., Tischfield, J.A. (1994). Missense Mutation in the Adenine Phosphoribosyltransferase Gene Causing 2,8-dihydroxyadenine Urolithiasis, *Hum Mol. Genet.* **3**, 817-818.
77. Hidaka, Y., Tarle, S.A., Fujimori, S., Kamatani, N., Kelley, W.N., Palella, T.D. (1988). Human Adenine Phosphoribosyltransferase Deficiency. Demonstration of a single Mutant Allele Common to the Japanese, *J. Clin. In Vest.* **81**, 945-950.
78. Hidaka, Y., Palella, T.D., O'Toole, T.E., Tartle, S.A., Kelley, W.N. (1987). Human Adenine Phosphoribosyltransferase. Identification of allelic mutations at the nucleotide complete deficiency of the enzyme. *J. Clin. In vest.*, **80**, 1409-1415.
79. Howlin, B., Butler, S.A., Moss, D.S., Harris, G.W., Driessen, H.P.C. (1993). TLSanlts Parameter-Analysis Program for Segmented Anisotropic Refinement of Macromolecular Structures, *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 622-624.
80. Akendengue, B., Ngou-Milama, E., Laurens, A., Hocquemiller, R. (1999). Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products, *Parasite.* **6**, 3-8.
81. Manuel, J. C-B., Luis, M. P-R. (2001). Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Products Reports.* **18**, 674-88.
82. Zerehsaz, F., Salmanpour, R., Handijani, F. (1999). A double-blind randomized clinical trial of a topical herbal extract (Z-HE) vs. Systemic meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran. *International Journal of Dermatology.* **38**, 610-12.
83. Paulo, B.C., Elizabeth, I.F. (2001). Leishmaniasis phytotherapy nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia.* **72**, 599-618.

84. Hyde, J.E. (1990). In Hyde, J.E. (ed.), *Molecular Parasitology*. Van Nostrand Reinhold, New York, 181-228.
85. Hassan, H.F., Coombs, G.H. (1986). A comparative study of the purine-and pyrimidine-metabolising enzymes of a range of trypanosomatids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. **84B**, 217-223.
86. Ullman, B. Carter, D. (1997). Molecular and biochemical studies on the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases of the pathogenic haemoflagellates. *International Journal of Parasitology*. **27**, 203-13.
87. Rocha, Waldirene C. (2004) Estudo Fitoquímico e biológico da casca do caule de *Salacia impressifolia* (Miers.) A.C. Smith (Hippocrateaceae). Tese (Doutorado).
88. Verdonk, M.L., Cole, J.C., Hartshorn, M.J., Mulrray, C.W., Taylor, R.D. (2003). Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. *Proteins*. **52**, 609-623.