**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA ENZIMA
GLICOSE-6-FOSFATO ISOMERASE DE *LEISHMANIA MEXICANA* E
COMPARAÇÃO COM A ENZIMA HOMÓLOGA DE HUMANOS.**

Artur Torres Cordeiro

USP/IFSC/SBI

8-2-001594

**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. Otavio Henrique Thiemann

São Carlos – 2004

**IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO**

IFSC - SBI
CLASS.....
CUTTER.....
TOMBO.....Te 1599

Cordeiro, Artur Torres

"DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA ENZIMA GLICOSE-6-FOSFATO ISOMERASE DE *LEISHMANIA MEXICANA* E COMPARAÇÃO COM A ENZIMA HOMÓLOGA DE HUMANOS."

Artur Torres Cordeiro – São Carlos, 2004

Tese (Doutorado) – Área de Física da Universidade de São Paulo,
2003 - Páginas: 79

Orientador: Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann

1. Cristalografia de Proteínas.

I. Título

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE ARTUR TORRES
CORDEIRO APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO, EM 16-04-2004.

COMISSÃO JULGADORA:

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

Prof. Dr. Wim Maurits Sylvain Degrave – FIOCRUZ

Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni – UNESP

Profa. Dra. Leila Maria Beltramini – IFSC/USP

Prof. Dr. Igor Polikarpov – IFSC/USP

DEDICATÓRIA

À Dani e ao Vinicius.

AGRADECIMENTOS

- Ao prof. Otavio H. Thiemann, meu orientador, pela incansável e valiosa orientação.
- A todos os colegas de pós-graduação pelos bons momentos que compartilhamos.
- A Wladerez, Jaciara, Fernando, Maria Helena e Marcia pela ajuda com os assuntos acadêmicos e burocráticos.
- Ao Jorgito, Ivone, Valesca, Tatiana, Ricardo e Neuza pelo respeito, atenção e carinho.
- Aos meus Pais e irmãos pela confiança que sempre depositaram em mim.
- A FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Sobre a doença	1
1.2 Vida de <i>Leishmania</i> : interações com o hospedeiro	4
1.3 Quimioterapia	5
1.4 Potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas	
contra leishmania e trypanosomas	9
1.5 Glicose-6-fosfato isomerase	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1 Alinhamento de seqüências de PGI's	16
2.2 Sub clonagem, expressão e purificação das PGI-Lm e dPGI-Lm.	16
2.3 Caracterização cinética e ensaio de inibidores.	19
2.4 Cristalização, coleta de dados de difração de raios-X,	
determinação, refinamento e análise das estruturas.	21
2.5 Comparação com a PGI-humana.	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1 Alinhamento de seqüências de PGI's	24

3.2. Sub clonagem, expressão e purificação das PGI-Lm e dPGI-Lm.	25
3.3. Caracterização cinética e ensaio de inibidores.	29
3.4. Cristalização, coleta de dados de difração de raios-X, determinação e refinamento das estruturas.	
3.4.1 Primeiro conjunto de dados (coletado no LNLS)	32
3.4.2 Segundo conjunto de dados (coletado no IFSC)	38
3.4.3 Terceiro conjunto de dados (coletado no Brookhaven National Laboratory. - BNL)	42
3.5. Análise das estruturas	46
3.6 Comparação entre as PGI's de humanos e <i>Leishmania</i>	51
4. CONCLUSÕES	58
ANEXO I	61
Cordeiro, A.T., Godoi, P.H.C., Silva, C.H.T.P., Garratt, R.C., Oliva, G. & Thiemann, O.H. (2003). Crystal structure of human phosphoglucose isomerase and analysis of the initial catalytic steps. <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , 1645 , 117-122.	
ANEXO II	68
Cordeiro A. T. , Hardré, R., Michels, P.A.M., Salmon, L., Delboni, L.F. & Thiemann, O.T. (2004). <i>Leishmania mexicana mexicana</i> glucose-6- phosphate isomerase crystallization, molecular replacement solution and inhibition. <i>Acta Cryst D</i> (in press)	
REFERÊNCIAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição de casos de Leishmania Visceral 2

Figura 2: Principais drogas disponíveis 6

Figura 3: Mercado mundial de fármacos em 1999 8

Figura 4: Esquema representativo da glicólise e da via das pentoses 12

Figura 5: Representação gráfica do desenvolvimento de culturas 15

Figura 6: Oligonucleotídeos utilizados para a 17

Figura 7: Ensaio enzimático para a atividade da PGI. 20

Figura 8: Inibidores testados contra a PGI 20

Figura 9: Representação esquemática alinhamento das sequências 24

Figura 10: Gel de agarose 1% com o produto 25

Figura 11: SDS-PAGE, método Laemmli em gel 15%. 26

Figura 12: (A) Acompanhamento das etapas de purificação 27

Figura 13: Gráfico da relação entre [F6P] e a velocidade de reação 28

Figura 14: Gráfico da atividade da PGI-humana 29

Figura 15 : Gráfico da atividade da PGI-Lm 30

Figura 16: Cristais da dPGI-Lm crescidos em pH 9.0 33

Figura 17: Imagem do padrão de difração do cristal de dPGI-Lm 35

Figura 18: Reflexões do conjunto de dados coletado no LNLS 36

Figura 19: Fator de correlação entre os mapas de patterson 37

Figura 20: Imagem do padrão de difração do cristal..... 39

Figura 21: Mapa de densidade eletrônica $2\sigma_A|F_o|-D|F_c|$ 41

Figura 22: Imagem do padrão de difração do cristal 43

Figura 23: Gráfico de Ramachandran 46

Figura 24: Superfície acessível ao solvente da dPGI-Lm	47
Figura 25: Mapa $2\sigma_A F_o -D F_c $ (contorno de 1σ) para a região do loop	48
Figura 26: : Comparação entre os loops A e B das estruturas	49
Figura 27: Representação dos contatos cristalinos observados	50
Figura 28: Representação da dPGI-Lm mostrando	51/52
Figura 29: Alinhamento entre as PGI's	53
Figura 30: Representação do domínio grande (azul)	54
Figura 31: Sobreposição da dPGI-Lm (verde) e PGI-humana (cinza)	55
Figura 32: Representação das interações observadas entre o substrato F6P	56
Figura 33: Imagem estéreo do sítio catalítico da dPGI-Lm/F6P	57

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Detalhes sobre os três conjuntos de dados ... 22

Tabela II: IC₅₀ dos inibidores ... 30

Tabela III: Estatística do conjunto de dados da dPGI-Lm ... 34

Tabela IV: estatísticas do processamento dos dados com ... 40

Tabela VI: Estatística do conjunto de dados da dPGI-Lm-F6P ... 43

Tabela VII: Estatística final para coleta de dados e refinamento ... 45

LISTA DE ABREVIATURAS

LV	Leishmaniose visceral
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
iRNA	RNA de interferência
ATP	Adenosina trifosfato
PTS	<i>peroxisome targeting sequence</i> (sequência sinalizadora para peroxisoma)
SDS- PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pI	ponto isoelétrico
UA	Unidade de Absorbância
5 PAA	D-arabinoato-5-fosfato
5 PAAm	D-arabinoamida-5-fosfato
5 PAH	D-arabinohidroximato-5-fosfato
5 PAHz	D-arabinohidroxiazida-5-fosfato
MPD	metil pentano diol
D.O.	Densidade óptica
G6P	Glucose-6-fosfato
F6P	Frutose-6-fosfato
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosídeo
mRNA	RNA mensageiro
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>

RESUMO

Esta tese apresenta em sua introdução uma revisão bibliográfica sobre a leishmaniose no Brasil e no mundo, com dados atuais de documentos do Ministério da Saúde e da Organização Mundial da Saúde. Discute também, com base em revisões bibliográficas recentes, os mecanismos que o parasita (*Leishmania*) possui para escapar da resposta imunológica e obter abrigo no interior das células de defesa dos humanos; os tratamentos atualmente empregados para a leishmaniose; a importância de uma abordagem racional para o desenvolvimento de novas drogas e a falta de interesse das indústrias farmacêuticas em direcionar a pesquisa & desenvolvimento para doenças tropicais. Ainda na introdução ressalta-se a importância da identificação e validação de potenciais alvos metabólicos antes de se investir na busca por compostos com potencial quimioterápico. Como exemplo discute-se o papel das enzimas do metabolismo energético, entre elas a fosfoglicose isomerase (PGI), na sobrevivência e homeostase do parasita *Leishmania*.

Os experimentos descritos nesta tese visam a determinação da estrutura cristalográfica da PGI de *L. mexicana* e a comparação cinética e estrutural com a PGI humana. O mapeamento das diferenças estruturais entre as duas enzimas é fundamental para a validação da PGI como potencial alvo metabólico e serve de guia para a idealização de inibidores seletivos da enzima dos parasitas.

ABSTRACT

This thesis presents a review about the occurrence of leishmaniasis in Brazil and all over the world. The main data sources were documents from Brazilian Health Ministry and the World Health Organization. The introduction presents actual information about strategies adopt by the parasite to evade the human immune response, the common drugs used in actual treatment, the need for new drugs based on a rational approach and the lack of interest from pharmaceutic industry to invest in research & development for tropical diseases. It also highlights the importance to identify and validate possible metabolic targets before spending time and money in searching potential compounds that blocks a non validated parasite target. The enzymes that participate in the energy metabolism are considered good target. An example is the glycosomal enzyme phosphoglucose isomerase (PGI), which was recently validated by RNA interference experiments in *T. brucei* as a good target.

The experiments described here intend to elucidate the crystallographic structure from *L. mexicana* PGI and compare its kinetic and structural proprieties to the human PGI. The mapping of the differences between both enzymes is crucial for the validation of PGI as a metabolic target and will assist in the design of inhibitors with high selectivity against the parasite enzyme.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sobre a doença

Este tópico apresenta uma visão epidemiológica da leishmaniose e o ciclo de vida do parasita. Dados atualizados do Ministério da Saúde e da Organização Mundial de Saúde mostram a distribuição geográfica da doença no Brasil e no Mundo.

Em 1903, Leishman e Donovan identificaram separadamente o protozoário causador do mal de Kalazar que acometia soldados na Índia. A doença veio a ficar conhecida como leishmaniose e o agente causador foi batizado de *Leishmania donovani*. Atualmente a leishmaniose é um conjunto de doenças causadas por mais de 17 espécies do gênero *Leishmania*, 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 é o que caracteriza os quadros de LV, LC e LMC, respectivamente.[1,2]

A LV quando não tratada pode causar a morte do paciente. As principais espécies causadoras da LV no velho mundo são *L. donovani*, *L. infantum* e *L. tropica*; no novo mundo a doença é associada as espécies *L. chagasi* e *L. amazonensis* [2]. A Organização Mundial de Saúde estima que 500.000 pessoas adquirem LV por ano, sendo que países com Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil contribuem com 90% dos casos [3].

A LC está associada as espécies *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. donovani* e *L. chagasi* no velho mundo e a *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. chagasi* e ao subgênero *Viannia* (*L. [V.] braziliensis*, *L. [V.] guyanensis* e *L. [V.] peruviana*) no novo mundo [2]. A doença se manifesta por lesões ulcerativas da derme que podem persistir por anos deixando cicatrizes mórbidas. A LMC está associada ao subgênero *Viannia* e na

maioria dos casos é resultante da disseminação do parasita, via corrente sanguínea ou linfática, de ulcerações da derme para os tecidos cartilagosos das vias respiratórias e das orelhas. A LC e LMC acometem um milhão e quinhentas mil pessoas a cada ano [3]; três vezes mais que a LV.

No Brasil, a LC e LMC são agrupadas em uma única doença denominada leishmaniose tegumentar americana (LTA) e foram registrados 388.155 casos entre os anos de 1985 a 1999 [4]. A LV tem apresentado mudança importante no padrão de transmissão, inicialmente restrita as 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 [5]. 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, esta situação vem se modificando e, no período de 2000 a 2002, foi registrado um aumento significativo de casos de LV detectados nos estados do Mato Grosso do Sul e Oeste de São Paulo (Fig.1).

Figura 1: Distribuição de casos de leishmaniose visceral segundo município no ano de 2002. (Figura adaptada do Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde [5]).

Durante o ciclo de vida dos protozoários do gênero *Leishmania*, o parasita pode ser isolado em duas formas morfológicamente distintas: a forma amastigota encontra no fagossoma de macrófagos do hospedeiro mamífero, com 2 a 4 µm de diâmetro e ausência de flagelos, e a forma promastigota encontrada no trato digestivo de mosquitos hematófagos dos gêneros *Phlebotomus* (no velho mundo) e *Lutzomyia* (no novo mundo), com o corpo oval de dimensões de 15 a 20 µm de comprimento por 2 a 4 µm de largura e com a presença de um flagelo anterior. A transmissão da leishmaniose entre mamíferos ocorre exclusivamente via contaminação sanguínea, sendo o mosquito infectado o principal vetor. Transfusão sanguínea e o compartilhamento de agulhas contaminadas são outras formas minoritárias de propagação da doença.

O primeiro passo durante a infecção é a fagocitose da forma promastigota pelos macrófagos. Os macrófagos têm como função a digestão do parasita e a apresentação de antígenos específicos que irão desencadear uma resposta imunológica. Durante a fagocitose, o fagossoma que envolve o parasita funde-se a lisosomas contendo enzimas proteolíticas originando o fagolisossoma. Durante esta fusão, o parasita é submetido a uma redução de pH (de aprox. 7 para 5) o que pode estar associado a mudança da forma promastigota para amastigota [6]. As formas amastigotas de *Leishmania* são adaptadas para viverem e se multiplicarem no ambiente hostil do interior dos vacúolos parasitofágicos (VP), denominação do fagolisossoma modificado pela presença do parasita [6]. Como a digestão proteolítica dos parasitas é comprometida, o macrófago deixa de funcionar como célula apresentadora de antígenos e passa a abrigar o parasita fornecendo

proteção contra o sistema imune e uma dieta rica em componentes de baixo peso molecular presentes nos vacúolos digestivos [7].

1.2 Vida de Leishmania: interações com o hospedeiro

Com base em revisões bibliográficas recentes, este tópico apresenta as estratégias do parasita para sobreviver no ambiente hostil do interior dos vacúolos digestivos das células de defesa do hospedeiro mamífero.

Todas as espécies de *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios. Durante a infecção, via saliva contaminada do mosquito vetor, a forma promastigota entra em contato com citocinas e imunoglobulinas (IgM e IgG) que ativam uma resposta do sistema imunológico do hospedeiro [8]. Esta resposta utiliza tanto a via alternativa (humoral) quanto a via clássica (celular) do sistema complemento, sendo o fator C3b o primeiro componente da cascata imunológica a interagir com o promastigota. O aumento de fosfolipoglicanas na membrana do parasita e a inativação do fator C3b (iC3b) pela glicoproteína *gp63* previnem a lise celular mediada pelo complexo de ataque a membrana (C5b-C9) da via alternativa do sistema complemento [9]. Além de bloquear a lise celular, o fator iC3b interage com os receptores CR3 e CR1 do macrófago induzindo a fagocitose do promastigota; seguindo pela via clássica do sistema complemento [10]. Durante o início da infecção, o parasita também é favorecido por peptídeos presentes na saliva do mosquito que interferem na via de produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos infectados [11].

Durante a fagocitose de um microorganismo, os macrófagos apresentam como resposta primária a ativação de vias oxidativas, acidificação do meio e liberação de enzimas proteolíticas pela fusão do fagossoma com lisossomas. As duas principais vias de

sinalização do macrófago que disparam sua resposta defensiva são mediadas pela proteína kinase C (PKC) e por tirosina kinases (PTKs). Estudos sugerem que fosfolipoglicanas de promastigotas interferem na fosforilação de proteínas mediadas pelas PKC, reduzindo o stress oxidativo [9,11]. A indução da síntese de óxido nítrico é outra importante via enzimática defensiva bloqueada por moléculas de fosfolipoglicosilinositol presentes na membrana do promastigota [11]. Além das estratégias defensivas próprias do macrófago, a *Leishmania* interfere ativamente no mecanismo de apresentação de antígenos e na ativação da resposta imunológica. O parasita é capaz de inibir a produção da interleucina 12 (IL-12), um potente estimulador da síntese de interferon- γ e da diferenciação de linfócitos auxiliares T1 (T_{H1}) [9].

À medida que avançam os estudos sobre os mecanismos que a *Leishmania* apresenta de evasão das defesas naturais do hospedeiro mamífero, mais complexa torna-se a possibilidade de uma estratégia racional para o desenvolvimento de uma vacina ou mesmo potencializadores do sistema imunológico, capazes de oferecer uma forma de controle da leishmaniose. Outro fator que dificulta o desenvolvimento de uma vacina eficaz é a variabilidade no tipo de interação parasita hospedeiro decorrente da diversidade interespecífica que o gênero *Leishmania* apresenta frente a resposta imunológica do hospedeiro humano [12].

1.3. Quimioterapia

Este tópico apresenta uma visão atualizada das drogas empregadas no tratamento da leishmaniose, aponta para a necessidade da descoberta de novas drogas e discute as barreiras econômicas para a pesquisa & desenvolvimento de novos fármacos em países subdesenvolvidos.

Os compostos derivados de antimoniais, introduzidos em 1945, formam a primeira linha no tratamento da leishmaniose e são utilizados atualmente contra LV e LC [13]. O estibogluconato de sódio (Pentostam™, GlaxoSmithKline) e o antimoniato n-metil glucamina (Glucantime®, Aventis) (Fig.2) são as duas formulações de antimoniais pentavalentes disponíveis no mercado. No Brasil o Glucantime® é distribuído pelo Ministério da Saúde em ampolas de 5 ml (contendo 405 mg) e a administração recomendada é de 2 a 4 ampolas por dia durante 20 a 40 dias. Estudos farmacocinéticos mostram uma rápida eliminação deste composto pelos rins, com vida média de aproximadamente 2 horas [5]. O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não foi esclarecido e a sua indicação tem sido comprometida pelo surgimento de cepas resistentes e pela variação na sensibilidade ao tratamento em função da diversidade de espécies associadas a doença [14]. As diaminas constituem outra classe de leishmanicidas introduzidas em 1952, mas que apresentam graves desvantagens quando comparas com os antimoniais. As diaminas apresentam uma toxicidade maior ao paciente, efeitos colaterais indesejáveis e períodos mais longos de tratamento. A principal formulação das diaminas atualmente utilizada é a pentamidina (Lomidine, SPECIA) (Fig2).

Figura 2: Principais drogas disponíveis para o tratamento da leishmaniose (Figura adaptada de Croft *et al*, 2003; [13]).

A segunda geração de drogas leishmanicidas é derivada de antibióticos poliênicos, sendo a Anfotericina B (Bristol-Myers Squibb) e sua formula associada a liposomas AmBisome® (Gilead) as drogas mais eficazes disponíveis atualmente. Ambas são eficazes contra formas amastigotas e promastigotas e atuam pela interação com esteróis do tipo ergosterol e episterol presentes na membrana plasmática do parasita [5,13]. A Anfotericina B é altamente tóxica para células do endotélio vascular, apresenta inúmeros efeitos colaterais - cefaléia, febre, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão - todos dose-dependentes e sua administração recomendada é intravenosa e lenta, prolongando-se por até 4 horas [5]. O AmBisome® tem uma toxicidade ao paciente menor do que a Anfotericina B, permanece por mais tempo no organismo, mas estas vantagens são embutidas no preço final do remédio [13].

Um significativo e recente avanço no tratamento da leishmaniose foi a descoberta em 1988 da ação leishmanicida do Miltefosine (Impavido®, Zentaris AG), uma hexadecilfosfatidilcolina desenvolvida originalmente como agente anticancerígeno. A principal vantagem desta droga é a administração oral e sua eficácia foi comprovada contra LV e LC. Em contrapartida, o Miltefosine apresenta ação teratogênica, o que limita sua administração a mulheres na idade de ter filhos [13].

A necessidade da descoberta de novas drogas contra a leishmaniose é reforçada pela diversidade de respostas e surgimento de cepas resistentes aos tratamentos atuais [14]. A diversidade de espécie e a complexidade das interações entre o parasita e o hospedeiro enfraquecem a crença na descoberta de uma única droga eficaz ao tratamento da leishmaniose. A utilização conjunta de compostos que estimulem o sistema imune contra o

parasita é uma alternativa que vem apresentando bons resultados no tratamento da leishmaniose. O Imiquimod (uma quilonila imidazólica) é um potente imuno estimulante presente no creme genital Aladara™ (3M Pharmaceuticals) que induz a produção de óxido nítrico em macrófagos infectados [13].

A avanço das pesquisas nas áreas da genética e bioquímica de parasitas tem favorecido uma abordagem racional para a identificação de vias metabólicas vitais ao parasita. Baseado nas diferenças metabólicas entre mamíferos e protozoários, a descoberta de drogas contra leishmaniose - e outras doenças tropicais como a malária, doença de chagas , esquistossomose - deveria ser consideravelmente mais fácil do que o desenvolvimento de drogas contra o câncer, hipertensão, diabetes e outras disfunções genéticas. Apesar disto, menos de 1 % dos 1223 novos medicamentos lançados no mercado entre 1975 e 1997 são destinados a doenças tropicais. Dados de 1999 indicam que a industria farmacêutica arrecadou 337 bilhões de dólares com a venda de remédios [15]. Deste total arrecadado, 82,4% correspondem aos mercados europeu, norte americano e japonês. Considerando uma população mundial em torno de 6 bilhões de pessoas (em 1997), estes três mercados correspondem a menos de 20% da população mundial (Fig.3).

Figura 3: Mercado mundial de fármacos em 1999 (adaptada de Trouiller *et al*, 2001; [15]).

As indústrias farmacêuticas justificam o desinteresse em direcionar investimentos para pesquisa e desenvolvimento de drogas contra doenças tropicais com o argumento de que o custo para produção de fármacos contra este tipo de doença é um investimento de risco. O receio das indústrias farmacêuticas baseia-se na falta de respeito às leis de patentes e a dificuldade da população de comprar tais medicamentos, tendo em vista que as pessoas acometidas por doenças tropicais geralmente vivem em áreas de pobreza endêmica. Devido a este tipo de discriminação, as doenças tropicais receberam o título de doenças negligenciadas [15]. Apesar do quadro pessimista, a aproximação recente entre a Organização Mundial de Saúde, o Banco Mundial e indústrias farmacêuticas aumenta a esperança de que o custo para o desenvolvimento de drogas contra doenças tropicais possa ser reduzido. Este tipo de associação é também do interesse de pesquisadores acadêmicos uma vez que pode vir a aumentar a disponibilidade de recursos para a pesquisa básica nas áreas de genética, bioquímica e biologia molecular de parasitas [16].

1.4. Potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas contra leishmanias e trypanosomas.

Este tópico apresenta algumas das principais vias metabólicas consideradas alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas e enfatiza a importância do metabolismo energético em trypanosomatídeos.

Juntamente com a *Leishmania* spp, o *Trypanosoma brucei* e o *T. cruzi* são outros importantes protozoários parasitas humanos, transmitidos por insetos hematófagos e causadores da doença do sono e doença de Chagas, respectivamente. O *T. brucei* tem sido utilizado como principal modelo de trypanosomatídeo em estudos de identificação e validação de potenciais alvos metabólicos para o desenvolvimento de novas drogas.

Trypanosoma e *Leishmania* são dois gêneros agrupados na família Trypanosomatidea, ordem Kinetoplastida, caracterizados pela presença de um fragmento de DNA citoplasmático com estrutura complexa denominado cinetoplasto, mecanismos especiais de editoração de RNA mitocondrial, transcrição de genes nucleares em longos fragmentos multicistrônicos e compartimentalização de parte do metabolismo energético em organelas tipo peroxissomas, denominadas glicosomas [revisão mais detalhada dos kinetoplastideos na ref.17].

A primeira etapa na pesquisa e desenvolvimento de novas drogas antiprotozoários é a identificação de enzimas essenciais para a sobrevivência ou desenvolvimento dos parasitas. A disponibilidade de seqüências gênicas obtidas pelos projetos genomas de parasitas permite a identificação de enzimas e vias metabólicas exclusivas dos parasitas ou bioquimicamente diferentes das de humanos [lista de site dos principais projetos genomas na ref.18]. A comparação bioquímica é a primeira evidência para incluir uma via metabólica e suas enzimas na lista de possíveis alvos de drogas antiprotozoários. Alguns exemplos de possíveis alvos identificados pela análise comparativa do metabolismo de trypanosomatideos incluem (1) a via glicolítica e via das pentoses, ambas apresentam os primeiros passos de reação compartimentalizados no glicosoma, uma organela exclusiva dos parasitas; (2) o metabolismo do composto N^1 - N^8 -bisglutathionil espermidina (ou tripanotiona) pela enzima tripanotiona redutase, o composto e enzima análogos em mamíferos são a glutathionina e a glutathionina redutase; e (3) metabolismo de folato pela enzima bifuncional dihidrofolato redutase-timidilato sintase que em mamíferos as funções

redutase e sintase estão associadas a cadeias polipeptídicas separadas [lista completa de vias promissoras nas ref.13,18].

A etapa seguinte à identificação das vias promissoras é a validação genética ou bioquímica das enzimas alvos. As duas principais ferramentas genéticas para validação de possíveis alvos são o silenciamento gênico (*gene knockout*) e mais recentemente o RNA de interferência (interference RNA, iRNA) [19]. Ambas as técnicas visam a anulação por silenciamento ou a redução por interferência dos níveis de expressão gênica [18]. A validação bioquímica requer o uso de compostos químicos que interagem de maneira específica e seletiva bloqueando ou diminuindo a atividade das enzimas alvos. Esta é uma abordagem mais complexa pois requer métodos experimentais para garantir a especificidade e seletividade *in vivo* dos compostos utilizados [18]. Somente após as etapas de identificação e validação é que se recomenda um maior investimento na busca de compostos líderes que atuem de maneira eficaz e seletiva no bloqueio da enzima alvo.

A glicólise é uma importante, e em alguns casos, a única via metabólica utilizadas pelos tripamosomatídeos para a obtenção de ATP. As primeiras sete enzimas da glicólise estão compartimentalizadas no interior do glicosoma [20]. Uma consequência desta compartimentalização é que as enzimas glicolíticas dos kinetoplastídeos diferem em características cinéticas e estruturais quando comparadas com as enzimas homólogas de mamíferos e o fluxo metabólico da via é regulado de forma distinta [20,21]. Não apenas a glicólise é localizada no interior dos glicosomas, mas também uma parte significativa da via das pentoses (Fig.4), que utiliza intermediários da glicólise para formação de D-ribose-

5-fosfato e NADPH, utilizados em processos de biosíntese de nucleotídeos e defesa contra stress oxidativo [22 e 23].

Figura 4: Esquema representativo da glicólise e da via das pentoses em tripanosomatídeos. A enzima glicose-6-fosfato isomerase está indicada em vermelho. A via das pentoses fornece o agente redutor NADPH e a D-ribose-5-fosfato, importantes no combate de agentes oxidantes e na biosíntese de ácidos nucleicos (Figura adaptada de Hannaert *et al*, 2003; [17])

Outra família de proteínas fundamental para a sobrevivência dos tripanosomatídeos é responsável pelo endereçamento das proteínas para o interior do glicosoma. O primeiro passo para a importação de uma proteína nascente para o interior do glicosoma é o reconhecimento de um peptídeo sinal localizado no C-terminal (*peroxisomal target sequence* - PTS-1) ou no N-terminal (PTS-2) da proteína a ser importada. PTS-1 é um tripeptídeo Ser-Lys-Leu, enquanto o PTS-2 é um nonapeptídeo, geralmente separado por 20 resíduos de aminoácido do início da cadeia, com uma sequência consenso -(Arg ou Lys)₁-(Leu, Val ou Ile)₂- (X)_{3 a 7} -(His ou Gln)₈- (Leu, Ala ou Fen)₉ , onde X representa

qualquer aminoácido [24]. O segundo passo é a interação da proteína nascente associadas as proteínas PEX5 ou PEX7 (com seqüências PTS1 ou PTS2, respectivamente) com um complexo de proteínas de membrana constituídos pelas PEX13, PEX14 e PEX17, localizadas na membrana do glicosoma. Como ocorre a translocação da proteína nascente ainda não está claro, mas experimentos de RNAi direcionados a PEX14 de *T. brucei* bloquearam a translocação de proteínas com sinais PTS1 e PTS2 concomitantemente [25]. Tanto a forma encontrada na corrente sanguínea, quanto a forma procíclica se mostraram inviáveis devido a ineficiência do sistema de transporte de proteínas para o interior do glicosoma.

Além da via glicolítica e da via das pentoses, outras importantes vias metabólicas - via de salvação de purinas e pirimidinas, síntese e degradação de ácidos graxos e biosíntese de isoprenoides - apresentam algumas de suas enzimas compartimentalizadas no interior dos glicosomas [26, 27]. A membrana do glicosoma funciona como uma barreira aos intermediários e produtos destas reações, criando um ambiente químico distinto do citosólico. Transportadores de membrana para substratos e produtos destas vias são postulados com base em análises de fluxo [28,29], mas ainda precisam ser identificados, isolados e caracterizados. A presença majoritária da via glicolítica no ambiente químico peculiar do glicosoma é o principal argumento bioquímico que justifica o estudo mais detalhado destas enzimas como potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas anti-trypanosomatídeos [30].

1.5. Glicose-6-fosfato isomerase

Este tópico apresenta a enzima glicose-6-fosfato isomerase, discute seu papel no metabolismo energético de tripanosomatídeos e apresenta evidências genéticas que validam seu potencial como possível alvo para o desenvolvimento de novas drogas. Aspectos estruturais e a comparação com a enzima homóloga em humanos serão apresentados na seção de resultados e discussão.

Glicose-6-fosfato isomerase (E.C. 5.3.1.9) - também conhecida como fosfoglicose isomerase (PGI) - é uma enzima intracelular que cataliza a reação reversível entre a D-glicose-6-fosfato e a D-frutose-6-fosfato. Esta reação de isomerização é uma etapa comum a via glicolítica, gliconeogênica e a via das pentoses (Fig.4).

Em promastigotas de *L. mexicana*, 90% da atividade da PGI está localizada no citosol e o restante, menos de 10%, está associada aos glicosomas. Apesar desta dupla localização, apenas uma cópia do gene correspondente a PGI foi identificada e a atividade citosólica e glicosomal são bastante similares, descartando assim a possibilidade de se tratar de isoenzimas com diferentes localizações. A presença de enzimas glicolíticas tanto no citosol quanto no glicosoma varia entre diferentes espécies de tripanosomatídeos e pode ser detectada para a maioria das enzimas desta via [31]. A PGI de *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. mexicana* apresentam menos de 50% de identidade com outras PGI's de mamíferos e todas as três apresentam um fragmento N-terminal de aproximadamente 50 aminoácidos que não apresenta identidade significativa com nenhuma outra sequência (ou fragmento) pesquisados em bancos de dados públicos [mais detalhes na seção de resultados e discussão]. A função deste fragmento é desconhecida e a hipótese que esteja envolvido na sinalização para o transporte pela membrana do glicosoma ainda precisa ser avaliada. Os resíduos catalíticos descritos nas estruturas da PGI de coelho [32], de porco [33], humana

[34] e de *Bacillus stearothermophilus* [35] são conservados nas seqüências de *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. mexicana*. Apesar da conservação dos resíduos catalíticos, diferenças nos parâmetros cinéticos entre a PGI de *L. mexicana* e a PGI humana foram observadas em condições experimentais idênticas [mais detalhes em resultados e discussão]. Portanto, é necessária uma análise estrutural mais detalha das PGIs de parasitas e humanos para que se possa avaliar o seu potencial como alvo quimio-terapêutico.

Do ponto de vista genético, experimentos de RNAi revelaram que a diminuição do nível de PGI na forma sanguínea de *T. brucei* resulta na inibição de crescimento de até 50% [36,37] no primeiro dia e volta a normalidade daí em diante. Essa recuperação do fenótipo após os primeiros ciclos é um efeito comum na forma sanguínea do *T. brucei*.

Figura 5: Representação gráfica do desenvolvimento de culturas da forma sanguínea de *T. brucei* (Figura adaptada do site <http://www.trypanofan.org> [37])

O resultado dos experimentos de RNAi em *T. brucei*, juntamente com as evidências bioquímicas, contribuem para a validação da PGI com potencial alvo para o desenho de drogas anti-tripanosomatídeos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Alinhamento de seqüências de PGI's

As seqüências da PGIs de *L. mexicana* (P42861) [31], *T. brucei* (P13377) [38] e *T. cruzi* (O61113) [39] foram obtidas no banco de dados do Swiss-Prot/TrEMBL (<http://us.expasy.org/sprot/>), e as de coelho [32], humana [34] e de *B. stearothermophilus* [35] foram extraídas das estruturas depositadas no Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). As seqüências foram alinhadas com o programa CLUSTAL W [40] e ajustes manuais foram feitos considerando as informações estruturais derivadas das estruturas disponíveis. Os resíduos funcionais foram identificados seguindo o mecanismo catalítico descrito para a PGI de coelho [41-43].

2.2. Sub clonagem, expressão e purificação das PGI-Lm e dPGI-Lm.

O gene da pgi de *L. mexicana* (PGI-Lm), clonado no plasmídeo pBSIIKS(+) (Stratagene) [31], foi gentilmente cedido pelo Prof. Paul Michels da Unidade de Pesquisa em Doenças tropicais, Instituto de Patologia Celular Christian Duve, Univ. Católica de Louvain Bruxelas, Bélgica. Foram encomendados três oligonucleotídeos distintos para a amplificação de dois fragmentos do gene pgi-lm, com tamanhos diferentes e introdução de sítios *NcoI* e *HindIII* nas extremidades 3' e 5' respectivamente (Fig.6). A primeira reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizou os óligos 1 e 3 para amplificar um fragmento correspondente a cadeia polipeptídica completa da PGI-Lm. No segundo PCR utilizou-se

os óligos 2 e 3 para a amplificação de um fragmento incompleto, correspondente a cadeia polipeptídica da PGI-Lm sem os primeiros 48 aminoácidos (dPGI-Lm).

Figura 6: Oligonucleotídeos utilizados para a introdução de sítios *NcoI* e *HindIII* nas extremidades 3' e 5' do gene da PGI-Lm. A reação de amplificação PCR com os oligos 1 e 3, e 2 e 3, resultaram no gene completo (PGI-Lm) e no fragmento com uma deleção de 144 pb na extremidade 3' (dPGI-Lm).

Ambos os PCRs continham aproximadamente 2 pmol de cada óligo, 50 ng do pBSIIKS(+)/PGI-Lm e 2,5 U da AmpliTaq DNA polimerase (Promega). As reações foram realizadas em um termociclador GeneAmp 2400 (Perkin-Elmer). Cada mistura de reação foi submetida a 2 min de denaturação a 94 °C e em seguida a 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 54 °C e 3 min 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 1% com brometo de etídeo. Para a primeira e segunda reação, uma banda de aproximadamente 1,6 e 1,8 Kb respectivamente, foram purificadas do gel com o *Kit* de purificação CONCERT DNA (GIBCO-BRL). Cada fragmento purificado foi digerido com as enzimas *NcoI* e *HindIII* a 37 °C por 2 horas e introduzidos por uma reação de ligação - com a enzima T4DNA ligase - no plasmídeo pET28a(+) previamente linearizado com as mesmas enzimas de restrição.

Cada construção foi utilizada para transformar, por choque térmico, células competentes de *E. coli* BL21 (DE3).

Colônias transformadas com os dois genes distintos, *pgi-lm* e *dpgi-lm*, foram crescidas em 5 mL de meio LB com 100 µg/mL de canamicina, a 37 °C durante 18 horas. Estas culturas foram utilizadas para inocular 500 mL de meio 2xYT com 100 µg/mL de canamicina e incubadas a 37 °C , 250 rpm . Ao atingirem uma $O.D_{600\text{ nm}} = 0,6$; foi adicionado 0.5 mM de isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) a cada cultura e a indução foi mantida por mais 4 horas nas condições previamente descritas.

Após a indução, as células foram centrifugadas a 6000g/20min/4 °C, resuspensas em 5 mL de tampão A (50 mM HEPES, pH 7,5) e a lise foi realizada pela adição de lisozima (0,5 mg/mL) seguida de repetidos ciclos de congelamento em N₂(l) e descongelamento a 42 °C. Após centrifugação a 10000g/20min/4 °C, os restos da lise celular foram descartados, o sobrenadante (proteína total solúvel) foi transferido para um béquer e foi adicionado sulfato de amônia para um concentração de 40 e 50 % (w/v) para as soluções contendo dPGI-Lm e PGI-Lm, respectivamente. As soluções foram submetidas a leve agitação a 4 °C por 30 min. Após este período, as soluções foram centrifugadas a 20000g/20min/4 °C; o *pellet* foi descartado e o sobrenadante, contendo a dPGI-Lm e PGI-Lm, foi transferido para um novo béquer. As soluções foram levadas a concentração de 70 % (w/v) de sulfato de amônia, deixadas a 4 °C com leve agitação por mais 30 min e em seguidas centrifugadas novamente a 20000g/20min/4°C. Desta vez, o sobrenadante foi descartado e cada *pellet* foi resuspenso em 5 mL de tampão A, seguindo dois ciclos de diálise em 250 mL do mesmo tampão para retirar o excesso de sulfato de amônia.

A etapa seguinte de purificação foi realizada em uma coluna de troca iônica Q-sepharose HP (10 mL; PHARMACIA) equilibrada com tampão A e em seguida carregada com a solução de proteína. A separação das frações de proteína (2 mL cada) que permaneceram ligadas à coluna foi realizada por gradiente isocrático de 100 mL com tampão B (mesmo tampão A com 0,5 M NaCl). As frações correspondentes a PGI-Lm e dPGI-Lm foram coletadas durante o gradiente e submetidas, separadamente, a uma cromatografia de exclusão por tamanho em coluna Superdex 200 (115 mL; PHARMACIA) equilibrada com tampão 25 mM HEPES, pH = 7,5 e 0,15 mM NaCl. O fluxo durante a separação foi de 1 mL/min e as frações coletadas de 2 mL cada. Todas as etapas de purificação foram monitoradas por SDS-PAGE (15%). A concentração da PGI-Lm e dPGI-Lm foram realizadas por filtração em concentradores Centriprep30 e Centricon10 (Millipore) e seus valores foram medidos pelo coeficiente de extinção molar medido a 280 nm em um espectrofotômetro convencional. O ponto isoelétrico (pI) foi determinado por focalização isoelétrica em pH 3 até 9 (PHASt system, Pharmacia).

2.3. Caracterização cinética.

O ensaio enzimático para a PGI é realizado pelo monitoramento da formação de NADPH a 340nm resultante da conversão de glicose-6-fosfato a δ -gluconolactona catalizada pela presença em excesso da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (fig. 7).

Figura 7: Ensaio enzimático para a atividade da PGI.

Os valores de K_m e V_{max} foram determinados para a frutose-6-fosfato a temperatura ambiente (25 °C) em 100 mM de tampão trietanolamina, pH = 7,6; durante 1 minuto de reação [44]. O coeficiente de extinção molar do NADPH é 6,22 UA.mM⁻¹ e a unidade de atividade da PGI é definida pela concentração em µM de NADPH formado durante 1 minuto de reação.

Quatro inibidores análogos ao intermediário de reação foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Laurent Salmon, do Lab. de Química Biorgânica e Bioinorgânica da Universidade de Paris-XI, para serem testados contra a PGI de *Leishmania* (fig. 8).

Figura 8: Inibidores testados contra a PGI. D-arabinoato-5-fosfato (5 PAA), D-arabinohidroxiazida-5-fosfato (5 PAHz), D-arabinoamida-5-fosfato (5 PAAm) e D-arabinohidroximato-5-fosfato (5 PAH).

As medidas de IC₅₀ foram realizadas variando-se a concentração de cada inibidor durante uma reação padrão com 800 µM de frutose-6fosfato.

2.4. Cristalização, coleta de dados de difração de raios-X, determinação, refinamento e análise das estruturas.

Para a realização dos ensaios de cristalização foi utilizado o método de difusão de vapor com gota dependurada, em placas de 24 poços. Cada poço recebeu 0,5 mL da solução de cristalização e cada gota dependurada continha 3 µL de solução de proteína misturas a 3 µl da solução do poço. As soluções de PGI-Lm e dPGI-Lm continham 5 mg/mL de proteína em tampão 6,25 mM de HEPES, 37,5 mM NaCl e pH = 7,5. As soluções de cristalização (HAMPTON) testadas inicialmente foram: Fatoriais I e II, Fatorial Sulfato de Amônia, Fat. PEG6K, Fat. MPD e Fat. de membrana. Após essa varredura inicial, as condições que apresentavam indícios de cristalização foram refinadas usando soluções preparas no laboratório.

Ao todo foram coletados e processados três diferentes conjuntos de dados de difração de raios-X. O primeiro conjunto, obtido de cristais da forma dPGI-Lm , foi coletado na linha de cristalografia de proteínas (CPr03) do Lab. Nacional de Luz Síncrotron, Campinas-SP; o segundo conjunto, obtido de cristais da forma PGI-Lm, foi coletado no Lab. de Cristalografia de Proteínas do Inst. de Física de São Carlos (São Carlos-SP) e o terceiro conjunto, obtido de cristais dPGI-Lm submetidos a "*soaking*" com F6P, foi coletado na linha X25 do Lab. Brookhaven (Upton-NY). Mais detalhes sobre as coletas de dados estão apresentados na tabela I.

Tabela I: Detalhes sobre os três conjuntos de dados de difração de raios-X coletados para diferentes cristais da PGI de *L. mexicana*. Todos os conjuntos foram obtidos pelo método de oscilação.

Conjunto	dPGI-Lm	PGI-Lm	dPGI-Lm/F6P
Fonte de raios-X	Síncrotron (CPr03, LNLS)	Anodo rotatório (RIGAKU)	Síncrotron (X25, brookhaven)
Comprimento de onda (λ) (Å)	1,5450	1,5418	1,1
Detector	MARccd	MAR345	ADSC Q315
Número de imagens	240	228	140
Oscilação por imagem (total)	0,75° (180 °)	0,75° (171°)	0,75 ° (105°)
Distância entre o cristal e o detetor	170 mm	250 mm	325 mm
Indexação e intergração	MOSFLM [45] e SCALA [46]	DENZO e SCALEPACK [47]	MOSFLM e SCALA

Todos os conjuntos foram obtidos com os cristais montados em *loops* de nylon (HAMPTON) e submetidos a fluxo contínuo de N₂ (g), durante a coleta. Para evitar a formação de gelo, os cristais foram imersos em solução crio-protetora constituída da mesma solução de cristalização adicionada de 17,5 % metil 2,4-pentenodiol (MPD).

As fases iniciais foram obtidas por substituição molecular, implementada no programa AMoRe [48], utilizando o conjunto dados coletado no LNLS e um modelo da própria dPGI-Lm construído por homologia com a PGI-humana através da ferramenta SWISS-MODEL [49]. O refinamento das estruturas foi realizado com as rotinas de refinamento de corpo rígido, recozimento simulado (*simmmulated annealing*) e adição de águas do programa CNS [50]. Intervenções "manuais" nos modelos foram realizadas pela inspeção de mapas tipo $2\sigma_A|F_o|-D|F_c|$ e $m|F_o|-D|F_c|$ visualizados pelo programa *O* [51]. Os refinamentos de ambas as estruturas foram finalizadas com ciclos de refinamento dos

parâmetros TLS implementado no programa REFMAC5 [46]. A análise das coordenadas e dos fatores de estrutura foi realizada pelo programa PROCHECK [52] e SFCHECK [53] durante o envio dos dados ao Protein Data Bank.

2.5. Comparação com a PGI-humana.

A determinação da estrutura cristalográfica da PGI-humana foi tema central da dissertação de mestrado. Este trabalho resultou em uma nota de cristalização [54] e um artigo descrevendo a estrutura e o mecanismo catalítico (anexoI) [34] publicado durante do programa de doutorado. A estrutura da PGI-humana, depositada no PDB com o código 1JLH, e as estruturas da PGI-Lm e dPGI-Lm/F6P foram utilizadas na análise de diferenças estruturais. A sobreposição das estruturas e cálculos de desvios das coordenadas atômicas foram realizadas com o program SWISS-PDBviewer [49]. O programa GRASP [55] e PYMOL [56] foram utilizados para cálculos de superfícies potenciais e preparo de figuras das estruturas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Alinhamento de seqüências de PGI's

A busca de seqüências homólogas a PGI-Lm na base de dados Swiss-Prot/TrEMBL não identificou nenhum fragmento com identidade maior do que 25% para os primeiros 45 aminoácidos da região N-terminal, exceto para as PGIs de *T. brucei* e *T. cruzi* (Fig.9).

Figura 9: Representação esquemática do alinhamento das seqüências de PGI dos organismos *L. mexicana* (L.mexi), *T. cruzi* (T.cruz), *T. brucei* (T.bruc), *H. sapiens* (Human), *Oryctolagus cuniculus* (rabbit) e *B. stearothermophilus* (B.stea). Os resíduos conservados e aqueles envolvidos no mecanismo catalítico estão identificados abaixo das seqüências nas linhas "cons." e "Funct.", respectivamente. A região N-terminal está representada no boxe A, enquanto as regiões com resíduos funcionais encontram-se nos boxes B a G.

A região N-terminal das PGI de kinetoplastideos apresenta um padrão de sequência do tipo - (Phe 30) - (Asn 31) - x - (Pro 33) - x - (Glu 35) - x₂ - (Arg 38) - para o qual não existe função associada, mas que chama a atenção pela proximidade dos resíduos conservados. Os resíduos envolvidos na coordenação do grupo fosfato do substrato estão localizados exclusivamente nos boxes B e C [41] (Fig. 9). A arginina do boxe D é responsável por ancorar o inibidor 6-fosfo-D-gluconato complexado a PGI de coelho [32]. Na presença do substrato, a arginina estabiliza uma carga transiente associada ao ácido glutâmico do boxe E durante o passo de isomerização entre F6P e G6P [41]. A histidina do boxe F e a lisina do boxe G participam da linearização do substrato logo após sua coordenação no sítio ativo [41]. A localização dos resíduos catalíticos em posições idênticas entre as PGI analisadas indica uma alta conservação do sítio ativo e por conseguinte do mecanismo de reação. Apesar disto, resíduos próximos ao sítio catalítico ou na interface dimérica podem desempenhar um importante papel para a estabilidade e atividade da enzima. Portanto, uma comparação detalhada entre as estruturas das PGIs de mamíferos e dos kinetoplastideos é fundamental para o emprego desta enzima como um alvo potencial para o desenho de novas drogas.

3.2. Sub clonagem, expressão e purificação das PGI-Lm e dPGI-Lm.

Após as transformações de células competentes de *E. coli* BL21(DE3) e plaqueamento em meio LB sólido, foi observado o crescimento de 12 colônias referentes a transformação com o vetor pET28a(+)/ PGI-Lm , 5 colônias referentes a transformação com o vetor pET28a(+)/dPGI-Lm e nenhuma colônia nas reações de controle negativo. A

extração dos vetores e digestão com as enzimas *NcoI* e *HindIII* confirmou a presença dos insertos referente aos fragmentos *pgi-lm* e *dpgi-lm* (Fig.10).

Figura 10: gel de agarose 1% com o produto da digestão de clones PGI-Lm e dPGI-Lm obtidos após transformação em *E. coli* BL21(DE3). Da esquerda para direita: M, marcador de peso molecular; 1, clone PGI-Lm; 2, clone PGI-Lm digerido por *NcoI* e *HindIII*; 3, clone dPGI-Lm e 4, clone dPGI-Lm digerido por *NcoI* e *HindIII*.

Ambos os clones, PGI-lm e dPGI-lm, quando não digeridos migram no gel com diferentes bandas devido ao fato de não estarem linearizados (poços 1 e 3; Fig.10). Após a clivagem pelas enzimas *NcoI* e *HindIII*, pode-se distinguir uma banda de alto peso (5,5 Kb) comum a ambos os clones que corresponde ao vetor pET28a e uma banda correspondente ao inserto; sendo o fragmento PGI-lm um pouco maior que o dPGI-lm, ambas entre 2 e 1,6 Kb.

O vetor pET28a apresenta uma região operadora *lac*, um promotor específico para a T7 RNA polimerase do bacteriófago λ e um gene de resistência a canamicina. Com essa construção, este vetor necessita que a bactéria produza a T7 RNA polimerase do bacteriófago λ para que possa ocorrer a transcrição dos genes associados ao seu operador *lac*. Um teste rápido de expressão da PGI-Lm e dPGI-Lm, induzido com 1 mM de IPTG

durante 4 horas, confirmou a expressão heteróloga das duas formas da PGI-Lm nas colônias isoladas (Fig.11).

Figura 11: SDS-PAGE, método Laemmli em gel 15%. M, marcador de peso molecular; 1, PGI-Lm antes da adição de IPTG; 2, dPGI-Lm antes da adição de IPTG; 3, PGI-Lm após 4 h de indução e 4, dPGI-Lm após 4 h de indução. As bandas de expressão das duas construções aparecem entre 45 e 66 KDa.

Ambas as construções expressaram proteínas recombinantes com o peso molecular esperado para a PGI-Lm e dPGI-Lm. A lise celular por congelamento e descongelamento não afetou a solubilidade das proteínas recombinantes e ambas foram recuperadas nas frações solúveis após o processo de lise.

As principais características observadas com relação à remoção do N-terminal da PGI-Lm é que a forma dPGI-Lm apresenta uma menor solubilidade ao sulfato de amônia, seu ponto isoelétrico é mais básico e apresenta a tendência de agregar-se quando em concentrações acima de 1 mg/ml.

A dPGI-Lm precipita com concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ superior a 40%, enquanto a PGI-Lm precipita acima de 50%. No gel de focalização isoelétrica (pH entre 3 e 9) podem ser observadas duas bandas para a dPGI-Lm e até 5 bandas para a PGI-Lm (Fig. 12b). No

entanto, como a amostra aplicada no gel de focalização isoeletrica provinha de uma cromatografia de exclusão por tamanho e sua pureza foi comprovada em SDS-PAGE (Fig. 12a), então esse padrão de várias bandas pode estar relacionado com a presença de populações com diferentes distribuições de cargas na superfície. Na média podem ser atribuídos valores de 5,5 e 6,3 para a PGI-Lm e dPGI-Lm, respectivamente.

Figura 12: (A) Acompanhamento das etapas de purificação da PGI-Lm e dPGI-Lm. Nos poços: M, marcador de peso molecular; 1, solução de proteína obtida após a precipitação por (NH₄)₂SO₄; 2, solução de proteína após a troca iônica e 3, proteína pura obtida após a cromatografia por exclusão de tamanho. (B) focalização isoeletrica em pH 3 até 9. M, marcadores de pI; 1, dPGI-Lm e 2, PGI-Lm..

Outra característica observada devido a retirada da porção N-terminal é a tendência de precipitar durante o processo de concentração rápida, utilizando sistemas de membrana associados a centrifugação (CENTRICON 10). A PGI-Lm mostrou-se mais solúvel durante a concentração de 10x até uma solução 8,2 mg/mL. Já a dPGI-Lm começa a formar precipitado em concentrações de 1 mg/mL, ao atingir esta concentração a proteína forma agregados que bloqueiam os poros do CENTRICON 10. Apesar da perda de proteína devido a necessidade de descartar a fração precipitada, a dPGI-Lm pode ser concentrada

até 5 mg/mL. Apesar das diferenças observadas entre a PGI-Lm e a dPGI-Lm durante as etapas de purificação e concentração, ambas as formas apresentam a mesma atividade específica (~ 450 U/mg).

3.3. Caracterização cinética e ensaio de inibidores.

Um dos propósitos de se obter a PGI-Lm é poder medir sua atividade nas mesmas condições da PGI-humana e comparar os valores de K_m e V_{max} das duas enzimas. A PGI-humana, usada nesta análise comparativa, também foi expressa em *E. coli*, purificada por precipitação com sulfato de amônia e duas etapas posteriores de cromatografia líquida [54]. Anterior aos ensaios de IC_{50} , foram repetidas as curvas de K_m e V_{max} para a a PGI-humana e PGI-Lm (Fig.13).

Figura 13: Gráfico da relação entre [F6P] e a velocidade de reação (A). Gráfico de Lineweaver-Burk (B).

A PGI-humana apresentou valores de K_m igual a 99 μM e V_{max} igual a 21 $\mu M \cdot min^{-1}$, enquanto a PGI-Lm apresentou valores mais elevados para os dois parâmetros, com K_m igual a 242 μM e V_{max} igual a 80 $\mu M \cdot min^{-1}$. Essa diferença pode ter sido

influenciada pelo pH no qual as medidas foram realizadas (pH = 7,6). Sabe-se que o pH ótimo da PGI-humana está próximo ao fisiológico [54], enquanto o da PGI-Lm é um pouco mais básico, variando entre o pH 8 e 9 [31].

A partir da curva de velocidade por concentração de substrato foi escolhida uma concentração de 800 μM de Frutose para ser utilizada nos ensaios de IC_{50} . As medidas de IC_{50} para PGI-hum, foram realizadas com os inibidores 5PAA e 5PAH nas concentrações de 500, 250, 100, 50 e 10 μM . Os inibidores 5PAAm e 5PAHz foram testados nas concentrações de 3000, 1500, 1000, 500 e 100 μM . (Fig.14).

Figura 14: gráfico da atividade da PGI-humana na presença de concentrações variadas de cada inibidor. O retângulo em vermelho está ampliado à direita.

As medidas de IC_{50} para PGI-Lm, foram realizadas com os inibidores 5PAA e 5PAH nas concentrações de 500, 250, 100, 25 e 10 μM . Os inibidores 5PAAm e 5PAHz foram testados nas concentrações de 2000, 1000, 500 e 100 μM (Fig. 15).

Figura 15: gráfico da atividade da PGI-Lm na presença de concentrações variadas de cada inibidor. O retângulo em vermelho está ampliado à direita.

Tanto para a PGI-hum quanto para a PGI-Lm os melhores inibidores são: D-arabinoato-5-fosfato (5PAA) e D-arabinohidroximato-5-fosfato (5PAH). Estes inibidores apresentam IC₅₀ abaixo de 50 µM para ambas as enzimas (tabela II).

Tabela II: IC₅₀ dos inibidores D-arabinoato-5-fosfato (5PAA), D-arabinohidroxiazida-5-fosfato (5PAHz), D-arabinoamida-5-fosfato (5PAAm) e D-arabinohidroximato-5-fosfato (5PAH) contra as enzimas PGI-hum e PGI-Lm.

<i>Inibidor</i>	IC50 (µM)	
	<i>PGI-Humana</i>	<i>PGI-Lm</i>
5PAH	16	50
5PAA	30	30
5PAAm	150	300
5PAHz	360	440

Os resultados de inibição realizados com PGI de outros organismos [57] e os valores de IC₅₀ medidos para a PGI-humana e PGI-Lm indicam que os compostos 5PAA e 5PAH comportam-se como análogos ao intermediário da reação de isomerização. A conservação dos resíduos catalíticos e ausência de seletividade medida para os inibidores 5PAA e 5PAH sugerem que os sítios catalíticos da PGI-Lm e PGI-humana sejam bastante similares.

3.4. Cristalização, coleta de dados de difração de raios-X, determinação e refinamento das estruturas.

3.4.1 Primeiro conjunto de dados (coletado no LNLS-Campinas)

Foram realizadas diversas tentativas de cristalização utilizando os fatores da Hampton disponíveis no laboratório. As condições testadas que resultaram na formação de estruturas cristalinas foram refinadas a partir do preparo de soluções semelhantes, mas que apresentavam pequenas variações nas condições de pH, concentração de agente precipitante, presença de aditivos e da própria concentração da proteína na gota de cristalização. Ao final do refinamento das condições de cristalização, obtiveram-se bons cristais para as duas construções da PGI-Lm. Os cristais apresentavam formas regulares, faces planas, capacidade de polarizar a luz incidente e tamanho adequado para caracterização por difração de raios-X. Ao final da busca pela melhor condição para cristalização, chegou-se as seguintes conclusões:

1. Ambas as proteínas cristalizam em condições similares.
2. As melhores condições para cristalização apresentam-se na faixa de pH entre 7,5 e 9,0 e concentração de agente precipitante PEG 6K entre 5 e 10 %. Condições com pH abaixo de 7,0 tendem a precipitar as proteínas e concentrações de PEG 6K acima de 12 % resultam em cristais alongados, visivelmente com problemas de crescimento (Fig.16).
3. Os cristais de dPGI-Lm e PGI-Lm são semelhantes a uma bi-pirâmide de base hexagonal, podendo chegar a dimensões de 0,3 x 0,3 x 1,0 mm .

Figura 16: Cristais da dPGI-Lm crescidos em pH 9,0 (Bicina 100 mM) e diferentes concentrações de PEG 6K 10% (A), 12,5% (B), 15 % (C) e 8% (D). Em concentrações abaixo de 10 % de PEG 6K é comum observar cristais únicos em uma gota

Os primeiros cristais obtidos foram da dPGI-Lm. Foram coletadas algumas imagens no difratômetro do lab. de cristalografia do IFSC e a partir destas imagens foi possível caracterizar a cela unitária e alguns aspectos intrínsecos do cristal. Inicialmente, o que ficou comprovado era que o cristal possuía um dos parâmetros de rede com aproximadamente 350 Å e isso seria a principal dificuldade de coletar um bom conjunto de dados para a dPGI-Lm. Estes primeiros cristais testados no laboratório difratavam até no máximo 3,5 Å. Dessa forma, o ideal seria melhorar os cristais para diminuir a mosaicidade,

aumentar a definição dos pontos de difração e se possível diminuir a resolução para baixo dos 3 Å.

Novos lotes de cristais da dPGI-Lm foram crescidos e dentre vários cristais testados, 15 foram selecionados para serem coletados no LNLS (Campinas). Nesta primeira coleta de dados, foram feitas 240 imagens com 0,75 ° de oscilação cada. O conjunto de dados foi processado até 3,34 Å de resolução com 88% de completeza na última camada e 97 % no total. Mais detalhes do conjunto de dados estão mostrados na tabela III.

Tabela III: Estatística do conjunto de dados da dPGI-Lm coletados no LNLS (Campinas). Indexação e integração realizadas com o programa MOSFLM, escalonamento com o programa SCALA. (tabela adaptada dos resultados do SCALA).

<i>Resolução (Å)</i>	<i>reflexões</i>	<i>%completeza</i>	<i>multiplicidade</i>	<i>Rfac</i>	<i><I></i>	<i>I/σ</i>
10,55	727	99,5	9,9	0,07	252	7,8
7,46	1284	100	9,8	0,08	203	4,7
6,09	1674	100	7,7	0,12	73	5,8
5,28	1957	99,8	6,4	0,13	67	5,2
4,72	2198	99,5	5,5	0,12	90	5,9
4,31	2416	99,2	5,1	0,13	81	5,1
3,99	2642	99,2	5,1	0,16	65	4,1
3,73	2832	99,1	5,3	0,22	45	3,1
3,52	3010	98,9	5,3	0,30	33	2,4
3,34	2806	88,2	3,9	0,48	20	1,5
total	21546	97,7	5,8	0,13	20,5	4,1

A indexação das primeiras imagens indicou o sistema hexagonal primitivo, com parâmetros de cela a = b = 85, c = 350 Å ; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$, como o melhor sistema para descrever o cristal da dPGI-Lm. O principal problema para a coleta de dados destes cristais é que as reflexões geradas pela família de planos perpendiculares ao eixo de maior dimensão (c = 350 Å) apresentam uma separação inversamente proporcional ao seu comprimento. Essas reflexões, principalmente as de baixa resolução, somente são

separadas (Fig.17) se o feixe de raio-X incidente apresentar uma baixa divergência, como no caso de fontes sincrotron; se o detector puder ser posicionado afastado do cristal e se o eixo de maior dimensão estiver orientado na direção perpendicular ao feixe incidente.

Figure 17: (A) Imagem do padrão de difração do cristal de dPGI-Lm coletado no LNLS, detector MARccd. (B) Ampliação da área selecionada no padrão completo.

No caso de afastar o detector o problema que surge é que as reflexões de alta resolução, mais afastadas do centro da imagem, cairão fora da área útil do detector e, portanto não serão coletadas na mesma imagem. Para evitar a sobreposição de reflexões durante a coleta no LNLS, tentou-se posicionar o eixo c do cristal perpendicular a direção do feixe incidente, paralelo ao eixo de oscilação ϕ e o detector foi posicionado a 170 mm do cristal; a essa distância o limite de resolução na borda do detector é de 3,3 Å. A

integração das 240 imagens coletadas resultaram em 21546 reflexões únicas entre 74,5 e 3,34 Å de resolução.

O programa MOSFLM, utilizado para a auto indexação, sugeriu uma rede hexagonal primitiva. Uma multiplicidade de 6, observada para a reflexões tipo *00l* (Fig.18), associada ao eixo de roto translação - 6₁ ou 6₅ - descartou a possibilidade do cristal pertencer ao grupo primitivo trigonal.

Figura 18: Reflexões do conjunto de dados coletado no LNLS para um cristal dPGI-Lm. A faixa cinza indica as reflexões *00l*. O círculo externo demarca a resolução de 3,3 Å e o símbolo + marca o centro do espaço recíproco. A direita uma lista das primeiras reflexões pertencentes à família de planos *0 0 l*.

Como este primeiro conjunto de dados apresentava uma boa estatística até um limite de resolução de 3,5 Å, foi possível realizar a busca de fases iniciais por substituição molecular. Para o modelo de busca inicial foi construído um modelo da dPGI-Lm por homologia com a PGI-humana (código pdb: 1jlh). A identidade sequencial entre a enzima humana e a de *Leishmania* é de 47 %.

O programa AMoRe foi utilizado na tentativa de encontrar as soluções de rotação e translação entre os mapas de Patterson do modelo e o gerado com as intensidades das reflexões até 3,5 Å. Durante a busca translacional, o programa resolveu a dúvida entre o eixo 6₁ e 6₅ indicando como única solução distinta para o grupo espacial P6₁ (Fig19a). As tentativas de encontrar uma solução para o grupo espacial P6₅ não convergiram na etapa translacional. A solução de rotação e translação foi aplicada ao modelo da dPGI-Lm e suas novas coordenadas foram usadas para o refinamento de corpo rígido e construção de mapas de densidade eletrônica (programa CNS) (Fig.19b).

Figura 19: (A)Fator de correlação entre os mapas de patterson do modelo de busca e do conjunto de dados de difração medidos para a dPGI-Lm no LNLS. O primeiro pico representa a solução encontrada pelo programa AMoRe. Após o refinamento desta solução a fator de correlação alcançou o valor final de 50,2. (B) Mapa de densidade eletrônica $2\sigma_A|F_o|-D|F_c|$ (contorno de 1σ) calculado após refinamento de corpo rígido seguido de um ciclo de "simulated annealing" executado com o programa CNS. O traçado dos Ca da dPGI-Lm está representado em preto e a densidade em amarelo.

Apesar do atual conjunto de dados ter possibilitado a construção de um mapa $2\sigma_A|F_o|-D|F_c|$ contínuo para os átomos da cadeia principal, algumas regiões mais acessíveis ao solvente ainda apresentavam falhas significantes na densidade eletrônica. Portanto novos esforços foram direcionados para obtenção de cristais que difratassem com melhor resolução e se possível permitisse observar densidade eletrônica para os 48 primeiros resíduos do N-terminal da PGI-Lm.

3.4.2 Segundo conjunto de dados (coletado no IFSC)

A partir de um novo lote de cristais para PGI-Lm e dPGI-Lm, foi realizada uma nova busca por cristais que apresentassem um limite de difração superior a 3,3 Å e que os "spots" (pontos de reflexão) apresentassem um perfil mais circular e com melhor definição do que os presentes no conjunto de dados anterior. A idéia foi selecionar os melhores cristais na fonte de raios-X do lab. do IFSC e coletá-los em nova oportunidade no LNLS. Neste novo lote os cristais da PGI-Lm cresceram com bons aspectos morfológicos. Devido a presença do N-terminal completo na PGI-Lm, seria interessante coletar um conjunto de dados desta forma cristalina para examinar se existe densidade eletrônica associada a alguma estrutura ordenada no N-terminal da proteína. Foram selecionados nove cristais da PGI-Lm e um deles foi coletado no próprio lab. do IFSC.

O grupo de Cristalografia do IFSC adquiriu recentemente uma nova fonte de raios-X tipo anodo rotatório (RIGAKU) e um detector tipo placa de imagem MAR345 com diâmetro de 345 mm. Portanto, apesar de não ser uma fonte sincrotron (com feixe de baixa divergência), o detector apresenta uma área útil maior que o do LNLS. Dessa forma foi

possível posicionar o detector a 250 mm do cristal e coletar reflexões até um limite de 2,5 Å próximo a borda do detector (Fig.20).

Figure 20: (A) Imagem do padrão de difração do cristal de PGI-Lm coletado no IFSC, detector MAR345. (B) Ampliação da área selecionada no padrão completo.

Um conjunto de dados de 228 imagens, 0,75 ° de oscilação por imagem, foi coletado e processado com DENZO e SCALEPACK. Apesar de na imagem (Fig 20b), as reflexões de baixa resolução aparecerem sobrepostas, foi possível resolvê-las selecionando uma área menor para os spots.

Durante a integração com SCALEPACK, observou-se que o grupo espacial $P6_122$ poderia ser utilizado para o processamento do novo conjunto de dados, sem comprometer os valores de R_{merge} (TabIV). A solução encontrada pelo AMoRe com o conjunto de dados anterior (grupo espacial $P6_1$), apresentava um dímero por unidade

assimétrica. A mudança para o grupo P6₁22 resulta na redução da unidade assimétrica para apenas um monômero. O eixo de ordem 2, que antes era considerado simetria não cristalográfica, equivale a um eixo cristalográfico e descreve a rotação necessária para a formação do dímero da PGI-Lm nativo.

Tabela IV: estatísticas do processamento dos dados em P6₁22 com DENZO e SCALEPACK. Tabela adaptada do scalepack. Em parênteses estão os valores para o processamento em P6₁

<i>Resolução (Å)</i>	<i>Reflexões</i>		<i>%completeza</i>		χ^2		<i>R_{merge}</i>	
30 - 5,6	(4342)	2671	(95,6)	96,3	(1,01)	0,98	(0,028)	0,030
4,4	(4209)	2455	(94,2)	96,9	(1,08)	1,07	(0,038)	0,040
3,9	(4255)	2413	(95,4)	97,0	(1,22)	1,19	(0,044)	0,047
3,5	(4380)	2447	(97,7)	99,1	(1,27)	1,25	(0,055)	0,057
3,3	(4379)	2413	(98,6)	99,4	(1,25)	1,24	(0,070)	0,074
3,1	(4407)	2412	(98,7)	99,5	(1,19)	1,20	(0,095)	0,102
2,9	(4432)	2413	(99,0)	99,4	(1,20)	1,21	(0,132)	0,141
2,8	(4369)	2275	(98,7)	99,4	(1,12)	1,12	(0,179)	0,190
2,7	(4408)	2275	(98,8)	99,5	(1,13)	1,14	(0,231)	0,245
2,6	(4316)	2383	(97,5)	98,8	(1,12)	1,14	(0,317)	0,339
total	(43497)	24333	(97,4)	98,8	(1,16)	1,15	(0,055)	0,058

$R_{merge} : \text{SUM} (|I - \langle I \rangle|) / \text{SUM} (I)$

Um refinamento de corpo rígido seguido de um ciclo de "simulated annealing" foi realizado utilizando as coordenadas de um monômero da dPGI-Lm e o novo conjunto de dados. Como não existem coordenadas para a porção N-terminal da PGI-Lm, a estratégia adotada foi adicionar os resíduos extras, de forma iterativa, mediante a inspeção dos mapas de densidade eletrônica calculados durante o refinamento. Após o primeiro ciclo de refinamento os valores de R e R-free foram 33,2 e 34,2 %, respectivamente. O refinamento foi realizado com as rotinas de "simulated annealing" e "water-pick" do CNS. No total, foram adicionadas 216 moléculas de água e 5 resíduos (44 a 48) adicionais ao N-terminal. Após a adição de moléculas de água, foi realizado um ciclo de refinamento

dos parâmetros TLS implementados no programa REFMAC e os valores de R e R-free estabilizaram em 19,5 e 24,9 %, respectivamente.

O novo conjunto de dados a 2,6 Å melhorou a definição dos mapas de densidade eletrônica da PGI-Lm. Comparando uma mesma região do mapa $2\sigma_A|F_o|-D|F_c|$, construído logo após o primeiro ciclo de refinamento (Fig. 21), pode-se observar uma melhora na definição dos contornos dos átomos da PGI-Lm. Apesar desta melhora significativa na resolução dos mapas, algumas regiões da PGI-Lm apresentam baixa densidade eletrônica o que dificultou a construção dos mapas e ajuste dos resíduos. A região mais crítica foi justamente um segmento de hélice localizado no sítio ativo da enzima e que contém um resíduo de histidina considerado fundamental para o processo catalítico.

Figura 21: Mapa de densidade eletrônica $2\sigma_A|F_o|-D|F_c|$ construído logo após o primeiro ciclo de refinamento.

Para diminuir a flexibilidade dos resíduos próximos ao sítio catalítico da PGI-Lm, foi realizada a tentativa de co-cristalização da dPGI-Lm com o substrato frutose-6-fosfato (F6P) e dois inibidores 5PAA e 5PAH . Uma alternativa para obter um complexo foi realizar "soaking" destes compostos, diluído na solução criogênica, por 5 min antes do congelamento em N₂ (l). As tentativas de co-cristalização não foram bem sucedidas; na presença de F6P, formaram-se poucos cristais e ainda muito pequenos, e na presença dos inibidores, nenhum cristal foi observado. O "soaking" foi realizado com a solução crio adicionada de 5 mM de F6P. Vários cristais racharam, principalmente os maiores, os que sobreviviam foram congelados em N₂ (l).

Após a conclusão do refinamento da estrutura da PGI-Lm, surgiu uma nova oportunidade de coletar estes cristais em uma fonte sincrotron; só que desta vez com um detector ADSC Q315, de 315 mm de lado. Esta oportunidade ocorreu durante a participação no curso *RapiData 2003* no Brookhaven National Laboratory. (Upton-NY). Novamente foram selecionados cristais no equipamento do IFSC e entre eles foram identificados cristais difratando até 2,3 Å.

3.4.3. Terceiro conjunto de dados (coletado no Brookhaven National Laboratory. - BNL)

Um cristal da forma dPGI-Lm, previamente submetido ao procedimento de "soaking" com F6P, foi selecionado para coleta na linha X25 do BNL. Esta linha possui um detector ADSC Q315 montado com 9 câmeras ccd dispostos em uma matriz 3x3. Foi coletado um conjunto de dados de 140 imagens, 0,75 ° de oscilação por imagem; com o detector posicionado a 325 mm do cristal. O conjunto de dados foi processado com o

programa MOSFILM e SCALA resultando em dados com resolução de 2,35 Å (Tabela VI).

Tabela VI: Estatística do conjunto de dados da DPGI-Lm-F6P coletados no BNL (NY). Processamento no grupo espacial P6₁22.

<i>Resolução (Å)</i>	<i>reflexões</i>	<i>%completeza</i>	<i>multiplicidade</i>	<i>R_{fac}</i>	<i><I></i>	<i>I/σ</i>
7,43	1252	99,9	6,4	0,051	54796	5,8
5,25	2018	99,9	6,3	0,065	17889	9,6
4,29	2521	100,0	7,0	0,054	22086	11,7
3,72	2926	100,0	7,2	0,050	15565	12,5
3,32	3293	100,0	7,4	0,060	8616	11,2
3,03	3581	100,0	7,5	0,077	3926	9,6
2,81	3890	100,0	7,5	0,116	2023	6,8
2,63	4145	100,0	7,6	0,202	1052	4,0
2,48	4378	100,0	7,7	0,329	627	2,5
2,35	4622	100,0	8,0	0,473	420	1,8
overall	32626	100,0	7,1	0,066	7718	4,1

O detector ADSC Q315 e cabeça goniométrica com liberdade de rotação do angula kappa, facilitaram a orientação do eixo de maior dimensão do cristal quase perpendicular ao feixe incidente. Essa orientação reduziu a sobreposição das reflexões geradas pelas famílias de planos perpendiculares ao eixo *c* e reflexões até 2,2 Å puderam ser coletadas nos cantos do detector (Fig.22).

Figure 22: (A) Imagem do padrão de difração do cristal dPGI-Lm/F6P coletado no BNL (NY). (B) Ampliação da área selecionada no padrão completo.

A coleta no detector ADSC Q315 utilizou toda a área disponível do aparelho e distância do cristal para o detector ainda poderia ser diminuída sem comprometer as reflexões de baixa resolução. A distância de 325 mm foi escolhida de forma a coletar todas as reflexões geradas pelo cristal. Isso está claro pela relação sinal/ruído ($\langle I/\sigma \rangle$) de 1,8 da última faixa de resolução (Tabela VI).

A estrutura da dPGI-Lm/F6P foi refinada usando como modelo inicial a estruturas sem moléculas de água da dPGI-Lm, previamente refinada com os dados coletados no IFSC. Após um ciclo inicial de refinamento de corpo rígido, os valores de R e R_{free} eram 30,52% e 32,76%, respectivamente. Em seguida, com auxílio do mapa diferença $m|F_o|-D|F_c|$ (contornado a 5σ) foi adicionado o ligante F6P ao conjunto de coordenadas. O refinamento utilizou sucessivos ciclos de "simulated annealing" seguido por ajustes manuais do modelo direcionados pelos mapas de densidade tipo $2\sigma_A|F_o|-D|F_c|$ (contorno de

1 σ) e $m|F_o|-D|F_c|$ (contornos de -3 e +3 σ). Foram realizados dois ciclos de adição de molculas de gua utilizando a rotina "water-pick" do programa CNS seguidos por um ciclo final de refinamento dos parmetros TLS. O modelo final constitudo por um mero com 556 aminocidos, 180 molculas de gua e uma molcula de frutose-6-fosfato. Os valores de R e R_{free} ficaram em 22,0 e 25,9 %, respectivamente. Um resumo dos parmetros finais para o refinamento das duas estruturas, PGI-Lm e dPGI-Lm/F6P, est apresentado na tabela VII.

Tabela VII: Estatstica final para coleta de dados e refinamento das duas principais estruturas obtidas.

Estrutura (Local de coleta)	PGI-Lm (IFSC)	dPGI-Lm (BNL)
Coleta de Dados		
Grupo espacial	P6 ₁ 22	
Parâmetros de rede		
a , b e c (�)	85,74, 85,74 e 350,43	85,13, 85,13 e 350,09
�, � e � (�)	90, 90 e 120	90, 90 e 120
Faixa de resolução (�)	30 – 2,6	70 – 2,35
Reflexões �nicas	24333	32626
Redundância	6,7	7,1
Completeza (�ltima camada) %	98,5 (98,8)	100 (100)
R-sym %	5,8	6,1
Refinamento		
Reflexões utilizadas	23091	30902
R _{factor}	19,5	22,0
R _{free}	24,9	25,9
r.m.s.		
ligação	0,022	0,018
�ngulo	1,83	1,69
< B _{factor} > (� ²)	30,9	32,8

3.5. Análise das estruturas

Pelo gráfico de Ramachandran, apenas dois resíduos, Ser 48 e His 441, ficaram em regiões não favoráveis para a estrutura PGI-Lm. Para a dPGI-Lm/F6P são três os resíduos em regiões impróprias: Ala 442, Ser 420 e Thr 437 (Fig. 23).

Figura 23: Gráfico de Ramachandran das estruturas finais da dPGI-Lm/F6P e PGI-Lm.

No caso da PGI-Lm, o resíduo 48 é o primeiro dos cinco aminoácido (Gly 44 a Ser 48) adicionado ao N-terminal e sua conformação se ajusta a densidade eletrônica observada (Fig.24b); a His 441 é considerada um importante resíduo catalítico e está localizado justamente na região onde os mapas de densidade apresentam uma baixa qualidade dificultando a correta orientação do resíduo. Já para a estrutura da dPGI-Lm/F6P, todos os resíduos em áreas não favoráveis apresentam uma alta correlação com os mapas de densidade eletrônica.

Com a análise da estrutura da PGI-Lm foi possível concluir que o N-terminal não tem uma estrutura definida e provavelmente deve apresentar uma alta flexibilidade quando a proteína está em solução. Pelo mapa de densidade $2\sigma_A|F_o|-D|F_c|$ da região N-terminal da PGI-Lm, pode-se observar que apenas cinco resíduos adicionais a cadeia da dPGI-Lm apresenta estrutura definida (Fig. 24).

Figura 24: (A) Superfície acessível ao solvente da dPGI-Lm e resíduos adicionais da porção N-terminal da PGI-Lm. (B) Mapa de densidade $2\sigma_A|F_o|-D|F_c|$ da região N-terminal da dPGI-Lm (verde) e PGI-Lm (amarelo). Não mais que cinco resíduos puderam ser adicionados a região N-terminal da dPGI-Lm.

A região mais crítica devido a baixa qualidade dos mapas é um fragmento de 10 resíduos (Gly 433 até Ala 442) no qual está inserida a histidina catalítica (His 441). Quando a estrutura da PGI-Lm foi resolvida (a 2,6 Å resolução), o mapa $2\sigma_A|F_o|-D|F_c|$ apresentava uma baixa definição, mas ainda assim permitiu o posicionamento dos átomos de cadeia principal (Fig 21a). A conformação deste loop difere do que é observado nas estruturas de mamíferos (coelho [32], porco [33] e humana [34]) previamente resolvidas. Quando a estrutura da dPGI-Lm/ F6P foi resolvida (a 2,35 Å de resolução), o mapa $2\sigma_A|F_o|-D|F_c|$ mostrou que a conformação desta região é mais parecida com as de mamíferos do que com a previamente descrita na estrutura da PGI-Lm (Fig 25b).

Figura 25 : mapa $2\sigma_A|F_o|-D|F_c|$ (contorno de 1σ) para a região do loop contendo histidina catalítica (His 441) das estruturas (A) PGI-Lm e (B) dPGI-Lm/F6P. (C) As duas estruturas estão sobrepostas, em amarelo a PGI-Lm e em verde a dPGI-Lm/F6P.

A hipótese que este fragmento, localizado próximo ao sítio ativo, sofra uma mudança de conformação devido a interações com o substrato tem como principal contra argumento o fato de estruturas de PGI's de mamíferos, cristalizadas na ausência [58, 34] e presença de ligantes [32, 33, 41-43, 59], não apresentarem distorções na geometria desta

região. Devido a baixa qualidade dos mapas gerados para PGI-Lm não podemos afirmar que a diferença observada para a estrutura da dPGI-Lm/F6P seja um ajuste do sitio ativo induzido pela presença do substrato.

Outra importante observação feita para a dPGI-Lm e PGI-Lm é que o r.m.s. entre os C α das duas estruturas é de apenas 0,4 Å. A comparação entre as enzimas de coelho com [41] e sem F6P [58], e de humano com [59] e sem [34] sulfato; indicam que regiões denominadas loop A e B apresentam um movimento de corpo rígido desencadeado pela interação das cadeias laterais do loop A com o grupo fosfato do ligante. A comparação entre a PGI-Lm com e sem F6P não apresenta diferença com relação a posição das regiões equivalentes aos loops A e B (Fig.26).

Figura 26 : Comparação entre os loops A e B das estruturas PGI-Lm (amarelo) e dPGI-Lm/ F6P (verde). Em (A) e (B) estão as estruturas com mapas $2\sigma_A|F_o|-D|F_c|$ (contorno de 1σ) para o Loop A; o loop B é formada pelo pequeno seguimento de hélice na parte superior da estrutura. Em (C) com a presença do F6P e o mapa $m|F_o|-D|F_c|$ com contorno de 5σ .

A Posição da F6P é coincidente com a descrita na estrutura de coelho [41] onde o ligante F6P foi inserido no cristal pela mesma técnica empregada para a PGI-Lm - soaking do ligante durante a crio proteção. Na estrutura de coelho, os loops A e B se deslocam em direção do substrato. Na estrutura da dPGI-Lm/F6P, o que impede esta movimentação são

os contatos cristalinos gerados pelo empacotamento dentro do cristal. Uma molécula vizinha interage por pontes de hidrogênio e com os loops A e B (Fig 27). Pontes de hidrogênio formadas entre os resíduos Gln 263 (loop A) e Lys 304 (loop B) de uma molécula com His 79, Gln 80 e Gln 83 de uma molécula vizinha são as principais interações geradas pelo empacotamento cristalino (Fig.27b). O loop A é responsável pela coordenação do grupamento fosfato de todas as estruturas cristalizadas na presença de ligantes. No caso da PGI-humana, cristalizada na presença de sulfato de amônia [59], o íon sulfato é coordenado pelo loop A e sua posição é equivalente ao grupo fosfato dos ligantes presentes nas demais estruturas. A partir desta observação, sugere-se que apenas a presença de um grupo carregado, sulfato ou fosfato, já seja capaz de desencadear o deslocamento dos loops A e B (Fig.3 do anexo I) [34].

Figura 27: Representação dos contatos cristalinos observados para o cristal dPGI-Lm/F6P. (A) Os monômeros da dPGI-Lm/F6P estão coloridos de cinza e azul. No monômero A, o loop A e B estão coloridos de verde e amarelo. (B) Detalhe dos contatos cristalinos e das interações hidrofóbicas entre os resíduos do loop A (Phe260) e loop B (Phe308).

Em geral, para as estruturas de PGI's conhecidas até o momento, a primeira etapa para a formação de um complexo do tipo enzima-substrato é a coordenação do grupo fosfato pelos resíduos do loop A. As interações hidrofóbicas entre o loop A e B (Fig. 27b) fazem com que o loop B acompanhe o deslocamento do loop A, fundamental para a catálise da reação. A movimentação dos loops A e B resultará na correta orientação do substrato para que ocorra a reação de isomerização. No caso da dPGI-Lm/ F6P, o substrato foi capaz de se ligar os loop A, mas devido aos contatos cristalinos a enzima permaneceu imóvel.

3.6 Comparação entre as PGI's de humanos e *Leishmania*

A sobreposição das estruturas de dPGI-Lm/F6P e PGI-humana [34] revelou uma diferença significativa na orientação entre os domínios destas enzimas. O monômero da dPGI-Lm, assim como da PGI-humana, é formado por dois domínios tipo sanduíche α/β , mais uma extensão C-terminal formada por dois segmentos de α hélices que "abraçam" o monômero adjacente, para a formação do dímero (Fig. 28a).

(A) legenda na pagina seguinte

Figura 28: (A) representação da dPGI-Lm mostrando o domínios grande (verde), pequeno (laranja) e a extensão C-terminal (azul) que "abraça" o monômero adjacente para a formação do dímero nativo. Os resíduos do sítio catalítico estão distribuídos no dom. pequeno, na extensão C-terminal (de um monômero) e domínio grande do outro monômero. (B) Mecanismo catalítico proposto para a PGI de coelho [43]. Os resíduos envolvidos estão indicados pelas cores correspondentes a localização nos domínios pequeno, grande e C-terminal.

Os resíduos que participam da formação do dímero estão localizados exclusivamente no domínio grande e na extensão C-terminal. O domínio pequeno é responsável pela coordenação do fosfato - os loops A e B estão localizados neste domínio. Após o deslocamento dos loops A e B, uma lisina localizada na extensão C-terminal de um monômero e uma histidina localizada no domínio grande do monômero adjacente, realizam linearização de glicose ou frutose. A reação de isomerização da carbonila ($C=O$) entre os carbonos C_1 e C_2 é favorecida por um ácido glutâmico e uma arginina do domínio grande (fig. 28b) [41].

Figura 29: Alinhamento entre as PGI's de *L. mexicana* (leish), *T. brucei* (Tryp), *H. sapiens* (human), *O. cuniculus* (rabbit) e *Sus scrofa* (pig). A sobreposição entre a dPGI-Lm e a PGI-humana usando os resíduos marcados de cinza resultou em um $\text{C}\alpha$ r.m.s. de 0,9 Å. A partir desta sobreposição, o $\text{C}\alpha$ r.m.s. calculado para os resíduos marcados de preto é igual a 3,3 Å. Os loops A e B estão coloridos de verde e amarelo, respectivamente. Os resíduos catalíticos estão marcados de roxo. As letras *h* e *s* representam os elementos de estrutura secundária tipo hélice e folhas β para a PGI-Lm, respectivamente. Os elementos de estrutura secundária sublinhados indicam os resíduos do domínio pequeno. O resíduo de metionina marcado com # interage com os resíduos marcados por o. O símbolo c indica os resíduos na interface dimérica.

Apesar dos resíduos catalíticos serem bem conservados entre a PGI-humana e PGI-Lm; a sobreposição dos domínios grandes e parte da extensão C-terminal (resíduos em cinza na Fig.29) resulta em um $\text{C}\alpha$ r.m.s. de 0,9 Å. A partir desta sobreposição, o $\text{C}\alpha$ r.m.s. calculado para os resíduos dos domínios pequenos (pintados de cinza na Fig. 29) é igual a

3.3 Å. Porém quando a sobreposição é definida apenas pelos resíduos do domínio pequeno, o C α r.m.s. cai de 3,3 Å para 0,7 Å. A partir desta análise pode-se concluir que tanto o domínio grande, quanto o pequeno são estruturalmente bem conservados. Porém a PGI-Lm apresenta o domínio pequeno numa orientação mais aberta em relação ao domínio grande, quando comparada com a PGI-humana. Essa diferença conformacional influencia a atividade de ambas as enzimas resultando em constantes cinéticas diferentes (Fig. 13, pag. 29), sem alterar o mecanismo catalítico.

A substituição de uma alanina (Ala 284) na PGI-Humana por uma metionina (Met 337) na PGI-Lm impede que o domínio pequeno da PGI-Lm possa adotar uma orientação semelhante a da PGI-Humana. Esta substituição ocorre em um segmento de α -hélice, denominado por "H-met" e localizado na região que conecta o C-terminal do domínio pequeno ao N-terminal do domínio grande. O domínio pequeno está ligado às regiões C e N terminais do domínio grande por duas longas α -hélices denominadas "LH-c" e "LH-n", respectivamente (Fig(s). 29 e 30).

Figura 30: Representação do domínio grande (azul) e pequeno (verde) da PGI-Lm. As longas α -hélices que conectam os domínios são denominadas LH-c (C-terminal) e LH-n (N-terminal). A met 337 encontra-se na α -hélice H-met. A α -hélice h-l, localizada no domínio pequeno, mantém a maioria dos contatos com o domínio grande.

Ao sobrepor os domínio grande das duas estruturas, o C β da Met 337 (na PGI-Lm) e da Ala 284 (na PGI-humana) ficam separados por apenas 1,6 Å. A presença da Met 337 na mesma posição da Ala 284 requer uma reorganização de alguns resíduos da vizinhança, por exemplo a Tyr 342 e a Met 176 na PGI-Lm. A separação entre os C β s da Tyr 342 e da Phe 289 (na PGI-humana) é de 2,5 Å; ou seja a acomodação da Met 337 causa uma distorção de aproximadamente 0,9 Å nos resíduos da vizinhança (Fig. 31).

Figura 31: Sobreposição da dPGI-Lm (verde) e PGI-humana (cinza) mostrando em detalhe o efeito da substituição da Ala 284 (na PGI-humana) pela Met 337 (na PGI-Lm). A superfície cinza representa o domínio pequeno da PGI-humana.

A acomodação da Met 337 na PGI-Lm requer um deslocamento das duas hélices que conectam o domínio grande ao domínio pequeno. Este deslocamento resulta na diferença observada para a sobreposição dos domínios pequenos da PGI-Lm e da PGI-humana (Fig. 31b).

A diferença observada para os domínios da PGI-Lm, deixa o sítio ativo da enzima mais aberto e aumenta para aproximadamente 5 Å o deslocamento necessário que os loops

A e B devem realizar para posicionar corretamente o substrato em relação aos resíduos His 441, Glu 410. A distância observada entre o O₁ da frutose e o O_{ε1} do Glu 357 da PGI de coelho [41] é de 2,71 Å (Fig. 32a). A distância entre a carboxila do ácido glutâmico e o intermediário 1,2-*cis*-enediolato deve ser inferior a 3 Å para que ocorra a etapa de isomerização do substrato.

Figura 32: Representação das interações observadas entre o substrato F6P complexado com a PGI de coelho (A) [41] e a dPGI-Lm (B).

A coordenação do fosfato é realizada por resíduos equivalentes nas estruturas da PGI de coelho e dPGI-Lm. A principal diferença é que na dPGI-Lm a Ser 207 interage com o O₃ e O₄ do anel da frutose enquanto na PGI de coelho a Ser 209 interage com o O_{3P} do grupo fosfato. Outra diferença é que o O_{γ1} e o N da Thr 259 de dPGI-Lm, equivalente a Thr 211 da PGI de coelho, encontram-se a 3,34 e 3,6 Å do O_{3P} do grupo fosfato, respectivamente. Na PGI de coelho estas distâncias são menores (Fig. 32a). Todas estas

diferenças ocorrem devido a rigidez imposta pelos contatos cristalinos aos resíduos do loop A (Ser 256 a Gln 263) da dPGI-Lm. Devido as restrições de deslocamento do loop A, a coordenação completa do grupo fosfato é comprometida e o substrato não forma as interações esperadas com os resíduos catalíticos (His 441 e Glu 410).

Duas medidas de distância entre o substrato e a dPGI-Lm indicam que o loop A deveria sofrer um deslocamento para que as interações observadas na PGI de coelho ocorressem. A primeira é a distancia de 7,7 Å entre a O γ da Ser 207 e o O $_{3P}$ da frutose e a segunda é a distância de 7,2 Å entre o O $_2$ da frutose e O $\epsilon 1$ do Glu 410 da dPGI-Lm (Fig. 33). Na PGI de coelho, as distâncias equivalentes (O γ _Ser 159 - O $_{1P}$ _F6P , O $_1$ _F6P - O $\epsilon 1$ _Glu 357) são de 2,83 Å e 2,71 Å, respectivamente (Fig. 32a). Se o loop A da dPGI-Lm se move-se aproximadamente 5 Å, estas distâncias atingiriam valores entorno de 2,5 Å e a frutose assumiria uma orientação parecida com a encontrada na PGI de coelho.

Figura 33: Imagem estéreo do sítio catalítico da dPGI-Lm/F6P. Monômero A, B, loop A e loop B coloridos de cinza, azul, verde e amarelo, respectivamente. As distâncias em vermelho ressaltam a diferença entre o ligante complexado a dPGI-Lm e a PGI de coelho. Na PGI de coelho, estas distâncias são menores que 3 Å.

4. Conclusões

As duas construções da PGI de *L. mexicana*, uma correspondendo a proteína completa (PGI-Lm) e a outra com a deleção de 48 resíduos do N-terminal (dPGI-Lm), foram expressas na fração solúvel de *E. coli* BL21(DE3). Foi estabelecido um protocolo de purificação, constituído de três etapas: precipitação com sulfato de amônia, cromatografia líquida em coluna de troca iônica e exclusão por tamanho. Ambas as formas da PGI de *L. mexicana* foram purificadas até a homogeneidade e não foi observada nenhuma diferença significativa na atividade específica devido a ausência do N-terminal para a dPGI-Lm. A determinação das constantes catalíticas para a PGI-Lm ($K_m = 242 \mu\text{M}$ e $V_{\max} = 80 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$) revelou que existem diferenças na afinidade e no ambiente químico em que a enzima atua quando compara a PGI-humana ($K_m = 99 \mu\text{M}$ e $V_{\max} = 22 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$). O alinhamento entre as seqüências de PGI's de mamíferos e trypanosomatídeos (*Leishmania* e *Trypanosoma*) aponta para a conservação de todos os resíduos catalíticos e dessa forma exclui a possibilidade de variações no mecanismo da reação.

Para explicar as diferenças enzimáticas entre as PGIs de mamíferos e dos trypanosomatídeos foi realizada uma análise comparativa das estruturas cristalográficas da PGI-humana e da PGI-Lm. O mecanismo catalítico, descrito no artigo da PGI-humana (anexo I) [34], pode ser dividido em três etapas: formação do complexo enzima/substrato devido a interação do grupo fosfato do substrato com o Loop A da enzima ; abertura do anel da glicose ou frutose e isomerização da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) entre o C_1 e C_2 do intermediário 1,2-*cis*-enediolato. A abertura do anel e a isomerização são realizadas pelos pares de resíduos His/Lys e Glu/Arg, respectivamente.

A sobreposição entre a dPGI-Lm/F6P e a PGI-humana mostrou que o domínio pequeno, responsável pela coordenação do grupo fosfato do substrato, apresenta uma distorção em relação ao restante da proteína. Na PGI-Lm, o domínio pequeno está mais afastado do domínio grande e conseqüentemente o sítio catalítico desta enzima está mais aberto do que o da PGI-humana. Esta distorção é resultante da acomodação da Met 337 (na PGI-Lm) na posição equivalente a Ala 284 (na PGI-humana). Esta substituição causa um afastamento das α -hélices que conectam o domínio pequeno ao restante da proteína, propagando uma distorção local ao longo de todo o domínio pequeno.

Os Loops A e B são flexíveis e sofrem um deslocamento de 2,5 Å na PGI-humana e de coelho para que ocorra a orientação do substrato em relação aos resíduos catalíticos. Devido a conformação mais aberta do domínio pequeno na dPGI-Lm/F6P, sugere-se que os loops A e B sofram um deslocamento de aproximadamente 5 Å para que o substrato seja orientado de maneira idêntica a observada na PGI de coelho. Esta flexibilidade variável dos loops A e B é necessária para a conservação do mecanismo catalítico nas enzimas de mamíferos e trypanosomatídeos.

A partir da comparação cinética e estrutural entre a PGI-Lm e a PGI-humana, podemos concluir que esta enzima apresenta diferenças significativas para o desenho de inibidores com seletividade contra a enzima do parasita. A diferença de volume da cavidade catalítica poderia ser explorada para o desenho de inibidores contra PGI-Lm, mas que tivessem sua eficiência contra a PGI-humana diminuída por impedimentos estéricos. Compostos elaborados para restringir a flexibilidade dos loops A e B reduziriam a eficiência catalítica da PGI-Lm, uma vez que esta enzima requer um deslocamento maior

destes loops para o seu funcionamento normal. Estes exemplos são meramente hipotéticos e precisam de mais evidências experimentais para, juntamente com resultados de validação por interferência genética, aumentar o potencial do uso da PGI no desenho racional de drogas anti-trypanosomatídeos.

ANEXO I

Crystal structure of human phosphoglucose isomerase and analysis of the initial catalytic steps

A.T. Cordeiro^a, P.H.C. Godoi^{a,b}, C.H.T.P. Silva^a, R.C. Garratt^a,
G. Oliva^{a,b}, O.H. Thiemann^{a,*}

^a *Laboratory of Protein Crystallography and Structural Biology, Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo-USP, Av. Trabalhador São-carlense 400, P.O. Box 369, 13566-590 São Carlos-SP, Brazil*

^b *Chemistry Institute of São Carlos, University of São Paulo-USP, Av. Trabalhador São-carlense 400, P.O. Box 369, 13566-590 São Carlos-SP, Brazil*

Received 21 February 2002; received in revised form 2 September 2002; accepted 25 September 2002

Abstract

The second enzyme in the glycolytic pathway, phosphoglucose isomerase (PGI), catalyses an intracellular aldose–ketose isomerization. Here we describe the human recombinant PGI structure (hPGI) solved in the absence of active site ligands. Crystals isomorphous to those previously reported were used to collect a 94% complete data set to a limiting resolution of 2.1 Å. From the comparison between the free active site hPGI structure and the available human and rabbit PGI (rPGI) structures, a mechanism for protein initial catalytic steps is proposed. Binding of the phosphate moiety of the substrate to two distinct elements of the active site is responsible for driving a series of structural changes resulting in the polarisation of the active site histidine, priming it for the initial ring-opening step of catalysis. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Human phosphoglucose isomerase; Glycolysis; Isomerization mechanism

1. Introduction

Phosphoglucose isomerase (PGI; EC 5.3.1.9) is a cytosolic enzyme that catalyses the interconversion of D-glucose-6-phosphate (G6P) and D-fructose-6-phosphate (F6P). The intermediate has been characterised as a *cis*-enediolate compound with the double bond between C1 and C2. The reaction is reversible and its direction is essentially driven by the G6P and F6P concentrations. PGI participates in glycolysis, gluconeogenesis and the pentose phosphate pathway. Recently, extracellular functions of a neuroleukin [1], an autocrine motility factor [2] and a maturation factor [3] have also been associated with mammalian PGI. Furthermore, PGI deficiency has been implicated in non-spher-

ocytic haemolytic anemia and in other autosomal recessive disorders [4].

Structures of mammalian PGIs are represented in the PDB by human [5] and pig (to be published) structures both with a sulfate ion occupying the binding site of the substrate phosphate, three rabbit PGI structures (rPGI) in the form of inhibitor bound complexes [6–8] and a rPGI structure with the product, F6P, complexed to the active site [9], therefore representing ligand-bound forms of the enzyme.

A multistep catalytic mechanism has been proposed for the interconversion of G6P and F6P. In one recent proposal, His³⁸⁸ is responsible for performing the initial ring-opening step by protonation of the G6P ring oxygen, aided by an appropriately orientated water molecule or hydroxyl ion. Once the substrate is in its linear form, the isomerization steps are believed to take place in the same enzyme cavity, principally by the acid/base action of Glu³⁵⁷ [10]. Despite the considerable progress made in recent years in understanding the structural basis of catalysis, little is known about the mechanism by which the active site assumes its catalytically active conformation. This has been due principally to the absence of a detailed description of the enzyme in its substrate free form.

Abbreviations: PGI, phosphoglucose isomerase; rPGI, rabbit phosphoglucose isomerase; G6P, D-glucose-6-phosphate; F6P, D-fructose-6-phosphate; hPGI, free active site form of human phosphoglucose isomerase; 6PG, 6-phospho-D-gluconate

* Corresponding author. Tel.: +55-16-273-8089; fax: +55-16-273-9881.

E-mail address: thiemann@ifsc.usp.br (O.H. Thiemann).

The present work describes the free active site human PGI (hPGI) structure and the identification of the conformational changes necessary for the initial catalytic steps of the enzyme prior to the first step of catalysis. Based on the comparison between the hPGI structure and that in which sulfate is bound, as well as with complexes of rPGI with F6P and G6P, it is concluded that several residues, including Ile¹⁵⁶ and Thr³⁸⁴ are fundamental to the mechanism which leads to the rearrangement of residues involved in the sugar ring-opening step. Such observations suggest that the binding of the phosphate moiety of the substrate to the active site triggers events which lead to the formation of a salt bridge between Glu²¹⁶ and His³⁸⁸, resulting in polarisation of the latter and arming the catalytic machinery for ring-opening.

2. Material and methods

2.1. Crystallisation and data collection

Preparation of the hPGI enzyme and its crystallisation were done as previously described [10]. A full data set was collected from a single, flash frozen crystal at the Protein Crystallography beamline at the National Synchrotron Light Laboratory (LNLS, Campinas, Brazil) using monochromatic X-rays of $\lambda = 1.5450$ Å. A total of 187 frames were collected at 100 K, with an exposure time of 4 min in oscillations of 0.75° and a crystal-to-detector distance of 170 mm. The diffraction data were processed using DENZO and SCALEPACK [11,12].

2.2. Structure determination and refinement

Initial phases were obtained by molecular replacement employing the program AMoRe [13] and the rPGI structure complexed with the inhibitor 6-phospho-D-gluconate as the search model (PDB code 1DQR). The hPGI model was refined using the CNS program [14]. Initially a rigid body routine was performed, with data ranging from 30 to 3 Å in order to refine the molecular replacement solution. Several cycles of simulated annealing, using the maximum like-

lihood method, was performed, followed by coordinate and B factor refinement using all data between 24 and 2.1 Å. The occupancy of side chain atoms of mutated residues between the hPGI here described and rPGI as well as all residues presenting poor electron density was initially set to zero. During each refinement cycle these residues were visually inspected with the program O [15] and occupancies were attributed to atoms from residues fitting the $2|Fo| - |Fc|$ electron density map. Non-crystallographic symmetry restraints were applied during the whole refinement procedure with a decreasing weight until the last two cycles, both performed in the absence of non-crystallographic restrictions. The “water-pick” routine from CNS was used to select water molecules based on data from the difference map. Water molecules without reasonable interactions and/or with B-factors higher than 60 Å² were removed. The hPGI refinement was concluded when no significant changes in R_{crystal} and R_{free} were observed in additional refinement steps. The coordinates have been deposited in the Protein Data Bank (accession code 1JLH).

2.3. Comparison procedure

The three-dimensional superposition between the hPGI and human PGI complexed with sulfate (PDB entry 1IAT) was entirely calculated using the lsq options of the program O. Given that the asymmetric unit of the PGI complexed with sulfate contains only a monomer, it was initially necessary to reconstruct the dimer by the application of twofold crystallographic symmetry. Subsequently an initial superposition of the two dimers was calculated based on residues close to the dimer axis and later extended to consider all α -carbon atoms with the use of the lsq.improve option. As a consequence, loop residues which suffer significant conformational changes on sulfate binding have not been forced to be considered equivalent.

3. Results and discussion

3.1. Structure quality

The space group ($P2_12_12_1$), non-crystallographic symmetry and cell parameters observed are almost identical to those previously reported although representing a better quality data set [10]. The asymmetric unit of the final refined structure contains 2224 amino acid residues in four monomers assembled as two homodimers as well as 1289 independent water molecules. At the final steps of refinement, the absence of non-crystallographic symmetry restraints and the independent inclusion of water molecules would allow structure differences between the related chains to show up. However, the r.m.s. calculated for C α and for all atoms between one dimer (composed by chains A and B) and its related molecule in the asymmetric unit (chains C and D) are 0.32 and 0.45 Å, respectively. Indeed, the water

Table 1
Data collection and refinement statistics

Space group	$P2_12_12_1$
Resolution range (Å)	22.21–2.1
Total reflections	672976
Unique reflexions	138362
Redundancy	4.8
Completeness (%)	99.7 (99.4) ^a
R_{sym} (%)	11.1 (39.9)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	6.7
R_{factor} (%)	19.7
R_{free} (%)	24.0

^a Numbers in parenthesis are listed for the highest resolution shell (2.23–2.1 Å).

network, 15 Å, around the His³⁸⁸ from the catalytic site remains highly conserved with structural water molecules (see below) at identical positions in both homodimers.

The overall fold of mammalian PGIs has been recently described [10]. Its isomerase activity is intimately associated with its homodimeric structure in which each monomer is composed of a large N-terminal domain, a second smaller domain and an extended C-terminal “arm” that embraces the adjacent monomer (Fig. 1A). The phosphate of the substrate is coordinated to residues located in the small domain, while the isomerization reaction takes place at the dimer interface and involves residues from both large and C-terminal domains. Of particular note is the fact that His³⁸⁸, believed to be critical for the ring-opening step, comes from the neighbouring twofold related subunit.

The Ramachandran plot for the four monomers indicates the presence of only three residues per monomer lying

Fig. 1. (A) Backbone representation of hPGI showing the small domain coloured in blue and flexible loops A and B coloured in yellow. (B) Superposition of the small domains from hPGI (blue) and rPGI, the structure used for molecular replacement (orange). The strands are numbered according to the amino acid sequence.

Fig. 2. (A) Superposition of the active sites of the hPGI (coloured by atom), sulfate-bound human PGI (cyan) and rPGI (gray) complexed with F6P (magenta). The sulfate ion of human PGI is located at a similar position to the phosphate from F6P. The hPGI presents loop A in an opened conformation when compared to the sulfate-bound PGI and rPGI. (B) Superposition of hPGI (coloured by atom type) and the sulfate bound to human PGI (cyan) illustrating the flipping of the χ_1 angle of Ile¹⁵⁶ leading to displacement of water molecules W31 and W1071, which are not visible in the sulfate-bound PGI. The electron density map for the hPGI around residues 156–159, 214 and the cited water molecules was calculated with coefficients $2|F_o| - |F_c|$ and is shown at the 1.5σ contour level.

outside the most favourable regions (data not shown). Residues Lys²³³, Thr³⁷⁴ and Thr³⁸⁴ show clear and unambiguous electron density in the $2|F_o| - |F_c|$ maps and establish hydrogen bonds with the protein and water molecules in the surrounding environment.

Based on the final model, two sequence variations are found when compared with the Swissprot hPGI sequence (accession number: P06744). The V157G mutation was also observed in the hPGI structure solved at 1.6-Å resolution as well as in other published sequences [10], therefore representing a possible mutation in the deposited sequence (P06744). The K399E mutation may have been a conse-

quence of the PCR amplification that does not affect either the enzyme folding, its hydrogen bonding pattern nor its enzymatic activity.

3.2. PGI structure comparison

The rPGI structure used for molecular replacement and the hPGI share 92% sequence identity and an overall C_{α} r.m.s. deviation of 0.64 Å. The main differences between

both molecules are restricted to two regions which we term loop-A (residues 209–215, situated between β -strand C and α -helix 11) and loop-B (residues 246–262 which comprise α -helix 13), both indicated in Fig. 1B. These present a local C_{α} r.m.s. deviation of 1.81 Å and are both located close to the catalytic site. Loop-A is the principal structural element responsible for the phosphate coordination observed in all inhibitors and the substrate F6P bound to the rPGI structure [16, 17]. Loop-B makes hydrophobic

Fig. 3. Structural reorganisation of the active site on substrate binding. In all panels hPGI is and the sulfate-bound human PGI structure in cyan. (A) hPGI showing the loop A together with residues important for the initial catalytic steps transition. The interaction between Glu²¹⁶ and His³⁸⁸ is weak or nonexistent in this state. (B) Shows how loop A moves on sulfate binding (cyan) leading to a steric clash between Thr²¹⁴ and Ile¹⁵⁶. (C) Flipping of Ile¹⁵⁶ to relieve the steric impedance would generate a similar clash with His³⁸⁸ from the opposite subunit if it did undergo a sidechain rotation as shown. (D) The final PGI conformation can be seen by the superposition of rPGI (gray) with F6P (magenta) and the sulfate-bound human PGI. The formation of the strong salt-bridge interaction between Glu²¹⁶ and His³⁸⁸, known as necessary for the ring-opening step of catalysis, is observed in both superposed structures. Although described sequentially for simplicity, this is not meant to imply that the transition must necessarily obey a step-by-step mechanism.

interactions with residues located in loop-A and, as a consequence, appears to move in concert with it. Local distortions between the hPGI and rPGI complexed with inhibitors or the substrate are clearly induced by their interaction with ligand in the catalytic site. The high-resolution structure of human PGI [1] superimposes better to the structure of complexes of rPGI than to the hPGI (Fig. 2A). This similarity is actually due to the presence of a sulfate ion at the equivalent position to that of the phosphate group of the ligands described in complex with rPGI. Besides binding to loop A, the sulfate ion also forms hydrogen bonds to Ser¹⁵⁹, as do the phosphate moieties of the rPGI complexes. Ser¹⁵⁹ therefore appears to act as an anchor, part of a rigid nonmobile substructure with respect to which loops A and B move on substrate binding. These data suggest that the phosphate/sulfate moiety alone may be sufficient to drive the loop movement which results in a slight closure of the active site.

3.3. Initial catalytic step

The first descriptions of the conversion mechanism of G6P to F6P catalysed by PGI indicated a basic group in the enzyme active site involved in the formation of a *cis*-enediol intermediate. The product is formed after a second proton migration and has been well characterised [12]. These studies proposed a catalytic mechanism without identifying the residues directly involved. More recent work has attributed the proton transfer role to Glu³⁵⁷, despite the fact that the pK_a of this residue is typically 2.6 pH units below that necessary to act as an effective base [13].

His³⁸⁸ and Lys⁵¹⁸ have been identified as being involved in the sugar ring opening process [16,17] and, more recently, this role has been specifically attributed to His³⁸⁸ via a proton transfer to the ring oxygen [2]. Although representing important advances, the structural changes involved in the substrate binding, ring opening and isomerization steps have not been completely described. The determination of the hPGI structure and the analysis described here allowed the identification of structural changes occurring during substrate or inhibitor binding from which we infer some of these missing details.

From the superposition of the hPGI with its sulfate-bound counterpart, it is clear that the entry of a phosphate/sulfate group into the enzyme active site induces an approximately 2.0 Å displacement of loop-A (Fig. 3B and 3C). This movement brings together the elements of the coordination sphere around the phosphate group by binding to Ser¹⁵⁹ and to residues of the flexible loop A. Simultaneously this brings the methyl group of Thr²¹⁴ to an improper distance from the C_{δ1} atom of the Ile¹⁵⁶ side chain (Fig. 3D). The superposition of sulfate-bound human PGI and hPGI illustrates the movement occurring around the χ_1 angle of Ile¹⁵⁶ in order to alleviate this steric impedance (Fig. 3E). In so doing, however, Ile¹⁵⁶ comes too close to His³⁸⁸ (Fig. 3F), forced to rotate approximately 40°

around χ_2 in order to alleviate this steric clash (Fig. 3D). A consequence of this reorientation together with the movement of loop A is to align His³⁸⁸ and Glu²¹⁶, forming a hydrogen bond between N_{ε2} and O_{ε1}. This strong ionic interaction is expected to polarise His³⁸⁸ favouring protonation of N_{δ1}, which is believed to be essential for the first step of catalysis [9].

A similar mechanism for the initial catalytic steps has been described previously, for example, in the case of the enzyme glucosamine-6-phosphate deaminase [16,17]. This enzyme catalyses an identical isomerisation reaction to that of PGI simultaneously coupled to a deamination. The transition between the T and R states of the enzyme involves the formation of a strong salt-bridge between Glu¹⁴⁸ and His¹⁴³, leading to protonation of the latter, preparing it for ring-opening attack on the substrate glucosamine-6-phosphate, similar to that which we propose here for PGI. In the case of the deaminase, movements of the residues participating in the salt-bridge are considerably larger than those seen in PGI. Based on the comparison between the sulfate complex with human PGI and the hPGI, the largest atomic displacements which take place are only 1.5 Å for His³⁸⁸ and 2.2 Å for Glu²¹⁶, illustrating the subtlety of the transition. Nevertheless, this realignment leads to a considerable strengthening of the salt-bridge interaction, as can be seen by the parameters given in Table 2. Using Kabsch and Sander's [18] geometrical estimation for the energy of a hydrogen bond, the energy of this interaction increases over sevenfold as a consequence of structural reorganisation described above.

The hPGI structure shows that all residues proposed to participate in the catalytic mechanism are involved in forming hydrogen bonds to water molecules, indicating that these residues are in a solvent accessible region and that rearrangement of the solvent structure is necessary for catalysis. On the other hand, a consequence of the flipping of the Ile¹⁵⁶ side chain is the release of two such waters (W31 and W1071) hydrogen bonded to the side chains of Asn³⁸⁵ and Thr³⁸⁴. The observed ϕ and ψ angles of Thr³⁸⁴ are located in a disallowed region in the Ramachandran plot (data not shown). This conformation, however, is stabilised by the network of hydrogen bonds between the side chains of Thr³⁸⁴, Asn³⁸⁵, Gly¹⁵⁷ and the water molecules W1071 and W31. The movement of the Ile¹⁵⁶ side chain rearranges

Table 2
Stereochemical parameters for the interaction between His³⁸⁸ and Glu²¹⁶

	Free hPGI ^a	Sulfate hPGI ^b
Distance His ³⁸⁸ N _{ε1} –O _{ε1} Glu ²¹⁶ (Å)	3.15	2.65
Distance His ³⁸⁸ H _{ε1} –O _{ε1} Glu ²¹⁶ (Å) ^c	2.49	1.69
Angle N _{ε1} –H–O _{ε1} (°)	152.4	121.35
His ³⁸⁸ χ_1 (°)	–63	–57
His ³⁸⁸ χ_2 (°)	–56	–97

^a Free active site form of the human PGI.

^b Sulfate bound form of the human PGI.

^c Hydrogen positions calculated using Insight II [19].

this network, altering the position of residues Gly³⁸³ to His³⁸⁸ and placing the His³⁸⁸ side chain in a more favourable orientation, closer to the ring oxygen of the cyclic substrate. This is coupled to the formation of the salt-bridge with Glu²¹⁶ as described above.

It has also been suggested that Lys⁵¹⁸ participates in the ring opening step, although its exact role is unclear. The superposed hPGI, rPGI complexed with F6P and the sulfate-bound human PGI structures (Fig. 2A) shows that the Lys⁵¹⁸ side chain undergoes a major conformational change. This brings it to a position where it would be able to stabilise the hydroxide ion proposed by Lee et al. [7] to abstract the proton of the hydroxyl group on C2 of the substrate necessary for completing the ring opening step. In summary, our data suggest that the active site of the mammalian PGIs requires substrate binding for its complete formation prior to the initiation of catalysis.

Acknowledgements

This work was supported in part by a research grant 98/14979-7 to O.H. Thiemann (FAPESP) and by the National Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Brazil. We wish to thank José Brandão for his technical support during the data collection and the members of the Protein Crystallography and Structural Biology Group (IFSC-USP) for helpful discussions in the course of this work. A.T. Cordeiro, P.H.C. Godoi and C.H.T.P. Silva are FAPESP fellowship awardees.

References

- [1] M.E. Gurney, S.P. Heinrich, M.R. Lee, H.S. Yin, Molecular cloning and expression of neuroleukin, a neurotrophic factor for spinal and sensory neurons, *Science* 234 (1986) 566–573.
- [2] H. Watanabe, K. Takehana, M. Date, T. Shinozaki, A. Raz, Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide, *Cancer Res.* 56 (1996) 2960–2963.
- [3] W. Xu, K. Seiter, E. Feldman, T. Ahmed, J.W. Chiao, The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase, *Blood* 87 (1996) 4502–4506.
- [4] M.A. Baughan, W.N. Valentine, D.E. Paglia, P.O. Ways, E.R. Simons, Q.B. Demarsh, Hereditary hemolytic anemia associated with glucosylphosphate isomerase (GPI) deficiency—a new enzyme defect of human erythrocytes, *Blood* 32 (1968) 249–326.
- [5] J. Read, J. Pearce, X. Li, H. Muirhead, J. Chirgwin, C. Davies, The crystal structure of human phosphoglucose isomerase at 1.6 Å resolution: implications for catalytic mechanism, cytokine activity and haemolytic anaemia, *J. Mol. Biol.* 309 (2001) 447–463.
- [6] C.J. Jeffery, B.J. Bahnson, W. Chien, D. Ringe, G.A. Petsko, Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase, a glycolytic enzyme that moonlights as neuroleukin, autocrine motility factor, and differentiation mediator, *Biochemistry* 39 (2000) 955–964.
- [7] C. Jeffery, R. Hardré, L. Salmon, Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase complexed with 5-phospho-D-Arabinonate identifies the role of Glu357 in catalysis, *Biochemistry* 40 (2001) 1560–1566.
- [8] D. Arsenieva, R. Hardré, L. Salmon, C.J. Jeffery, The crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase complexed with 5-phospho-D-arabinonohydroxamic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2001) 5872–5877.
- [9] J.H. Lee, K.Z. Chang, V. Patel, C.J. Jeffery, Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase complexed with its substrate D-fructose 6-phosphate, *Biochemistry* 40 (2001) 7799–7805.
- [10] A.T. Cordeiro, P.H. Godoi, L.F. Delboni, G. Oliva, O.H. Thiemann, Human phosphoglucose isomerase: expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis, *Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr.* 57 (Pt 4) (2001) 592–595.
- [11] Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* 276 (1997) 307–326.
- [12] J. Navaza, P. Saludjian, AMoRe: an automated molecular replacement program package, *Methods Enzymol.* 276 (1997) 581–594.
- [13] A.T. Brünger, et al., Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr., D* 54 (1998) 905–921.
- [14] T.A. Jones, J.-Y.S.W.C. Zou, M. Kjeldgaard, Improved methods for building protein structures in electron-density maps and the location of errors in these models, *Acta Crystallogr., A* 47 (1991) 110–119.
- [15] I.A. Rose, Mechanism of the aldose–ketose isomerase reactions, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 43 (1975) 491–517.
- [16] G. Oliva, M.R.M. Fontes, R.C. Garratt, M.M. Altamirano, E. Horjales, Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *E. coli* at 2.1 Å resolution, *Structure* 3 (1995) 1323–1332.
- [17] E. Horjales, M.M. Altamirano, M. Calcagno, R. Garratt, G. Oliva, The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase: the structure of the T state at 2.3 Å resolution, *Structure Fold Des.* 7 (1999) 527–537.
- [18] W. Kabsch, C. Sander, Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers* 22 (1983) 2577–2637.

ANEXO II

Leishmania mexicana mexicana glucose-6-phosphate isomerase: crystallization, molecular-replacement solution and inhibition

Artur T. Cordeiro,^a Renaud
 Hardré,^b Paul A. M. Michels,^c
 Laurent Salmon,^b Luis F.
 Delboni^d and Otavio H.
 Thiemann^{a*}

^aLaboratory of Protein Crystallography and
 Structural Biology, Physics Institute of São
 Carlos, University of São Paulo, USP,
 Av. Trabalhador São-carlense 400, PO Box 369,
 13566-590 São Carlos-SP, Brazil, ^bLaboratoire
 de Chimie Bioorganique et Bioinorganique,
 CNRS-UMR 8124, Institut de Chimie
 Moléculaire et des Matériaux d'Orsay,
 Université Paris-Sud XI, 91405 Orsay CEDEX,
 France, ^cResearch Unit for Tropical Diseases and
 Laboratory of Biochemistry, Christian de Duve
 Institute of Cellular Pathology, Avenue
 Hippocrate 74, 1200 Brussels, Belgium, and
^dPontificia Universidade Católica de Minas
 Gerais, Campus de Poços de Caldas, Av. Padre
 Francis Cletus Cox 1661, 37701-355 Poços de
 Caldas-MG, Brazil

Correspondence e-mail: thiemann@ifsc.usp.br

Glucose-6-phosphate isomerase (PGI; EC 5.3.1.9; also often called by its old nomenclature phosphoglucose isomerase) is an intracellular enzyme that catalyses the reversible conversion of D-glucose 6-phosphate (G6P) to D-fructose 6-phosphate (F6P). The native *Leishmania* PGI is a homodimeric molecule of 60 kDa per monomer with 47% sequence identity to human PGI. It has been shown to be present in both the cytosol and the glycosome of *Leishmania* promastigotes and represents a potential target for rational drug design. The present work describes the crystallization of two bacterially expressed *Leishmania* PGI constructs, one corresponding to the natural protein and the other to an N-terminally deleted form. Crystals of both forms are identical and present a large *c* unit-cell parameter. A complete data set was collected from the N-terminally deleted PGI to a resolution of 3.3 Å in space group *P*6₁, with unit-cell parameters *a* = *b* = 87.0, *c* = 354.7 Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$. A preliminary study of the first inhibitors to be evaluated on the *Leishmania* enzyme is also reported.

Received 13 August 2003
 Accepted 17 February 2004

1. Introduction

Glucose-6-phosphate isomerase (PGI; EC 5.3.1.9) is an intracellular enzyme that catalyzes the reversible conversion of D-glucose 6-phosphate (G6P) to D-fructose 6-phosphate (F6P). This isomerization reaction is a common step in the glycolytic, gluconeogenesis and pentose-phosphate pathways.

PGI has been studied in the Kinetoplastida as a potential target for the design of novel inhibitors because of the differences between the host (human) and parasitic glycolytic pathways and the dependence of the parasite on glycolysis. Recently, RNA-interference (RNAi) studies have revealed that decreasing the level of PGI in bloodstream-form *Trypanosoma brucei* PGI results in a 50% growth inhibition (Readmond *et al.*, 2003). This result is indicative of the central role that PGI plays in the parasite metabolism.

In *Leishmania mexicana mexicana* promastigotes, PGI activity is mainly (90%) detected in the cytosol and the remainder is localized to peroxisome-like organelles called glycosomes. The PGI activity in the two compartments could not be attributed to different isoenzymes owing to protein similarity and a single PGI gene is present in the haploid genome (Nyame *et al.*, 1994). Glycosomes are present in all Kinetoplastida and are known to compartmentalize the first seven enzymes of the glycolytic pathway with

important consequences for the regulation of the glycolytic flux (Michels *et al.*, 2000).

PGI catalytic residues are well conserved in *L. mexicana*, *T. cruzi* and *T. brucei* as identified by the alignment of their amino-acid sequences with those of rabbit (Jeffery *et al.*, 2000), pig (Davies & Muirhead, 2002), human (Cordeiro *et al.*, 2003) and *Bacillus* (Sun *et al.*, 1999), the crystal structures of which have been described previously. This pattern of conserved residues suggests that the kinetoplastid PGIs share a common reaction mechanism with other PGIs. Nevertheless, differences can be observed between the mammalian and parasitic enzymes. A detailed comparison of the human and *Leishmania* PGI structures is critical to investigate whether these differences can be exploited in future structure-directed drug design.

In the present work, we describe the first successful expression, crystallization and preliminary X-ray characterization of the *Leishmania* PGI enzyme. For this purpose, two expression constructs were prepared, one containing the full-length gene (*PGI-Lm*) and a second construct (*dPGI-Lm*) in which the 5' end of the gene that codes an N-terminal sequence unique to the *Leishmania* PGI was deleted. Hexagonal crystals with a large *c* unit-cell parameter were obtained and analyzed by X-ray diffraction. The initial phasing data for *dPGI-Lm* were obtained. Additionally, we have compared the inhibitory effects of four

69

phosphorylated compounds on human and *Leishmania* PGIs.

2. Material and methods

2.1. Subcloning *PGI-Lm* and *dPGI-Lm*

The *PGI-Lm* gene in the plasmid pBS1IKS(+) (Stratagene), as previously reported by Nyame *et al.* (1994), was used as starting material for our work. Oligodeoxynucleotide primers for PCR amplification (GIBCO-BRL) introduced *NcoI* and *HindIII* restriction sites at the 5' and 3' ends, respectively (5'-ACGGCCATGGGCGATT-ATTTTCCAAATTGAAG-3' for *NcoI* *PGI-Lm*, 5'-ACGGCCATGGGCGCTGTG-CCTGCGTGG-3' for *NcoI* *dPGI-Lm* and 5'-TCATGCAAAGCTTTTCACAGGTGTGCGCGAG-3' *HindIII* for both constructs, *dPGI-Lm* and *PGI-Lm*) for cloning into pET28a(+) (Novagen). Two separate PCRs were used for the amplification of *PGI-Lm* and *dPGI-Lm*. Both reactions contained 2 pmol of each primer and approximately 50 ng of the pBS1IKS(+) containing the *PGI-Lm* open reading frame. The reactions were performed in a GeneAmp 2400 thermocycler (Perkin-Elmer CETUS) with 2.5 U of AmpliTaq DNA polymerase (Promega) according to the manufacturer's instructions. Each sample was subjected to 2 min denaturation at 367 K followed by 30 cycles of denaturation at 367 K for 0.5 min, annealing at 327 K for 0.5 min and extension at 345 K for 1 min. For each reaction, one DNA fragment of between 1.6 and 2.0 kbp was identified and gel purified with the Concert DNA-purification kit (GIBCO-BRL). Each purified DNA fragment was digested with the restriction enzymes *NcoI* and *HindIII* and ligated into the pET28a(+) vector previously digested with *NcoI* and *HindIII*. *Escherichia coli* BL21(DE3) competent cells were transformed with the products of the ligation reactions. Both cloned amplified forms of the *PGI* gene were sequenced with an ABI377 DNA sequencer to confirm their identity.

Cells from single colonies transformed with distinct vector constructs (*PGI-Lm* and *dPGI-Lm*) were grown overnight at 310 K at 250 rev min⁻¹ in 5 ml LB medium containing 100 µg ml⁻¹ kanamycin. These cultures were used as an inoculum to 250 ml 2×YT media containing 100 µg ml⁻¹ kanamycin and grown at 310 K at 250 rev min⁻¹ until OD_{600 nm} = 0.6. The cultures were then induced for expression of recombinant protein for 4 h with 0.5 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG).

The *E. coli* BL21(DE3) cells were harvested by centrifugation at 6000g for 20 min. The cell pellet was suspended in 5 ml 50 mM HEPES pH 7.5 (buffer A) and cell lysis was obtained by the addition of lysozyme (0.5 mg ml⁻¹) and repeated freeze-thaw cycles. The crude extract was clarified by centrifugation (6000g, 20 min) and brought to 40%(w/v) and 50%(w/v) ammonium sulfate for 30 min with slow agitation at 277 K for *dPGI-Lm* and *PGI-Lm*, respectively. Each suspension was separated by centrifugation at 20 000g for 20 min and the supernatant was submitted to a final precipitation step with 70%(w/v) ammonium sulfate for both *dPGI-Lm* and *PGI-Lm* as described above. Each pellet was suspended in 5 ml buffer A and dialyzed against 250 ml of the same buffer with two buffer exchanges. Both PGI preparations were loaded (in separate runs) onto a 10 ml Q-Sepharose HP column equilibrated with buffer A and eluted in approximately 0.3 M NaCl in a linear gradient of buffer B (buffer A plus 1 M NaCl). Both recombinant *Leishmania* PGI proteins were dialyzed against 25 mM HEPES, 0.15 M NaCl pH 7.5 and applied (in separate runs) to a 115 ml Superdex-200 column equilibrated in the same buffer; the protein elution was checked by 15% SDS-PAGE. Concentration of both PGI forms to 5 mg ml⁻¹ and buffer dilutions were performed by ultrafiltration using Centriprep30 and Centricon10 (Millipore). The isoelectric point for the recombinant PGIs was determined by gel isoelectric focusing in the pH range 3–9 (PhastSystem, Pharmacia).

2.2. Enzyme kinetics

Values of the kinetic parameters K_M and V_{max} were determined using F6P as the substrate at room temperature (298 K) in 100 mM triethanolamine buffer pH 7.6, following the formation of NADPH at 340 nm for 1 min in a coupled assay with glucose-6-phosphate dehydrogenase (Cracey & Tilley, 1975). Four PGI inhibitors analogous to reaction intermediates were evaluated and the measured IC₅₀ values were determined at an F6P concentration of 800 µM for both *Leishmania* and recombinant human PGI.

2.3. Sequence alignment

The amino-acid sequences of *PGI-Lm* (P42861) and its homologues from *T. brucei* (P13377; Marchand *et al.*, 1989) and *T. cruzi* (AAN78341; Andersson *et al.*, 1998) were obtained from the Swiss-Prot/TrEMBL database. Rabbit, human and *B. stearo-*

thermophilus PGI sequences were obtained from the Protein Data Bank (PDB). The sequences were aligned using CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). Further manual refinements were performed to optimize the alignment, taking the predicted secondary structure obtained from the individual polypeptides into consideration. Based on the recently proposed reaction mechanism described for rabbit PGI (Lee *et al.*, 2001; Arsenieva *et al.*, 2002; Jeffery *et al.*, 2001), functional residues were assigned.

2.4. Crystallization, X-ray diffraction data collection and initial phasing

Crystallization conditions for both *dPGI-Lm* and *PGI-Lm* were initially screened by the hanging-drop vapour-diffusion method using the sparse-matrix kits Crystal Screen and Crystal Screen II from Hampton Research at 291 K. 3 µl of protein solution at a concentration of 5 mg ml⁻¹ in 6.25 mM HEPES, 37.5 mM NaCl pH 7.5 was mixed with an equal volume of well solution (0.5 ml per well) to form the drop. Screening different concentrations of precipitating agent and pH values further optimized the initial crystallization conditions. The best crystallization condition for both *PGI-Lm* and *dPGI-Lm* was obtained with a reservoir solution containing 10% polyethylene glycol 6000 (PEG 6000), 0.1 M Bicine pH 9.0 in a drop mounted as described above.

Crystals were mounted in nylon loops (Hampton Research) after quick soaking in a cryoprotectant solution consisting of the reservoir solution and 17.5%(w/v) methyl pentanediol (MPD). A complete data set consisting of 240 frames was collected from a single crystal of *dPGI-Lm* at the Protein Crystallography Beamline at the National Synchrotron Light Laboratory (Polikarpov *et al.*, 1998) using monochromatic X-rays of $\lambda = 1.5450 \text{ \AA}$ at 110 K. The crystal-to-detector distance was 170 mm and each frame was exposed for 40 s with a 0.75° ϕ -angle oscillation. The MOSFLM package (Leslie, 1992) was used for autoindexing, data-collection strategy and image integration. Scaling and merging of reflections was performed using SCALA from the CCP4 package (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994); the Matthews coefficient and solvent content were calculated using the program MATTHEWS_COEF, also from the CCP4 package. A homology-based model for *dPGI-Lm* was obtained from the SWISS-MODEL facility (Vagin & Teplyakov, 1997) using human PGI (PDB code 1jlh; Cordeiro *et al.*, 2001), which has 47.7% sequence

Table 1
IC₅₀ values obtained in inhibition assays of human and *L. mexicana mexicana* PGI.

The inhibitors tested were 5-phospho-D-arabinono-hydroxamic acid (5PAH), 5-phospho-D-arabinonate (5PAA), 5-phospho-D-arabinonamide (5PAAm) and 5-phospho-D-arabinonhydrazide (5PAHz).

Inhibitor	IC ₅₀ (μM)	
	hPGI	PGI-Lm
5PAH	16	50
5PAA	30	30
5PAAm	150	300
5PAHz	360	440

identity. This model was used for initial phasing by molecular replacement performed with the programs *AMoRe* (Navaza, 1997) and *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 1997). With the *AMoRe* routine, 18 887 unique reflections were used in the resolution range 30–3.5 Å; with the *MOLREP* routine, a total of 18 912 unique reflections were used to a maximum resolution of 3.5 Å. Both methods (*AMoRe* and *MOLREP*) resulted in equivalent solutions. Rigid-body and simulated-annealing refinement were performed using *CNS* v.1.1 (Brünger *et al.*, 1998). The program *O* v.8 (Jones *et al.*, 1991) was used to visualize the structure and to plot map files.

3. Results and discussion

3.1. Purification

The two recombinant forms of *L. mexicana mexicana* PGI were purified by similar procedures composed of three steps: selective precipitation by ammonium sulfate, ion-exchange and size-exclusion chromatography. These procedures resulted in approximately 2 mg of pure PGI from a 500 ml culture. Expression of the protein without the N-terminal 48 residues of the wild-type enzyme results in a protein (named dPGI-Lm) that has lower solubility in the presence of ammonium sulfate, a more basic isoelectric point and a tendency to aggregate at concentrations higher than 1 mg ml⁻¹. In the first purification step, concentrations higher than 40%(w/v) ammonium sulfate resulted in the precipitation of dPGI-Lm, while the complete form, PGI-Lm, is soluble at up to 50%(w/v) ammonium sulfate. Isoelectric focusing experiments in the pH range 3–9 resulted in the separation of multiple bands for both PGI forms. The identity of each band was not determined, but since the preparation was of high purity we speculate that the pattern of band separation in the IEF experiment arises from different quaternary

conformations. We observed that the bands of PGI-Lm are spread over the pH range 5.2–5.8, while dPGI-Lm migrates as two bands at pH 6.0 and 6.4. This difference can be attributed to the elimination of the charged amino acids located in the N-terminus of PGI-Lm. The slightly acidic pI of 6.6 previously calculated from the amino-acid sequence (Nyame *et al.*, 1994) is thus confirmed by our experimental results. A tendency to form aggregates at concentrations higher than 1 mg ml⁻¹ was only observed for dPGI-Lm. Although part of the purified dPGI-Lm was lost during concentration, it was possible to obtain a solution at 5 mg ml⁻¹ that was suitable for crystallization experiments.

3.2. Enzyme kinetics and inhibitor assays

The enzyme-kinetic experiments performed on both forms (PGI-Lm and dPGI-Lm) indicate that the specific activity of the N-terminally abbreviated enzyme (450 U mg⁻¹) is not altered compared with that of the full-length form. Moreover, dPGI-Lm seems to crystallize with a better

intrinsic order than PGI-Lm (see §3.4), suggesting that a disordered conformation of the N-terminal sequence affects the crystal packing.

Under our conditions, the kinetic parameters of PGI-Lm differ significantly from those of the recombinant human PGI when using F6P as the substrate. The human PGI has *K_M* and *V_{max}* values of 99 μM and 22 μM min⁻¹, respectively, while the *K_M* and *V_{max}* values for recombinant PGI-Lm are 242 μM and 80 μM min⁻¹, respectively. This may be a consequence of the natural pH range for both enzymes. The human PGI has a peak activity at physiological pH (close to 7.5), while for the *Leishmania* enzyme this value is more basic (between 8 and 9; Nyame *et al.*, 1994).

Four competitive inhibitors are known for *T. brucei*, *B. stearotherophilus*, yeast and/or rabbit muscle PGIs (Chirgwin & Noltmann, 1975; Hardré *et al.*, 1998, 2000; Hardré & Salmon, 1999). These inhibitors, namely 5-phospho-D-arabinonohydroxamic acid (5PAH), 5-phospho-D-arabinonate (5PAA), 5-phospho-D-arabinonamide (5PAAm) and 5-phospho-D-arabinonhydrazide (5PAHz),

Figure 1
The top part of the figure represents a general view of the alignment of several PGIs of known three-dimensional structure [rabbit PGI (PDB code 1koj), human PGI and *B. stearotherophilus* PGI (PDB code 2pgi)] aligned with the *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi* sequences. The position of conserved regions is indicated by boxes marked A–G. Those regions (A–G) are shown in more detail in the lower part.

were evaluated on the recombinant human and *L. mexicana mexicana* PGIs for comparative purposes (Table 1). To our knowledge, these compounds represent the first inhibitors to be evaluated on *L. mexicana mexicana* PGI. SPAH and SPAA have the highest IC₅₀ values for both enzymes. Consistent with previously reported inhibition studies on the other PGIs, SPAA and SPAH behave as intermediate analogues of the isomerization reaction catalyzed by both the parasitic and human enzymes. In contrast, the IC₅₀ values for SPAAm and SPAHz may indicate that these two compounds instead act as substrate-analogue inhibitors. Also, none of the four inhibitors show significant selectivity for the parasitic enzyme, a result consistent with the conserved active site as inferred from the sequence alignment. Furthermore, high-resolution crystal structures of PGIs in complex with the transition-state analogues SPAA (Chou *et al.*, 2000; Jeffery *et al.*, 2001; Davies & Muirhead, 2002; Swan *et al.*, 2003) and SPAH (Arsenieva *et al.*, 2002) highlight the structural conservation of the active-site region between those enzymes, except for *Pyrococcus furiosus* PGI (Swan *et al.*, 2003). Obviously, differences between the parasitic and human enzymes other than the active site would need to be taken into account for the further development of molecules of therapeutic interest. Nevertheless, these new inhibitors of the parasitic enzyme, especially SPAH and SPAA, can be considered as valuable tools for the future design of species-specific inhibitors of *Leishmania* PGI.

3.3. Sequence alignment

The multiple sequence alignment of PGI-Lm and its homologues adjusted with information from the available three-dimensional structures permitted the identification of highly conserved regions (illustrated as grey boxes in Fig. 1). Box A shows

Table 2
Statistics of the data set obtained from a single dPGI-Lm crystal and processed with SCALA.

Shell resolution (Å)	Reflections	Completeness (%)	Multiplicity	R _{sym}	⟨I⟩	I/σ(I)
10.55	727	99.5	9.9	0.07	252	7.8
7.46	1284	100	9.8	0.08	203	4.7
6.09	1674	100	7.7	0.12	73	5.8
5.28	1957	99.8	6.4	0.13	67	5.2
4.72	2198	99.5	5.5	0.12	90	5.9
4.31	2416	99.2	5.1	0.13	81	5.1
3.99	2642	99.2	5.1	0.16	65	4.1
3.73	2832	99.1	5.3	0.22	45	3.1
3.52	3010	98.9	5.3	0.3	33	2.4
3.34	2806	88.2	3.9	0.48	20	1.5
Overall	21546	97.7	5.8	0.13	20.5	4.1

the N-terminal sequence that is restricted to Kinetoplastida. Boxes B and C show the regions next to the active site containing functional residues that are associated with the coordination of the substrate phosphate group in rabbit PGI (Lee *et al.*, 2001). Box D highlights a conserved peptide containing an arginine residue that acts like an anchor, stabilizing the non-reactive substrate analogue 6-phospho-D-gluconate (Jeffery *et al.*, 2000). In the presence of the substrate this arginine stabilizes the transient charge of a glutamic acid (in box E) during the isomerization step (Lee *et al.*, 2001). A histidine (box F) and lysine (box G) act in the ring-opening step prior to the isomerization step (Lee *et al.*, 2001).

3.4. Crystallization, data collection and initial phasing

Crystals of both forms of *Leishmania* PGI have the same morphology. They grow as bipyramids with a hexagonal base and tend to be longer when grown using PEG 6000 concentrations of higher than 12.5% (Fig. 2). Comparing the diffraction pattern of crystals from both *Leishmania* PGI constructs grown under equivalent conditions, we realised that the crystals of dPGI-Lm presented a better intrinsic order, resulting in a larger number of reflections in the higher resolution shells,

better defined reflection spots and a higher signal-to-noise ratio compared with the full-length PGI-Lm crystals. Although data from both crystals could be indexed, only the dPGI-Lm data resulted in a complete data set with acceptable statistical parameters. The crystals of both PGI-Lm and dPGI-Lm were best described by the primitive hexagonal crystalline system, with unit-cell parameters $a = b = 87.0$, $c = 354.7$ Å, $\alpha = \beta = 90$, $\gamma = 120^\circ$. In order to avoid overlaps in the spots, we tried to orient the crystal c axis perpendicularly to the direction of the X-ray beam and parallel to the φ rotation direction and set the crystal-to-detector distance to 170 mm. At this distance, the maximum resolution at the border of the detector was 3.3 Å (Fig. 3). Integrating and merging of 240 frames produced a total of 21 546 unique reflections in the resolution range 74.5–3.3 Å. A more detailed analysis of the reflection quality by resolution shell is presented in Table 2.

The autoindexing routine of the *MOSFLM* program suggested a primitive hexagonal lattice for the dPGI-Lm crystal. The observed multiplicity of 6 for the 00/ reflections is associated with a screw axis (6,

Figure 2
Crystals obtained from the dPGI-Lm constructs. These crystals were grown at pH 9.0 in 100 mM Bicine buffer and different concentrations of PEG 6000: (a) 10, (b) 12.5 and (c) 15%(w/v).

Figure 3
Diffraction image of PGI-Lm crystal on a MAR CCD detector.

or 6₅) and removed any possibility of a primitive trigonal group. Reasonable values of the Matthews coefficient (3.2 Å³ Da⁻¹) and solvent content (61.6%) are predicted for a homodimer of dPGI-Lm in the asymmetric unit of space group P6₁ or P6₅. The application of molecular-replacement procedures for both possibilities indicated P6₁ to be the correct space group.

Initial phasing for one homodimer in space group P6₁ was performed separately using the *MOLREP* and *AMoRe* programs, resulting in equivalent solutions for the rotation and translation functions. The three highest *AMoRe* solution peaks present correlation coefficients of 50.4, 33.5 and 33.7. The highest peak is clearly a distinct solution described by rotational and translational vectors of 313.1, 113.9, 12.3 (Euler angles ϕ , θ , ψ) and 13.9, 42.0, 1.4 (x , y , z), respectively. Rigid-body and initial simulated-annealing refinement resulted in a dimer of dPGI-Lm in the asymmetric unit with an R factor of 0.27 and an R_{free} of 0.33. Continuous electron density is visible for all backbone atoms, allowing the orientation of inserted loops in dPGI-Lm that do not exist in the mammalian PGI structures. Future efforts will be made to grow crystals with better intrinsic order and higher resolution.

This work was supported in part by research grants 98/14979-7 from FAPESP and 478127/01-4 from CNPq to OHT. ATC is

the recipient of a FAPESP student fellowship (Project No. 00/14960-6). We would like to thank the members of the Protein Crystallography and Structural Biology Group (IFSC-USP) for helpful discussions during the course of this work.

References

- Andersson, B., Aslund, L., Tammi, M., Tran, A. N., Hoheisel, J. D. & Pettersson, U. (1998). *Genome Res.* **8**, 809–816.
- Arsenieva, D., Hardré, R., Salmon, L. & Jeffery, C. J. (2002). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 5872–5877.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). *Acta Cryst. D* **54**, 905–921.
- Chirgwin, J. M. & Noltmann, E. A. (1975). *J. Biol. Chem.* **250**, 7272–7276.
- Chou, C.-C., Sun, Y. J., Meng, M. & Hsiao, C.-D. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 23154–23160.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst. D* **50**, 760–763.
- Cordeiro, A. T., Godoi, P. H., Delboni, L. F., Oliva, G. & Thiemann, O. H. (2001). *Acta Cryst. D* **57**, 592–595.
- Cordeiro, A. T., Godoi, P. H. C., Silva, C. H. T. P., Garratt, R. C., Oliva, G. & Thiemann, O. H. (2003). *Biochim. Biophys. Acta*, **1645**, 117–122.
- Cracey, R. W. & Tilley, B. E. (1975). *Methods Enzymol.* **41**, 392–400.
- Davies, C. & Muirhead, H. (2002). *Proteins Struct. Funct. Genet.* **50**, 577–579.
- Hardré, R., Bonnette, C., Salmon, L. & Gaudemer, A. (1998). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 3435–3438.
- Hardré, R. & Salmon, L. (1999). *Carbohydr. Res.* **318**, 110–115.
- Hardré, R., Salmon, L. & Oppendoes, F. R. (2000). *J. Enzyme Inhib.* **15**, 509–515.
- Jeffery, C. J., Bahnson, B. J., Chien, W., Ringe, D. & Petsko, G. A. (2000). *Biochemistry*, **39**, 955–964.
- Jeffery, C. J., Hardré, R. & Salmon, L. (2001). *Biochemistry*, **40**, 1560–1566.
- Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). *Acta Cryst. A* **47**, 110–119.
- Lee, J. H., Chang, K. Z., Patel, V. & Jeffery, C. J. (2001). *Biochemistry*, **40**, 7799–7805.
- Leslie, A. G. W. (1992). *Int. CCP4/ESF-EAMCB Newsl. Protein Crystallogr.* **26**, 27–33.
- Marchand, M., Kooistra, U., Wierenga, R. K., Lambeir, A. M., Van Beeumen, J., Oppendoes, F. R. & Michels, P. A. (1989). *Eur. J. Biochem.* **184**, 455–464.
- Michels, P. A. M., Hannaert, V. & Bringaud, F. (2000). *Parasitol. Today*, **16**, 482–489.
- Navaza, J. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 581–594.
- Nyame, K., Do-Thi, C.-D., Oppendoes, F. R. & Michels, P. A. M. (1994). *Mol. Biochem. Parasitol.* **67**, 269–279.
- Polikarpov, I., Perles, L. A., de Oliveira, R. T., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt, R. C. & Craievich, A. (1998). *J. Synchrotron Rad.* **5**, 72–76.
- Readmond, S., Vadivelu, J. & Field, M. C. (2003). *Mol. Biochem. Parasitol.* **128**, 115–118.
- Sun, Y. J., Chou, C. C., Chen, W. S., Wu, R. T., Meng, M. & Hsiao, C. D. (1999). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 5412–5417.
- Swan, M. K., Solomons, J. T. G., Beeson, C. C., Hansen, T., Schönheit, P. & Davies, C. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 47261–47281.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022–1025.

REFERÊNCIAS

- [1] Davies, C.R., Kaye, P. Croft, S.L. & Sundar, S. (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. *B.M.J.* **326**, 377-382.
- [2] Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *The Lancet*, **354**, 1191-1199.
- [3] <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>
- [4] Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Fund. Nac. de Saúde. (2000). Brasília/DF.
- [5] Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde/SVS/DVP. (2003), Brasília/DF.
- [6] Antoine, J., Prina, E. Lang, T. & Courret, N. (1998). The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends in Microbiology*, **7**, 392- 400.
- [7] Burchmore, R.J.S. & Barrett, M.P. (2001) Life in vacuoles - nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Inter. Jour. for Parasit.*, **31**, 1311-1320.
- [8] Domínguez, M., Moreno, I., Aizpurua, C. & Toranõ, A. (2003). Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes and Infection*, **5**, 507-513.
- [9] Sacks, D. & Sher, A. (2002) Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunology*, **3**, 1041-1047.
- [10] Handman, E. & Bullen, D. (2002) Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in parasitology*, **18**, 332-334.
- [11] Cunningham, A. (2002) Parasitic Adaptive Mechanism in infection by *Leishmania*. *Exp. and Mol. Pathology*, **72**, 132-141.
- [12] Rittig, M.G. & Bogdan, C. (2000). *Leishmania*-host-cell interactions : complexities and alternative views. *Parasitology Today*, **16**, 292-297.
- [13] Croft, S. & Coombs, G. (2003). Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, **19**, 502- 508.

- [14] Croft, S. (2001). Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop. Med. and Inter. Health*, **6**, 899-905.
- [15] Trouiller, P., Torreele, E., Olliaro, P., White, N., Foster, S., Wirth, D. & Pécou, B. (2001). Drugs for neglected diseases: a failure of the market and public health failure? *Trop. Med. and Inter. Health*, **6**, 945-951.
- [16] Watkins, B. M. (2003). Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development. *Trends in Parasitology*, **11**, 447-448.
- [17] Hannaert, V. Bringaud, F. Opperdoes, F. & Michels, P. (2003). Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol. Dis.*, **2**, 11-41.
- [18] Cowman, A. & Crabb, B. (2003) Functional genomics: identifying drug targets for parasitic diseases. *Trends in Parasitology*, **19**, 538-543.
- [19] Ullu, E. Djikeng, A. Shi, H. & Tschudi, C. (2002). RNA interference: advances and questions. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* , **357**, 65-70.
- [20] Michels, P.A.M.; Hannaert, V. & Bringaud, F. (2000) Metabolic aspects of glycosomes in Trypanosomatidae - new data and views. *Parasitol. Today*, **16**, 482-489.
- [21] Verlinde, C.L.M.J.; Hannaert, V.; Blonski, C.; Willson, M.; Périe, J.J.; Fothergill-Gilmore, L.A.; Opperdoes, F.R.; Gelb, M.H.; Hol, W.G.J. & Michels, P.A.M. (2001) Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist. Updates*, **4**, 50-65.
- [22] Barrett, M.P. (1997) The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitol Today*, **13**, 11-16.
- [23] Barrett, M.P. and Gilbert, I.H. (2002) Perspectives for new drugs against trypanosomiasis and leishmaniasis, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2**, 471-482.
- [24] Chudzik, D., Michels, P., Walque, S. & Hol, W. (2000). Structure of type 2 peroxisomal targeting Signals in two trypanosomatid aldolase. *J. M. B.* **300**, 697-707.

- [25] Mooyersoer, J., Choe, J., Kumar, A., Voncken, F., Hol, W. & Michels, P (2003). Characterization of *Trypanosoma brucei* PEX14 and its role in the import of glycosomal matrix proteins. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2059-2067.
- [26] Michels, P., Hannaert, V. & Bringaud, F. (2000). Metabolic Aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. *Parasitology Today*, **16**, 482-489.
- [27] Parson, M., Furuya, T., Pal, S., & Kessler, P. (2001). Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol. Biochem. Paras.*, **115**, 19-28.
- [28] Bakker, B., Mensonides, F., Teusink, B. Hoek, P., Michels, P. & Westerhoff, H. (2000). Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *P.N.A.S.* **97**, 2087-2092.
- [29] Bakker, B., westerhoff, H. Oppendoes, F. & Michels, P. (2000). Metabolic control of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Mol. Biochem. Paras.* **106**, 1-10.
- [30] Verlinde, C.L.M.J.; Hannaert, V.; Blonski, C.; Willson, M.; Périe, J.J.; Fothergill-Gilmore, L.A.; Oppendoes, F.R.; Gelb, M.H.; Hol, W.G.J. & Michels, P.A.M. (2001) Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist. Updates*, **4**, 50-65.
- [31] Nyame, K; Do-Thi, C.D.; Oppendoes, F.R. & Michels, P.A.M. (1994) Subcellular distribution and characterization of glucosephosphate isomerase in *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*, **67**, 269-279.
- [32] Jeffery, C. J., Bahnson, B. J., Chien, W., Ringe, D. & Petsko, G. A. (2000). Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase, a glycolytic enzyme that moonlights as neuroleukin, autocrine motility factor, and differentiation mediator. *Biochemistry*. **39**, 955-964.
- [33] Davies, C., Muirhead, H. (2002) Crystal structure of phosphoglucose isomerase from pig muscle and its complex with 5-phosphoarabinonate. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **4**, 577-579.
- [34] Cordeiro, A.T; Godoi, P.H.C.; Silva, C.H.T.P.; Garratt, R.C.; Oliva, G. & Thiemann, O.H. (2003) Crystal structure of human phosphoglucose isomerase and analysis of the initial catalytic steps. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1645:117-122.

- [35] Sun, Y., Chou, C., Chen, W., Wu R., Meng, M. & Hsiao, C.(1999). The crystal structure of a multifunctional protein: phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin. *P.N.A.S.*, **96**, 5412-5417.
- [36] Redmond, S., Vadivelu, J. & Field, M. (2003). RNAit: an automated web-based tool for the selection of TNAi targets in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **128**, 115-118.
- [37] <http://www.trypanofan.org> ; código de busca, Tb927.1.3830
- [38] Marchand, M., Kooystra, U., Wierenga, R.K., Lambeir, A.M., van Beeumen, J., Oppendoes, F.R. & Michels, P.A.M. (1989).Glucosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*. Cloning and characterization of the gene and analysis of the enzyme.*Eur. J. Biochem.* **184**,455-464.
- [39] Andersson, B. & Bontempi, E.J. (2002). Large scale sequencing of *Trypanosoma cruzi* chromosome 3. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases
- [40] Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J.(1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressivemultiple sequence lignment through sequence weighting,position-specific gap penalties and weight matrix choice.*Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- [41] Lee, J.H.; Chang, K.Z.; Patel, V. & Jeffery, C.J. (2001). Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase complexed with its substrate D-fructose 6-phosphate. *Biochemistry*, **40**, 7799-7805.
- [42] Jeffery, C.; Hardré, R. & Salmont, L. (2001). Crystal Structure of rabbit phosphate isomerase complexed with 5-phospho-D-arabinonate identifies the role of Glu357 in catalysis. *Biochemistry*, **40**:1560-1566.
- [43] Arsenieva, D.; Hardré, R.; Salmon, L. & Jeffery, C. (2002) The crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase complexed with 5-phospho-D-arabinonohydroxamic acid. *P.N.A.S.*, **99**(9):5872-5877.
- [44] Cracey, R. W. & Tilley, B. E. (1975). Phosphoglucose isomerase of human erythrocytes and cardiac tissue. *Methods Enzymol.*; **41**, 392-400.

- [45] Leslie, A. G. W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography, Number 26.
- [46] Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst. D*, **50**, 760-763.
- [47] Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- [48] Navaza, J. & Saludjian, P. (1997) AMoRe: an automated molecular replacement program package. *Methods Enzymology*, **276**, 581-594.
- [49] Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- [50] Brunger, A.T. et al (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D*, **54**,: 905-921.
- [51] Jones, T. A.; Zou, J.-Y.; Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein structures in electron-density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst. A*. **47**, 110-119.
- [52] Laskowski, R., Moss, D. & Thornton, J. (1993). Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J.M.B.* **231**, 1049-1067.
- [53] 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.
- [54] Cordeiro AT, Godoi PH, Delboni LF, Oliva G and Thiemann OH (2001). Human phosphoglucose isomerase: expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis. *Acta Crystallogr D*. **57**(Pt 4):592-5.
- [55] Nicholls, A., Sharp, K. & Honig, B.(1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins*, **11**, 281-296.
- [56] DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.

- [57] Hardré, R., Bonnette, C., Salmon, L. & Gaudemer, A. (1998). Competitive inhibitors of yeast phosphoglucose isomerase: synthesis and evaluation of new types of phosphorylated sugars from the synthon D-arabinolactone-5-phosphate. *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, 8: 3435-3438
- [58] Arsenieva, D. & Jeffery, C. (2002). Conformational changes in phosphoglucose isomerase induced by ligand binding. *J.M.B.* **323**, 77-84.
- [59] Read, J., Pearce, J., Li, X., Muirhead, H., Chirgwin, J. & Davies, C. (2001) The crystal structure of human phosphoglucose isomerase at 1.6 Å resolution: implications for catalytic mechanism, cytokine activity and haemolytic anaemia. *J.M.B.* **309**, 447-463.