Adenilosuccinato Liase (ADSL) de Leishmania major Friedlin: sua relevância na via de recuperação de purino - nucleotídeos”

Monique Mantovani

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências “Física Aplicada - Opção Física Biomolecular”

Orientador: Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann

São Carlos

2006

OK

IFSC - SBI
CLASS.....
CUTTER.....
TOMBO.....

Mantovani, Monique

"Adenilosuccinato Liase (ADSL) de Leishmania major Friedlin: sua relevância na via de recuperação de purino - nucleotídeos"

Monique Mantovani – São Carlos, 2006

Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2006

Páginas: 194

Área: Física Aplicada – Opção Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann

1. Adenilosuccinate Liase; 2. Biologia molecular; 3. Biologia estrutural

I. Título

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE MONIQUE MANTOVANI APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 28/11/2006.

COMISSÃO JULGADORA:

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

Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo – IFSC/USP

Prof. Dr. Wim Maurits Degrave – FIOCRUZ

Profa. Dra. Glória Regina Franco – UFMG

Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa – LNLS

Aos meus pais, Nivaldo e Ivone
Com todo meu amor e minha gratidão

AGRADECIMENTOS

Foram muitas as pessoas e instituições que me auxiliaram no decorrer deste trabalho, às quais eu gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann, pelo apoio e pela confiança em mim depositada, mas principalmente por ser uma excelente pessoa e um exemplo de pesquisador e orientador a ser seguido. É muito difícil expressar com palavras minha gratidão pela oportunidade de ter sido sua orientada.

Ao Grupo de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural, ao Centro de Biotecnologia Molecular e Estrutural (CBME - CEPID/FAPESP) e ao Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada, da Universidade de São Paulo (USP -Campus São Carlos), pela oportunidade para a realização do meu doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo nº 01/10216-3) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos auxílios financeiros.

Ao Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) e aos membros da Linha CPR, pelos serviços prestados aos usuários.

À Eurofarma pela oportunidade de emprego; em especial aos amigos do grupo de Biotecnologia- Vanda, Cecília, Renata, Patrícia, Kátia, Thiago e Eric- pelo apoio e incentivo nos momentos finais.

Aos professores do Grupo de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural, Profa. Dra. Yvonne Primerano Mascarenhas, Prof. Dr. Eduardo Ernesto Castellano, Prof. Dr. Glaucius Oliva, Prof. Dr. Richard Charles Garratt, Prof. Dr. Igor Polikarpov, Prof. Dr. Javier Alcides Ellena, Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo e aos demais professores da Pós-Graduação do IFSC, pelas valiosas contribuições e ensinamentos que contribuíram para a minha formação e para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. David A. Campbell, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Genética da University of California, Los Angeles – UCLA, pela colaboração e possibilidade de fazer um estágio de 3 meses em seu laboratório e aos membros do grupo que sempre foram muito prestativos. Gostaria também de

agradecer aos amigos Taboca, Thiago, Helena, Augusto, Patrícia e Clarinha, por tornarem minha estadia em Los Angeles divertida.

À Profa. Dra. Ângela K. Cruz, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos – FMRP (USP), pela colaboração e chance de realizar alguns experimentos em seu laboratório. Agradeço também aos alunos do grupo e ao Dr. André L. Pedrosa que foi quem mais me auxiliou.

Ao Prof. Dr. Lewis Joel Greene, do Centro de Química de Proteínas da Escola de Medicina de Ribeirão Preto (USP), pelo sequenciamento do N-terminal.

À Profa. Dra. Heloisa Araújo, do Departamento de Ciências Fisiológicas - Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pelos experimentos de produção de anticorpos e sequenciamento do N-terminal.

Ao Prof. Dr. Flavio H. da Silva, do Departamento de Genética e Evolução - Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), que me indicou e apresentou aos pesquisadores do Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural. Aproveito para agradecer sua família Terumi, Gui e Marina pela amizade.

Aos membros da banca examinadora por se disporem a ler este trabalho e pelas contribuições.

À Profa. Dra. Ana Paula, à Profa. Dra. Dulce e à Dra. Maria por participarem da banca do exame de qualificação, pelas contribuições e também pela amizade.

Às secretárias da Pós-Graduação, Samira, Cristiane e Wladerez e ao pessoal que fez ou faz parte da secretaria do nosso grupo, Maria Helena, Jaciara, Fernando, Luciana e Fernanda, por todos os auxílios prestados.

Aos técnicos do nosso laboratório Augusto, Geraldo, Bianca, Beth e Susana e também aos da biofísica Beto, Bel e Andressa, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Às amigas Celina, Susana e Elisandra, pela amizade e receptividade que no início facilitaram minha adaptação ao grupo e ao laboratório.

Aos amigos Arthur, Marcão, Humberto e André Ambrósio, pela ajuda em testar, congelar e coletar dados dos primeiros cristais.

Ao Hamilton e ao Frederico por coletarem dados no APS (Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory USA) e ao Mario Sanches por coletar os dados do cristal de gadolínio no LNLS.

À Dra. Raquel K. Bugs, que no início nos auxiliou no manuseio do equipamento de DLS.

Ao Mario de Oliveira Neto, pelas análises de SAXS.

Ao Ricardo, à Natália e à Jaqueline, pela colaboração nos estudos da ADSL humana. Em particular à Jaque, por sua amizade e pela oportunidade de “tentar” orientar.

Ao Eli e ao Mineiro, pela ajuda durante a rotina do laboratório.

Ao João e à Sandra M., pela amizade e companhia extralaboratório, durante as aulas da Beatrice.

Aos queridos amigos e excelentes cristalógrafos Dr. Ronaldo Nagem e Dra. Adriana Rojas, por “adotarem” a ADSL, pela amizade que se originou desta colaboração e, particularmente, por não terem desistido e sim acreditado que a estrutura seria resolvida. Vocês merecem todo o mérito.

Aos amigos Ney, Sandra M., Rafael (Caqui), Ricardo (Nico), Rodrigo Portugal, Elisandra e Adriana, que mesmo ocupados, sempre dispunham de algum tempo para me auxiliar na confecção final da tese, seja enviando os artigos, lendo os capítulos, discutindo os resultados ou na impressão dos exemplares. Valeu!

A todos os amigos que fazem ou fizeram parte do nosso grupo – André “Diabão”, André Coelho, Adriana “Rolhas”, Aderson, Alexandre “Vermão”, Alécio, Antonio, Arthur, Castilho, Cer, Sur, Lir, Claudia Munte, Claudia Alves, Caqui, Humberto, Hannes, Maurício, Ney, Maria, Rodrigo “Portuga”, Nádia, Lucas, Alessandro, Napola, Carol Guzzi, Carol “Chatinha”, Carol “Gatinha”, Sandra K., Sandra M., Sandra Cruz, João, Fabão, Stefano, pH, Peninha, Pavão, Diet, Aparício, Hamilton, Márcio, Fred, Marcão, Mario Sanches, Mario “Minimi”, Renata, Raquel, Ronaldo, Jaque, Tavinho, Reinaldo, Aline, Naná, Fer, Mamé, Ana Letícia, Dani, Wânus e aos que talvez eu tenha esquecido de mencionar o nome – pela agradável convivência.

Às companheiras de “república” Lu, Tati, Val, Déb e Claudia, por fazerem do nosso lar um lugar aconchegante durante os anos que moramos juntas, pela amizade, pelos momentos de diversão e também por me “escutarem” quando precisei.

Aos amigos César, Déia, Luiz e Érica, pela amizade, companhia e pelos churrascos.

À família Biajiz: Célia, Mauro e Ana Clara, por sempre me acolherem fazendo com que eu me sinta em casa e pela preciosa amizade, que palavras não expressariam sua importância para mim.

Ao amigo da família Ari, pela inesgotável ajuda em vários momentos.

À minha amada família, meus pais Nivaldo e Ivone, vovó Mariquita, irmãos Marcelo e Maurício, cunhadas Eliana e Vera, sobrinhos Giovanna, Larissa, Marcella e Mauricinho, pela constante presença, dedicação e por nunca medirem esforços durante minha formação pessoal e profissional.

Ao Marcos, meu companheiro, meu amigo, meu amor, por ter me apoiado quando decidi fazer o doutorado na USP, por me incentivar nas minhas decisões, por compartilhar comigo todos os momentos e acima de tudo por sua lealdade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
 CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO.....	 01
1. MOTIVAÇÃO.....	02
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1 Leishmaniose.....	04
2.1.1 <i>Agente etiológico, formas clínicas e distribuição global da doença.....</i>	<i>04</i>
2.1.2 <i>Diagnóstico, Ciclo de vida e Transmissão.....</i>	<i>10</i>
2.1.3 <i>Tratamento e Prevenção.....</i>	<i>13</i>
2.1.4 <i>Enzimas do metabolismo de purino-nucleotídeos como potenciais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos contra leishmaniose.....</i>	<i>19</i>
2.2 A enzima Adenilossuccinato Liase (ADSL).....	25
3. OBJETIVOS.....	28
 CAPÍTULO II: VALIDAÇÃO GENÉTICA DA ENZIMA ADSL – EXPERIMENTOS DE RNAi EM Trypanosoma brucei.....	 29
1. INTRODUÇÃO.....	30
1.1 RNA de interferência – RNAi.....	30
1.1.1 <i>Definição de RNAi.....</i>	<i>30</i>
1.1.2 <i>Descoberta do RNAi.....</i>	<i>30</i>
1.1.3 <i>Mecanismo de RNAi.....</i>	<i>31</i>
1.1.4 <i>Aplicações de RNAi.....</i>	<i>33</i>
1.1.6 <i>RNAi em Trypanosoma brucei.....</i>	<i>35</i>
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 Amplificação do gene <i>adsl-Tb</i> e clonagem no vetor pGEM-T.....	38

2.2 Subclonagem do gene <i>adsl-Tb</i> em vetor apropriado para RNAi: construção pZJM/ <i>adsl-Tb</i>	40
2.3 Cultivo de células de <i>Trypanosoma brucei</i> da linhagem 29-13.....	41
2.4 Transfecção de células de <i>Trypanosoma brucei</i> da linhagem 29-13.....	44
2.5 Indução de RNAi da construção pZJM/ <i>adsl-Tb</i>	47
2.6 Análise da indução de RNAi por contagem de células e RT-PCR (“Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction”).....	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.1 Amplificação do gene <i>adsl-Tb</i> e clonagem no vetor pGEM-T.....	50
3.2 Subclonagem do gene <i>adsl-Tb</i> em vetor apropriado para RNAi: construção pZJM/ <i>adsl-Tb</i>	41
3.3 Transfecção de células de <i>Trypanosoma brucei</i> da linhagem 29-13.....	46
3.4 Indução de RNAi da construção pZJM/ <i>adsl-Tb</i>	56
3.5 Análise da indução de RNAi por contagem de células e RT-PCR.....	56
3.5.1 Padronização da reação de RT-PCR utilizando-se a linhagem selvagem de <i>T. brucei</i> 29.13.....	57
3.5.2 Aplicação da reação de RT-PCR para as amostras de culturas de <i>T. brucei</i> 29.13 pZJM/ADSL- <i>Tb</i> induzidas e não induzidas.....	59
 CAPÍTULO III: CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE <i>adsl-Lm</i>	63
1. INTRODUÇÃO SOBRE AS METODOLOGIAS UTILIZADAS.....	64
1.1 Clonagem do gene <i>adsl-Lm</i> em vetor de expressão apropriado.....	64
1.2 Caracterização molecular do gene <i>adsl-Lm</i>	65
1.2.1 Experimentos de eletroforese em campo pulsado “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE) e “Southern blot”.....	65
1.2.2 Caracterização das regiões 5’ e 3’ não traduzidas (UTRs) do gene <i>adsl-Lm</i> através de RT-PCR.....	67
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1 Amplificação do gene <i>adsl-Lm</i> e clonagem no vetor de expressão PCR T7/TOPO.....	68
2.2 Caracterização molecular do gene <i>adsl-Lm</i>	70

2.2.1 Experimentos de “Pulse Field Gel Electrophoresis” (PFGE) e “Southern blot”.....	70
2.2.2 Caracterização das regiões 5’ e 3’ não traduzidas (UTRs) do gene <i>adsl-Lm</i> através de RT-PCR.....	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
3.1 Amplificação do gene <i>adsl-Lm</i> e clonagem no vetor de expressão PCR T7/TOPO.....	75
3.2 Caracterização molecular do gene <i>adsl-Lm</i>.....	79
3.2.1 Experimentos de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e “Southern blot”.....	79
3.2.2 Caracterização das regiões 5’ e 3’ UTRs do gene <i>adsl-Lm</i>	80
 CAPÍTULO IV: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DA ENZIMA ADSL-LM.....	85
 1. INTRODUÇÃO SOBRE AS METODOLOGIAS UTILIZADAS.....	86
1.1 Complementação funcional.....	86
1.2 Expressão da enzima recombinante ADSL-Lm em células de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	86
1.3 Purificação da enzima recombinante ADSL-Lm.....	87
1.4 Caracterização bioquímica e estrutural da enzima recombinante ADSL-Lm.....	88
1.4.1 Determinação do peso molecular da ADSL-Lm por cromatografia de exclusão molecular, espalhamento dinâmico de luz e eletroforese em gel nativo.....	88
1.4.2 Determinação do ponto isoelétrico (pI) da ADSL-Lm.....	90
1.4.3 Ensaio de atividade enzimática da ADSL-Lm.....	91
1.4.4 Cristalização da proteína ADSL-Lm.....	93
1.4.5. Coleta, processamento de dados de difração de raios-X e obtenção das fases.....	98
1.4.6 Refinamento do modelo.....	101
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	103
2.1 Complementação funcional.....	103

2.2 Transformação em células competentes de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)pLysS e ensaios de expressão.....	107
2.3 Expressão da enzima ADSL-Lm.....	108
2.4 Purificação da enzima ADSL-Lm.....	110
2.5 Caracterização bioquímica e estrutural da enzima recombinante ADSL-Lm.....	111
2.5.1 <i>Determinação da massa molecular da ADSL-Lm por cromatografia de exclusão molecular.....</i>	<i>111</i>
2.5.2 <i>Estudo do estado de oligomerização da ADSL-Lm através de “Dynamic Light Scattering”(DLS).....</i>	<i>113</i>
2.5.3. <i>Estudo do estado de oligomerização da ADSL-Lm através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes)..</i>	<i>114</i>
2.5.5 <i>Ensaio de clivagem da cauda de histidina com a enzima Enteroquinase.....</i>	<i>114</i>
2.5.6 <i>Seqüenciamento de N-terminal.....</i>	<i>115</i>
2.5.7 <i>Determinação do ponto isoelétrico (pI).....</i>	<i>116</i>
2.5.8 <i>Ensaio de atividade enzimática da ADSL-Lm para os substratos ademilosuccinato (ADS) e SAICAR.....</i>	<i>117</i>
2.5.9 <i>Cristalização da ADSL-Lm com cauda de histidina.....</i>	<i>119</i>
2.5.10 <i>Cristalização da ADSL-Lm sem cauda de histidina.....</i>	<i>126</i>
2.5.11 <i>Coleta e processamento de dados de difração de raios-X.....</i>	<i>129</i>
2.5.12 <i>Obtenção das fases.....</i>	<i>130</i>
2.5.13 <i>Construção e refinamento do modelo.....</i>	<i>133</i>
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	134
3.1 Complementação funcional.....	134
3.2 Expressão e purificação da enzima ADSL-Lm.....	136
3.3 Caracterização bioquímica e estrutural da enzima recombinante ADSL-Lm.....	139
3.3.1 <i>Determinação da massa molecular da ADSL-Lm por cromatografia de exclusão molecular.....</i>	<i>139</i>
3.3.2 <i>Estudo do estado de oligomerização da ADSL através de “Dynamic Light Scattering” (DLS).....</i>	<i>141</i>

2.2 Transformação em células competentes de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)pLysS e ensaios de expressão.....	107
2.3 Expressão da enzima ADSL-Lm.....	108
2.4 Purificação da enzima ADSL-Lm.....	110
2.5 Caracterização bioquímica e estrutural da enzima recombinante ADSL-Lm.....	111
2.5.1 <i>Determinação da massa molecular da ADSL-Lm por cromatografia de exclusão molecular.....</i>	<i>111</i>
2.5.2 <i>Estudo do estado de oligomerização da ADSL-Lm através de “Dynamic Light Scattering”(DLS).....</i>	<i>113</i>
2.5.3. <i>Estudo do estado de oligomerização da ADSL-Lm através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes)..</i>	<i>114</i>
2.5.5 <i>Ensaio de clivagem da cauda de histidina com a enzima Enteroquinase.....</i>	<i>114</i>
2.5.6 <i>Seqüenciamento de N-terminal.....</i>	<i>115</i>
2.5.7 <i>Determinação do ponto isoelétrico (pI).....</i>	<i>116</i>
2.5.8 <i>Ensaio de atividade enzimática da ADSL-Lm para os substratos adenilosuccinato (ADS) e SAICAR.....</i>	<i>117</i>
2.5.9 <i>Cristalização da ADSL-Lm com cauda de histidina.....</i>	<i>119</i>
2.5.10 <i>Cristalização da ADSL-Lm sem cauda de histidina.....</i>	<i>126</i>
2.5.11 <i>Coleta e processamento de dados de difração de raios-X.....</i>	<i>129</i>
2.5.12 <i>Obtenção das fases.....</i>	<i>130</i>
2.5.13 <i>Construção e refinamento do modelo.....</i>	<i>133</i>
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	134
3.1 Complementação funcional.....	134
3.2 Expressão e purificação da enzima ADSL-Lm.....	136
3.3 Caracterização bioquímica e estrutural da enzima recombinante ADSL-Lm.....	139
3.3.1 <i>Determinação da massa molecular da ADSL-Lm por cromatografia de exclusão molecular.....</i>	<i>139</i>
3.3.2 <i>Estudo do estado de oligomerização da ADSL através de “Dynamic Light Scattering” (DLS).....</i>	<i>141</i>

3.3.3 Estudo do estado de oligomerização da ADSL-Lm através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes)..	142
3.3.3. Ensaio de clivagem da cauda de histidina com a enzima Enteroquinase e Sequenciamento do N-terminal.....	143
3.3.4 Determinação do ponto isoelétrico (pI).....	145
3.3.5 Ensaio de atividade enzimática da ADSL-Lm para os substratos adenilosuccinato (ADS) e SAICAR.....	146
3.3.6 Cristalização da ADSL-Lm com e sem cauda de histidina.....	149
3.3.7 Coleta e processamento de dados de difração de raios-X.....	154
3.3.8 Obtenção das fases e do modelo da estrutura cristalográfica da ADSL-Lm.....	157
3.3.9 Refinamento da estrutura cristalográfica da ADSL-Lm.....	170

CAPÍTULO V: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS..... 173

1. CONCLUSÕES.....	174
1.1 Sobre o papel da ADSL para a sobrevivência dos tripanosomatídeos investigado através de experimentos de RNAi em <i>Trypanosoma brucei</i>	174
1.2 Sobre a caracterização molecular do gene <i>adsl-Lm</i>	174
1.3 Sobre a caracterização bioquímica e estrutural da enzima recombinante ADSL-Lm.....	175
1.4 Sobre a evolução da via de síntese <i>de novo</i> de purino-nucleotídeos em Kinetoplastida, averiguada através de estudos da enzima ADSL.....	176
2. PERSPECTIVAS.....	177

CAPÍTULO VI: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 179

APÊNDICE A..... 191

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1: Formas do parasita <i>Leishmania</i>	7
Figura 2: Formas clínicas de leishmaniose.....	7
Figura 3: Distribuição global de leishmaniose.....	8
Figura 4: Distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral segundo município, no ano de 2002.....	9
Figura 5: Esquema representativo do ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	12
Figura 6: Estruturas químicas dos principais medicamentos empregados no tratamento da leishmaniose.....	15
Figura 7: Esquema representativo da via de síntese <i>de novo</i> de purino-nucleotídeos.....	22
Figura 8: Esquema representativo do metabolismo de purino-nucleotídeos.....	23
Figura 9: Esquema das duas etapas catalisadas pela adenilosuccinato liase (ADSL) no metabolismo de purino-nucleotídeos.....	26

Capítulo II

Figura 1: Modelos propostos para o processo de RNAi.....	33
Figura 2: Ilustrações esquemáticas dos vetores empregados para RNAi em <i>T. brucei</i> , na forma linearizada após clivagem da região espaçadora de DNAr.....	36
Figura 3: Sequência de nucleotídeos do gene <i>adsl-Tb</i>	42
Figura 4: Amplificação da fase aberta de leitura (ORF) do gene de interesse (<i>adsl-Tb</i>).....	53
Figura 5: Identificação de clones recombinantes positivos.....	53
Figura 6: Subclonagem do fragmento referente à porção do <i>adsl-Tb</i> no pZJM.....	54
Figura 7: Recombinantes pZJM + fragmento do gene <i>adsl-Tb</i>	55
Figura 8: Curvas de crescimento.....	57
Figura 9: Eletroforese dos produtos das reações de PCR que usaram como molde 5,0µl das reações de RT-PCR.....	58

Figura 10: Resultado das reações de RT-PCR nas diferentes amostras induzidas e não induzidas para o gene *adsl-Tb*.....60

Figura 11: Resultado do RT-PCR nas diferentes amostras induzidas e não induzidas para o gene da GADPH.....61

Capítulo III

Figura 1: Esquema ilustrativo do vetor pCR T7/NT-TOPO.....65

Figura 2: Estratégia adotada para a realização das reações de RT-PCR.....72

Figura 3: Amplificação da fase aberta de leitura (ORF) do gene de interesse (*adsl-Lm*).....75

Figura 4: Esquema representativo do alinhamento múltiplo, realizado pelo programa SeqMan, dos eletroferogramas resultantes dos seqüenciamentos do gene *adsl-Lm*...76

Figura 5: Alinhamento da seqüência do gene *adsl-Lm* depositada e experimental.....77

Figura 6: Experimentos de PFGE e “Southern Blot” para caracterização molecular do gene *adsl-Lm*.....80

Figura 7: RT-PCR para amplificação das regiões 5’UTR e 3’UTR do gene *adsl-Lm*.....81

Figura 8: Confirmação de clones recombinantes 5’ e 3’UTRs no vetor pGEM-T.....82

Figura 9: Região “upstream” do gene *adsl-Lm*, presente no cromossomo 4, obtida pelo Blastn.....83

Figura 10: Seqüência completa do RNAm do gene *adsl-Lm*.....84

Capítulo IV

Figura 1: Esquema representativo de um cristal de proteína.....94

Figura 2: Esquema do método da gota suspensa.....95

Figura 3: Diagrama de fases.....97

Figura 4: Esquema ilustrativo do vetor pBluescript II SK⁺ (Stratagene)104

Figura 5. Modelos da ADSL usados na substituição molecular.....131

Figura 6. Domínio conservado da ADSL.....132

Figura 7: Amplificação por PCR do gene <i>adsl-Lm</i> para experimentos de complementação funcional.....	134
Figura 8: Bactérias JK268 contendo o plasmídeo recombinante (pSK ⁺ + gene <i>adsl-Lm</i>).....	135
Figure 9: Complementação funcional do gene <i>adsl-Lm</i> no genoma da bactéria mutante JK268.....	136
Figura 10: Expressão e purificação da ADSL-Lm.....	138
Figura 11: Cromatograma mostrando o perfil de eluição da proteína recombinante, proveniente da coluna Hi Prep Superdex 200 16/60 (Amersham Biosciences)	138
Figura 12: Curva de calibração da coluna Superdex 200.....	140
Figura 13: Experimentos de DLS.....	142
Figura 14: Experimento de eletroforese em gel nativo.....	143
Figura 15: Clivagem da cauda de histidina da ADSL-Lm recombinante.....	144
Figura 16: Determinação do pI.....	145
Figura 17: Gráfico do experimento de focalização isoeétrica da ADSL-Lm.....	145
Figura 18: Cinética enzimática para o substrato ADS.....	146
Figura 19: Ensaios de atividade enzimática para o substrato SAICAR.....	149
Figura 20: Cristalização da proteína ADSL-Lm.....	150
Figura 21: Padrão de difração de raios-X do cristal da ADSL-Lm sem a cauda de histidina.....	150
Figura 22: Cristalização da ADSL-Lm.....	151
Figura 23: “Macroseeding”	152
Figura 24: “Microseeding”	153
Figura 25: Cristalização da ADSL-Lm - refinamento mais acurado (18°C).....	154
Figura 26: Cristalização da ADSL-Lm - refinamento mais acurado (4°C).....	154
Figura 27: Padrão de difração de raios-X do melhor cristal obtido.....	157
Figura 28: Mapas de densidade eletrônica.....	162

Figura 29: Estrutura da ADSL-Lm.....	162
Figura 30: Empacotamento cristalino das moléculas da ADSL-Lm.....	163
Figura 31: Monômero da ADSL-Lm e resíduos envolvidos no sítio ativo.....	164
Figura 32: Introdução por inspeção manual dos substratos no sítio ativo da ADSL de <i>T. marítima</i>	166
Figura 33: Sítio ativo da ADSL-Lm.....	167
Figura 34: Representação da superfície do dímero da ADSL-Lm.....	168
Figura 35: Alinhamento múltiplo sequencial das ADSLs depositadas no PDB e a ADSL-Lm.....	169
Figura 36: Gráfico de Ramachandran.....	171
Figura 37: Mapa de densidade eletrônica para alguns resíduos que se encontram fora da região permitida no gráfico de Ramachandran.....	172

Capítulo V

Figura 1: “Docking” dos substratos SAICAR e ADS no sítio ativo da ADSL-Lm..	178
---	-----

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1: Diversidade e complexidade da leishmaniose humana.....	6
--	---

Capítulo II

Tabela 1: Nome e sequência dos oligonucleotídeos utilizados no PCR para amplificação do gene <i>adsl-Tb</i>	38
Tabela 2: Reagentes usados na reação de PCR realizada para amplificação do gene <i>adsl-Tb</i>	39
Tabela 3: Protocolo do programa de PCR (com “Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase High Fidelity”)......	39
Tabela 4: Reagentes usados nas reações de digestão com <i>Nco</i> I e <i>Nde</i> I.....	41
Tabela 5: Reagentes usados nas reações de digestão dos vetores pGEM/ <i>adsl-Tb</i> e pZJM.....	42
Tabela 6: Reagentes usados nas reações de ligação do fragmento do gene <i>adsl-Tb</i> no vetor pZJM.....	43
Tabela 7: Reagentes usados na preparação de meio “Cunninghams”, para cultivo de células promastigotas de <i>Trypanosoma brucei</i>	45
Tabela 8: Reagentes usados na preparação do tampão A da solução de eletroporação utilizada para transfecção de células de <i>T. brucei</i>	47
Tabela 9: Reagentes usados na preparação do tampão B da solução de eletroporação utilizada para transfecção de células de <i>T. brucei</i>	47
Tabela 10: Tabela representativa da diluição seriada de células de <i>T. brucei</i> 29-13 após 24 hs da transfecção.....	48
Tabela 11: Nome e sequência dos oligonucleotídeos utilizados no RT-PCR para amplificação região 5'UTR do gene <i>adsl-Tb</i>	51
Tabela 12: Reagentes usados nas reações de RT-PCR para amplificação das regiões 5'UTR dos genes <i>adsl-Tb</i> e <i>gadph</i>	51
Tabela 13: Protocolo do programa de RT-PCR.....	52
Tabela 14: Sequência dos oligonucleotídeos específicos à GADPH (controle).....	52

Capítulo III

Tabela 1: Nome e sequência dos oligonucleotídeos utilizados no PCR para amplificação do gene <i>adsl-Lm</i>	68
Tabela 2: Reagentes usados nas reações de PCR realizadas com “ <i>Taq</i> DNA Polymerase, Recombinant”	70
Tabela 3: Protocolo do programa de PCR para amplificações com “ <i>Taq</i> DNA Polymerase, Recombinant”	70
Tabela 4: Nome e sequência dos oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento do gene <i>adsl-Lm</i> , além dos oligos ADSL1 e ADSL2.....	70
Tabela 5: Nome e sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR para caracterização das regiões 5' e 3'UTRs do gene <i>adsl-Lm</i>	72
Tabela 6: Reagentes usados na preparação de meio M199 1x (Gibco) usado para cultivo de células de <i>Leishmania</i>	73
Tabela 7: Protocolo do programa de RT-PCR-3'UTR.....	73

Capítulo IV

Tabela 1: Nome e sequência dos oligonucleotídeos utilizados no PCR para amplificação do gene <i>adsl-Lm</i> , nos estudos de complementação funcional.....	104
Tabela 2: Reagentes usados nas reações de digestão com <i>Xba</i> I e <i>Hind</i> III.....	105
Tabela 3: Reagentes usados na reação de ligação do gene <i>adsl-Lm</i> no vetor pBluescript SK ⁺ (Stratagene)	105
Tabela 4: Proteínas utilizadas para calibração da coluna HiPrep 16/60XK Superdex 200 (Amersham Biosciences)	112
Tabela 2: “Kit” de proteínas padrão (Amersham Biosciences) utilizado no experimento de gel nativo.....	112
Tabela 5: “Kit” de proteínas padrão (Amersham Biosciences) utilizado para determinação de pI (ponto isoeletrico)	117
Tabela 6: Refinamento da condição fosfato de Na/K 1,4M, pH 6,3.....	121
Tabela 7: Refinamento da condição sulfato de amônio 1,6M, Tris 0,1M, pH 8,0....	121
Tabela 8: Refinamento da condição sulfato de amônio 1,6M, dioxano 10% (v/v), Mes 0,1M, pH 6,5.....	121
Tabela 9: Refinamento da condição 0,1M Ácido Cítrico, pH 5,0 e 15% de PEG	

4000	121
Tabela 10: Condição 8% PEG 8000 e variação da força iônica do tampão (horizontal) e do pH (vertical)	123
Tabela 11: Refinamento da condição sulfato de amônio 1,6M, dioxano 10% (v/v), Mes 0,1M, pH 6,5 para os testes com os 3 tipos diferentes de óleos.....	124
Tabela 12: Refinamento da condição sulfato de amônio 1,6M, dioxano 10% (v/v), Mes 0,1M, pH 6,5 para os ensaios a 4°C e 18°C.....	126
Tabela 13: Resumo do número de experimentos realizados para a cristalização da ADSL-Lm, totalizando 721 gotas.....	128
Tabela 14: Porcentagem de identidade sequencial entre ADSL-Lm e as demais depositadas no PDB.....	132
Tabela 15: Proteínas utilizadas para calibração da coluna HiPrep 16/60XK Superdex 200 e seus respectivos volumes de eluição e valores de K_{av}	139
Tabela 16: Estatísticas do processamento do cristal nativo coletado no IFSC.....	155
Tabela 17: Estatísticas do processamento do cristal nativo coletado no LNLS.....	155
Tabela 18: Estatísticas do processamento do cristal derivado de gadolínio coletado no LNLS.....	155
Tabela 19: Estatísticas do processamento do cristal nativo coletado à baixa resolução no LNLS.....	156
Tabela 20: Estatísticas do processamento do cristal derivado de césio coletado no APS.....	156
Tabela 21: Oito primeiras soluções fornecidas pelo programa ROTFUN (AMoRe).....	158
Tabela 22: Resultados obtidos depois da translação.....	158
Tabela 23: Oito primeiras posições encontradas pelo programa SHELX para o derivado de gadolínio.....	160
Tabela 24: Sumário do refinamento mostrando os parâmetros que dizem sobre a qualidade do modelo da ADSL-Lm.....	171

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

- Å – Angstrons
- ADP – Adenosina difosfato
- ADS – Adenilosuccinato
- ADSL - Adenilosuccinato liase
- ADSL-Lm – Adenilosuccinato liase de *Leishmania major*
- ADSL-Tb - Adenilosuccinato liase de *Trypanosoma brucei*
- ADSL-hum - Adenilosuccinato liase humana
- ADSS - Adenilosuccinato sintetase
- AICAR – 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribotideo
- AMD - AMP deaminase
- AMP – Adenosina monofosfato
- APRT - Adenina-fosforribosil-transferase
- APS – “Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory USA”
- Arg - Arginina
- Asn- Asparagina
- ATP – Adenosina trifosfato
- BLAST: “Basic Local Alignment Search Tool”
- CCP4 – “Collaborative Computing Project Number 4”
- DLS – “Dynamic Light Scattering”
- DNA – “DesoxirriboNucleic Acid”
- DNAr - DNA ribossômico
- dNTP: Desoxinucleotídeo trifosfato
- DO – Densidade óptica
- dsRNA – “double-strand RNA”
- EDTA - “EthyleneDiamineTetrAcetic acid”
- EKMax: Enzima EnterokinaseMax
- FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
- GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- Gln – Glutamina
- GMP - Guanosina monofosfato

Glu - Glutamato
 G418 – antibiótico genético
 HEPES: “N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid”
 His – Histidina
 HGPRT - Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase
 IEF - Isoelectric Focusing
 IFSC - Instituto de Física de São Carlos
 IMP – Inosina monofosfato
 IMAC – “Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography”
 IPTG – “Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside”
 kDa - quilodáton
 k_{cat} – Constante de catálise
 K_m – Constante de Michaelis-Menten
 LB – Luria Bertane (meio de cultura)
 LC - Leishmaniose Cutânea
 Leu - Leucina
 LMC – Leishmaniose Mucocutânea
 LNLS – Laboratório Nacional de Luz Sincrotron
 LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana (L)
 LV – Leishmaniose Visceral
 Lys - Lisina
 MAD – “Multiple Anomalous Dispersion”
 MES – “2-Morpholinoethanesulfonic acid”
 MIRAS – “Multiple Isomorphous Replacement with Anomalous Dispersion”
 MW – “Molecular Weight”
 NCBI: “National Center for Biotechnology Information”
 nt - nucleotídeo
 OMS – Organização Mundial da Saúde
 ORF – “Open Reading Frame”
 Otet - região operadora -tetraciclina
 pb – pares de bases
 PCR – “Polymerase Chain Reaction”
 PDB – “Protein Data Bank”

PEG – Polietilenoglicol

PFGE – “Pulsed Field Gel Electrophoresis”

pI - ponto isoeletrico

PRPP – Fosforribosilpirofosfato

PRTases: Fosforribosil transferases.

RNA – “Ribonucleic Acid”

RNAc - RNA complementar

RNAm - RNA mensageiro

PTGS – “Pos-Transcriptional Gene Silence”

RdRP – “RNA dependent RNA polymerase”

RISC – “RNA-induced silencing complex”

RMSD – “Root Mean Square Deviation”

RNase - Ribonuclease

RNAi – “RNA interference”

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – “Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction”

SAD – “Single Anomalous Dispersion”

SAICAR – 5'-fosforibosil-5-aminoimidazol-4-N'-succinocarboxamida

SDS-PAGE – “Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis”

SIRAS – “Single Isomorphous Replacement with Anomalous Dispersion”

siRNAs – “small interfering RNAs”

TAE - Tampão composto de tris, ácido acético, EDTA

TBE - Tampão composto de tris, ácido bórico, EDTA

T7RNP - T7 RNA polimerase

Tet - Tetraciclina

TetR - Proteína repressora - tetraciclina

Tris – Hydroxymethyl aminomethane

Triton X 100 – “t-octylphenoxyethoxyethanol”

UCLA – “University of California, Los Angeles”

UTR – “Untranslated Region”

Ve – Volume de eluição

$V_{\max}$ – velocidade inicial máxima

V_0 - velocidade inicial

XPRT - xantina-fosforribosil-transferase

X-Gal – “5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopyranoside”

WHO – “World Health Organization”

RESUMO

Muitas espécies de *Leishmania* são responsáveis por sérias doenças cutâneas e viscerais, que exibem alta incidência em regiões tropicais e subtropicais. Os medicamentos disponíveis são potencialmente carcinogênicos, requerem múltiplas administrações e a hospitalização do paciente. Um programa efetivo de desenvolvimento de novos fármacos requer a validação genética e bioquímica dos alvos. Neste contexto, uma das diferenças metabólicas mais marcantes entre os protozoários parasitas e o hospedeiro mamífero encontra-se na cadeia de síntese de purino-nucleotídeos. A enzima adenilosuccinato liase (ADSL), no hospedeiro mamífero, atua em duas etapas no metabolismo de purino-nucleotídeos: uma na via de síntese *de novo* e outra na via de recuperação. Esta característica particular da ADSL nos motivou a investigar como esta enzima poderia nos fornecer evidências sobre a evolução desta via metabólica em Kinetoplastida. Assim, os objetivos do presente trabalho foram validar a ADSL como potencial alvo terapêutico, através da técnica de RNA de interferência (RNAi), usando *Trypanosoma brucei* como modelo, bem como, caracterizar molecularmente o gene *adsl-Lm* e caracterizar bioquímica e estruturalmente a enzima recombinante de *Leishmania major* Friedlin (ADSL-Lm). Os resultados de RNAi demonstraram que a ADSL pode ser considerada um potencial alvo, uma vez que ela se apresentou essencial à viabilidade do parasita. Em relação à caracterização molecular do gene *adsl-Lm* suas regiões não traduzidas 5'UTR e 3'UTR foram definidas por RT-PCR, indicando que o RNA mensageiro maduro possui 2060 nucleotídeos. Análises com enzimas de restrição e eletroforese em campo pulsado (PFGE), seguidas de "Southern blot" revelaram que *adsl-Lm* trata-se de um gene de cópia simples e está localizado no cromossomo 4 deste parasita. O gene *adsl-Lm* foi clonado em um vetor de expressão e um protocolo de purificação da enzima recombinante foi estabelecido. A forma tetramérica da ADSL-Lm foi confirmada por eletroforese em gel nativo e por espalhamento dinâmico de luz (DLS). ADSL-Lm apresentou um pI experimental de 6,07 e exibiu atividade máxima no pH 8,5. Os parâmetros cinéticos de K_m , V_{max} , K_{cat} e eficiência catalítica (K_{cat}/V_m) foram determinados para o substrato adenilosuccinato. Experimentos de complementação funcional evidenciaram que ADSL-Lm foi capaz de complementar de maneira eficiente o genoma deficiente em ADSL da linhagem de *E. coli* JK268 (mutação *purB58*). Entretanto, esta complementação deve ocorrer na via de recuperação, uma vez que ensaios enzimáticos com o SAICAR (substrato da via *de novo*) mostraram que a enzima não retém atividade sobre este composto. Estes resultados indicam que provavelmente os tripanosomatídeos não representam um caso de perda da via de síntese *de novo*. Adicionalmente, ADSL-Lm foi cristalizada no grupo espacial tetragonal I4₁22, com parâmetros de cela unitária $a = b = 130,023 \text{ \AA}$, $c = 316,826 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. A estrutura cristalográfica da ADSL-Lm foi resolvida por SIRAS (substituição isomórfica simples com dispersão anômala) usando um cristal nativo (2.2 $\text{\AA}$) e um derivado de Gadolínio. O monômero é composto por três domínios em um enovelamento típico das enzimas da superfamília de β -eliminação e é constituído quase exclusivamente por hélices- α . Para o sítio ativo, três subunidades são requeridas e os resíduos envolvidos são His 153 (ácido geral), His 231 (base geral), Gln 308, Asn 364 and Glu 369. Entretanto, sem um ligante (substrato ou inibidor) no sítio ativo torna-se difícil estudar detalhadamente as interações entre a enzima e seus dois substratos. Desta forma, experimentos de co-cristalização e modelagem molecular podem auxiliar nesta questão.

ABSTRACT

Many species of *Leishmania* are responsible for serious visceral or skin diseases that exhibit high incidence in tropical and subtropical regions. The drugs currently employed in the treatment of parasitic diseases are potentially carcinogenic, often require prolonged treatment and patient hospitalization. An effective program of drug design requires the validation of the potential target. In this context, one of the most striking metabolic discrepancies between Trypanosomatidae and their human hosts is the purine nucleotide biosynthesis pathway. Adenylosuccinate lyase (ADSL) is a bifunctional enzyme that catalyses two non-sequential steps in this cycle (one in the *de novo* purine pathway and another in the salvage pathway). This particular ADSL feature motivated us to investigate if ADSL could give us information about purine biosynthesis evolution in Kinetoplastida. Hence, the present work is aimed to validate ADSL as a potential target using the RNAi (RNAi) technique, as well as to characterize the *adsl* gene and the recombinant enzyme from *Leishmania major* Friedlin (ADSL-Lm). The RNAi results proved that ADSL can be considered a potential target, because it is shown to be essential for parasite viability. Regarding the molecular characterization of the *adsl-Lm* gene, the mature mRNA transcript containing 2060 nucleotides was defined by 5' and 3' RT-PCR. Restriction analysis and Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) followed by Southern Blot hybridizations showed that *adsl-Lm* is a single copy gene and is located in chromosome 4 of this parasite. The *adsl-Lm* gene was cloned into an expression vector and a purification protocol of the recombinant enzyme was established. The tetrameric form of the recombinant ADSL-Lm enzyme was confirmed by native gel electrophoresis and Dynamic Light Scattering. ADSL-Lm has an experimental pI of 6.07 and exhibited maximum enzymatic activity at pH 8.5. The kinetic parameters of K_m , V_{max} , K_{cat} and kinetic efficiency (K_{cat}/V_{max}) were obtained for adenylosuccinate substrate. Functional complementation experiments showed that the *adsl-Lm* gene can effectively complement the *E. coli* JK268 *purB58* mutation. However, this complementation must be in the salvage pathway, because enzymatic assays were performed using SAICAR (*de novo* pathway substrate) and ADSL-Lm did not convert this compound into product. This result indicates that probably *Trypanosomatidae* is not an example of *de novo* purine nucleotide cycle lost. In addition, ADSL-Lm was crystallized in the tetragonal I4₁22 space group, with unit cell parameters $a = b = 130,023 \text{ \AA}$, $c = 316,826 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ and diffracted beyond $2.2 \text{ \AA}$. ADSL-Lm crystal structure has been determined by SIRAS (Single Isomorphous Replacement with Anomalous Dispersion), using both native and Gadolinium derivative crystals. The ADSL-Lm monomer is composed of three domains arranged in the elongated manner typical of enzymes in the β -elimination superfamily, and is constituted almost exclusively by helices. Three subunits are necessary to form the active site cleft and the residues His 153, His 231 (general bases), Gln 308, Asn 364 and Glu 369 are involved. Without a bound inhibitor or substrate, the specific contacts made by the enzyme to its two substrates can not be analyzed in detail. Hence, co-crystallization and docking can help in this question.

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1. MOTIVAÇÃO

O gênero *Leishmania* compõe um importante grupo de protozoários parasitas de mamíferos. Estes microrganismos são responsáveis por doenças graves em seres humanos de duas formas: a leishmaniose tegumentar que causa lesões não fatais, e a forma visceral que é potencialmente fatal. Estas entidades clínicas são consideradas, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como doenças tropicais importantes devido ao alto nível de mortalidade e morbidade a elas associadas.

A leishmaniose está distribuída em 22 países no Novo Mundo e em 66 países no Velho Mundo, não sendo encontrada no Sudoeste asiático. Infecções humanas são encontradas em 16 países europeus, incluindo a França, Itália, Grécia, Malta, Espanha e Portugal, sendo globalmente responsável por 59.000 mortes anuais, segundo dados de 2002. Os métodos empregados atualmente no tratamento das infecções causadas por *Leishmania* se mostram pouco operacionais e apresentam efeitos colaterais indesejados nos pacientes tratados. Apesar dos avanços recentes, o desenvolvimento de vacinas tem sido muito lento. Este cenário revela a importância da descoberta de novos medicamentos para a terapêutica da leishmaniose.

Os protozoários parasitas são dependentes da *via de recuperação* de purino-nucleotídeos pela ausência da via de síntese *de novo*. Células de mamíferos, por outro lado, são capazes de sintetizar os purino-nucleotídeos *de novo*, além de possuírem a *via de recuperação*. Desta diferença metabólica fundamental resulta a sensibilidade dos protozoários à inibição por análogos de purino-nucleotídeos que afetem os componentes enzimáticos da *via de recuperação* como, por exemplo, a sensibilidade ao alopurinol. Desta forma, a via de recuperação se apresenta como um

potencial alvo no desenvolvimento racional de fármacos ao tratamento da leishmaniose.

O estudo do metabolismo dos purino-nucleotídeos de *Leishmania major* traz grandes benefícios. Praticamente todos os genes centrais envolvidos na *via de recuperação* em *Leishmania* estão presentes no parasito. Diversos trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório, com diferentes enzimas desta via levantam a possibilidade de dissecá-la ao nível molecular e estrutural e possibilitam a avaliação do papel de cada componente enzimático no contexto global da *via de recuperação* de purino-nucleotídeos. A enzima adenilosuccinato liase (ADSL) atua em duas etapas no metabolismo de purino-nucleotídeos: uma na via de síntese *de novo*, onde o substrato é o composto SAICAR (5'-fosforibosil-5-aminoimidazol-4-N-succinocarboxamida) e na via de recuperação, cujo substrato é o adenilosuccinato (ADS). ADSL apresenta importância não somente na replicação, como também no metabolismo celular. Além disto, a deficiência desta enzima em humanos está relacionada a doenças severas, cujos principais sintomas são retardos mentais e psicomotores, associados com características autistas.

Assim, a motivação do presente trabalho baseou-se nas seguintes questões:

i) A enzima ADSL é realmente um bom alvo para auxiliar na busca de compostos que possam vir a contribuir para o tratamento de leishmaniose?

ii) Considerando-se a participação da ADSL em dois passos do metabolismo de purinas em mamíferos: um na via de síntese *de novo* e outro na via de recuperação (sendo que em cada passo esta enzima é capaz de utilizar um substrato diferente), juntamente com o fato dos Kinetoplastida serem auxotróficos para purino-nucleotídeos, ou seja, estes organismos não possuem as enzimas envolvidas na síntese *de novo*, a questão que se levanta é: durante a evolução dos Kinetoplastida

houve perda da via de síntese *de novo*? Os estudos molecular, bioquímico e estrutural da ADSL de *L. major* pode contribuir no esclarecimento da evolução desta via metabólica em Kinetoplastida. Devido à dualidade da ADSL, se ela for capaz de converter o composto SAICAR em produto, teríamos um indício de algum resquício da via de síntese *de novo* nestes organismos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leishmaniose

2.1.1 Agente etiológico, formas clínicas e distribuição global da doença

Há mais de um século, em 1903, os doutores Leishman e Donovan identificaram, em trabalhos independentes, um protozoário que foi então batizado por Ronald Ross como *Leishmania donovani* em pacientes na Índia, os quais apresentavam uma doença atualmente conhecida como leishmaniose visceral.

Leishmaniose trata-se de um conjunto de doenças causadas por pelo menos 17 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, sendo a segunda causa de morte entre as doenças parasitárias, só perdendo para a malária. O parasita existe em duas formas (figura 1): uma flagelada ou promastigota, que vive nas fêmeas dos mosquitos vetores (flebotomíneos) e outra não flagelada ou amastigota, que é parasita intracelular obrigatória dos macrófagos no hospedeiro mamífero. Leishmaniose é classificada em três formas clínicas (figura 2): leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV), que apresentam distintos níveis de morbidade e mortalidade. 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 (Herwaldt, 1999; Davies *et al.*, 2003).

Juntamente com a *Leishmania* ssp, as espécies do gênero *Trypanosoma*, *T. brucei* e *T. cruzi*, são importantes protozoários parasitas humanos, transmitidos por insetos hematófagos e causadores da doença do sono e doença de Chagas, respectivamente. *Trypanosoma* e *Leishmania* são dois gêneros da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, que apresentam uma série de características peculiares: presença de DNA mitocondrial denominado de kinetoplasto, mecanismos especiais de editoração do RNA mitocondrial, transcrição de genes nucleares em longos fragmentos policistrônicos e compartimentalização da glicólise em organelas denominadas glicossomas (para revisão ver Hannaert *et al.*, 2003). Além destas peculiaridades compartilhadas com os demais membros da família Trypanosomatidae, as espécies de *Leishmania* apresentam imensa diversidade que é refletida na complexidade da doença leishmaniose (veja tabela 1).

Tabela 1: Diversidade e complexidade da leishmaniose humana (tabela adaptada de Herwaldt, 1999).

Agente etiológico Protozoário intracelular obrigatório do gênero <i>Leishmania</i> (Ordem Kinetoplastida). Cerca de 21 das 30 espécies que infectam mamíferos infectam humanos.
Formas do parasita <i>Promastigota</i> : forma flagelada encontrada no trato digestivo de mosquitos hematófagos e nas culturas de células: 15-20µm de comprimento por 1,5-3,5µm de largura com 15-28µm de flagelo. <i>Amastigota</i> : forma não flagelada (2-4µm de diâmetro) que, nos hospedeiros humanos, se replica dentro dos fagossomos no interior dos macrófagos.
Espécies causadoras da leishmaniose visceral Complexo de espécies <i>L. donovani</i> : <i>L. donovani</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. tropica</i> no velho mundo e <i>L. chagasi</i> e <i>L. amazonensis</i> no novo mundo.
Epidemiologia da leishmaniose visceral (organismos mais agressivos) Em algumas regiões (Índia e Sudão) encontra-se uma forma de leishmaniose dérmica pos-kalazar (PKDL). É transmitida por <i>Phlebotomus</i> e existe no subcontinente indiano e na África equatorial. Reservatório: seres humanos e cães. A <i>L. infantum</i> provoca uma variante menos grave da leishmaniose visceral e existe na região mediterrânea, incluindo países do Norte de África, Turquia, Israel, Grécia, Itália, sul da França, Portugal e Espanha e ainda nos Balcãs, Irã e algumas regiões da China e Ásia central. É transmitida pelo <i>Phlebotomus</i> . Reservatório: cães, lobos e raposas. A <i>L. chagasi</i> existe na América Latina, incluindo Brasil. O inseto transmissor é o mosquito <i>Lutzomyia</i> . Reservatório: cães.
Espécies causadoras da leishmaniose cutânea No velho mundo: <i>L. tropica</i> , <i>L. major</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. donovani</i> . No novo mundo: complexo de espécies <i>L. mexicana</i> (especialmente <i>L. mexicana</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. venezuelensis</i>) e subgênero <i>Viannia</i> (notavelmente <i>L. [V] braziliensis</i> , <i>L. [V] panamensis</i> , <i>L. [V] guyanensis</i> e <i>L. [V] peruviana</i>); também organismos tipo <i>L. major</i> e <i>L. chagasi</i> .
Epidemiologia da leishmaniose cutânea (organismos de virulência baixa) <i>L. major</i> : Norte de África, Médio Oriente e Ásia central. Transmitida por <i>Phlebotomus</i> . Reservatório: roedores. <i>L. aethiopica</i> : Existe na Etiópia e no Quênia. Transmitida por <i>Phlebotomus</i> . Reservatório: pequenos mamíferos. <i>L. tropica</i> : Existe em países do Mediterrâneo e no Oriente Médio. Transmitida por <i>Phlebotomus</i> . Reservatório: principalmente humano. <i>L. mexicana</i> : América central e Sul dos EUA (especialmente no Texas). Transmissão pelo <i>Lutzomyia</i> . Reservatório: roedores. <i>L. amazonensis</i> : América do Sul. Transmissão pelo <i>Lutzomyia</i> . Reservatório: roedores.
Epidemiologia da leishmaniose mucocutânea (organismos de virulência intermediária) <i>L. braziliensis</i> : existe em todo o Brasil, Venezuela, Colômbia e Guianas. Transmissão pelo <i>Lutzomyia</i> . Reservatório: principalmente roedores. <i>L. peruviana</i> : predomina nos países andinos. Reservatório: cães.
Modos de transmissão A transmissão da leishmaniose entre mamíferos ocorre via contaminação sanguínea, sendo o mosquito infectado o principal vetor. Cerca de 30 espécies do gênero <i>Phlebotomus</i> e <i>Lutzomyia</i> já foram identificadas como vetor. Transfusão sanguínea e o uso de agulhas compartilhadas são outras formas minoritárias de propagação da doença.
Distribuição geográfica e estimativa do número de casos Endêmica em 88 países nos 4 continentes: da região norte da Argentina ao sul do Texas, sul da Europa, Ásia, Oriente Médio e África. Número estimado de pessoas sob risco de infecção: cerca de 350 milhões. Número estimado de novos casos/ano de leishmaniose visceral: cerca de 500.000. Número estimado de novos casos/ano de leishmaniose cutânea: 1,5 milhões.

Figura 1: Formas do parasita *Leishmania*. À esquerda forma promastigota ou flagelada: encontrada no trato digestivo de mosquitos hematófagos e nas culturas de células, apresentando 15 a 20µm de comprimento por 1,5 a 3,5µm de largura com 15 a 28µm de flagelo. À direita forma amastigota ou não flagelada: 2 a 4µm de diâmetro que, nos hospedeiros humanos, se replica dentro dos fagossomos no interior dos macrófagos. Figura obtida do manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral - Ministério da Saúde 2003 (http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/pdfs/manual_controle_lv.pdf).

Figura 2: Formas clínicas de leishmaniose. A) Foto de um garoto brasileiro com leishmaniose cutânea. B) Foto de um homem peruano com leishmaniose mucocutânea. C) Foto de um menino brasileiro de 4 anos com leishmaniose visceral (figuras adaptadas do site <http://www.vet.uga.edu>).

Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que 12 milhões de casos de leishmaniose em humanos são distribuídos pelo mundo, principalmente nas regiões tropicais e sub-tropicais (figura 3).

Figura 3: Distribuição global de leishmaniose. Em azul claro regiões endêmicas da doença e em azul escuro regiões onde ocorrem casos de co-infecção da SIDA (AIDS) associada à leishmaniose. Figura obtida no sítio da WHO (<http://www.who.int/csr/resources>).

A LV, também conhecida como calazar, cujos principais sintomas são a febre, perda acentuada de peso, anemia e inchaço do baço e do fígado, ataca os órgãos internos e quando não tratada pode levar a morte da pessoa infectada dentro de 2 a 3 anos. A emergência da LV em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (SIDA, figura 3), tem aumentado a atenção para leishmanioses. A OMS estima que 500.000 pessoas adquirem LV por ano, sendo 90% dos casos ocorrentes em países como Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. Na América Latina, a doença também denominada leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar neotropical já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que

90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente nas zonas rurais da Região Nordeste. No entanto, dados epidemiológicos revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral nos centros de médio e grande porte, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (Ministério da Saúde 2003). As áreas de transmissão da doença no Brasil estão representadas na figura 4. Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LVA no país somaram 48.455 e nos últimos dez anos a média anual foi de 3.156 casos. (manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral - Ministério da Saúde 2003).

Figura 4: Distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral segundo município, no ano de 2002. Fonte: SINAN- COVEV/ CGDT/DEVEP/SVS/(MS). Figura adaptada do manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral - Ministério da Saúde 2003, que pode ser obtido diretamente do endereço eletrônico http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/pdfs/manual_controle_lv.pdf.

A leishmaniose cutânea se manifesta por lesões ulcerativas da derme, principalmente na face, braços e pernas, que podem persistir por anos deixando cicatrizes mórbidas. A LMC geralmente é resultante da disseminação do parasita, via corrente sanguínea ou linfática, de ulcerações da derme para os tecidos cartilagosos, especialmente da boca e do nariz. A LC e LMC acometem um milhão e quinhentas mil pessoas a cada ano: três vezes mais que a LV (WHO - <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>).

No continente americano a LC e a LMC são agrupadas em uma única doença denominada leishmaniose tegumentar americana (LTA), também conhecida como úlcera de Bauru, ferida brava entre outras denominações regionais. A LTA distribui-se amplamente estendendo-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile. No Brasil tem sido assinalada em todos os estados, constituindo, portanto, uma das infecções dermatológicas que merece maior atenção devido sua magnitude, bem como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no homem (Ministério da Saúde - FUNASA, 2000). Nos últimos 20 anos, ocorreu um aumento no número de casos associado à expansão geográfica sob diferentes perfis epidemiológicos, estimando-se 523.975 casos autóctones (1985 a 2003) (Basano & Camargo, 2004), com média anual de 35 mil novos casos (Gontijo & Carvalho, 2003).

2.1.2 Diagnóstico, Ciclo de vida e Transmissão

O diagnóstico se divide em três categorias principais: diagnóstico parasitológico, diagnóstico imunológico e métodos de biologia molecular (PCR). O diagnóstico parasitológico é a metodologia mais simples e mais comumente

utilizada. É baseada na observação das formas amastigotas pela histopatologia ou citologia utilizando-se esfregaços de medula óssea ou aspirados de linfonodos corados pelo Giemsa. Este método é de baixo custo, mas a dificuldade na obtenção dos tecidos faz com que o diagnóstico imunológico seja mais utilizado. Os quatro principais testes sorológicos, que se baseiam na detecção de anticorpos antileishmania, são DAT ou teste de aglutinação direta (“Direct Agglutination Test”), IFAT ou imunofluorescência (“Indirect Fluorescent Antibody Test”), ELISA (“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”) e Western Blot. Entretanto, variação entre as amostras, alto custo dos antígenos comercialmente disponíveis e a persistência de anticorpos após a cura são fatores limitantes. Já o método de PCR (amplificação/detecção do DNA de *Leishmania*) é altamente sensível e específico, o que possibilita a identificação dos parasitas a partir de grande variedade de amostras. No entanto, esta técnica nem sempre está disponível para os diagnósticos de rotina (Davies *et al.*, 2003).

O ciclo de vida (figura 5) inicia-se com a liberação dos parasitas no sangue pela picada de mosquitos fêmeas dos gêneros *Phlebotomus* (velho mundo) ou *Lutzomyia* (novo mundo). As leishmanias na forma flagelada de promastigotas ligam-se por receptores específicos (CR3 e CR1) aos macrófagos, pelos quais são fagocitadas (Handman & Bullen, 2002). Os macrófagos deveriam funcionar como células apresentadoras de antígenos ao sistema imune, desencadeando assim uma resposta imunológica. No entanto, as formas amastigotas são adaptadas para viverem e se multiplicarem nos vacúolos parasitóforos (fagossomos), cujo baixo pH (~5) parece estar associado com a mudança de formas de promastigota para amastigota (Antoine *et al.*, 1998; Burchmore & Barrett, 2001). Pelo fato da digestão proteolítica dos parasitas ser comprometida, o macrófago deixa de funcionar como célula

apresentadora de antígenos e passa a abrigar o parasita, fornecendo proteção contra o sistema imune. Desta forma, os parasitas multiplicam-se por divisão binária, saindo para o sangue ou linfa por exocitose, o que leva a destruição da célula hospedeira e possibilita que as leishmanias invadam outros macrófagos. As formas amastigotas ingeridas pelos insetos transmissores transformam-se em promastigotas e multiplicam-se no seu intestino, migrando depois para as probóscides (prolongamento do aparelho bucal, que funciona como picador-sugador).

Figura 5: Esquema representativo do ciclo de vida da *Leishmania*. Figura modificada de www.biosci.ohio-state.edu e apresentada no manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral - Ministério da Saúde 2003.

A transmissão da doença para os hospedeiros vertebrados é feita predominantemente por meio da inoculação das formas promastigotas infectantes durante a picada do inseto vetor. Entretanto outras possibilidades tais como a via

placentária, transfusão sanguínea e compartilhamento de agulhas são formas minoritárias de propagação da leishmaniose.

2.1.3 Tratamento e Prevenção

Os compostos derivados de antimoniais, introduzidos na década de 40, são os medicamentos de primeira escolha atualmente empregados no tratamento contra LV e LC (Croft & Coombs, 2003; Croft *et al.*, 2005). Existem no mercado duas formulações (figura 6) de antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) disponíveis: o estibogluconato de sódio (Pentostam- GlaxoSmithKline) e o antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime - Aventis), não parecendo existir diferenças quanto à eficácia terapêutica destas formulações. No Brasil a única formulação disponível é o antimoniato N-metil glucamina, que vem sendo distribuída pelo Ministério da Saúde em ampolas de 5 ml (contendo 405mg de Sb^{+5}). A dose recomendada é de 2 a 4 ampolas por dia durante 20 a 40 dias e a administração é parenteral. Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasita, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. Os estudos sobre farmacocinética dos Sb^{+5} mostram que esses compostos são rapidamente eliminados da circulação através dos rins (vida média de aproximadamente 2 horas). Nos últimos anos, doses progressivamente maiores dos antimoniais têm sido recomendadas devido ao aparecimento de resistência do parasita a essas drogas e pela variação na sensibilidade ao tratamento em função da diversidade de espécies associadas à doença (Croft, 2001). O principal efeito colateral do antimoniato-N-metil glucamina é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular.

Pentamidina (figura 6), uma diamidina aromática, apresentada como sal de isocianato (Pentacarinat) ou sal metilsufonado (Lomidine), tem sido empregada como tratamento de segunda escolha contra leishmaniose desde 1952. Sua administração é parenteral. No entanto, quando comparada com os antimoniais, apresenta maior toxicidade ao paciente, períodos mais longos de tratamento e sérios efeitos colaterais, tais como hipoglicemia, diabetes, taquicardia, entre outros (Croft & Coombs, 2003).

Outra geração de medicamentos leishmanicidas, Anfotericina B (Bristol Meyers Squibb) (figura 6), são derivados de antibióticos poliênicos e são os mais eficazes disponíveis comercialmente. Sua atividade foi descoberta no início de 1960 e a experiência clínica acumulada com seu uso no tratamento da leishmaniose visceral vem aumentando ao longo dos últimos anos tanto no Brasil quanto na Índia. Anfotericina B atua nas formas promastigotas e amastigotas do parasita e o mecanismo de ação se dá através da ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática da leishmania. No entanto, seus efeitos colaterais, todos dose-dependentes, são inúmeros e freqüentes e sua administração recomendada é intravenosa e lenta, prolongando-se por até 4 horas. As complicações renais são as mais importantes, graus variados de comprometimento renal ocorrem em praticamente todos os pacientes ao longo do tratamento. Novas formulações da Anfotericina B associadas a lipossomas, AmBisome (lipossomal) e Amphocil (dispersão coloidal), tornaram-se disponíveis comercialmente, apresentando uma menor toxicidade ao paciente e permanecendo por mais tempo no organismo. Entretanto, o custo elevado impossibilita o uso destes novos compostos na rotina do serviço (Ministério da Saúde 2003; Croft & Coombs, 2003; Croft *et al.*, 2005).

Figura 6: Estruturas químicas dos principais medicamentos empregados no tratamento da leishmaniose. A) Glucantime. B) Anfotericina B. C) Imiquimod. D) Miltefosine. E) Pentamidina (diamidina) F) Allopurinol. Figura adaptada de Croft & Coombs (2003) e de Kouni (2003).

Talvez o avanço recente mais significativo foi a descoberta, em meados de 1980, da ação leishmanicida do Miltefosine (figura 6) (Impávido – Zentaris AG), uma hexadecilfosfatidilcolina desenvolvida originalmente como agente anticancerígeno. A principal vantagem deste medicamento é a administração oral e sua eficácia foi comprovada contra LV e LC. No entanto, ele apresenta ação teratogênica, impossibilitando seu emprego em mulheres grávidas ou na idade fértil. Nestes casos, a Anfotericina B é a droga de escolha (Ministério da Saúde 2003; Croft & Coombs, 2003).

Os análogos de purinas formam outra frente de compostos leishmanicidas. A atividade antileishmaniose do alopurinol (figura 6) foi identificada há mais de 30 anos. Por causa da sua biodisponibilidade oral e seu vasto uso no tratamento de hiperuricemia (ácido úrico sanguíneo elevado) e artrite aguda (gota) em seres humanos (Martinez & Maar, 1992), se iniciaram os testes clínicos para LC e LV.

Infelizmente, os resultados não foram conclusivos (Croft & Coombs, 2003; Croft *et al.*, 2005). Por outro lado, a administração combinada de alopurinol com um medicamento típico antileishmaniose, como por exemplo pentamidina ou antimonial, foi mais efetiva do que o emprego do medicamento sozinho (Kouni, 2003).

Além destes medicamentos usualmente administrados, estudos preliminares com o fluconazol (antifúngico) e com produtos tópicos como paramomicina e imiquimod têm apresentado resultados satisfatórios com altos índices de cura da leishmaniose (Basano & Camargo, 2004).

A resistência das leishmanias aos fármacos tem sido associada ao aumento de expressão de glicoproteínas específicas envolvidas com mecanismos de transporte de membrana: um conjunto de proteínas ligantes de ATP que modulam a saída e o tráfico intracelular dos agentes quimioterapêuticos. Além disto, a exposição do parasita a doses sub-ótimas e eventos de mudanças fisiológicas tais como: infectividade e metabolismo do parasita, interações parasita-hospedeiro e diferenciação das formas celulares promastigotas e amastigotas também podem estar associados à tal resistência. Entretanto, ainda não está claro se estes eventos fisiológicos são essenciais para conferir resistência aos parasitas ou se são fenômenos não diretamente relacionados. Desta forma, uma melhor compreensão a respeito destes mecanismos é fundamental para o tratamento e controle da leishmaniose (Ponte-Sucre, 2003). Para um maior detalhamento sobre os medicamentos utilizados no tratamento de leishmaniose consultar as revisões feitas por Croft & Yardley (2002) e por Croft *et al.* (2005).

Com o intuito de encontrar novos compostos menos tóxicos, economicamente mais viáveis, de efeito específico e que revertam a resistência do parasita aos medicamentos, estudos com produtos naturais extraídos de plantas têm aumentado

nos últimos anos (Bergmann *et al.*, 1997). Neste contexto, as espécies de plantas *Kalanchoe pinata* e *Solanum lyratum Thunb* demonstraram ter efeito sobre a redução das lesões em camundongos, pelo aumento da produção de óxido nítrico pelos macrófagos (Bergmann *et al.*, 1997) e pelas células da cavidade peritoneal (Kim *et al.*, 1999), sugerindo possível atividade terapêutica no tratamento da leishmaniose.

No que diz respeito à prevenção, os métodos mais comuns são a desinsetização das áreas de risco para a erradicação dos insetos vetores, o uso de mosquiteiros impregnados de inseticidas e a aplicação de repelentes sobre a pele. Sacrificar cães infectados também faz parte do controle da doença.

Ainda em se tratando de prevenção, devemos ressaltar a importância das vacinas. O foco da pesquisa moderna de vacinas é o uso de proteínas recombinantes que funcionam como antígenos, parasitas vivos atenuados e vacinas de DNA. As diferentes espécies de *Leishmania* possuem variações na expressão de proteínas durante o processo de diferenciação; e as formas amastigotas e promastigotas não apresentam o mesmo padrão antigênico. Assim, nenhuma evidência exclui a possibilidade que diferentes antígenos estejam relacionados a mecanismos imunes efetores distintos (Pinheiro, 2004).

A vacina denominada Leishvacin (Biobrás) tem duas possibilidades de uso: preventiva ou terapêutica (cura). Os testes da vacina terapêutica já foram concluídos e apresentaram excelentes resultados. Entretanto, o registro da vacina preventiva somente poderá ser solicitado quando todos os testes clínicos forem concluídos. Estima-se que a produção em escala comercial da Leishvacin (preventiva) se iniciará após o ano 2020 (www.revista.fapemig.br).

Considerando-se o panorama descrito acima em relação ao tratamento da leishmaniose: características de toxicidade indesejáveis dos medicamentos,

aparecimento de formas resistentes de leishmania e ausência até o momento de uma vacina eficiente disponível comercialmente, torna-se evidente a necessidade da descoberta de novos fármacos antileishmanióticos.

Apesar desta necessidade ser alarmante, das 1.393 novas entidades químicas aprovadas entre 1975 e 1999, apenas 16 (1%) são para tratar doenças tropicais e tuberculose, que afetam as populações pobres e correspondem a 12% do total de doenças. No mesmo período, 179 novos medicamentos foram criados para combater problemas cardiovasculares, que representam 11% do total de enfermidades. Devido a este tipo de discriminação, as doenças tropicais foram batizadas como “doenças negligenciadas” (Trouiller *et al.*, 2001; Trouiller *et al.*, 2002). Por causa da falta de remédios ou da inexistência de tratamento adequado, todo ano 14 milhões de pessoas morrem no mundo vítimas deste tipo de doenças infecciosas. Nos últimos cinco anos, nenhuma das 20 empresas de maior faturamento dos Estados Unidos, da Europa e do Japão lançou no mercado novos fármacos para moléstias consideradas extremamente negligenciadas. Além disto, apenas 10% das pesquisas em saúde são dedicadas a estas doenças, que correspondem a 90% da carga global de enfermidades. O argumento usado pelas indústrias farmacêuticas para justificar o investimento próximo de zero em pesquisa e desenvolvimento para doenças negligenciadas é o alto custo comparado ao retorno esperado muito pequeno (Troiller *et al.*, 2002; Morel, 2003).

Embora os países subdesenvolvidos convivam com doenças infecciosas e parasitárias (como leishmaniose, doença de Chagas, esquistossomose, malária, dengue e etc), eles possuem centros de pesquisa qualificados. Assim, cabe aos centros financiados pelo setor público tentar suprir a lacuna deixada pelos grandes laboratórios farmacêuticos, cujas prioridades estão voltadas às populações com poder

de compra. Neste contexto, vale ressaltar a importância das pesquisas nas áreas de genética, bioquímica e biologia molecular de parasitas desenvolvidas em nosso país, visando a busca de vias alternativas e identificação de potenciais alvos, aliados a descoberta de novos compostos que, futuramente, possam ser empregados no tratamento das doenças negligenciadas.

Diante deste cenário, o Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do IFSC (Instituto de Física de São Carlos-USP) vem desenvolvendo pesquisas na área de planejamento racional de compostos que possam ser úteis no desenvolvimento de fármacos antitripanosomatídeos, com base na estrutura de proteínas alvos.

2.1.4 Enzimas do metabolismo de purino-nucleotídeos como potenciais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos contra leishmaniose

A primeira etapa na abordagem moderna de desenvolvimento racional de fármacos se baseia na identificação de vias metabólicas indispensáveis à sobrevivência do parasito (Hassan & Coombs, 1986). Tradicionalmente, através de comparações bioquímicas, enzimas identificadas no parasita que sejam ausentes ou bastante distintas das do hospedeiro mamífero têm sido consideradas potenciais alvos (para revisão ver Cowman & Crabb, 2003). Contudo, para que se possa empreender um programa efetivo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, além da caracterização detalhada das enzimas da via metabólica que se deseja interromper, as validações genéticas e bioquímicas dos seus alvos são imprescindíveis.

As principais técnicas de biologia molecular empregadas atualmente para validação genética de alvos são: “gene knockout”, RNA anti-senso e mais

recentemente o RNA de interferência – RNAi. Estas metodologias visam a supressão por “silenciamento” ou a redução dos níveis de expressão gênica.

O RNAi apresenta algumas vantagens quando comparado com as demais técnicas. Por ser um processo disparado pela presença de RNA dupla fita (dsRNA), cuja sequência é específica ao RNA mensageiro alvo que será degradado (Fire *et al.*, 1998), o RNAi não interfere ao nível do DNA, como ocorre em “knockout”, uma vez que ele atua numa etapa pós-transcricional. Além disto, as pequenas moléculas dupla fita siRNAs (“small interfering RNAs”), que são produtos da clivagem da dsRNA, apresentam maior facilidade para atingir o alvo, devido a sua maior estabilidade. Por sua vez, os RNAs anti-senso, que são RNAs longos e fita simples, são mais facilmente degradados dentro da célula (para revisão ver Thakur, 2003). Considerando-se a família Trypanosomatidea, o RNAi foi primeiramente descoberto em *T. brucei* (Ngô *et al.*, 1998) e rapidamente se tornou o método de escolha para estudos de supressão da expressão gênica em parasitas (para revisão ver Ullu *et al.*, 2004). É interessante salientar que a técnica do RNAi se aplica somente a *T. brucei*, uma vez que *Leishmania* e *T. cruzi* não possuem as enzimas necessárias ao processo.

Já a validação bioquímica requer o uso de compostos químicos que interagem de maneira específica e seletiva bloqueando ou diminuindo a atividade das enzimas chave. Assim, a determinação das características físico-químicas e estruturais da enzima, bem como a caracterização cinética e a identificação dos sítios catalíticos são indispensáveis para a abordagem de desenho racional de fármacos. Esta abordagem, apesar de muito útil e informativa, é susceptível a artefatos pela interação inesperada do inibidor com outros componentes do metabolismo celular que podem aumentar ou diminuir o efeito do mesmo sobre o alvo esperado.

Uma das diferenças metabólicas mais marcantes entre os protozoários parasitas e o hospedeiro mamífero encontra-se na cadeia de síntese de purino-nucleotídeos (figuras 7 e 8) (Hochstadt, 1978a; Berens *et al.*, 1995). Em células de mamíferos, os purino-nucleotídeos podem ser sintetizados a partir de duas vias. Uma via, envolvendo dez reações enzimáticas sequenciais leva a síntese “*de novo*” dos purino-nucleotídeos a partir de precursores mononucleotídeos. Estas reações resultam na síntese do anel purínico e a formação de inosina monofosfato (IMP), como representado na figura 7. O IMP por sua vez é convertido em adenosina monofosfato (AMP) e guanosina monofosfato (GMP). Uma segunda cadeia metabólica, denominada via de recuperação (Hochstadt, 1978b; Ullman & Carter, 1997), mostrada na figura 8, utiliza os purino-nucleotídeos pré-formados (adenina, guanina e/ou hipoxantina) derivados da degradação de ácidos nucleicos ou nucleotídeos livres. Na via de recuperação, as purinas livres reagem diretamente com fosforribosilpirofosfato (PRPP) sendo convertidas nos nucleotídeos-5'-monofosfatos, IMP, AMP e GMP. Em mamíferos estas reações são catalisadas por enzimas fosforribosiltransferases (PRTases) distintas: adenina-fosforribosil-transferase (APRT) e hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT). Diversos organismos, entre eles os Kinetoplastida, possuem além da APRT e HGPRT uma enzima adicional, a xantina-fosforribosil-transferase (XPRT).

Figura 7: Esquema representativo da via de síntese *de novo* de purinonucleotídeos. A enzima de interesse do presente trabalho - ADSL (em vermelho) atua no passo 9, convertendo o substrato SAICAR no produto AICAR com a liberação de fumarato. 1 Glutamina-PRPP amidotransferase; 2 GAR sintetase; 3 GAR transformilase; 4 FGAR amidotransferase; 5 AIR sintetase; 6 N⁵-CAIR sintetase; 7 N⁵-CAIR mutase; 8 SAICAR sintetase; 9 SAICAR lyase (ADSL); 10 AICAR transformilase e 11 IMP sintetase. Fonte: Nelson & Cox (2005).

Figura 8: Esquema representativo do metabolismo de purino-nucleotídeos, com destaque para a via de recuperação. Os passos da via de síntese *de novo* estão representados pela linha tracejada em cinza e via de recuperação está englobada pelo círculo laranja. Os hospedeiros mamíferos podem usar as duas vias, enquanto os parasitas utilizam apenas a via de recuperação para obtenção dos purino-nucleotídeos. A enzima de interesse do presente trabalho está representada pela seta rosa: ADSL. IMP: insina monofosfato, AMP: adenosina monofosfato; ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato GMP: guanosina monofosfato; GDP: guanosina difosfato; GTP: guanosina trifosfato; XMP: xantina monofosfato; PPi: pirofosfato; PRPP: 5-Fosforribosil-1-Pirofosfato; ADSS: Adenilossuccinato sintetase; ADSL: adenilossuccinato liase; AMD: AMP deaminase; APRT: adenina-fosforribosil-transferase; HGPRT: hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase; XPRT: xantina-fosforribosil-transferase; IMDh: inosina-5'-monofosfato desidrogenase; GMS: GMP sintetase; GMR: GMP redutase; AAH: adenina aminohidrolase.

A maioria dos protozoários parasitas, em contraste com seus hospedeiros, é auxotrófica para purino-nucleotídeos (Hochstadt, 1978a; Berens *et al.*, 1995), sendo

dependente da via de recuperação. Em consequência disso, cada gênero de parasito desenvolveu um conjunto específico de enzimas da via de recuperação que permite ao organismo utilizar as purinas pré-formadas adquiridas do hospedeiro ou derivadas do metabolismo de nucleotídeos. Características únicas da via de recuperação em *Leishmania* e *Trypanosoma* constituem a base para a suscetibilidade destes microrganismos a análogos de purino-nucleotídeos (Hochstadt, 1978a; Palella & Fox, 1989; Berens *et al.*, 1995; Ullman & Carter, 1995). Em particular, o alopurinol (4-hidroxipirazol[3,4]pirimidina) tem sido explorado clinicamente no tratamento de leishmaniose cutânea e doença de Chagas crônica (Gallerano *et al.*, 1990).

Enzimas envolvidas na via de recuperação de purino-nucleotídeos de várias espécies de parasitos foram clonadas e caracterizadas em detalhe (Fish *et al.*, 1982; Lafon *et al.* 1982; Beck & Wang, 1993; Allen & Ullman, 1994; Allen *et al.*, 1995a; Allen *et al.*, 1995b; Jiang *et al.*, 1996; Sommer *et al.*, 1996, para uma maior revisão ver Kouni, 2003). Entre os membros dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* essa via é extremamente conservada.

As enzimas adenilosuccinato liase (ADSL, EC 4.3.2.2), adenilosuccinato sintetase (ADSS, EC 6.3.4.4) e AMP deaminase (AMD, EC 3.5.4.6) de *Leishmania* estão envolvidas na conversão do IMP em AMP pelo intermediário de reação, o adenilosuccinato. A adenilosuccinato liase é uma enzima capaz de ligar diversos análogos de IMP, inclusive o ribonucleotídeo allopurinol.

As diferenças no metabolismo de purino-nucleotídeos entre os parasitas e seus hospedeiros mamíferos são bem documentadas (para revisão ver Kouni, 2003). Entretanto, algumas considerações foram levantadas pela existência de múltiplas vias independentes no metabolismo de purinas de parasitas: para continuar a explorar as enzimas da via de recuperação de purino-nucleotídeos como potenciais alvos para o

desenho racional de fármacos, idealmente todos os passos enzimáticos desta cadeia devem ser identificados e investigados através de análises de estrutura-função. Adicionalmente, um inibidor para cada passo deve ser descoberto e dois ou mais destes inibidores devem ser combinados para que se obtenha uma quimioterapia efetiva contra os parasitas, uma vez que esta via possui várias rotas redundantes. Assim, uma estratégia possível baseia-se em intervir em duas ou mais etapas da via de recuperação.

Neste contexto, dentro dos projetos desenvolvidos no grupo, estão sendo estudadas diversas enzimas desta via. A investigação da participação da adenilosuccinato liase no metabolismo da via de recuperação, seu envolvimento e importância nesta via metabólica e sua possível dupla atividade (via de recuperação e via de síntese de novo) são aspectos de interesse do presente trabalho. Uma consequência deste projeto é seu potencial para vir a contribuir como um novo alvo molecular para o desenho de inibidores e substratos subversivos para a possível quimioterapia de leishmanioses.

2.2 A enzima Adenilosuccinato Liase (ADSL)

Adenilosuccinato liase, também denominada adenilosuccinase, ADSL ou ASL, é uma enzima que atua em duas etapas no metabolismo de purino-nucleotídeos (figuras 7, 8 e 9). Na via de síntese *de novo*, a ADSL converte o composto 5-aminoimidazol-(N-succinilocarboxamida) ribotideo (SAICAR) em 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribotideo (AICAR), sendo este o nono passo da via de síntese *de novo* de purino-nucleotídeos. Na via de recuperação, a ADSL converte adenilosuccinato em adenosina monofosfato (AMP) (Woodward & Braymer, 1966; Ratner, 1972).

Figura 9: Esquema das duas etapas catalisadas pela adenilossuccinato liase (ADSL) no metabolismo de purino-nucleotídeos. A) Conversão do SAICAR em AICAR na via de síntese *de novo* de purino-nucleotídeos. B) Conversão do adenilossuccinato em AMP na via de recuperação de purino-nucleotídeos. Figura adaptada de Toth & Yeates (2000).

ADSL, juntamente com as enzimas adenilossuccinato sintetase (ADSS) e AMP deaminase, participa do metabolismo de purino-nucleotídeos. Estes compostos são precursores dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e, portanto apresentam fundamental importância na replicação celular. Além do papel essencial na replicação, os purino-nucleotídeos regulam o metabolismo celular através do controle da quantidade disponível de intermediário do ciclo do ácido cítrico (Fumarato) e de AMP livre (que afeta a taxa de formação de adenosina trifosfato - ATP). Portanto, ADSL tem um papel fundamental não apenas na replicação, como também no metabolismo celular. Resta determinar se em Kinetoplastida este papel é exercido diretamente ou indiretamente sobre os diversos metabolismos celulares.

A participação desta enzima, em seres humanos, tem um efeito pronunciado no metabolismo do cérebro e de músculos e a deficiência na sua atividade pode gerar severas desordens neurológicas incluindo retardo mental e psicomotor, com características autistas (Van den Berghe *et al.*, 1991). A relação entre tais características e a deficiência da ADSL foi primeiramente estabelecida quando Jaeken & Van den Berghe (1984), detectaram elevados níveis de derivados desfosforilados dos substratos SAICAR e adenilosuccinato no sangue de crianças que apresentavam estes sintomas. Atualmente, várias mutações na enzima humana já foram identificadas em pacientes com tais patologias neurológicas e estudos bioquímicos têm sido realizados com o intuito de correlacionar os aspectos clínicos, bioquímicos e genéticos da deficiência da ADSL (Race *et al.*, 2000; Kmoch *et al.*, 2000). Neste contexto, análises de estrutura-função envolvendo mutagênese sítio dirigida sobre o gene da ADSL humana, ensaios bioquímicos de atividade enzimática e modelagem da estrutura tridimensional (3D) das formas mutantes vêm sendo realizados também em nosso grupo (Evangelista *et al.*, 2005), com colaboração do Prof. Dr. Stanislav Kmoch (Institute for Inherited Metabolic Disorders, Charles University 1st School of Medicine and General Faculty Hospital – República Tcheca).

ADSL pertence à superfamília de enzimas que catalisam reações de β -eliminação. Todos os membros analisados até o momento são homotetrâmeros e apresentam um peso molecular de aproximadamente 200 kDa. A identidade sequencial entre os diversos membros da superfamília é geralmente menor que 25%. Entretanto, devido à similaridade de suas funções, as estruturas cristalográficas destas enzimas mostram enovelamentos 3D semelhantes. Até o momento, foram resolvidas as estruturas cristalográficas das ADSLs das bactérias *Bacillus subtilis*

(Toth, 1999), *Thermotoga maritima* (Toth & Yeates, 2000), da arqueobactéria *Pyrobaculum aerophilum* (Toth *et al.*, 2000), do verme nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Symersky *et al.*, submetido), do parasita *Plasmodium vivax* (Wernimont *et al.*, submetido) e humana (Stenmark *et al.*, submetido).

O foco principal do presente trabalho foi a caracterização molecular do gene *adsl* e a caracterização bioquímica e estrutural da enzima ADSL do parasita *Leishmania major* Friedlin (ADSL-Lm). Paralelamente, a ADSL humana (ADSL-hum) também vem sendo por nós analisada e seu estudo físico-químico, funcional e estrutural possibilitará uma análise comparativa da ADSL-hum e da ADSL-Lm, auxiliando na busca de substratos subversivos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos contra a leishmaniose.

3. OBJETIVOS

Para responder as questões levantadas no início deste capítulo, os objetivos específicos foram:

- i) Investigar o papel da ADSL para a sobrevivência dos tripanosomatídeos, através de experimentos de RNAi em *Trypanosoma brucei*.
- ii) Caracterizar molecularmente o gene *adsl-Lm*.
- iii) Caracterizar bioquímica e estruturalmente a enzima recombinante ADSL-Lm.
- iv) Investigar a possibilidade funcional e/ou estrutural da ADSL de Kinetoplastida possuir ou não atividade remanescente na via de síntese de novo, refletindo sua origem evolutiva.

CAPÍTULO II

VALIDAÇÃO GENÉTICA DA ENZIMA ADSL – EXPERIMENTOS DE RNAi EM Trypanosoma brucei

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. David Campbell (Department of Microbiology, Immunology & Genetics, UCLA, Los Angeles, USA), mediante a realização de um estágio de 3 meses em seu laboratório.

1. INTRODUÇÃO

1.1 RNA de interferência - RNAi

1.1.1 Definição de RNAi

RNAi é um processo de “silenciamento” pós-transcricional da expressão gênica (PTGS), o qual é disparado pela presença de RNA dupla fita (dsRNA) cuja sequência é específica ao RNA mensageiro alvo que será degradado (Fire *et al.*, 1998).

1.1.2 Descoberta do RNAi

O mecanismo de PTGS foi descoberto ao acaso há aproximadamente dez anos em um estudo realizado por Rich Jorgensen e colaboradores (Jorgensen *et al.*, 1994), ao tentarem intensificar a cor púrpura de pétalas em Petúnias. Os pesquisadores introduziram um gene que codifica este pigmento sob controle de um forte promotor e ao invés de obterem, como esperado, uma intensificação da coloração desejada, muitas das flores apareceram variegadas e até mesmo brancas. Este fenômeno foi inicialmente considerado “bizarro” e então denominado de co-supressão, uma vez que a expressão tanto do gene introduzido (transgene), quanto do homólogo endógeno foi suprimida (Napoli *et al.*, 1990). No entanto, RNAi foi primeiramente descrito em 1998 (Fire *et al.*, 1998). Neste ano, os grupos de Andrew

Fire e Craig Mello descreveram os efeitos inesperados da injeção de moléculas de RNA dupla fita (dsRNAs) nos vermes nemátodos *Caenorhabditis elegans*: os dsRNAs induziam o “silenciamento” gênico de maneira gene-específica e alguns animais apresentavam fenótipos mutantes. Desde então, o termo RNAi vem sendo utilizado para indicar interferência genética por dsRNA.

1.1.3 Mecanismo de RNAi

O passo iniciador que dispara RNAi é a presença de moléculas longas de RNA dupla fita (dsRNA) com centenas de nucleotídeos (nt). A fita que possui a sequência idêntica à região do RNAm alvo é denominada senso, enquanto a outra fita, complementar, é chamada de anti-senso. Uma endoribonuclease - DICER (Bernstein *et al.*, 2001), similar a RNaseIII, reconhece o dsRNA e efetua a clivagem desta longa fita em pequenos fragmentos de RNA conhecidos como siRNAs (“small interfering RNAs”, Elbashir *et al.*, 2001), os quais têm uma estrutura característica: 21nt de RNA, sendo 19nt pareados formando uma dupla fita e 2nt não pareados projetados (“overhang”) nas extremidades 3'. O próximo passo consiste da remoção da fita senso do siRNA, e a fita anti-senso (complementar ao RNA mensageiro alvo) induz a degradação do mesmo suprimindo assim sua expressão.

Três modelos têm sido propostos para explicar o processo de RNAi (Schwarz *et al.*, 2002). Cada um busca elucidar o mecanismo pelo qual siRNAs direcionam para a destruição do RNAm alvo.

No primeiro modelo (figura 1), a degradação do alvo requer uma enzima polimerase dependente de RNA (RdRP) para converter o RNAm em dsRNA (Lipardi *et al.*, 2001). RdRP utiliza a fita anti-senso do siRNA como iniciadora (“primer”) para síntese de uma fita complementar (RNAc) ao molde de RNAm. A molécula

resultante é uma dupla fita de RNA constituída de RNAm/RNAc, que será então clivada pela DICER, uma vez que dsRNA é o substrato desta enzima, degradando assim, o RNAm alvo. A clivagem gera novos siRNAs que podem amplificar o processo. O segundo modelo propõe que fitas anti-senso dos siRNAs não participam como iniciadoras para a RdRP. Elas se anelam ao longo do RNAm alvo e são então ligadas por uma RNA ligase para formar RNAc (Lipardi *et al.*, 2001; Nishikura, 2001). As moléculas híbridas RNAc/RNAm são dupla fita e podem ser novamente clivadas pela DICER. No terceiro modelo (figura 1), duas enzimas ou dois complexos enzimáticos distintos atuam no ciclo de RNAi. Assim como nos dois modelos anteriores, DICER é considerada a responsável pela clivagem de dsRNAs em siRNAs. Estes siRNAs são então incorporados em um segundo complexo protéico denominado “RNA-induced silencing complex” - RISC (Hammond *et al.*, 2000; Zamore *et al.*, 2000; Nykänen *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2002), em um passo que envolve a abertura das fitas dos siRNAs para a formação de fitas simples. A fita anti-senso proveniente do siRNA guia todo o complexo RISC para o reconhecimento e degradação do RNAm alvo.

Figura 1: Modelos propostos para o processo de RNAi. Ambos predizem que moléculas dsRNAs são convertidas em pequenos fragmentos também dupla fita de RNA, siRNAs, pela endoribonuclease DICER. No entanto, os modelos se distinguem nos passos posteriores relacionados ao modo como estes siRNAs conduzem à degradação do RNA mensageiro alvo, resultando no “silenciamento” gene-específico. No modelo à esquerda, siRNAs funcionam como iniciadores para a síntese de uma fita de RNA complementar ao RNAm alvo pela RdRP. Moléculas dsRNAs resultantes são novamente clivadas pela DICER, levando à degradação do RNAm e formação de mais siRNAs que podem realimentar o ciclo de RNAi. Neste processo, a DICER atua duas vezes. No modelo à direita, siRNAs são incorporados ao complexo enzimático (RISC), distinto da DICER, que é guiado ao RNAm alvo a ser degradado. Figura adaptada de Schwarz *et al.* (2002).

1.1.4 Aplicações de RNAi

As principais vantagens do mecanismo de RNAi comparado ao “knockout” e RNA anti-senso podem ser ressaltadas como:

- RNAi não interfere no DNA, como ocorre em “knockout”, uma vez que RNAi atua numa etapa pós-transcrição.

- siRNAs apresentam maior facilidade para atingir o alvo, devido sua maior estabilidade, quando comparados com RNAs anti-senso que são fita simples, e portanto, facilmente degradados dentro da célula.

A descoberta de que moléculas dupla fita de RNA com 21-23nt (siRNAs) podem silenciar genes alvos, através de uma clivagem sequência-específica do RNA transcrito, tem proporcionado um avanço no estudo da função gênica baseado no fenômeno de RNAi. Assim, este mecanismo tem causado uma revolução na biologia molecular nos últimos anos, no que diz respeito ao controle da expressão gênica, e tem se mostrado como uma poderosa ferramenta na validação de genes em muitas espécies, para aplicações terapêuticas contra várias doenças e na compreensão do funcionamento de genes envolvidos em fenômenos complexos como a obesidade e o envelhecimento (para revisão ver Thakur, 2003). Neste contexto, podemos citar alguns exemplos do uso de RNAi:

i) contra HIV: eliminação de proteínas que o vírus necessita para causar a infecção (entrada na célula) e/ou para multiplicação dentro da célula hospedeira, via “silenciamento” dos genes codificadores de tais proteínas. A estratégia de RNAi pode incluir múltiplos alvos para eliminar o HIV.

ii) contra o câncer: o fato de siRNAs poderem silenciar oncogenes é uma vantagem em relação aos tratamentos quimioterapêuticos que destroem tanto células cancerígenas quanto células saudáveis.

iii) contra parasitas: siRNAs são efetivos contra parasitas e podem ser utilizados para validar alvos e silenciar genes de parasitas e outros patógenos que se beneficiam de células hospedeiras humanas.

iv) estudo da função de genes em grande escala: injeções de siRNAs sintéticos e análises dos fenótipos possibilitam que experimentos sejam feitos em

grande escala em busca de um melhor entendimento da função de genes envolvidos com fenômenos biológicos complexos que ocorrem dentro das células. Além disto, permite decifrar o papel de genes que foram parcialmente sequenciados.

1.1.6 RNAi em *Trypanosoma brucei*

RNAi foi descoberto em *T. brucei*, por acaso, em pesquisas realizadas por grupos da Yale Medical School (EUA) e os primeiros dados foram reportados em 1997 (Ullu *et al.*, 2004). Naquele momento, as implicações das descobertas não eram completamente entendidas, mas no ano seguinte, tornou-se claro que *T. brucei* (Ngô *et al.*, 1998), assim como o nemátodo *C. elegans* (Fire *et al.*, 1998), possuía a maquinaria enzimática responsável pela degradação específica de um RNA mensageiro disparada pela exposição de um dsRNA homólogo. Desde então, RNAi tem sido considerado o método de escolha para estudar a supressão da expressão gênica em *T. brucei* e vários grupos têm investido na produção de vetores apropriados (Shi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000).

Existem dois tipos de vetores para expressão de dsRNA em *T. brucei*. O primeiro envolve a clonagem de um fragmento do gene de interesse entre dois promotores e terminadores T7 opostos. O segundo permite a expressão de uma estrutura tipo grampo de cabelo (“hairpin”) do gene de interesse (Wang *et al.*, 2000). Ambos são usualmente utilizados para RNAi em *T. brucei*, se integram nas regiões espaçadoras de DNAr (DNA ribossômico) e possuem promotores fortes induzidos por Tetraciclina (Tet) (figura 2). A integração do vetor numa região não transcrita do genoma de *T. brucei* resulta no estabelecimento de uma linhagem celular estável e a indução por Tet leva a produção de dupla fita de RNA (dsRNA) com concomitante degradação do RNA mensageiro alvo.

Figura 2: Ilustrações esquemáticas dos vetores empregados para RNAi em *T. brucei*, na forma linearizada após clivagem da região espaçadora de DNAr. A) Vetor pJZM. Este vetor possibilita a expressão de uma dupla fita de RNA (dsRNA), pois a sequência do gene alvo é clonada entre dois promotores T7 com orientações opostas, substituindo a sequência do gene da tubulina α . B) Vetor "stem-loop". Este tipo de vetor possibilita a produção de uma dupla fita de RNA (dsRNA) através da formação de uma alça. As direções 5'-3' do gene alvo ("target gene") estão indicadas por setas horizontais. Promotor induzido por tetraciclina = *seta Procyclin*; Operador de tetraciclina = *Tet Op*; Terminadores T7 = $\Omega\Omega$; Promotores T7 induzidos por tetraciclina = *setas T7*; DNA ribossômico = *rDNA spacer*; Sequência de adição poly A actina = *ACT polyA*; Gene que confere resistência ao antibiótico fleomicina = *BLE*; Sítio aceitor de splice = *SAS*; Sequência de adição poly A aldolase = *ALD polyA*. Figura extraída de Wang *et al.*, 2000.

Um fato interessante é que membros da mesma família que *T. brucei*, como *T. cruzi* e *L. major*, são considerados RNAi negativos. Estratégias experimentais similares às que revelaram RNAi em *T. brucei*, evidenciaram que tanto *L. major* quanto *T. cruzi* são incapazes de utilizar dsRNA para disparar a degradação do RNAm, provavelmente por não possuírem a maquinaria enzimática responsável pela

resposta de RNAi (Robinson & Beverley, 2003; para revisão de RNAi em protozoários parasitas, ver Ullu *et al.*, 2004). Assim, embora o enfoque do presente trabalho seja a ADSL de *L. major*, os experimentos de RNAi foram realizados com o gene *adsl* de *T. brucei* (*adsl-Tb*).

Considerando-se que para empreendimento de um programa efetivo de desenho racional de fármacos, além da caracterização detalhada da via metabólica que se deseja interromper, a validação dos seus alvos é imprescindível, torna-se claro o motivo pelo qual nos interessamos em adquirir conhecimentos sobre a técnica de RNAi. O estágio realizado no laboratório do Prof. Dr. David Campbell (Department of Microbiology, Immunology & Genetics, UCLA, Los Angeles, USA) nos possibilitou investigar a participação da enzima ADSL na via de purino-nucleotídeos, em relação à sua importância para o crescimento do parasita, bem como introduzir a utilização de RNAi em nosso laboratório para validação de outros alvos que fazem parte de diversos projetos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Primeiramente o gene *adsl* de *T. brucei* foi clonado no vetor pGEM-T (Promega). O vetor pGEM-T foi escolhido pelo fato de fornecer um sistema conveniente para clonagem de produtos de PCR ("Polymerase Chain Reaction"). Este plasmídeo possui um nucleotídeo desoxiribotimina (T) em ambas extremidades 3'. Isto aumenta significativamente a eficiência de ligação do produto de PCR prevenindo a recircularização do plasmídeo e fornecendo uma extremidade compatível para ligação do fragmento gerado por algumas DNA polimerases termoresistentes usadas em reações de PCR, que adicionam uma desoxiriboadenina

(A) nas extremidades 3' dos fragmentos amplificados (Manual do pGEM-T - PROMEGA). De posse do clone recombinante, este foi levado para o laboratório da UCLA para que o gene pudesse ser subclonado nos vetores apropriados para RNAi.

2.1 Amplificação do gene *adsl-Tb* e clonagem no vetor pGEM-T

A sequência do gene *adsl-Tb* encontra-se depositada nos bancos de dados <http://www.genedb.org> (Tb09.160.5560) e <http://www.ncbi.nih.gov> (XM-8220152015). Com base nesta sequência foram sintetizados oligonucleotídeos específicos para as extremidades 5' (senso) e 3' (anti-senso) do gene. A fase aberta de leitura (ORF) do gene *adsl-Tb* foi amplificada por PCR, a partir do DNA genômico de *T. brucei*, utilizando a enzima “Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity” (Invitrogen) e os iniciadores TbADSL-1 (que possui uma sequência específica de reconhecimento da enzima de restrição *Bam*HI) e TbADSL-2 (que possui uma sequência específica de reconhecimento da enzima *Xho*I) (tabela 1). Estes oligonucleotídeos foram desenhados visando a subclonagem nos dois vetores apropriados para RNAi em *T. brucei*: pZJM e pGR (“stem loop”) e por este motivo as sequências de reconhecimento das endonucleases citadas acima foram adicionadas. Entretanto, os resultados obtidos para o segundo vetor (pGR) não foram satisfatórios. Desta maneira, demos continuidade somente com a construção no pZJM. A reação foi feita segundo condições descritas na tabela 2 e submetida a um programa de PCR (tabela 3), no termociclador PTC-100 TM Programable Thermal Controller (MJ Research Inc.).

Tabela 1: Nome e sequência dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para amplificação do gene *adsl-Tb*. Sequências nucleotídicas reconhecidas pela *Bam* HI e *Xho* I estão sublinhadas.

Oligonucleotídeos	Sequências dos oligos 5'-3'
TbADSL-1 (senso)	ACTCGGATCCATGGAGAAGGGTTCACCATCCGACTTAAAC
TbADSL-2 (anti-senso)	CTACTCGAGTTTAGCACTGAAGCGAGGAACGTACCCTAC

Tabela 2: Reagentes usados na reação de PCR realizada para amplificação do gene *adsl-Tb*.

Mistura da reação de amplificação	Volume (μl)	Concentração final
Tampão PCR [10X] sem Mg (Invitrogen)	5,0	1X
dNTPs 10mM solução estoque (A, G, C, T)	1,0	0,2mM cada
MgSO ₄ 50mM	2,0	2,0mM
Oligodeoxinucleotídeo senso 100pmol/ul	1,0	0,2μM
Oligodeoxinucleotídeo anti-senso 100pmol/ul	1,0	0,2μM
DNA molde		100ng
Platinum <i>Taq</i> DNA polimerase (5U/μl)	0,2	1,0U
H ₂ O milliQ autoclavada q.s.p.	50,0	

Tabela 3: Protocolo do programa de PCR (com “Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity”).

Programa de PCR						
Número de ciclos	1x	25x			1x	
T° C	94	94	60	68	68	4
Tempo	2min	30seg	30seg	90seg	10min	infinito

O produto da amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% feito em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40mM e EDTA 1mM, pH 8,0) e a banda de interesse foi purificada do gel preparativo utilizando-se o “Perfectprep Gel Cleanup Kit” (Eppendorf), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. O fragmento purificado foi submetido à adição de desoxiriboadenina (A), a 70°C por 30 minutos e ligado ao vetor de clonagem pGEM-T, conforme especificações do fabricante (Promega). Células competentes de *Escherichia coli* DH5α foram transformadas por choque térmico (Sambrook & Russell, 2000), com o plasmídeo proveniente da ligação. Cerca de 100μl e 200 μl da cultura foram espalhados em placas de Petri contendo meio de cultura LB (Luria Bertane) sólido (1% de bactotripton, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,5 e 1,5% agar), ampicilina (100μg/ml), IPTG (0,5mM) e X-Gal (80μg/ml). As placas de Petri foram

incubadas a 37°C por 16 horas para o crescimento das colônias transformadas. Colônias foram individualmente inoculadas em 5ml de meio LB líquido (1% de bactotripton, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,5), com ampicilina a 100µg/ml. Estes inóculos foram deixados a 37°C, sob 250rpm de agitação por 16 horas e preparações plasmidiais, por lise alcalina, dos clones recombinantes foram realizadas de acordo com Sambrook & Russell (2000). A estratégia adotada para a verificação destes clones envolveu a amplificação por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos do vetor e digestão com duas endonucleases de restrição (*Nco* I e *Nde* I) que não clivam internamente o gene *adsl-Tb*, mas clivam o vetor pGEM-T (tabela 4). As reações de digestão foram deixadas a 37°C por 4 horas e os produtos tanto de PCR quanto da digestão foram analisados em gel de agarose. Uma vez identificados os clones positivos, estes foram submetidos ao sequenciamento de DNA.

Para o sequenciamento dos clones, com oligonucleotídeos específicos ao vetor e ao gene, utilizou-se do “Kit BigDye-terminator” e do sequenciador automático de DNA ABI377 (Perkin-Elmer). Os eletroferogramas resultantes foram analisados por alinhamentos feitos pelo programa “SEQMAN”(Pacote DNASTAR Lasergene Sequence Analysis Software). Estes alinhamentos possibilitam a obtenção de uma única sequência consenso do gene, que foi submetida à comparação com as sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados NCBI. Para tanto, utilizou-se o programa “BLASTn” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), com o objetivo de verificar a porcentagem de identidade entre a sequência consenso (SeqMan) e a sequência do gene presente no NCBI. Além disso, pôde-se checar se existiam mutações introduzidas pela reação de PCR durante a amplificação do mesmo.

Tabela 4: Reagentes usados nas reações de digestão com *Nco* I e *Nde* I.

Mistura da reação de digestão	Volume (μl)
DNA plasmidial (pGEM-T/ <i>adsl-Tb</i>)	15 (137ng/μl)
Enzima <i>Nco</i> I (10U/μl) New England	0,5
Enzima <i>Nde</i> I (20U/μl) New England	0.25
Tampão - NE buffer 4 (10X) New England	2,0
H ₂ O q.s.p	20,0

2.2 Subclonagem do gene *adsl-Tb* em vetor apropriado para RNAi: construção pZJM/*adsl-Tb*

O plasmídeo recombinante pGEM-T/*adsl-Tb* e o plasmídeo pZJM foram clivados com as enzimas de restrição *Hind* III e *Xho* I, conforme especificado na tabela 5. Estas endonucleases clivam o vetor pZJM liberando o gene da tubulina α , que é substituído pelo gene de interesse (ver figura 2). *Xho* I não cliva o gene *adsl-Tb*, enquanto *Hind* III o cliva em duas posições: 514 e 1024 (destaque em vermelho da figura 3).

Figura 3: Sequência de nucleotídeos do gene *adsl-Tb*. Oligo TbADSL-1 (senso) em azul; sequência de reconhecimento da enzima de restrição *Hind* III em vermelho e Oligo TbADSL-2 (anti-senso) em verde. As setas indicam se o iniciador é no sentido “forward” (→) ou “reverse” (←).

Tabela 5: Reagentes usados nas reações de digestão dos vetores pGEM/*adsl-Tb* e pZJM

Mistura da reação de digestão	Volume (μl)
DNA plasmidial	1 (3,0μg/μl)
Enzima <i>Hind</i> III (20U/μl) New England	0,5
Enzima <i>Xho</i> I (20U/μl) New England	0,5
Tampão – NE buffer 2 (10X) New England	3,0
BSA (10mg/ml)	0,3
H ₂ O q.s.p	30,0

As reações de digestão da construção pZJM/*adsl-Tb* foram deixadas a 37°C por 4 horas e então o volume total de cada reação (30μl) foi aplicado em gel de agarose 1%. As bandas de interesse foram purificadas do gel preparativo utilizando-se o “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante.

Os fragmentos já purificados do gel, com tamanhos esperados referentes às digestões do vetor e do gene *adsl-Tb* foram utilizados nas reações de ligação (tabela 6), que foram incubadas a 16°C durante 16 horas. No total, quatro reações de ligação diferentes foram realizadas, variando-se a quantidade de inserto: 2µl, 5µl, 10µl e sem inserto (que serviu como reação controle).

Tabela 6: Reagentes usados nas reações de ligação do fragmento do gene *adsl-Tb* no vetor pZJM.

Mistura da reação de ligação	Volume (µl)
Inserto	Variável - 2 a 10 (5ng/µl)
Vetor	1 (10ng/µl)
Enzima T4 DNA ligase (20U/µl) (New England)	1,0
Tampão (10x)	2,0
H ₂ O q.s.p.	20,0

O volume total das misturas de ligação (20,0µl) foi utilizado para transformação de células competentes *E. coli* DH5α, através de choque térmico. Preparações plasmidiais, por lise alcalina, (Sambrook & Russell, 2000) foram realizadas de vinte e uma colônias da construção pZJM/*adsl-Tb* crescidas em meio LB líquido, contendo ampicilina (100µg/ml). A estratégia adotada para checar se os clones eram recombinantes envolveu digestão com as enzimas de restrição *Hind* III e *Xho* I.

OBS: Em todos os procedimentos de clonagem descritos neste capítulo, alíquotas de cultura das colônias que continham plasmídeos recombinantes positivos (com insertos ligados) foram acrescidas de glicerol na proporção 1:1 (glicerol 65%, Tris-HCl 0,025M, pH 8,0 e MgSO₄ 0,1M) e estocadas a -80°C.

2.3 Cultivo de células de *Trypanosoma brucei* da linhagem 29-13

Uma linhagem celular chamada *T. brucei* 29-13 é portadora de um sistema útil de promotor tetraciclina/T7 e é resistente aos antibióticos higromicina e G418. Os genes para T7 RNA polimerase (T7RNP) e para a proteína repressora de tetraciclina (TetR) foram inseridos neste organismo através dos plasmídeos pLEW13 e pLEW29 (Wirtz *et al.*, 1999). Em células 29-13, T7RNP e TetR são constitutivamente sintetizadas em um nível basal, que não é prejudicial às células, mas a quantidade de TetR é suficiente para regular a região operadora de tetraciclina (Otet). Assim, células de *T. brucei* 29-13 podem ser transfectadas com um terceiro plasmídeo contendo a sequência de interesse sob regulação do promotor T7 e Otet, e a expressão desta sequência pode ser modulada pela adição de tetraciclina no meio de cultura.

Antes de transfectar as células de *T. brucei* 29-13 é necessário clivar o plasmídeo com *Not* I, pois esta enzima cliva-o na região espaçadora de DNAr. Desta forma, o clone recombinante pZJM/*adsl-Tb* foi clivado com *Not* I, sendo o produto purificado com “Qiaquick PCR Purification Kit” (Qiagen) e ressuspenso em 100µl de água.

Para o experimento de RNAi, formas promastigotas de *T. brucei* 29-13 foram crescidas em garrafas de cultura a 28°C, contendo 10ml de meio “Cunninghams”, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado, 50µg/ml de higromicina e 15µg/ml de G418. Os reagentes para este meio de cultivo encontram-se na tabela 7. O soro fetal bovino foi inativado através de aquecimento a 56°C por uma hora e o meio foi esterilizado em filtros de 0,22µm.

Tabela 7: Reagentes usados na preparação de meio “Cunninghams”, para cultivo de células promastigotas de *Trypanosoma brucei*.

Para 4 litros de meio	
B-Alanina	8mg
DL-Alanina	4,36g
L-Arginina	1,76g
L-Asparagina.1 H ₂ O	960mg
L-Ácido Aspártico	440mg
L-Cisteína-HCl H ₂ O	320mg
L-Cystina	120mg
L- Ácido Glutâmico	1g
L-Glutamina	6,56g
Glycina	480mg
L-Histidina	640mg
DL-Isoleucina	360mg
L-Leucina	360mg
L-Lisina	600mg
DL-Metionina	800mg
L-Fenilalanina	800mg
L-Prolina	27,6g
DL-Serina	800mg
L-Taurina	1,08g
DL-Treonina	400mg
L-Triptofano	400mg
L-Tirosina	800mg
DL-Valina	840mg
NaH ₂ PO ₄ 1 H ₂ O	2,12g
MgCl ₂ 6 H ₂ O	12,16g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	14,8g
KCl (anidro)	11,92g
CaCl ₂ 2 H ₂ O	600mg
D-Glucose	2,8g
D-Fructose	1,6g
Sucrose	1,6g
L-Málico	2,68g
α-Cetoglutarato	1,48g
Fumárico	220mg
Succínico	240mg
cis-Aconitato (3 mM Final)	2,088g
Na-Piruvato (1 mM Final)	40ml (estoque 100 mM)
Vitamina BME (estoque 100X)	8ml
Pen-Strep (estoque 100x)	40ml
Phenol Red (estoque 0.5%)	16ml
H ₂ O milli Q q.s.p.	4 litros

* O pH do meio deve ser ajustado para 7.4 com NaOH 10N (antes de completar o volume final).

A contagem de células foi efetuada com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Para cada contagem, 100µl de cultura foram misturados com 900µl de solução fixadora (0,5% formaldeído em 1x PBS), resultando numa diluição 1:10. Desta diluição, 10µl foram pipetados na área específica da câmara, que foi coberta com uma lamínula. As células fixadas de quatro quadrantes de 1mm foram contadas; o número obtido foi dividido por quatro, multiplicado pelo fator da diluição (no nosso caso foi 10) e multiplicado por 10^4 (que leva em conta o volume da área de contagem de células). O resultado obtido é expresso como $n^\circ \times 10^5$ células/ml (cels/ml).

2.4 Transfecção de células de *Trypanosoma brucei* da linhagem 29-13

O conteúdo total de uma cultura saudável e em fase de crescimento logarítmico ($\log \sim 4-5 \times 10^6$ cels/ml) foi centrifugado a 2000rpm por 5 minutos. O precipitado de células foi ressuspensionado para 5×10^7 cels/ml em Solução para Eletroporação (SE), constituída de 75% de tampão A (tabela 8) e 25% de tampão B (tabela 9). Um volume de 450µl de células em SE foi adicionado a uma cubeta de eletroporação de 0,4cm (BioRad), contendo os 100µl de DNA (total de 20µg) já digerido com *Not* I e purificado. O conteúdo total de 550µl foi eletroporado num aparelho BioRad Gene Pulser, da seguinte maneira: 2 pulsos de 1500V, 25 microF, esperando-se 10 segundos entre os pulsos (a constante de tempo deve ser entre 0,5 e 0,7 mseg). O mesmo procedimento foi realizado para eletroporar as células ressuspensionadas em 100µl de água (controle). As amostras foram transferidas para garrafas contendo 5ml de meio Cunninghams com higromicina e G418, como descrito acima, que foram colocadas na estufa a 28°C.

Tabela 8: Reagentes usados na preparação do tampão A da solução de eletroporação utilizada para transfecção de células de *T. brucei*.

Para 500ml de tampão A – sol. Estoque	
KCl	4,47mg
150mM CaCl ₂	0,5ml
K ₂ HPO ₄ (anidro)	0,87mg
HEPES	2,97mg
0,5M EDTA pH 8,0	2ml
1M MgCl ₂	2,5ml
H ₂ O milli Q q.s.p.	500ml

* Ajustar o pH para 7,6 com KOH (antes de completar o volume final) e filtrar.

Tabela 9: Reagentes usados na preparação do tampão B da solução de eletroporação utilizada para transfecção de células de *T. brucei*.

Para 500ml de tampão B – sol. Estoque	
Sucrose	47,41g
0,5M K _x PO ₄ pH 7,4 **	7ml
1M MgCl ₂	0,5ml
H ₂ O milli Q q.s.p.	500ml

* Ajustar o pH para 7,4 com 0,5M K₂HPO₄ (antes de completar o volume final) e filtrar.

** Note que 0,5M K_xPO₄ é feito por titulação de 0,5M KH₂PO₄ com KOH, ou com 0,5M K₂HPO₄

Após 24 horas de crescimento das células que sofreram eletroporação, fleomicina foi adicionada às garrafas numa concentração final de 2,5µg/ml, para seleção de transfectantes estáveis, uma vez que o plasmídeo pZJM confere resistência a este antibiótico de seleção. É esperado que as células da cultura controle morram após esta etapa, pois elas foram transfectadas apenas com água e, portanto, não devem ser resistentes a fleomicina. No mesmo dia que se adicionou o antibiótico, uma diluição seriada foi realizada para obtenção de um único clone positivo, ou seja, que contenha o plasmídeo pZJM/*adsl-Tb* integrado ao seu genoma. Para esta diluição foram usadas placas de 96 poços, como descrito abaixo:

- pipetou-se 160µl de meio (contendo higromicina, G418 e fleomicina) na coluna 2;

- pipetou-se 100µl de meio nas colunas de 3 a 12;

- contou-se as células e diluir para 5×10^4 cels/ml;
- pipetou-se 200 μ l das células (5×10^4 cels/ml) na coluna 1;
- transferiu-se 40 μ l de células da coluna 1 para a coluna 2 e pipetar gentilmente para homogeneização;
- transferiu-se 100 μ l de células da coluna 2 para a coluna 3 e homogeneizar;
- transferiu-se 100 μ l de células da coluna 3 para a coluna 4 e homogeneizar;
- repetiu-se o mesmo procedimento até a coluna 12;
- removeu-se 100 μ l da coluna 12;
- incubou-se a placa de 96 poços na estufa a 28°C para monitorar o crescimento das culturas (cada poço);

Este método resulta numa diluição seriada como mostrado na tabela 10. É esperado que em todos os poços da coluna 1 haja crescimento, ao contrário da coluna 12. Foram feitas monitorações diárias por visualização ao microscópio e após um período de 8-10 dias foram escolhidas seis culturas que continham uma densidade apropriada de células (poços: 4F, 5A, 6C, 7G, 9F e 10A). Assim, o volume de 100 μ l dos poços escolhidos foram transferidos para 900 μ l (final = 1ml) de meio contendo os antibióticos (higromicina, G418 e fleomicina) nas concentrações adequadas numa placa de 24 poços, que foi incubada a 28°C. O mesmo tipo de acompanhamento foi efetuado para a placa de 24 poços e apenas uma cultura (proveniente do poço 7G) continuou apresentando crescimento satisfatório e, portanto, as células foram transferidas para garrafas contendo 5ml de meio. Este passo pode demorar semanas, até que se estabilize a cultura.

Tabela 10: Tabela representativa da diluição seriada de células de *T. brucei* 29-13 após 24 hs da transfecção.

Coluna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
vol (μ l)	160	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
#cels	8000	1000	500	250	125	60	30	15	8	4	2	1

OBS: Nesta etapa, alíquotas da cultura estável pZJM/*adsl-Tb* foram acrescidas de glicerol na proporção 1:1 (glicerol 20%, citrato trisódico. 3 H₂O e 0,04M glicose) e estocadas a -80°C.

2.5 Indução de RNAi da construção pZJM/*adsl-Tb*

Com a diluição seriada foi possível a obtenção de uma cultura estável. Assim, células desta mesma cultura original foram cultivadas em duas garrafas distintas, contendo o meio apropriado (higromicina, G418 e fleomicina). Monitorações diárias do crescimento e alguns repiques de ambas culturas foram realizados com o intuito de se obter células saudáveis e na fase de crescimento logarítmico. Uma vez atingida esta fase ($\sim 4\text{-}5 \times 10^6$ células/ml), uma das garrafas foi identificada como + Tet, na qual foi adicionada tetraciclina numa concentração final de 3 µg/ml, induzindo assim, o processo de RNAi. A outra garrafa foi identificada como não induzida (não foi adicionada Tet) e serviu como controle.

Após indução de RNAi, as células de ambas culturas (+Tet e -Tet) foram contadas duas vezes ao dia para monitoração e comparação do crescimento. As culturas foram acompanhadas por aproximadamente 5 dias (contagens foram efetuadas até 135 horas após a indução).

Neste estudo, se o alvo a ser validado por RNAi for essencial para o organismo *T. brucei*, espera-se que com a degradação do RNA mensageiro (no caso do gene *adsl-Tb*) as células induzidas apresentem um crescimento diferenciado das células não induzidas.

2.6 Análise da indução de RNAi por contagem de células e RT-PCR (“Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction”)

A análise dos resultados após indução de RNAi baseia-se não somente no monitoramento da cultura induzida e da não induzida através de contagem das células e curva de crescimento, como também em metodologias de “Northern blot” e RT-PCR, que permitem checar se de fato ocorreu degradação do RNA mensageiro (RNAm) alvo ou “Western blot” que possibilita analisar diretamente a ausência ou presença da proteína em estudo.

Como na época das análises da indução de RNAi dispúnhamos do anticorpo anti-ADSL-Lm produzido em camundongo, tentativas de “Western blot” (Sambrook & Russell, 2000) foram conduzidas, uma vez que as proteínas ADSL-Lm e ADSL-Tb compartilham 67% de identidade. Entretanto, não obtivemos bons resultados.

Desta forma, empregamos RT-PCR baseando-se no protocolo descrito por Thiemann *et al.* (1994), com algumas modificações. Este método é sensível para detecção e quantificação de RNAm e consiste da síntese de cDNA a partir de RNA, pela transcrição reversa seguida de amplificação do cDNA específico por PCR.

Para extração de RNA, o mesmo procedimento de indução de RNAi já descrito no item anterior foi efetuado, mas em um volume maior de meio (50ml). Amostras de ambas garrafas (+Tet e - Tet) após 24, 48, 74, 100 e 258 horas da indução foram recolhidas. A extração de RNA destas amostras foi realizada utilizando-se Trizol (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

Primeiramente, tentamos buscar o RNA mensageiro alvo da linhagem selvagem de *T. brucei* 29-13, através de RT-PCR, com o intuito de obtermos um controle e também para a padronização da reação de RT-PCR, que foi posteriormente aplicada para as amostras induzidas e não induzidas.

Para a reação de RT-PCR que visava amplificar a região 5'UTR do gene *adsl-Tb*, partindo do RNA total de *T. brucei* 29-13, foram empregados os oligonucleotídeos RT-TbADSL, que é anti-senso ao gene *adsl-Tb* e o SL, que é específico à porção do “Spliced Leader” do RNA de *L. tarentolae* (tabela 11). A reação foi realizada utilizando-se “OneStep RT-PCR Kit” (Qiagen), segundo condições descritas na tabela 12 e submetidas a um programa de RT-PCR (tabela 13) utilizado pelo termociclador PTC-100TM Programable Thermal Controller (MJ Research Inc.). Como controle da reação de RT-PCR o método foi empregado para o gene da proteína GAPDH, a qual é constitutivamente expressa pelo *T. brucei*. As seqüências dos oligonucleotídeos específicos à seqüência da GAPDH encontram-se na tabela 14.

Tabela 11: Nome e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados no RT-PCR para amplificação região 5'UTR do gene *adsl-Tb*.

Oligonucleotídeos	Seqüências dos oligos 5'-3'
RT-TbADSL	TCGCCGTATTGTTTATGTCCTGTGATGTCA
SL	AACTAACGCTATATAAGTATCAGTTTCTGTACTTTATTG

Tabela 12: Reagentes usados nas reações de RT-PCR para amplificação das regiões 5'UTR dos genes *adsl-Tb* e *gapdh*.

Mistura da reação de RT-PCR	Volume (µl)	Concentração final
Tampão RT-PCR [5x]	10,0	1x
dNTPs 10mM (A, G, C, T)	2,0	0,4mM cada
Oligonucleotídeos 100pmol/ul	0,5 cada	1µM cada
RNA molde		0,5µg
Enzima MIX (Reverse Transcriptase+ Hot Star Taq DNA Polymerase)	2,0	
Solução Q [5x]	10,0	1x
Rnase out (40U/µl)	0,25	10U
H ₂ O milliQ autoclavada q.s.p.	50,0	

Tabela 13: Protocolo do programa de RT-PCR utilizado pelo termociclador PTC-100™ Programable Thermal Controller

Programa de RT-PCR								
Número de ciclos	1x	1x	1x	35x			1x	
T° C	94	50	95	94	50	72	72	4
Tempo	1min	30min	15min	15seg	30seg	45seg	10min	infinito

Tabela 14: Sequência dos oligonucleotídeos específicos à GAPDH (controle)

Oligodeoxinucleotídeos	Sequências dos oligos 5'-3'
TbGAPDH 206-236ForRNAi	CCTCGGGAATGAGATTGATGTCGTTGCTGT
TbGAPDH 426-450RevRNAi	CACATACTCCACACCAAGCTTTCCC

Através do sequenciamento de DNA, foi possível identificar a banda de interesse referente à região 5'UTR do gene *adsl-Tb* na linhagem selvagem 29-13. Uma vez confirmado o fragmento desejado, aplicamos esta técnica para comparar a ausência ou presença do RNA mensageiro alvo entre amostras induzidas (+Tet) e não induzidas (-Tet).

Um protocolo de RT-PCR idêntico ao usado para a linhagem selvagem foi empregado para todas as amostras: 24 horas não induzida (NI) e induzida (I); 48 horas NI e I; 74 horas NI e I; 100 horas NI e I. O conteúdo de RNA molde utilizado nas reações foi padronizado e os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Amplificação do gene *adsl-Tb* e clonagem no vetor pGEM-T

A fase aberta de leitura (ORF) do gene *adsl-Tb* foi amplificada através de PCR, utilizando-se a enzima "Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity" (figura

4). O tamanho esperado do fragmento de DNA, como produto da amplificação, foi de 1416pb.

Figura 4: Amplificação da fase aberta de leitura (ORF) do gene de interesse (*adsl-Tb*). Gel de agarose 1% TAE 1X mostrando o resultado da eletroforese do produto da reação de PCR. Coluna 1: padrão de peso molecular (pb=pares de bases). Coluna 2: presença de fragmento com 1416pb, referente à amplificação do gene *adsl-Tb* (seta *a*).

Células competentes de *Escherichia coli* DH5 α foram eficientemente transformadas com o produto da ligação (gene *adsl* + pGEM-T) e clones recombinantes positivos foram obtidos (figura 5).

Figura 5: Identificação de clones recombinantes positivos. Géis de agarose 1%. (A) Coluna 1: padrão de peso molecular, em pb (pares de bases). Colunas 2-7: PCRs de seis colônias selecionadas, usando oligos do vetor, as bandas na altura de 1650pb mostram que todos os clones são recombinantes (pGEM-T + *adsl-Tb*). (B) Coluna 1: padrão de peso molecular, em pb (pares de bases). Colunas 2-7: reações de digestão com as enzimas (*Nco* I e *Nde* I), mostrando que os fragmentos liberados do vetor apresentam o tamanho esperado referente ao gene *adsl-Tb* (1416pb, seta *a*). Os resultados de PCR e digestão são concordantes.

3.2 Subclonagem do gene *adsl-Tb* em vetor apropriado para RNAi: construção pZJM/*adsl-Tb*

O plasmídeo recombinante pGEM-T/*adsl-Tb* e o vetor pZJM foram clivados com as enzimas de restrição *Hind* III e *Xho* I. Estas endonucleases clivam o pZJM liberando o gene da tubulina α , que é substituído pelo gene de interesse (figura 2). *Xho* I não cliva o gene *adsl* de *T. brucei*, enquanto *Hind* III o cliva em duas posições: 514 e 1024 (figura 3). Desta forma, o fragmento referente à porção do *adsl-Tb* a ser subclonada no pZJM consistiu de 392pb (1416-1024), como pode ser observado na figura 6. Embora não tenha sido possível obter o gene completo, uma sequência de 392pb é suficiente para gerar uma resposta de RNAi.

Figura 6: Subclonagem do fragmento referente à porção do *adsl-Tb* no pZJM. Gel de agarose 1%. Coluna 1: padrão de peso molecular. Coluna 2: digestão do plasmídeo recombinante pGEM-T/*adsl-Tb*, com as enzimas *Hind* III e *Xho* I. A banda de 392pb, indicada pela seta *a*, é correspondente ao fragmento do gene *adsl-Tb* que substituirá o fragmento da tubulina- α no vetor pZJM. Coluna 3: digestão do plasmídeo recombinante pGEM-T/*adsl-Tb*, com as enzimas *Bam* HI e *Xho* I. Coluna 4: digestão do vetor pZJM, com as enzimas *Hind* III e *Xho* I (seta *b*). Coluna 5: digestão do plasmídeo pGR ("stem loop") com as enzimas *Bam* HI e *Xho* I.

A banda de 392pb referente à porção C-terminal do gene *adsl-Tb* (seta *a* na figura 6) e a banda correspondente ao vetor pZJM digerido (seta *b* na figura 6) foram purificadas do gel e utilizadas em reações de ligação. Células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas com os produtos destas reações. As placas provenientes

das ligações contendo 1µl, 5µl e 10µl de inserto (item 2.2), como esperado, apresentaram um número maior de colônias do que a placa controle (sem inserto), mostrando uma boa eficiência de ligação e transformação. Das 21 colônias selecionadas aleatoriamente, para checarmos a presença de clones recombinantes (pZJM + fragmento do gene *adsl-Tb*), 15 mostraram-se positivas (na figura 7 estão ilustrados três recombinantes). Apenas um destes clones foi escolhido para continuidade dos experimentos.

Figura 7: Recombinantes pZJM + fragmento do gene *adsl-Tb*. Gel de agarose 1%. Coluna 1: padrão de peso molecular. Colunas 2-4: digestão de 3 clones da construção pZJM/*adsl-Tb*, com as enzimas *Hind* III e *Xho* I. A liberação de um fragmento próximo a 400pb (seta *a*) evidencia que os 3 clones são recombinantes.

3.3 Transfecção de células de *Trypanosoma brucei* da linhagem 29-13

Células de *T. brucei* da linhagem 29-13 foram eficientemente transfectadas com a construção pZJM/*adsl-Tb*. Através da seleção com o antibiótico fleomicina (resistência conferida pelo vetor pZJM) e do método de diluição seriada, foi possível a obtenção de uma população clonal que foi cultivada para a indução de RNAi.

3.4 Indução de RNAi da construção pZJM/*adsl-Tb*

O crescimento da cultura de transfectantes contendo o plasmídeo pZJM/*adsl-Tb* foi monitorado diariamente. Uma vez atingida a fase log ($\sim 4\text{-}5 \times 10^6$ células/ml), esta cultura foi dividida em duas: uma das garrafas foi identificada como +Tet e a outra foi identificada como -Tet (serviu como controle). A indução de RNAi foi realizada, adicionando-se tetraciclina numa concentração final de 3µg/ml na garrafa +Tet.

3.5 Análise da indução de RNAi por contagem de células e RT-PCR

O crescimento das células tanto da cultura induzida, quanto da não induzida foi monitorado, através de contagem do número de células duas vezes ao dia. O acompanhamento foi feito por aproximadamente 5 dias e esta análise evidenciou que as culturas apresentaram um crescimento diferenciado. Após 50 horas de indução, as células da amostra induzida pararam de crescer, como pode ser visualizado no gráfico que expressa as curvas de crescimento (figura 8). Este resultado é de extrema importância, pois é um indicio de que o gene *adsl-Tb* é essencial à sobrevivência do parasita *T. brucei* e, portanto, a enzima ADSL pode ser considerada um bom alvo para desenho racional de fármacos contras as doenças causadas por parasitas tripanosomatídeos.

Figura 8: Curvas de crescimento. Gráfico que expressa as curvas de crescimento das amostras induzida (+Tet) e não induzida (-Tet), até 135 horas de cultivo. Notar que após 50hs de indução a cultura induzida cessa seu crescimento. Os pontos no gráfico representam os repiques das culturas, sendo que tetraciclina numa concentração final de $[3\mu\text{g/ml}]$ foi adicionada ao meio da cultura induzida em todos os repiques.

Embora a interrupção de crescimento das células da cultura induzida seja um grande indicio de que o gene *adsl-Tb* é essencial ao organismo, é necessário confirmarmos se este fato é decorrente da degradação do RNA mensageiro e conseqüentemente da ausência da proteína ADSL-Tb. Assim, experimentos de RT-PCR também foram empregados para análise do RNA mensageiro.

3.5.1 Padronização da reação de RT-PCR utilizando-se a linhagem selvagem de *T. brucei* 29-13

O produto da reação de RT-PCR que visava amplificar a região 5' não traduzida (UTR) do gene *adsl-Tb* foi reamplificado por PCR, resultando em três

fragmentos: ~350pb, 500pb e 600pb (coluna 1 da figura 9). Estes fragmentos foram purificados do gel e inseridos no vetor de clonagem pGEM-T.

Figura 9: Eletroforese dos produtos das reações de PCR que usaram como molde 5,0µl das reações de RT-PCR. Gel de agarose 2% TAE 1X mostrando 5'UTR do gene *adsl-Tb* (coluna 1). Coluna 3: padrão de peso molecular (50pb).

Células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas com os produtos das ligações e preparações plasmidiais de algumas colônias selecionadas foram submetidas às reações de sequenciamento de DNA. Através do sequenciamento foi possível confirmar que a banda de 600pb é a referente ao fragmento da região 5'UTR do gene (dados não mostrados).

Uma vez identificada a banda de 600pb como o fragmento desejado, pudemos aplicar esta técnica para buscar o RNA mensageiro alvo nas amostras induzidas e não induzidas.

3.5.2 Aplicação da reação de RT-PCR para as amostras de culturas de *T. brucei* 29-13 pZJM/adsl-Tb induzidas e não induzidas

O protocolo de RT-PCR já otimizado para a linhagem selvagem foi empregado de forma idêntica para todas as amostras: 24 horas não induzida (NI) e induzida (I); 48 horas NI e I; 74 horas NI e I; 100 horas NI e I; 258 horas NI e I. A quantidade de RNA molde utilizada em cada reação foi padronizada para 500ng, a fim de anular qualquer interferência nos resultados provenientes da diferença de molde utilizado, uma vez que devemos comparar a presença ou ausência da banda desejada entre as amostras não induzidas e induzidas. Através da análise dos produtos das reações de RT-PCR em gel de agarose 2%, foi possível verificar que a partir de 48 horas de indução já ocorre uma diminuição do RNA mensageiro alvo, indicando sua degradação decorrente do mecanismo de RNAi (comparar as intensidades das bandas das amostras 48 horas NI e I, nas colunas 5 e 6 da figura 10). Entretanto, a diferença é marcante nas amostras 74I e 100I (colunas 8 e 10 da figura 10, identificadas com círculos brancos).

Um dado interessante foi que após 100 horas de indução paramos de adicionar tetraciclina ao meio e quando observamos os resultados de RT-PCR das amostras 258NI e 258 horas proveniente da cultura induzida, porém sem Tet (colunas 11 e 12 da figura 10), percebemos que o RNA mensageiro alvo voltou a ser disponível dentro da célula. Entretanto, contagens do número de células não indicaram uma recuperação no crescimento da cultura induzida quando comparada à não induzida. Um acompanhamento minucioso do crescimento da cultura induzida, a partir de um determinado momento onde não se adiciona mais Tet ao meio, nos permitiria estender a aplicação da técnica de RNAi para investigar as consequências oriundas da deficiência da ADSL. Em humanos, as características severas de retardo

mental e psicomotor associadas ao autismo têm sido atribuídas aos níveis elevados de derivados desfosforilados dos substratos (SAICAR e ADS), em casos de deficiência desta enzima (Jaeken & van den Berghe, 1984). Da mesma forma, poderíamos pensar que a ausência da ADSL para *T. brucei* iniba seu crescimento, provavelmente não por causar sua morte devido à falta de AMP (produto), uma vez que este pode ser produzido por outra enzima da via (APRT), mas sim por algum efeito metabólico derivado do acúmulo do substrato ADS dentro da célula.

Figura 10: Resultado das reações de RT-PCR nas diferentes amostras induzidas e não induzidas para o gene *adsl-Tb*. Gel de agarose 2% TAE 1X evidenciando a ausência de banda referente ao RNA mensageiro do gene *adsl-Tb* nas amostras de 74 e 100 horas após indução de RNAi pela adição de tetraciclina ao meio de cultura. Entretanto, na ausência de Tet, o RNA volta a ser sintetizado, decorrente da interrupção do mecanismo de RNAi, o que pode ser observado quando comparamos as amostras 258NI e 258 proveniente da cultura induzida, porém na ausência de Tet. Coluna 1: Padrão de peso molecular (50pb). Coluna 2: Produto da reação de RT-PCR, usando RNA das células controle *T. brucei* 29-13. Coluna 3: 24 horas NI. Coluna 4: 24 horas I. Coluna 5: 48 horas NI. Coluna 6: 48 horas I. Coluna 7: 74 horas NI. Coluna 8: 74 horas I. Coluna 9: 100 horas NI. Coluna 10: 100 horas I. Coluna 11: 258 horas NI. Coluna 12: 258 horas da cultura I, porém sem Tet. Os círculos brancos estão indicando ausência da banda referente ao fragmento correspondente ao RNA mensageiro alvo do gene *adsl-Tb*.

Estes experimentos de RT-PCR foram também empregados para o gene da GAPDH de *T. brucei* que serviu como controle das reações. Em todas as amostras (de 24 a 100 horas) tanto nas induzidas, como nas não induzidas foi possível observar a mesma intensidade para as bandas de aproximadamente 200pb, que é o tamanho esperado do fragmento amplificado (figura 11). Estes resultados comprovam que as bandas fracas obtidas, principalmente para 74I e 100I, do RT-PCR do gene *adsl-Tb*, não eram resultantes de algum problema das amostras de RNA e sim da verdadeira degradação do RNA mensageiro alvo, decorrente do mecanismo de RNAi.

Figura 11: Resultado do RT-PCR nas diferentes amostras induzidas e não induzidas para o gene da GAPDH. Gel de agarose 2% TAE 1X evidenciando a mesma intensidade das bandas referentes ao fragmento da GAPDH (~200pb, indicado pelas setas brancas). A) Coluna 1: Padrão de peso molecular (1Kb). Coluna 2: Produto da reação de RT-PCR, usando RNA das células controle *T. brucei* 29-13. Coluna 3: Produto da reação de RT-PCR, usando RNA das células 24 horas NI. Coluna 4: Produto da reação de RT-PCR, usando RNA das células 24 horas I. Coluna 5: Produto da reação de RT-PCR, usando RNA das células 48 horas NI. Coluna 6: Produto da reação de RT-PCR, usando RNA das células 48 horas I. Coluna 7: Padrão de peso molecular (50bp). B) Coluna 1: Padrão de peso molecular (1Kb). Coluna 2: Produto da reação de RT-PCR, usando RNA das células 74 horas NI. Coluna 3: Produto da reação de RT-PCR, usando RNA das células 74 horas I. Coluna 4: Produto da reação de RT-PCR, usando RNA das células 100 horas NI. Coluna 5: Produto da reação de RT-PCR, usando RNA das células 100 horas I. Coluna 6: Padrão de peso molecular (50bp).

De posse destes resultados podemos concluir que a interrupção do crescimento da cultura de *T. brucei* contendo a construção pZJM/*adsl-Tb* após indução do mecanismo de RNAi está relacionada com a degradação do RNA mensageiro alvo específico ao gene da *adsl-Tb*, e conseqüentemente à ausência da enzima ADSL. Estes dados confirmam que ADSL pode ser considerada um alvo promissor para o desenvolvimento racional de fármacos ao tratamento de infecções causadas por protozoários tripanosomatídeos e justifica o interesse em seu estudo. Embora *T. brucei* tenha sido utilizado para investigação do papel da ADSL para o crescimento destes organismos parasitas, uma frente de pesquisa do nosso grupo envolve análises de diversas proteínas do metabolismo de purinas de *Leishmania*. Desta forma, os próximos capítulos descreverão nossas contribuições para a caracterização da ADSL de *L. major*.

CAPÍTULO III

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO

MOLECULAR DO GENE *adsl-Lm*

1. INTRODUÇÃO SOBRE AS METODOLOGIAS UTILIZADAS

1.1 Clonagem do gene *adsl-Lm* em vetor de expressão

O sistema de expressão escolhido para clonagem do gene *adsl-Lm* foi o “pCR T7 TOPO TA Cloning” (Invitrogen), que possibilita a inserção direta de produtos de PCR purificados no plasmídeo de expressão pCR T7/NT-TOPO (figura 1). Os DNAs clonados neste vetor, quando expressos, produzem uma proteína recombinante que possui uma sequência de seis histidinas “His-tag” no N- terminal com a finalidade de facilitar a purificação da proteína recombinante. A expressão do gene clonado é regulada pelo promotor reconhecido pela enzima T7 RNA polimerase. Para a expressão do gene de interesse é necessário que a célula produza T7 RNA polimerase, o que ocorre na presença do indutor Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Uma vez produzida esta enzima, ela se liga ao promotor T7 e transcreve o gene de interesse (Manual pCR T7 TOPO TA Cloning - INVITROGEN).

1.2.1 Experimentos de eletroforese em campo pulsado "Pulsed Field Gel"

A manipulação e análises de DNA são fundamentais na área da biologia molecular. A técnica de separação por eletroforese de misturas complexas de fragmentos de DNA com diversos tamanhos foi bem estabelecida no início de 1970.

Em 1984, a eletroforese em campo pulsado (“Pulse Field Gel Eletrophoresis” ou PFGE) foi descrita (Schwartz & Cantor, 1984), introduzindo uma nova maneira de separar DNA de alto peso molecular, como cromossomos inteiros. DNAs de 30 a 50 kb apresentam a mesma mobilidade independentemente do tamanho. Isto pode ser visto no gel como uma única banda grande e difusa. No entanto, durante a PFGE, o DNA é forçado a mudar de direção (devido às reorientações do campo elétrico relativo ao gel), e assim, fragmentos com diferentes tamanhos dentro de uma banda difusa começam a se separar. Desta forma, ao invés de analisar fragmentos pequenos de DNA, provenientes de digestões com endonucleases de restrição, PFGE permite o estudo de pedaços muito grandes de um genoma. Uma das aplicações desta técnica é a determinação do número e tamanho dos cromossomos (“cariótipo eletroforético”) de leveduras, fungos e parasitas como *Leishmania*, *Plasmodium* e *Trypanosoma*. Já a localização de seqüências particulares dentro de um genoma é acompanhada pela técnica de “Southern blot” (Southern, 1975). O DNA genômico é digerido com uma ou mais enzimas de restrição e os fragmentos resultantes são separados de acordo com o tamanho, por eletroforese em gel de agarose. O DNA é então desnaturado e transferido do gel para um suporte sólido, geralmente um filtro de nitrocelulose, ou uma membrana de nylon. As posições relativas dos fragmentos de DNA são preservadas durante esta transferência. O DNA fixo ao suporte é então hibridizado com uma sonda de DNA e a auto-radiografia é usada para localizar as posições das bandas complementares à sonda.

Com o objetivo de caracterizar molecularmente o gene *adsl-Lm* em relação à sua localização cromossômica e ao número de cópias do gene presente no organismo do parasita *L. major*, as metodologias de PFGE e análise com enzimas de restrição, seguidos de “Southern blot” foram empregadas. Vale ressaltar que na época em que

realizamos estes experimentos, o projeto Genoma de *Leishmania* (WHO/TDR) ainda não havia sido finalizado.

1.2.2 Caracterização das regiões 5' e 3' não traduzidas (UTRs) do gene *adsl-Lm* através de RT-PCR

Entender os mecanismos básicos de crescimento, diferenciação e resposta celular aos estímulos ambientais, ou seja, compreender a organização espacial e temporal dos eventos moleculares vem sendo um desafio para a biologia molecular. Na verdade, embora muitos dos elementos regulatórios situem-se em regiões não codificadoras do genoma, os dados disponíveis de seqüências nucleotídicas são referentes, na sua grande maioria, às seqüências expressas correspondentes às porções gênicas codificadoras de proteínas. Dentre as porções não codificadoras, as regiões 5' e 3' não traduzidas dos RNAs mensageiros eucarióticos (5'UTR e 3'UTR – UnTranslated Region) têm se mostrado interessantes por conter elementos de regulação da expressão gênica. As principais funções que têm sido atribuídas a estas regiões são: *i*) controle da localização celular do RNAm; *ii*) controle da estabilidade do RNAm e *iii*) controle da eficiência de tradução do RNAm (Pesole *et al.*, 2002).

Visando a caracterização das regiões 5'UTR e 3'UTR do gene *adsl-Lm*, adotamos a estratégia da técnica de RT-PCR, que consiste da síntese de cDNA a partir de RNA, pela transcrição reversa seguida de amplificação do cDNA específico por PCR.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amplificação do gene *adsl-Lm* e clonagem no vetor de expressão PCR T7/TOPO

Embora o genoma completo de *Leishmania* ainda não estivesse disponível, a sequência do gene *adsl-Lm* já se encontrava depositada nos bancos de dados <http://www.genedb.org> (Lm F04.0460) e <http://www.ncbi.nih.gov> (AL389894). Assim, baseando-se nesta sequência, foram construídos oligonucleotídeos específicos para as extremidades 5' (senso) e 3' (anti-senso) do gene. A fase aberta de leitura (ORF) do gene *adsl-Lm* foi amplificada por PCR, a partir do DNA genômico de *L. major* Friedlin, utilizando a enzima "Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity" (Invitrogen) e os iniciadores ADSL1 e ADSL2 (tabela 1). A reação foi feita segundo condições já descritas no capítulo II (tabelas 2 e 3), com exceção de que a temperatura de anelamento foi de 55 °C.

Tabela 1: Nome e sequência dos oligonucleotídeos utilizados no PCR para amplificação do gene *adsl-Lm*.

Oligonucleotídeos	Sequências dos oligos 5'-3'
ADSL1	ATGTCACTGCCTTCGGCACAAGAAG
ADSL2	TCAGGGACGCGCCGTGTAGC

O produto da reação de amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% feito em tampão TAE 1X e a banda de interesse foi purificada do gel utilizando-se o "kit ConcertTM Rapid Gel Extraction System" (Invitrogen), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante.

O fragmento purificado do gel, referente ao gene *adsl-Lm*, foi submetido à adição de desoxiriboadenina (A), a 70°C por 30 minutos, ligado ao vetor pCR

T7/NT-TOPO e células competentes de *E. coli* TOP 10F' (Invitrogen) foram transformadas com o plasmídeo proveniente da ligação, conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. Cerca de 100µl e 200 µl de cada cultura foram espalhados em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido e o antibiótico de seleção adequado para o vetor (ampicilina numa concentração final de 100µg/ml). As placas de Petri foram incubadas a 37°C por 16 horas para o crescimento das colônias transformadas.

Colônias isoladas foram inoculadas em 5ml de meio LB líquido, contendo ampicilina (100µg/ml). Estes inóculos foram deixados a 37°C, sob 250rpm de agitação por 16 horas e preparações plasmidiais, por lise alcalina, foram feitas segundo Sambrook & Russell (2000). A estratégia adotada para a verificação da orientação correta ou incorreta em relação ao promotor T7, de cada construção recombinante, envolveu a amplificação por PCR, com a enzima “*Taq* DNA Polymerase, Recombinant – Invitrogen” (seguindo protocolo das tabelas 2 e 3) e combinando-se oligonucleotídeos específicos do vetor e do gene inserido. Uma vez identificados os clones positivos, estes foram submetidos ao sequenciamento de DNA (como já descrito no capítulo anterior) para verificar a fase de leitura. Devido ao fato do gene *adsl-Lm* possuir 1440pb, não foi possível seqüenciá-lo por completo a partir de oligonucleotídeos que hibridizam no vetor, então mais 2 oligonucleotídeos (ADSL3 e ADSL4) internos à seqüência do gene foram sintetizados (tabela 4).

Tabela 2: Reagentes usados nas reações de PCR realizadas com “*Taq* DNA Polymerase, Recombinant”

Mistura da reação de amplificação	Volume (μl)	Concentração final
Tampão PCR [10X] sem Mg (Invitrogen)	5,0	1X
Solução estoque de dNTPs 10mM (A, G, C, T)	1,0	0,2mM cada
MgCl ₂ 50mM	1,5	1,5mM
Oligonucleotídeo senso 100pmol/ul	1,0	2μM
Oligonucleotídeo anti-senso 100pmol/ul	1,0	2μM
DNA molde		100ng
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U/μl)	0,25	1,25U
H ₂ O milliQ autoclavada q.s.p.	50,0	

Tabela 3: Protocolo do programa de PCR para amplificações com “*Taq* DNA Polymerase, Recombinant”

Programa de PCR						
Número de ciclos	1x	25x			1x	
T° C	95	95	55	72	72	4
Tempo	3min	30seg	30seg	2min	10min	infinito

Tabela 4: Nome e sequência dos oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento do gene *adsl-Lm*, além dos oligos ADSL1 e ADSL2.

Oligonucleotídeos	Sequências dos oligos 5'-3'
ADSL3	CACTTTGGGCTAACGTCGCAG
ADSL4	CTCCGCCACGACAGCCCAATTG

2.2 Caracterização molecular do gene *adsl-Lm*

2.2.1 Experimentos de “Pulse Field Gel Electrophoresis” (PFGE) e

“Southern blot”

Esta etapa foi realizada em colaboração com o grupo e sob supervisão da Profa. Dra. Ângela K. Cruz (Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos – FMRP-USP).

Formas promastigotas de *L. major* Friedlin foram crescidas a 26°C, em meio de cultura M199 (Gibco), como descrito por Kapler *et al.* (1990). Quando a cultura atingiu uma densidade de $0.6-1.0 \times 10^7$ células/ml, seu conteúdo foi centrifugado a 2.000g por 10 minutos para preparação do DNA genômico. Blocos de agarose

contendo DNA genômico de *L. major* Friedlin foram preparados de acordo com Beverley (1988) e Coburn *et al.* (1991).

Para PFGE, os cromossomos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% feito em TBE 0,5X (45 mM Tris-borato, 2 mM Na₂EDTA, pH 8,0), usando o sistema Bio-Rad CHEF-DR II (Chu *et al.*, 1986). As condições usadas para eletroforese foram: 50-120 segundos de tempo de pulso, com uma rampa linear de 4,5 V/cm por 48 horas a 14°C. Os procedimentos de transferência para membrana ("Southern blotting"), hibridização e lavagens foram conduzidos como descrito por Cruz & Beverley (1990).

Blocos de agarose contendo, cada um, aproximadamente 1,0µg de DNA genômico de *L. major* Friedlin foram submetidos à digestão com as seguintes endonucleases de restrição: *Bam* HI, *Hind* III, *Dra* I e *Eco* RI. O DNA digerido foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% feito em TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM Na₂EDTA, pH 7.6). A corrida foi realizada a 60V, durante 6 horas. Os procedimentos de transferência para membrana ("Southern blotting"), hibridização e lavagens foram realizados de acordo com Sambrook & Russell (2000). A sonda utilizada nestes experimentos foi o produto da amplificação do gene *adsl-Lm* por PCR, o qual foi marcado através de "Random Priming" (Feinberg & Vogelstein, 1983).

2.2.2 Caracterização das regiões 5' e 3' não traduzidas (UTRs) do gene *adsl-Lm* através de RT-PCR

Para a caracterização do RNAm do gene *adsl-Lm*, foram realizados experimentos de RT-PCR como descrito por Thiemann *et al.* (1994), com algumas modificações. A estratégia adotada para a realização das reações de RT-PCR e a

seqüência dos oligonucleotídeos utilizados encontram-se na figura 2 e na tabela 5, respectivamente.

Figura 2: Estratégia adotada para a realização das reações de RT-PCR. As setas indicam os oligonucleotídeos utilizados nas reações, cujas seqüências encontram-se na tabela 20.

Tabela 5: Nome e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR para caracterização das regiões 5'e 3'UTRs do gene *adsl-Lm*.

Reação	Oligonucleotídeos	Seqüências dos oligos 5'-3'
5'UTR	1 - SL	AACTAACGCTATATAAGTATCAGTTTCTGTACTTTATTG
	2 - ADSL 5'UTR	GAGGGGGTTGTCTTGACTGATC
	3 - ADSL 5'UTR 2	GCTGTAGCGACCATCGAGA
3'UTR	4 - ADSL 3'UTR 2	GCAACGCGCATGTTACGGAG
	5 - ADSL 3'UTR	CGGTGCACCGCTTCATCCAG
	6 - 3'UTR 1-c/a/g	NAAGCGATCGAGACATGTAGCAGTTTTTTTTTTTTTTT; N = C, ou A, ou G
	7 - 3'UTR 2	AAGCGATCGAGACATGTAGCAG

Para extração do RNAm, células de *L. major* Friedlin foram crescidas em garrafas de cultura contendo 10 ml de meio M199 1X (Gibco), a 26°C. Os reagentes para este meio de cultivo estão listados na tabela 6.

O RNAm foi extraído, partindo-se de 1×10^7 células, utilizando-se "Oligotex Direct mRNA Kit" (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A resina "Oligotex" consiste de partículas com oligonucleotídeos dC10T30 ligados em sua superfície, o que permite a purificação de RNA poli-A diretamente de culturas celulares.

Para a reação de RT-PCR que visava amplificar a região 5'UTR do gene *adsl-Lm*, partindo do RNA de *L. major*, foram empregados os oligonucleotídeos ADSL5'UTR2 (anti-senso ao início do gene) e SL (específico à porção do "Spliced Leader" do RNA de *L. tarentolae*). A reação foi realizada utilizando-se "OneStep RT-PCR Kit" (Qiagen), segundo as mesmas condições já descritas no capítulo II (tabelas 12 e 13).

Já para a reação de RT-PCR que visava amplificar a região 3'UTR do gene *adsl-Lm*, foram empregados os oligonucleotídeos ADSL3'UTR 2 (que hibridiza ao fim do gene *adsl*), 3'UTR1 (que se hibridiza à cauda poli-A) e 3'UTR2 (que possui 22 nucleotídeos compartilhados ao 3'UTR1). A reação foi realizada utilizando-se o "OneStep RT-PCR Kit" (Qiagen), de acordo com as condições descritas na tabela 13 do capítulo II e submetidas a um programa de RT-PCR (tabela 7), no termociclador PTC-100TM Programable Thermal Controller (MJ Research Inc.).

Tabela 6: Reagentes usados na preparação de meio M199 1x (Gibco) usado para cultivo de células de *Leishmania*.

M199 1x para uso	
M199 5x	100ml
Soro fetal bovino	50ml
Hepes 1,0M (pH 7,5)	20ml
Adenina 10mM	5ml
Biotina 0,1%	0,5ml
Hemina 0,25%	1ml
Penicilina/Streptomicina	2,5ml
H ₂ O milliQ autoclavada	318,5ml
Volume final	500ml

Tabela 7: Protocolo do programa de RT-PCR-3'UTR.

Programa de RT-PCR									
Número de ciclos	1x	1x	1x	1x	35x			1x	
T° C	94	25	45	94	94	55	72	72	4
Tempo	1,0min	30min	1hora	2min	15seg	30seg	1min	10min	infinito

Aliquotas de 5 µl das reações de RT-PCR 5'UTR e 3'UTR foram utilizadas como molde para outras duas reações de PCR, empregando-se os pares de oligonucleotídeos SL - ADSL5'UTR e ADSL3'UTR – 3'UTR1, respectivamente. As reações foram feitas segundo condições já descritas acima (tabela 3).

Os produtos destas reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, purificados utilizando-se o “Kit” “Concert DNA extraction” (Invitrogen) e ligados ao vetor de clonagem pGEM-T (Promega), conforme especificações do fabricante. Células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas, por choque térmico (Sambrook & Russell, 2000), com os plasmídeos provenientes das ligações. As colônias cresceram em placas contendo ampicilina (100 µg/ml), IPTG (0,5mM) e X-Gal (80 µg/ml). Cinco colônias de cada região (5' e 3'UTR) foram selecionadas e fervidas em 10 µl de H₂O, por 10 minutos. Dois microlitros de cada colônia fervida foram utilizados como molde em reações de PCR, empregando-se oligonucleotídeos específicos ao vetor para confirmar se os clones continham o inserto de interesse. Preparações plasmidiais, por lise alcalina (Sambrook & Russell, 2000), dos clones recombinantes foram realizadas e submetidas ao sequenciamento de DNA. Os eletroferogramas resultantes foram analisados por alinhamentos feitos pelo programa “SEQMAN”. A sequência consenso obtida foi submetida à comparação com as sequências depositadas no banco de dados NCBI, através do programa “BLASTn” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Amplificação do gene *adsl-Lm* e clonagem no vetor de expressão PCR T7/TOPO

A fase aberta de leitura (ORF) do gene *adsl-Lm* foi amplificada através de PCR (figura 3).

Figura 3: Amplificação da fase aberta de leitura (ORF) do gene de interesse (*adsl-Lm*). Gel de agarose 1% TAE 1X mostrando resultado da eletroforese do produto da reação de PCR. Coluna 1: padrão de peso molecular, em pb (pares de bases). Coluna 2: presença de fragmento com 1440pb, referente à amplificação do gene *adsl-Lm*.

O fragmento purificado do gel, referente ao tamanho esperado do gene *adsl-Lm* (1440 pares de bases) foi inserido no vetor de expressão pCR T7/NT-TOPO.

Células competentes de *Escherichia coli* TOP 10F' foram eficientemente transformadas com o produto da ligação (gene *adsl-Lm* + pCR T7/TOPO-NT). Doze colônias foram selecionadas, aleatoriamente, para checar quais delas possuíam o gene clonado na orientação desejada. Esta análise possibilitou a identificação de clones recombinantes (que possuem o inserto na orientação correta). Um destes clones foi escolhido e submetido à preparação plasmidial para posterior

transformação de cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS, e expressão heteróloga da enzima ADSL-Lm.

Adicionalmente, submeteu-se o clone selecionado ao seqüenciamento de DNA para verificar se o gene tinha sido clonado em fase (quadro de leitura correto), se não continha mutações e, conseqüentemente, se a proteína expressa possuía a seqüência de aminoácidos prevista. Utilizando os quatro oligonucleotídeos descritos no item 2.1 foi possível realizar o seqüenciamento completo do gene *adsl-Lm* e obter uma única seqüência consenso (figura 4), que foi submetida à comparação com as seqüências nucleotídicas depositadas no banco de dados NCBI. Esta análise demonstrou que a seqüência do gene *adsl-Lm*, clonada no presente trabalho, estava em fase e possui 100% de identidade com a depositada (figura 5). Portanto, nenhuma mutação foi introduzida pela reação de PCR durante sua amplificação.

Figura 4: Esquema representativo do alinhamento múltiplo, realizado pelo programa SeqMan, dos eletroferogramas resultantes dos seqüenciamentos do gene *adsl-Lm*. “Contig 1” é referente à seqüência consenso, as setas contínuas são referentes aos seqüenciamentos na direção 5’-3’ e as setas pontilhadas aos na direção 3’-5’.

gi|15027087|emb|AL389894.4|LMFLCHR4A Leishmania major Friedlin chromosome 4, left end Length = 225394, Score = 2855, bits (1440), Expect = 0.0, Identities = 1440/1440 (100%), Strand = Plus / Minus.

```

Query: 19      atgtcactgccttcggcacaagaagcgggcgggccatctgtgaccacgacggcacacaag 78
                |||
Sbjct: 181349  atgtcactgccttcggcacaagaagcgggcgggccatctgtgaccacgacggcacacaag 181290

Query: 79      gccctcgaggatcagtcgaagacaacccctctactcgctctctctctcgatgggtgc 138
                |||
Sbjct: 181289  gccctcgaggatcagtcgaagacaacccctctactcgctctctctctcgatgggtgc 181230

Query: 139     tacaagcgtgacacggcgcgctgcgcgcctacttctcgaatacgcgttattcaagtat 198
                |||
Sbjct: 181229  tacaagcgtgacacggcgcgctgcgcgcctacttctcgaatacgcgttattcaagtat 181170

Query: 199     cgcggtgcaggtggaggtgctgtacttccaagcgtgtgcaaggaggtgccggtgatcacg 258
                |||
Sbjct: 181169  cgcggtgcaggtggaggtgctgtacttccaagcgtgtgcaaggaggtgccggtgatcacg 181110

Query: 259     cagcttcgcgcggtcacagatgcgcagctggagaagctgcgggcaaccaccttcgagAAC 318
                |||
Sbjct: 181109  cagcttcgcgcggtcacagatgcgcagctggagaagctgcgggcaaccaccttcgagAAC 181050

Query: 319     ttcacagtggacgatgcccgatgataaaggacattgaggcggtcacgaaccacgatatac 378
                |||
Sbjct: 181049  ttcacagtggacgatgcccgatgataaaggacattgaggcggtcacgaaccacgatatac 180990

Query: 379     aaggcagtgagtgactacctaaggacaagatgtctgctgcggcctcgaggcgcaaaag 438
                |||
Sbjct: 180989  aaggcagtgagtgactacctaaggacaagatgtctgctgcggcctcgaggcgcaaaag 180930

Query: 439     gaggttcatc[REDACTED]gacatcaacaacacctcgattccgatgctc 498
                |||
Sbjct: 180929  gaggttcatc[REDACTED]gacatcaacaacacctcgattccgatgctc 180870

Query: 499     ctgcgcgacgctctgcaccacactacatcccaacgctggatcagctgatcgcgacctc 558
                |||
Sbjct: 180869  ctgcgcgacgctctgcaccacactacatcccaacgctggatcagctgatcgcgacctc 180810

Query: 559     aagagcaagctgcctgagtggtgatgtcccgatgctggcccggaacgcagcgaacccggcg 618
                |||
Sbjct: 180809  aagagcaagctgcctgagtggtgatgtcccgatgctggcccggaacgcagcgaacccggcg 180750

Query: 619     agcccgacgaacttggcgaaggaattcatggtgtgattgagcggctggaagagcagcgg 678
                |||
Sbjct: 180749  agcccgacgaacttggcgaaggaattcatggtgtgattgagcggctggaagagcagcgg 180690

Query: 679     acgatgctgctgagcatcccaaacacaggcaagttcggcggcgctaccggcaacttcaac 738
                |||
Sbjct: 180689  acgatgctgctgagcatcccaaacacaggcaagttcggcggcgctaccggcaacttcaac 180630

Query: 739     gcgcacctctgtgcgtacctggcgtaaaactggctggagtttggggagctcttcctgagc 798
                |||
Sbjct: 180629  gcgcacctctgtgcgtacctggcgtaaaactggctggagtttggggagctcttcctgagc 180570

Query: 799     aagtaccttggccttcgcgcgcagcgctacacaactcagatcgagcactacgacaacctc 858
                |||
Sbjct: 180569  aagtaccttggccttcgcgcgcagcgctacacaactcagatcgagcactacgacaacctc 180510

Query: 859     gccgcatctgcgatgcgtgcgcgcggtgcacacaatcttgatggacctggccaaggac 918
                |||
Sbjct: 180509  gccgcatctgcgatgcgtgcgcgcggtgcacacaatcttgatggacctggccaaggac 180450

Query: 919     gtgtggcagtagatttactcggctactttgatcagaaggtgaaggcgggcgaagtcggc 978
                |||
Sbjct: 180449  gtgtggcagtagatttactcggctactttgatcagaaggtgaaggcgggcgaagtcggc 180390

Query: 979     agcagcgcgatgccgcataaggtgaacccgatcgacttcgagaacgctgagggcaacctg 1038
                |||
Sbjct: 180389  agcagcgcgatgccgcataaggtgaacccgatcgacttcgagaacgctgagggcaacctg 180330

```

```

Query: 1039   ggcatgagcaacgcgcgtcctcggtttttctttcagcgaagttgcccatctcccgctctgcag 1098
             |||
Sbjct: 180329 ggcatgagcaacgcgcgtcctcggtttttctttcagcgaagttgcccatctcccgctctgcag 180270

Query: 1099   cgcgacctcacagacagcacggtgctgcgcaacctcgcggttcggttagccacgcctc 1158
             |||
Sbjct: 180269 cgcgacctcacagacagcacggtgctgcgcaacctcgcggttcggttagccacgcctc 180210

Query: 1159   atcgcggtttgcctccctgcaacgcggcatcggaagctccttctcaacaaggacgtcatc 1218
             |||
Sbjct: 180209 atcgcggtttgcctccctgcaacgcggcatcggaagctccttctcaacaaggacgtcatc 180150

Query: 1219   gccgcggacctagaggg[redacted]ggcatccagacggtgctgcgc 1278
             |||
Sbjct: 180149 gccgcggacctagagggcaattgggctgctggtggcgaggggcatccagacggtgctgcgc 180090

Query: 1279   cgggaggggtaccggaagcgcgtacgaggcgctcaaggacctgacgcgcggcaacgcgc 1338
             |||
Sbjct: 180089 cgggaggggtaccggaagcgcgtacgaggcgctcaaggacctgacgcgcggcaacgcgc 180030

Query: 1339   gttacggaggagacgggtgcaccgcttcacgcagctcgaggggcatcacagaggaggtg 1398
             |||
Sbjct: 180029 gttacggaggagacgggtgcaccgcttcacgcagctcgaggggcatcacagaggaggtg 179970

Query: 1399   cggcaggagctgctcgccattacgcccttcacgtacgtgg[redacted] 1458
             |||
Sbjct: 179969 cggcaggagctgctcgccattacgcccttcacgtacgtggggtacacggcgctccctga 179910

```

Figura 5: Alinhamento da sequência do gene *adsl-Lm* depositada no NCBI e da experimental. Ilustração do alinhamento mostrando 100% de identidade entre a sequência de nucleotídeos do gene *adsl-Lm* obtida experimentalmente, e a depositada no banco de dados NCBI, indicando, portanto, a ausência de mutação que pudesse ser introduzida pela reação de PCR durante a amplificação do gene. Os oligonucleotídeos ADSL1, ADSL2, ADSL3 e ADSL4 estão destacados, respectivamente, nas cores amarelo, verde, azul claro e rosa. Os oligonucleotídeos ADSL5'UTR, ADSL5'UTR2, ADSL3'UTR2, ADSL3'UTR, 3'UTR1 e 3'UTR2 estão sublinhados de vermelho, lilás, laranja e azul, respectivamente. As setas indicam se o iniciador é no sentido "forward" (→) ou "reverse" (←).

3.2 Caracterização molecular do gene *adsl-Lm*.

3.2.1 Experimentos de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e "Southern blot"

Segundo as informações contidas no banco de dados NCBI, provenientes do projeto Genoma de *Leishmania* (WHO/TDR), o gene *adsl-Lm* situa-se no cromossomo 4. Os experimentos de PFGE, realizados com diferentes linhagens de *Leishmania*, corroboraram estes dados, pois evidenciaram que este gene está localizado em um fragmento de aproximadamente 460Kb, consistente com o tamanho do cromossomo 4 do complemento cariotípico de *L. major* Friedlin (figura

6A). A distinção dos cromossomos que co-migraram foi possível devido à variabilidade de tamanhos cromossômicos entre as linhagens de *Leishmania* utilizadas como referências, as quais são estabelecidas com base em grupos sintênicos (Wincker *et al.*, 1996). Desta forma, a localização cromossômica do gene *adsl-Lm* foi efetuada, comparando-se os resultados obtidos com os cariótipos estabelecidos por Wincker *et al.*, (1996).

Os experimentos de “Southern blot”, provenientes das digestões do DNA genômico de *L. major*, revelaram que as enzimas *Bam*H I, *Hind* III e *Dra* I, as quais não clivam dentro da sequência do gene *adsl*, geraram um único fragmento de DNA homólogo à sonda (sequência nucleotídica completa do gene). Já a enzima *Eco*R I, que apresenta um sítio de clivagem interno à fase aberta de leitura do *adsl*, resultou no padrão esperado de duas bandas hibridizadas. Estes resultados indicam que *adsl-Lm* é um gene de cópia simples (figura 6B).

Figura 6: Experimentos de PFGE e “Southern Blot” para caracterização molecular do gene *adsl-Lm*. A) Análise de “Southern blot” de PFGE de cromossomos intactos de diferentes linhagens de *Leishmania*. Coluna 1: *L. infantum* LEM1317. Coluna 2: *L. infantum* LEM1163. Coluna 3: *L. major* LEM1958. Coluna 4: *L. major* LV39. Coluna 5: *L. major* Friedlin. Marcadores de DNA são concatâmeros do fago lambda, em Kb. C-zona de compressão. O sinal mais forte na coluna 5 (indicado pela seta *a*) mostra que o gene *adsl-Lm* localiza-se num fragmento de aproximadamente 460Kb, que é consistente com o tamanho do cromossomo 4. B) Análise de “Southern blot” proveniente da digestão do DNA genômico de *L. major* Friedlin, com diferentes enzimas de restrição. Coluna 1: *Bam*HI. Coluna 2: *Hind*III. Coluna 3: *Dra*I. Estas enzimas não clivam dentro da sequência do gene *adsl*, e portanto, geram um único fragmento de DNA hibridizado com a sonda. A enzima *Eco*RI (coluna 4), que cliva uma vez dentro do gene, gerou um padrão de duas bandas hibridizadas. Estes experimentos demonstraram que *adsl-Lm* é um gene de cópia simples.

3.2.2 Caracterização das regiões 5' e 3' UTRs do gene *adsl-Lm*

As reações de RT-PCR que visavam amplificar as regiões 5' e 3' não traduzidas (UTRs) do gene *adsl-Lm* resultaram na amplificação de um fragmento de aproximadamente 200pb, para 5'UTR, e de um fragmento de aproximadamente 700pb para 3'UTR (figura 7). Estes fragmentos foram reamplificados por reações de PCR, como descrito no Material e Métodos e então purificados do gel, para ligação no vetor de clonagem pGEM-T.

Figura 7: RT-PCR para amplificação das regiões 5'UTR e 3'UTR do gene *adsl-Lm*. A) Gel de agarose 1% TAE 1X mostrando eletroforese do produto da reação de RT-PCR 5'UTR (coluna 2). Coluna 2: padrão de peso molecular, em pares de bases. B) Gel de agarose 1% TAE 1X mostrando o fragmentos equivalentes à 3'UTR, com aproximadamente 700pb (coluna 2). Coluna 1: padrão de peso molecular, em pares de bases.

Células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas com os produtos das duas ligações (fragmento purificado referente a 5'UTR + pGEM-T e fragmento purificado referente a 3'UTR + pGEM-T). Colônias foram submetidas às reações de PCR para confirmar se eram recombinantes e mostraram possuir os insertos (figura 8). Assim, o DNA plasmidial destes clones foi extraído e utilizado em reações de seqüenciamento de DNA.

Figura 8: Confirmação de clones recombinantes 5' e 3'UTRs no vetor pGEM-T. Géis de agarose 1% TAE1X mostrando eletroforese dos produtos das reações de PCR, que foram realizadas para verificar a presença de clones recombinantes nas construções 5'UTR/pGEM-T (A) e 3'UTR/pGEM-T (B). Em A) coluna 1: padrão de peso molecular, em pares de bases; colunas 3 a 6: fragmentos de aproximadamente 350pb, referentes ao tamanho das regiões 5'UTR (200pb) + "polylinker" do vetor (144pb), indicando clones recombinantes (seta *a*). Em B) coluna 1: padrão de peso molecular, em pares de bases; colunas 2 3 e 4: fragmentos de aproximadamente 850pb, referentes ao tamanho das regiões 3'UTR (~700pb) + "polylinker" do vetor (144pb), indicando clones recombinantes (seta *b*).

Os alinhamentos múltiplos dos eletroferogramas provenientes dos sequenciamentos dos plasmídeos recombinantes pGEM-T + 5'UTR e pGEM-T + 3'UTR, nos forneceram uma sequência consenso da região "upstream" do gene *adsl-Lm*, possuidora de 79 nucleotídeos (incluindo o "Spliced Leader" de 39pb) e da região "downstream" do gene possuidora de 541 nucleotídeos. A sequência de nucleotídeos 5'UTR situada entre o SL e o início do gene (40pb) e a sequência de nucleotídeos 3'UTR situada entre o fim do gene e a cauda poli-A foram submetidas à comparação com as sequências depositadas no banco de dados NCBI, através do Blastn. Ambas mostraram identidade com sequências presentes no cromossomo 4 de *L. major* (dados não mostrados), que é o cromossomo portador do gene *adsl*. Estes resultados confirmaram que os insertos clonados eram realmente das regiões 5' e

3' não traduzidas. Além disto, através do Blastn, foi possível a identificação de uma região rica em pirimidinas na extremidade 5' (figura 9), antecedendo o sítio acceptor (AG, destacado em amarelo na figura 9) para o SL. Estas seqüências polipirimídicas já foram descritas como elementos de reconhecimento para inserção do SL (Matthews *et al.*, 1994).

Com base nestes dados, pode-se inferir que as regiões 5' e 3'UTRs do gene *adsl-Lm* foram definidas e que o RNA mensageiro maduro foi completamente caracterizado, resultando em uma seqüência de 2060 nucleotídeos, incluindo o "Spliced Leader" de 39pb. A figura 10 mostra as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos completas, bem como das regiões 5' e 3'UTRs.

TTGCAGAGCTCACGTGTGTACTCACGCAAGCATCATCTCTTCGCCCAC
TCTCGCTCCTCCTCCCTTCTCGTTCCTGCTCCGTGCAGGATCAATTTTTTT
GTTCCGAATAGTTGAGCACGCAGAACAATGTCACCTGCCTTCGGCACAAAGAA
M S L P S A Q E

Figura 9: Região "upstream" do gene *adsl-Lm*, presente no cromossomo 4, obtida pelo Blastn. A seqüência representada em azul é rica em pirimidinas, uma característica das seqüências que antecedem a região 5'UTR. O AG, destacado em amarelo, indica o sítio acceptor do "Spliced Leader". A seqüência 5'UTR (40pb) está representada em rosa e em vermelho a Metionina iniciadora (M) da proteína ADSL-Lm.

AACTAACGCTATATAAGTATCAGTTTCTGTACTTTATTGGATCAATTTTTT
GTTCGGAATAGTTGAGCACGACGAGCAACAATGTCACCTGCCTTCGGCACAAAGAA
M S L P S A Q E
 GCGGCGGCGCCATCTGTGACCACGACGGCACACAAGGCCCTGCGGAGATC
 A A A P S V T T T A H K A P A E I
 AGTCAAGACAACCCCTCTACTCGCTCTCTCTCTCGATGGTGGCTACAAG
 S Q D N P L Y S L S P L D G R Y K
 CGTGACACGGCGCGCTGCGCGCTACTTCTCGAATACGGTTATTCAAG
 R D T A A L R A Y F S E Y A L F K
 TATCGCGTGCAGGTGGAGGTGCTGTACTTCCAAGCGCTGTGCAAGGAGGTG
 Y R V Q V E V L Y F Q A L C K E V
 CCGGTGATCACGCGCTTTCGGCGCTCACAGATGCGCAGCTGGAGAAGCTG
 P V I T Q L R G V T D A Q L E K L
 CGGGCAACACCTTCGAGAAGTTCACAGTGGACGATGCCCGATGATAAAG
 R A T T F E N F T V D D A R M I K
 GACATTGAGCGGTACGGAACACGATATCAAGGCACTGGAGTACTACCTG
 D I E A V T N H D I K A V E Y Y L
 AAGGACAAGATGTCTGCGCTGCGGCTCGAGGCGGAAAAGGAGTTCATCCAC
 K D K M S A C G L E A E K E F I H
 TTTGGGCTAACGTCGACGACATCAACAACACCTCGATTCCGATGCTCCTG
 F G L T S Q D I N N T S I P M L L
 CCGGACGCTCTGCACCACTACATCCCAACCTGGATCAGCTGATCGCG
 R D A L H H H Y I P T L D Q L I A
 CACCTCAAGAGCAAGCTGCTGAGTGGGATGTCCGATGCTGGCCCGGACG
 H L K S K L P E W D V P M L A R T
 CACGGCCAAACGGCGAGCCGACGAACTTGGCGAAGGAATTCATGGTGG
 H G Q P A S P T N L A K E F M V W
 ATTGAGCGGTGGAAGAGCAGCGGACGATGCTGCTGAGCATCCCAACACA
 I E R L E E Q R T M L L S I P N T
 GGCAGTTCGCGCGGCTACCGGCAACTTCAACGCGCACCTCTGTGCGTAC
 G K F G G A T G N F N A H L C A Y
 CTTGGCGTAACTGGCTGGAGTTTGGGGAGCTCTTCTGAGCAAGTACCTT
 P G V N W L E F G E L F L S K Y L
 GGCCTTCGCGGCCAGCGCTACACAACCTCAGATCGAGCACTACGACAACCTC
 G L R R Q R Y T T Q I E H Y D N L
 GCGGCCATCTGCGATGCGTGGCGCGGCTGCACACAATCTTGATGGACCTG
 A A I C D A C A R L H T I L M D L
 GCCAAGGACGTGTGGCAGTACATTTCACTCGGCTACTTTGATCAGAAGGTG
 A K D V W Q Y I S L G Y F D Q K V
 AAGGCGGGCGAAGTCGGCAGCAGCGCGATGCGCATAAGGTGAACCCGATC
 K A G E V G S S A M P H K V N P I
 GACTTCGAGAAGCTGAGGGCAACCTGGGCATGAGCAACGCCGCTCCTCGGT
 D F E N A E G N L G M S N A V L G
 TTTCTTTCAGCGAAGTTGCCATCTCCCGTCTGCGACGCGACCTCACAGAC
 F L S A K L P I S R L Q R D L T D
 AGCACGGTGTGCGCAACCTCGGCGTTCCGCTTAGCCACGCCCTCATCGCG
 S T V L R N L G V P L S H A L I A
 TTTGCTCCCTGCAACGCGGCTCGGCAAGCTCCTTCTCAACAAGGACGTC
 F A S L Q R G I G K L L L N K D V
 ATCGCGCGGACCTAGAGGGCAATTGGGCTGTGCTGGCGGAGGGGATCCAG
 I A A D L E G N W A V V A E G I Q
 ACCGTGCTGCGCGGGAGGGCTACCGAAGCGGTACGAGGCGCTCAAGGAC
 T V L R R E G Y P K P Y E A L K D
 CTGACGCGCGCAACGCGCATGTTACGGAGGAGACGGTGCACCGCTTCATC
 L T R G N A H V T E E T V H R F I
 CAGCAGCTCGAGGGCATCACAGAGGAGGTGCGGACGAGGCTGCTCGCCATT
 Q Q L E G I T E E V R Q E L L A I
 ACGCCCTTACGTACGTGGGCTACACGGCGCTCCCTGAGAGAACGAGAAA
 T P F T Y V G Y T A R P *
 AGGAAGCGCGACAGTCTTGGGAGCCCGTGGTGAACCGAAGAGCCCGGTGC
 GCGCGGGGGAGGAATAGACGTGGTACTGTTGCTGTCTGTTGTACAGTCA
 GCGCGAAGCGGGGCTGCATTAAGGGTGAGCGCAACGGCCCTTGTCTCT
 GGCAGGGGGTGGAGAGGGGGTGGGGTCTGCTGAGCTGAGGTGAATAAG
 AACCGTCTGTCTCTCTCAGCAGCAGAGTTCAGCGCTTACTAGCGT
 GCTGCGGAGAGAGATGCAGCGCGAGGTTTGATCATCTCTCCTCAATCCAC
 CTTCTGCACCGTTTCATCACTCTGGCGCACACACATACACATACACACT
 CCTCCCTCCCGCTAAGGCACACATGCATATAGCAGCAGCAGCGCGGGC
 GCGGTTCTACTTGAACCTCTGCTGTCGCTCTAGTTTCTTGGCGCACA
 CATGCCGTGCCAAGGCTACATGTATGTTTTTTCTTTTTTTTGGAGCCCTT
 CGTTTGTTTAGCAGTGA

Figura 10: Sequência completa do RNAm do gene *adsl-Lm*. Sequência nucleotídica do gene *adsl-Lm* (sublinhada). Abaixo de cada trinca de nucleotídeos encontra-se o aminoácido correspondente. Em vermelho estão representados a Metionina iniciadora (M) da proteína ADSL-Lm e seu códon de terminação (*). O destaque em amarelo representa o "Spliced Leader" (39pb). A sequência 5'UTR (40pb) está representada em rosa e a 3'UTR (541pb) em azul. A região destacada em verde refere-se à cauda Poli-A do RNA mensageiro possuidor de 2060 pb.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DA ENZIMA ADSL-LM

1. INTRODUÇÃO SOBRE AS METODOLOGIAS UTILIZADAS

1.1 Complementação funcional

A identificação de novos genes de interesse em *Leishmania* através da complementação funcional vem contribuindo para estudos nas áreas de resistência aos medicamentos e virulência (Beverley, 1995). No caso do presente trabalho, a complementação funcional, que envolve a introdução de um gene homólogo em um organismo que seja deficiente deste determinado gene, foi utilizada com o intuito de verificar se a enzima ADSL de *L. major* era capaz de complementar a célula de *E. coli* deficiente de ADSL, permitindo assim seu crescimento em condições controladas. Com isto, podemos abordar melhor a questão evolutiva da perda ou não da via de síntese *de novo*, uma das questões que nos motivou a desenvolver este trabalho, como já mencionado no capítulo I.

1.2 Expressão da enzima recombinante ADSL-Lm em células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Para a produção da proteína ADSL-Lm, empregamos a linhagem bacteriana de *E. coli* BL21(DE3)pLysS por recomendação do fabricante do sistema de expressão escolhido “pCR T7 TOPO TA Cloning” (Invitrogen). A designação DE3 indica que esta linhagem contém o lisógeno do bacteriófago lambda DE3 que carrega o gene *lac I*, uma pequena porção do gene *lac Z* e o gene codificador da enzima T7 RNA polimerase sob controle do promotor *lacUV5*. Este promotor encontra-se constitutivamente reprimido pela proteína LAC I. Para sua ativação, adiciona-se IPTG, o qual, sendo análogo da

lactose, se liga a LAC I, promove mudanças conformacionais na estrutura desta proteína, que então se desprende do promotor, permitindo a transcrição pela T7 RNA polimerase. O plasmídeo pLysS, também carregado por estas bactérias, além de conferir resistência ao antibiótico cloranfenicol, produz T7 lisozima, que se liga à T7 polimerase e inibe sua atividade de transcrição, reduzindo, assim, o nível de expressão basal do sistema. Este sistema de expressão é interessante em especial para genes que podem ser tóxicos à célula hospedeira, mesmo quando expressos em pequenas quantidades em decorrência do “vazamento” do promotor *lacUV5*. No caso da ADSL-Lm não há evidências de ser uma proteína tóxica para a bactéria, mas o sistema, por ser bem regulado ao nível da transcrição, se apresentou como uma boa opção inicial para a expressão heteróloga da proteína de interesse.

1.3 Purificação da enzima recombinante ADSL-Lm

Como o gene *adsl-Lm* foi clonado em fase no vetor pCR-TOPO/T7-NT, a proteína de interesse é expressa com uma sequência codificante N-terminal portadora de 6 histidinas (figura 1 do capítulo III). A presença desta “cauda” propicia alta afinidade para ligação em resinas de cromatografia contendo íons de metal (Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+3}) quelados, resultando assim na imobilização da proteína recombinante (contendo a cauda de histidinas) na fase estacionária da cromatografia, sendo esta técnica conhecida como IMAC (“Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography”). Portanto, as proteínas são separadas por suas especificidades de ligação. Para a eluição da proteína ligada pode ser utilizado um doador de elétrons que compete com a proteína pela interação com o metal quelado na resina ou pela alteração do pH da solução, alterando o pKa das histidinas e

assim sua coordenação com o metal quelado. No primeiro caso, que é o mais comumente usado, o composto empregado é o imidazol, uma vez que o anel imidazólico é constituinte normal do aminoácido histidina.

Geralmente apenas um passo de purificação não é suficiente para obtenção de uma amostra de proteína com alto grau de pureza, o que é requerido para alguns experimentos de caracterização bioquímica, bem como para a cristalização da proteína em questão. Assim, como segundo passo de purificação, empregamos a cromatografia por exclusão molecular. Esta técnica também conhecida como gel filtração e baseia-se no princípio de que moléculas em solução são separadas de acordo com diferenças em seus tamanhos enquanto migram pela matriz. Os poros presentes no gel da matriz são preenchidos pela fase líquida e devem ser comparáveis em tamanho às moléculas que desejamos separar. Moléculas relativamente pequenas podem se difundir para dentro dos poros, enquanto moléculas maiores apresentam maior dificuldade em se difundir para dentro do gel. As moléculas que forem suficientemente grandes para não penetrarem nos poros ficam confinadas à solução que os cerca. Desta forma, moléculas muito grandes (fora do limite de separação da resina) saem no volume equivalente ao líquido intersticial da coluna ("void volume") e as demais são separadas de acordo com a capacidade de ficarem retidas nos poros.

1.4 Caracterização bioquímica e estrutural da enzima recombinante ADSL-Lm.

1.4.1 Determinação do peso molecular da ADSL-Lm por cromatografia de exclusão molecular, espalhamento dinâmico de luz e eletroforese em gel nativo

De acordo com as propriedades descritas acima para a cromatografia de exclusão molecular, ressaltamos que esta técnica também foi utilizada para determinar o peso molecular da ADSL-Lm.

Além da gel filtração, medidas de espalhamento dinâmico de luz (“Dynamic Light Scattering” ou DLS) foram empregadas para a determinação da forma oligomérica da ADSL-Lm. DLS mede intensidade de luz espalhada por moléculas em solução, isto é, o coeficiente de difusão translacional. Na prática, as macromoléculas em solução não são esféricas, o raio calculado a partir do coeficiente de difusão das partículas oferece uma estimativa do tamanho aparente da partícula hidratada ou solvatada. Esta medida é designada pela terminologia “raio hidrodinâmico”. O raio hidrodinâmico inclui o efeito decorrente da forma e da hidratação das partículas a partir de modelos estimados. Desta forma, a técnica pode fornecer informações sobre a homogeneidade estrutural da amostra, em relação à presença ou ausência de agregados e também fornecer uma estimativa do peso molecular das moléculas espalhadoras de luz (Berne & Pecora, 1976).

O estado de oligomerização da ADSL-Lm também foi analisado através da eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes. “Native PAGE” (Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis) é uma das técnicas utilizadas para o estudo da composição e estrutura de proteínas nativas, uma vez que a conformação e a atividade biológica das proteínas permanecem intactas durante esta técnica. Tal metodologia separa as proteínas com base em tamanhos, cargas resultantes e conformações das mesmas. Géis formados por gradiente de poliacrilamida comprimem as bandas de proteína e aumentam a faixa de resolução para análise dos tipos moleculares presentes.

O gradiente no gel de separação determina o campo de separação por peso molecular, possível de se analisar em uma corrida. Para proteínas nativas e globulares de tamanho entre 90-600kDa, o gradiente de 10-15% de poliacrilamida é adequado para dar uma relação linear entre a distância de migração da proteína e o logaritmo de seu peso molecular. A distância de migração de proteínas não globulares ou com cargas extremas pode não ser proporcional ao logaritmo do peso molecular. Uma outra maneira de analisar as proteínas por “Native PAGE” é através de géis com concentração homogênea de poliacrilamida.

1.4.2 Determinação do ponto isoelétrico (pI) da ADSL-Lm

Proteínas são polímeros que possuem somatórias de cargas positivas, negativas, ou neutras, dependendo do pH do meio em que se encontram. O ponto isoelétrico teórico (pI) é o valor de pH específico para cada proteína, no qual a somatória de cargas é zero (Garfin, 1990), considerando-se a proteína como um polímero sem estrutura secundária e terciária e pode ser obtido pela soma algébrica de todas as cargas das cadeias laterais dos aminoácidos que as compõe. Entretanto, como as proteínas em seu estado funcional possuem uma estrutura terciária definida, que expõe algumas cadeias laterais e esconde outras do contato com o solvente, o pI teórico e o pI real de uma proteína nem sempre são coincidentes. Desta forma, se faz necessária a determinação do pI experimentalmente uma vez que nas condições de pI a proteína é menos solúvel. Deste modo, a determinação deste valor para escolha do pH dos tampões utilizados nas demais técnicas, como ensaios de atividade enzimática e cristalização da proteína, torna-se útil. A metodologia consiste de uma eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de

pH e da migração da proteína através do gel até o ponto onde o valor de pH for igual ao seu pI. Neste ponto, a proteína assume carga total igual a zero e não migra mais para o catodo ou anodo.

1.4.3 Ensaio de atividade enzimática da ADSL-Lm

Três propriedades distintas das enzimas permitem que elas exerçam papel central na promoção e regulação dos processos celulares, caracterizando-as como componentes vitais aos sistemas vivos:

1) *Elevada especificidade da reação* – como regra geral, cada reação sob condições apropriadas é catalisada por uma enzima específica. Diante de várias rotas potencialmente possíveis, a enzima escolhe a com menor energia livre de ativação.

2) *Condições de reação mais brandas* – a atividade de cada enzima é dependente do pH, da temperatura, da presença de vários co-fatores e das concentrações de enzima, substratos e produtos.

3) *Capacidade de regulação da concentração e da atividade* – permite o ajuste fino do metabolismo em diferentes condições fisiológicas.

A catálise ocorre apenas em uma pequena região bem definida denominada sítio ativo. O estudo da velocidade das reações enzimáticas, ou cinética enzimática, envolve informações indiretas sobre o mecanismo de ação catalítica, especificidade das enzimas, alguns fatores que afetam a velocidade das reações e a determinação quantitativa de seus efeitos. Assim, as enzimas podem ser analisadas quanto as suas velocidades, a fim de quantificar suas eficiências catalíticas. A relação quantitativa entre a velocidade de

reação enzimática e a concentração do substrato é definida pela equação de *Michaelis-Menten*:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

V_0 é a velocidade inicial, $V_{\max}$ é a velocidade máxima e $[S]$ é a concentração inicial de substrato, sendo todos os parâmetros relacionados através da constante de Michaelis-Menten K_m . A equação descreve o comportamento cinético da maioria das enzimas e todas estas enzimas que exibem uma dependência hiperbólica de V_0 em relação a $[S]$ são ditas seguir a cinética de Michaelis-Menten (Nelson & Cox, 2000). Nestes casos, o valor de K_m é numericamente igual à concentração do substrato (mol/L), ou seja $[S] = K_m$, quando $V_0 = V_{\max}/2$. A concentração da enzima não afeta o valor de K_m (estado estacionário). Os valores de K_m das enzimas variam amplamente e dependem de cada substrato em particular, como também das condições ambientais, como pH, temperatura e força iônica.

O melhor parâmetro cinético para comparações de eficiência catalítica leva em consideração não apenas a constante K_m , mas também outra constante, k_{cat} , a qual expressa o número de moléculas do substrato convertidas em produto por uma única molécula de enzima em uma dada unidade de tempo (número de renovação). Assim, o fator k_{cat}/K_m é o parâmetro adequado para discussão de eficiência catalítica (Nelson & Cox, 2000).

Para a determinação dos parâmetros cinéticos da enzima ADSL-Lm, ensaios de atividade enzimática foram padronizados utilizando o substrato da reação adenilosuccinato. Além disto, experimentos foram também conduzidos com o composto

SAICAR (substrato da reação da enzima na via de síntese de novo), a fim de investigar se esta enzima é capaz de converter o SAICAR, o que nos forneceria uma evidência para discutir o aspecto evolutivo da ausência da via de síntese *de novo* de purino-nucleotídeos em tripanosomatídeos. O SAICAR nos foi gentilmente cedido pelo colaborador Prof. Dr. Knoch (Institute for Inherited Metabolic Disorders, Charles University 1st School of Medicine and General Faculty Hospital, República Tcheca).

1.4.4 Cristalização da proteína ADSL-Lm

A cristalografia de proteínas é uma poderosa ferramenta na elucidação detalhada da estrutura das proteínas e tem um papel fundamental no estudo de vários problemas biológicos. Os passos envolvidos na resolução da estrutura tridimensional de uma determinada proteína, por cristalografia e difração de raios-X, são em sequência: *i)* Purificação da proteína; *ii)* Cristalização; *iii)* Coleta de dados; *iv)* Determinação das fases; *v)* Construção e refinamento do modelo.

Uma das etapas críticas é a obtenção de um mono cristal de proteína. Um cristal é formado por moléculas idênticas que se repetem num arranjo tridimensional ordenado e periódico (figura 1). A formação de cristais é dependente de vários parâmetros, como pH, temperatura, concentração de proteína e a natureza do tampão e do agente precipitante (Rhodes, 1993; Drenth, 1994). A cristalização ocorre em soluções supersaturadas e, qualquer mudança no processo de supersaturação pode levar à formação de um precipitado sólido amorfo, ao invés de cristais. As metodologias mais utilizadas para a cristalização de proteínas são as técnicas de difusão de vapor, em particular a da gota suspensa (“hanging drop”, Hampel *et al.*, 1968). Neste método, uma

pequena gota de cerca de 2-10 μ l de proteína é misturada com um volume igual ou similar de solução de cristalização (formada usualmente por tampão e precipitante) e colocada sobre uma lamínula siliconizada. A lamínula é invertida e selada sobre um reservatório contendo 500-1000 μ l de solução de cristalização (figura 2). A diferença de concentração de solutos entre a gota e o reservatório direciona o sistema, no sentido de um equilíbrio de concentração entre a gota e a solução do reservatório. Isto se dá por difusão através da fase de vapor da solução menos concentrada (da gota) para a de maior concentração (a do poço). Se o equilíbrio for atingido lentamente, possibilitando o arranjo das moléculas de forma ordenada, resultará então na formação do cristal e não na precipitação da proteína (Rhodes, 1993; Drenth, 1994).

Figura 1: Esquema representativo de um cristal de proteína. O arranjo ordenado das moléculas de proteína leva à formação de um cristal.

Figura 2: Esquema do método da gota suspensa. À esquerda, placa utilizada nos experimentos de cristalização. À direita, um dos poços está ampliado. A gota de cristalização é composta pela solução do poço (que contém, normalmente, um agente tamponante, sal e um precipitante) e a solução da proteína. Uma vez montada sobre uma lamínula, a gota é colocada sobre o reservatório. A diferença na concentração de solutos entre a solução do poço e a da gota (que contém a proteína) induz a evaporação da água da gota, aumentando lentamente a concentração da proteína, o que pode induzir sua cristalização.

A aparência macroscópica dos cristais não é um critério para avaliar a qualidade de um cristal. Cristais que parecem perfeitos, isto é, com suas faces bem determinadas, podem não difratar os raios-X e cristais que macroscopicamente não parecem excelentes podem difratar até alta resolução ($< 2\text{\AA}$). Somente o experimento de difração pode determinar se um cristal é realmente apropriado para estudos cristalográficos.

Os experimentos iniciais de difração de raios-X demonstraram que os cristais obtidos da ADSL-Lm não difratavam à alta resolução, o que é requerido para a determinação de sua estrutura cristalográfica (dados mostrados na sessão de resultados e discussão deste capítulo). Assim, empregamos algumas metodologias, como óleos para cobrir a superfície da solução do poço e sementeiras ("microseeding" e

“macroseeding”), na tentativa de diminuir a taxa da velocidade de difusão de vapor (entre a gota e a solução do poço) e reduzir a nucleação a fim de levar à formação de um cristal maior.

Óleos como a parafina e o silicone funcionam como “barreiras” para difusão de vapor entre a gota e a solução do poço. Desta forma, adicionando-se uma camada de óleo sobre a superfície da solução de cristalização no poço, consegue-se diminuir a taxa de difusão de vapor (Chayen, 1997; Chayen, 2004), o que pode levar ao surgimento de poucos cristais e de maior tamanho na gota.

Para uma melhor compreensão dos eventos de semeadura, devemos observar o diagrama esquemático de cristalização, que é dividido em zonas (figura 3) e relaciona a concentração de proteína e a concentração de precipitante:

A - Estável – zona não saturada, onde a cristalização não é possível

B - Limite de solubilidade

C- Metaestável – zona de supersaturação, onde o nível de saturação é suficiente para o crescimento de cristais, mas não é alta o suficiente para que se inicie nucleação espontânea. Esta é a melhor zona para “seeding.”

D - Zona supersaturada - onde ocorre a agregação ordenada (cristalização)

E – Precipitação – zona onde ocorre agregação desordenada (precipitado amorfo)

Figura 3: Diagrama de fases. Figura extraída de Bergfors (2003). O diagrama mostra a relação entre a concentração da proteína (ordenada) e a concentração de precipitante (abscissa) num experimento de cristalização de proteína.

Tanto a nucleação quanto o crescimento de cristais dependem do grau de supersaturação da proteína; entretanto, os processos físicos envolvidos nestes dois eventos são diferentes. O grau de supersaturação requerido para a nucleação é geralmente maior do que o requerido para o crescimento. Quando um núcleo é formado, seu crescimento reduz o grau de supersaturação da solução e, conseqüentemente, diminui a probabilidade de que outro núcleo se forme. As técnicas de semeadura tomam vantagem de que na zona metaestável a probabilidade da nucleação é menor, assim espera-se que o cristal cresça a partir de uma semente introduzida na solução (Bergfors, 2003). Neste contexto, estas metodologias têm sido bastante utilizadas para obtenção de um número menor de cristais na gota, mas com tamanhos maiores. Existem dois métodos básicos de semeadura: “macro” e “microseeding”.

No “macroseeding”, um cristal, geralmente de 5-50 μ m, é transferido de uma “solução mãe”, onde a nucleação e o crescimento inicial ocorrem, para uma gota pré-equilibrada com menor grau de supersaturação para continuar seu crescimento. Antes da

transferência, o cristal deve ser lavado em uma solução não saturada para a remoção de defeitos na sua superfície, como moléculas desordenadas de proteína ou precipitado amorfo, que resultam na interrupção do seu crescimento.

No “microseeding”, micro-cristais, cristais em formato de agulhas finas ou aglomerados de cristais (que não são apropriados para utilização em “macroseeding”) são introduzidos em uma solução metaestável e então quebrados para formar uma solução estoque. A partir desta solução, são feitas diluições seriadas e as sementes são colocadas em gotas pré-equilibradas em uma condição próxima daquela que originaram os cristais.

1.4.5. Coleta, processamento de dados de difração de raios-X e obtenção das fases

O problema experimental que envolve a determinação de uma estrutura molecular por difração de raios-X é a obtenção dos fatores de estrutura, das ondas difratadas pelo cristal, que carregam informações sobre a distribuição eletrônica do material espalhador ($\rho(xyz)$). Esses fatores de estrutura podem ser descritos em termos de amplitudes, $|F(hkl)|$, e de fases, $\alpha(hkl)$. Contudo, em um experimento de difração em cristalografia é possível se medir apenas a amplitude da onda difratada resultante, sendo a informação das fases perdida. Assim, com o intuito de se obter uma imagem direta da estrutura da proteína em um cristal, é necessário medir a intensidade ($I \propto |F(hkl)|^2$), a direção da onda difratada, estimar as fases e, através de métodos computacionais, calcular a estrutura (modelo) que deu origem ao padrão de difração.

Em princípio, para se resolver o problema das fases e possibilitar o cálculo inicial dos mapas, duas técnicas foram desenvolvidas: substituição molecular (Rossmann & Blow, 1962) e substituição isomórfica (Green *et al.*, 1954). No método da substituição molecular, as fases são determinadas a partir de um modelo estrutural de uma proteína homóloga à proteína de interesse. Já no método da substituição isomórfica, para determinação das fases são incorporados átomos pesados ou espalhadores anômalos no cristal nativo. Como estes átomos apresentam um espalhamento diferenciado dos raios-X isso pode ser usado para determinar de maneira indireta as fases do cristal nativo, desde que ambos sejam isomórficos.

A técnica que utiliza apenas um cristal derivado com sinal anômalo para obtenção das fases dos fatores de estrutura recebe o nome de dispersão anômala simples (SAD). Se forem coletados vários conjuntos em diferentes comprimentos de onda específicos para o espalhador anômalo contido em um cristal, a metodologia é conhecida como dispersão anômala múltipla (MAD). A utilização de um cristal nativo e um cristal derivado com sinal anômalo recebe o nome de substituição isomorfa simples com espalhamento anômalo (SIRAS). Se além de um cristal nativo, dois ou mais derivados forem usados, o método é denominado substituição isomorfa múltipla com espalhamento anômalo (MIRAS).

Revisões descrevendo aspectos teóricos e práticos dos procedimentos envolvidos na resolução de uma estrutura cristalográfica têm sido publicadas (Dauter, 1999; Nagem *et al.*, 2003).

Na tentativa de obtenção das fases da proteína ADSL-Lm as técnicas de substituição molecular e substituição isomórfica com contribuição anômala foram utilizadas.

Substituição molecular faz uso de um modelo pré-existente, que pode ser a mesma estrutura resolvida num grupo espacial diferente, ou uma estrutura que se acredite possuir uma alta similaridade estrutural com aquela que se deseja resolver. Assume-se que o nível de similaridade entre as duas estruturas seja correlacionado com a similaridade seqüencial dos aminoácidos. Como regra, é provável que a substituição molecular funcione razoavelmente bem se o modelo é satisfatoriamente completo e possui ao menos 40% de identidade seqüencial com a estrutura desconhecida. Torna-se progressivamente mais difícil de se obter sucesso conforme o modelo torna-se menos completo ou possui identidade seqüencial menor. O método da substituição molecular orienta a molécula de estrutura conhecida dentro da cela unitária da estrutura desconhecida.

Na técnica de SIRAS, uma vez que os átomos pesados são introduzidos na estrutura cristalina de um composto, coletam-se dois conjuntos de dados: um do cristal nativo e outro do cristal derivado. Se a introdução dos átomos não deformar a estrutura do cristal, a diferença entre os dois padrões de difração será devida aos átomos pesados. Uma das consequências imediatas do efeito anômalo é o surgimento de um fator de espalhamento atômico complexo para o tipo de átomo em questão. Assim, as fases dos fatores de estrutura do cristal derivado podem ser determinadas quando se coleta um conjunto de dados de um cristal derivado (assumindo que todos os átomos incorporados são do mesmo tipo) e se sintoniza o comprimento de onda da radiação incidente para

produzir o maior efeito anômalo possível (a escolha do comprimento de onda depende do tipo de átomo usado para a derivatização). Teoricamente, quanto mais informações forem utilizadas para a obtenção das fases, maior é a probabilidade de obtê-las com os valores corretos.

1.4.6 Refinamento do modelo

Após a obtenção do conjunto inicial de fases, é possível calcular o mapa de densidade eletrônica, a partir do qual pode-se construir um modelo da proteína. Entretanto, o refinamento da posição dos átomos (x, y e z), assim como do fator de temperatura (β) para cada um deles faz-se necessário. Para melhorar a concordância deste modelo com os dados experimentais, são feitos ajustes quantitativos e qualitativos. A análise qualitativa é feita através da inspeção visual do acordo entre o modelo e o mapa de densidade eletrônica, o que é realizado com a ajuda de alguns programas gráficos. Nesta etapa se faz uma imagem tridimensional da densidade eletrônica na qual se sobrepõe a imagem do modelo. Assim, pode-se avaliar com detalhe o ajuste entre o mapa e o modelo. A análise quantitativa se faz minimizando uma função de energia que leva em conta a estereoquímica do modelo, bem como os dados experimentais. Os fatores de estrutura calculados a partir do modelo geralmente apresentam uma diferença com os obtidos a partir das intensidades medidas. Para medir esta diferença utiliza-se um fator denominado Rfactor, definido como:

$$R = \frac{\sum_{(hkl) \in A} \|F_{obs} - k|F_{calc}|\|}{\sum_{(hkl) \in A} |F_{obs}|}$$

onde $|F_{obs}|$ é a magnitude do fator de estrutura observado e $|F_{calc}|$ é a magnitude do fator de estrutura calculado. A estimativa deste fator é feita a partir de uma parte das reflexões que é denominada conjunto de trabalho (A) e o restante denomina-se conjunto teste (T).

Pode-se considerar um bom refinamento quando o valor do Rfactor for menor ou igual a 20% para um cristal que difrata ao redor de 2Å. Antes de atingir este valor é necessário alternar ciclos de minimização com novos cálculos do mapa de densidade eletrônica para a inspeção visual do ajuste do modelo com o mapa. Além do Rfactor, existem outros parâmetros que permitem avaliar a qualidade do modelo, os quais geralmente estão relacionados com a estereoquímica do mesmo. Por exemplo, o gráfico de Ramachandran possibilita determinar os resíduos que na cadeia principal apresentam valores dos ângulos da ligação peptídica não permitidos. Também é possível calcular o RMS (desvio médio quadrático) entre os valores dos ângulos e das distâncias de ligação de todos os átomos do modelo com valores experimentais conhecidos. Durante o processo de minimização, é possível obter um valor de Rfactor pequeno, o que não significa que o modelo reflita os dados experimentais. Desta forma, se define um parâmetro de controle estatístico denominado Rfree, definido como:

$$R_{free} = \frac{\sum_{(hkl) \in T} \|F_{obs} - k|F_{calc}|\|}{\sum_{(hkl) \in T} |F_{obs}|}$$

Na minimização se omite o conjunto T para que o Rfree seja independente deste processo (Brunger, 1992). No exemplo anterior, para o modelo com um Rfactor de 20%, até 25% de Rfree é aceitável.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Complementação funcional

A linhagem mutante de *E. coli* JK268 (*dadR1*, *trpE61*, *trpA62*, *ma5*, *purB58*) (Hadar *et al.*, 1976) nos foi gentilmente cedida pelo “*E. coli* Genetic Stock Center” (<http://cgsc.biology.yale.edu>). Esta linhagem é deficiente do gene *adsl* e, portanto, incapaz de crescer em meio mínimo M9 (0,5g de NaCl; 6,73g Na₂HPO₄; 3g KH₂PO₄ e 1g NH₄Cl em 1 litro de água Milli-Q). Como vetor de clonagem, foi utilizado o plasmídeo pBluescript II SK⁺ (Stratagene, figura 4).

O produto da reação de amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% feito em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40mM e EDTA 1mM, pH 8,0) e a banda de interesse foi purificada do gel utilizando-se o “Perfectprep Gel Cleanup Kit” (Eppendorf), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante.

O fragmento purificado do gel referente ao tamanho esperado do gene *adsl-Lm* (1440 pares de bases) e o vetor pBluescript II SK⁺ foram submetidos à digestão com as endonucleases de restrição *Xba* I e *Hind* III, por 4 horas a 37°C (detalhes da reação estão sumarizados na tabela 2). O plasmídeo e o inserto foram purificados e então foi feita uma reação de ligação (tabela 3), que foi incubada a 4°C durante 16 horas.

Tabela 2: Reagentes usados nas reações de digestão com *Xba* I e *Hind* III

Mistura da reação de digestão	Volume (µl)
Vetor pSK ⁺	3,5 (300ng/µl)
Fragmento de <i>adsl-Lm</i>	20 (100ng/µl)
Enzima <i>Xba</i> I (10U/µl) Invitrogen	1,5
Enzima <i>Hind</i> III (10U/µl) Invitrogen	1,5
Tampão React 2 (10X) Invitrogen	3,0
H ₂ O q.s.p.	30,0

Tabela 3: Reagentes usados na reação de ligação do gene *adsl-Lm* no vetor pBluescript SK⁺ (Stratagene)

Mistura da reação de ligação	Volume (µl)
Fragmento de <i>adsl-Lm</i> digerido e purificado	2,0 (50ng/µl)
vetor pBluescript SK ⁺ (Stratagene) digerido e purificado	1,0 (75ng/µl)
Enzima T4 DNA ligase (5U/µl) (Invitrogen)	1,0
Tampão (5X) (Invitrogen)	2,0
H ₂ O q.s.p.	10,0

O volume total da mistura de ligação (10,0µl) foi utilizado para transformação, através de choque térmico, de células competentes *E. coli* DH5α (Sambrook & Russell, 2000).

Pré-inóculos das prováveis colônias recombinantes foram crescidos e preparações plasmidiais, por lise alcalina (Sambrook & Russell, 2000), dos clones recombinantes foram realizadas. A estratégia adotada para a verificação destes clones (pSK⁺/*adsl-Lm*) envolveu a amplificação por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do vetor (“polylinker”). Uma vez identificados os clones positivos, estes foram submetidos ao sequenciamento de DNA para checar se o gene foi clonado em fase (quadro de leitura correto) e depois utilizados para transformar, através de choque térmico, células competentes de *E. coli* JK268. Bactérias JK268 transformadas com a construção recombinante (pSK⁺ mais o gene *adsl* de *L. major*) foram plaqueadas em meio mínimo M9 (Sigma), contendo 1,5% agar, o antibiótico apropriado (ampicilina a 100µg/ml) e suplementado com 0,5% de glicose, 0,1% caseína ácida hidrolisada, 0,2µg/ml de tiamina e 50µg/ml de triptofano (Aimi *et al.*, 1990). Como controle, bactérias JK268 transformadas apenas com o vetor (pSK⁺ sem o inserto) foram plaqueadas em meio mínimo (M9) contendo as mesmas suplementações. As placas foram incubadas a 37°C.

OBS: Em todos os procedimentos de clonagem descritos neste capítulo, alíquotas de cultura das colônias que continham plasmídeos recombinantes (com insertos ligados) foram acrescidas de glicerol na proporção 1:1 (glicerol 65%, Tris-HCl 0,025M, pH 8,0 e MgSO₄ 0,1M) e mantidas a -80°C.

2.2 Transformação em células competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS e ensaios de expressão

Para os ensaios de expressão da enzima recombinante ADSL-Lm, células competentes de *E. coli* BL21(DE3)pLysS foram transformadas com o plasmídeo pCR T7/NT-TOPO recombinante positivo (que possuía o inserto ligado na orientação desejada). As transformações foram feitas de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante (Invitrogen). Cerca de 100µl e 200 µl de cada cultura foram espalhados em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido e os antibióticos de seleção adequados para os vetores (ampicilina a 100µg/ml e cloranfenicol a 34µg/ml para o vetor pLysS). As placas de Petri foram incubadas a 37°C por 16 horas para o crescimento das colônias transformadas. Para os testes de expressão foram feitos pré-inóculos de colônias recombinantes positivas e negativas em tubos contendo 5,0ml de meio (LB líquido + ampicilina 100µg/ml + cloranfenicol 34µg/ml). Estes tubos foram incubados a 37°C, sob 250rpm de agitação por cerca de 16 horas. Após o crescimento das células, alíquotas destas culturas foram acrescidas de glicerol na proporção 1:1 (glicerol 65%, Tris-HCl 0,025M, pH 8,0 e MgSO₄ 0,1M) e guardadas à -80°C. Do restante, 500µl foram utilizados para inocular 10ml de LB contendo os antibióticos apropriados, o que foi mantido sob 250rpm de agitação a 37°C até as culturas atingirem uma D.O._{600nm} de aproximadamente 0,6. Retirou-se uma alíquota referente ao controle não induzido, que foi congelada a -20°C. Ao restante, adicionou-se o indutor IPTG numa concentração final de 1mM. Após 5 horas de indução, retirou-se uma alíquota de 1ml. As alíquotas foram centrifugadas por 2 minutos a 15700g e os sobrenadantes foram descartados. O precipitado do controle não induzido foi ressuspendido em 100µl de

tampão de lise (fosfato de potássio 50mM pH 7,8; NaCl 400mM; KCl 100mM; 10% glicerol e 10mM imidazol) e os precipitados resultantes das induções foram ressuspensos em 500µl deste mesmo tampão de lise. A lise das células foi realizada através de 6 a 8 repetições de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em um banho a 42°C. As células, após lise, foram centrifugadas por 5 minutos a 13.000rpm, a fim de separar a fração solúvel (sobrenadante) da insolúvel ("pellet"). Às alíquotas acrescentou-se tampão de amostra (Tris/HCl 2M, pH 6,8; SDS 6%; glicerol 30%; β-mercaptoetanol 15% e azul de bromofenol 0,01%), na proporção 2:1. Estas amostras foram fervidas por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10 ou 15%, em condições desnaturantes, pelo método de Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando um sistema vertical Mini V 8.10 da Gibco-BRL. Para padrão de peso molecular, as seguintes proteínas foram utilizadas: albumina sérica bovina (66kDa), ovalbumina (45kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1kDa) e citocromo c (12,4kDa). Os géis foram corados com "Coomassie blue" e descorados com ácido acético 10%.

De acordo com os resultados obtidos dos ensaios de expressão e com o intuito de otimizar a expressão da proteína ADSL-Lm, na fração solúvel, foram realizados experimentos variando-se a temperatura de indução (25°C e 37°C), bem como a concentração final do indutor IPTG (0; 10µM; 100µM; 500µM e 1mM).

2.3 Expressão da enzima ADSL-Lm

Tomando-se por base os resultados dos testes de expressão, cujas variáveis foram temperatura de indução e concentração de IPTG, foi possível estabelecer a melhor

condição de expressão da enzima ADSL-Lm e partir para a expressão em larga escala. Células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS (contendo o plasmídeo recombinante pCRT7/TOPO-NT + gene *adsl-Lm*), estocadas a -80°C, foram utilizadas para inocular meio LB líquido contendo ampicilina (100µg/ml) e cloranfenicol (34µg/ml). Estas culturas foram incubadas a 37°C, sob 250rpm de agitação por 16 horas. Após crescimento bacteriano, foram feitas diluições de 1:100 do pré-inóculo em 2 erlenmeyers de 2 litros, cada um deles com 500ml de meio 2XYT (1,6% de bactotripton, 1% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,5), contendo os antibióticos apropriados e 0,2% de glicose, que foram mantidos sob 250rpm de agitação a 37°C até as culturas atingirem uma D.O._{600nm} de aproximadamente 0,6. Neste instante, a temperatura foi reduzida a 25°C e a expressão da proteína recombinante foi induzida com IPTG à concentração de 100µM. Após 5 horas de indução, as células foram centrifugadas a 5.000g, por 15 minutos, a 4°C. Cada um dos precipitados ("pellets") foi ressuspensionado em 10ml (20ml por litro de cultura) de tampão de lise. O volume foi transferido para tubos do tipo "falcon" e congelado a -80°C. A lise celular foi realizada através de 6 a 8 repetições de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em um banho a 42°C. Durante este processo, aproximadamente 150U de DNase (Invitrogen) foram adicionadas ao extrato que estava sendo lisado. A amostra lisada foi centrifugada a 20.000g por 30 minutos, a 4°C, separando a fração solúvel (sobrenadante) da insolúvel ("pellet"). Aliquotas destas frações foram analisadas em gel de poliacrilamida de 10 ou 15% (SDS-PAGE) (como descrito no item anterior) e o volume do sobrenadante foi utilizado para purificação da enzima recombinante.

2.4 Purificação da enzima ADSL-Lm

A proteína de interesse, ADSL-Lm, é expressa no vetor pCR-TOPO/T7-NT com uma cauda N-terminal portadora de 6 histidinas. Assim, o primeiro passo de purificação empregado foi a cromatografia por afinidade, utilizando-se a resina “Ni-NTA Superflow” (Qiagen). Para tanto, a fração solúvel (sobrenadante) obtida no passo anterior, aproximadamente 20ml, foi aplicado à coluna de afinidade (5ml de resina), previamente equilibrada com 4 volumes de coluna (vc) do tampão de lise. Em seguida, a coluna foi lavada com 4vc de tampão de lavagem (fosfato de potássio 50mM, pH 7,8; NaCl 400mM; KCl 100mM; 10% de glicerol e imidazol 25mM) para retirada das proteínas que se ligaram fracamente à resina. A proteína recombinante ADSL-Lm foi eluída da coluna com a aplicação de 2vc (10ml) do tampão de eluição (fosfato de potássio 50mM, pH 7,8; NaCl 400mM; KCl 100mM; 10% de glicerol e **imidazol 500mM**). As frações foram analisadas em gel de poliacrilamida de 10 ou 15% (SDS-PAGE), como descrito anteriormente.

Como segundo passo de purificação, empregamos a cromatografia por exclusão molecular, utilizando-se a coluna HiPrep 16/60XK Superdex 200 (Amersham Biosciences), cuja faixa de resolução é de 10 a 600 kDa (informações obtidas no manual do usuário). O volume proveniente da eluição da proteína recombinante da coluna de afinidade (10ml) foi dialisado a 4°C, utilizando-se “Spectra/Por Molecularporous Dialysis Membrane” (Spectrum), cujo limite de exclusão molecular varia de 12 a 16kDa, contra quatro trocas de 500ml cada do tampão A (fosfato de potássio 50mM, pH 7,8 e NaCl 200mM). A amostra dialisada foi concentrada por ultrafiltração até um volume de 2ml (contendo 3,0mg/ml de ADSL-Lm), que foi centrifugado a 15.700g por 10 minutos

e então aplicado na coluna Superdex 200 previamente equilibrada com tampão A. Realizou-se uma eluição com 1,5 volumes de coluna (180ml) e com uma taxa de fluxo de 0,5ml/minuto, a qual foi monitorada à 280nm. As frações eluídas, que apresentaram picos de absorbância à 280nm, foram analisadas em gel de poliacrilamida 10 ou 15% (SDS-PAGE).

2.5 Caracterização bioquímica e estrutural da enzima recombinante ADSL-Lm.

2.5.1 Determinação do peso molecular da ADSL-Lm por cromatografia de exclusão molecular

Além da cromatografia de gel filtração, em Superdex 200, ter sido utilizada como uma segunda etapa na purificação da enzima ADSL-Lm, também foi empregada para determinar o peso molecular aparente desta enzima.

Esta mesma coluna foi calibrada com os “kits” de calibração de coluna de gel filtração para baixo, médio e alto peso molecular (Amersham Biosciences). As proteínas utilizadas, suas concentrações e seus pesos moleculares estão especificados na tabela 4. Foram realizadas três corridas, monitorando-se a absorbância a 280nm e obedecendo as mesmas condições descritas acima (item 2.3): a primeira com Blue Dextran 2000 (1mg/ml) para determinação do “void” da coluna, pois esta molécula é grande e está fora da faixa de resolução da resina; a segunda contendo a mistura de Tireoglobulina e Catalase e a terceira contendo um conjunto de proteínas de baixo, médio e alto peso (Ferritina, Aldolase, Ovalbumina e Ribonuclease A). Esta estratégia foi adotada a fim de evitar possíveis sobreposições de picos referentes às proteínas com pesos moleculares aproximados.

A curva de calibração define a relação entre o volume de eluição das proteínas padrões e o logaritmo de seus respectivos pesos moleculares. Um dos parâmetros utilizados para a construção da curva é o K_{av} , dado pela equação abaixo:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

onde, V_e = Volume de eluição da proteína

V_o = “Void” da coluna (corresponde ao volume de eluição do Blue Dextran 2000)

V_c = Volume da coluna (no caso da coluna usada, V_c equivale 120ml)

Assim, o valor obtido referente ao K_{av} de cada proteína utilizada na calibração foi plotado *versus* o log de seu peso molecular. Construiu-se a curva, da qual foi possível obter uma equação de reta. Esta equação foi empregada para o cálculo do peso molecular aparente da proteína em estudo. Foram aplicados 2,0ml na coluna tanto das proteínas padrões (nas concentrações especificadas na tabela abaixo), quanto da ADSL-Lm à 3,0mg/ml.

Tabela 4: Proteínas utilizadas para calibração da coluna HiPrep 16/60XK Superdex 200 (Amersham Biosciences)

Proteínas	MW (kDa)	Concentração
Tireoglobulina	669	2mg/ml
Ferritina	440	0,5mg/ml
Catalase	232	5mg/ml
Aldolase	158	2mg/ml
Ovalbumina	45	7mg/ml
Ribonuclease A	13	10mg/ml

MW = “Molecular Weight” (peso molecular)

2.5.2 Estudo do estado de oligomerização da ADSL-Lm através de “Dynamic Light Scattering”(DLS)

Além da gel filtração, medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), de amostras de ADSL-Lm pura, foram empregadas para a determinação da forma oligomérica desta enzima, bem como de seu peso molecular. Frações provenientes da cromatografia por exclusão molecular (2,5ml) (item 2.3), contendo ADSL-Lm pura, foram agrupadas e dialisadas, a 4°C, utilizando-se “Spectra/Por Molecularporous Dialysis Membrane” (Spectrum – 12 a 16kDa), contra quatro trocas de 250ml do tampão B (fosfato de potássio 5mM, pH 7,8; NaCl 5mM e AMP 100µM). Aliquotas de 30µl desta amostra, cuja concentração mínima era de 1mg/ml, foram centrifugadas a 15.700g, a 4°C por 10 minutos e então submetidas ao ensaio de DLS, utilizando-se o equipamento “DynaPro MS200” (Protein Solutions). Os dados foram analisados pelo programa “Dynamics V5.26” (Protein Solutions). As medidas foram realizadas a 18°C com tempo de aquisição de 2.5 segundos, 30 aquisições por medida, utilizando-se cubetas de quartzo de 12µl. As características do solvente foram consideradas no cálculo do *Rh*. Foram feitas 3 medidas sequenciais para cada amostra, que foram promediadas para os valores de raio hidrodinâmico. Estes ensaios também serviram para acompanharmos o estado de agregação da amostra protéica antes de realizarmos os ensaios de cristalização da ADSL-Lm.

2.5.3. Estudo do estado de oligomerização da ADSL-Lm através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes)

Para a realização deste estudo empregou-se o equipamento “PhastSystem” e géis prontos “PhastGel gradient media” 10-15% (Amersham Biosciences). O sistema de tampão no gel é de 0,112M de acetato e 0,112M de Tris, pH 6,4. São também fornecidas tiras de tampão geleificado em agarose contendo 0,88M de L-alanina e 0,25M Tris, pH 8,8.

Aplicou-se no gel 4,0µl de ADSL-Lm pura em duas concentrações diferentes de proteína (1,86mg/ml e 3,0mg/ml). A corrida foi efetuada sob condições padrões do equipamento (descritas no manual) e o gel foi corado com 0,1% de “Comassie Blue R”, em solução aquosa de metanol 25% e ácido acético 5%.

2.5.5 Ensaio de clivagem da cauda de histidina com a enzima Enteroquinase

O sistema utilizado para expressão da ADSL-Lm recombinante fornece o sítio de clivagem reconhecido pela enzima EnteroquinaseMax-EKMax (Invitrogen). Assim, a cauda de histidinas fusionada no N-terminal da proteína recombinante pode ser liberada através da digestão proteolítica com EKMax.

De posse da enzima ADSL-Lm pura, em tampão B, alguns ensaios de clivagem com EKMax foram realizados (de acordo com as instruções da Invitrogen), para se determinar experimentalmente a melhor condição de digestão da cauda de histidina da proteína recombinante. Para cada reação utilizou-se 20µg de proteína, tampão EKMax (concentração final 1X) e diferentes quantidades, expressas em unidades (U), da enzima EKMax: 0U (controle), 0,1U; 1,0U e 4,0U. O volume final das reações foi de 30µl e

foram testadas duas temperaturas: 18 e 25°C. Três alíquotas, de 10µl cada uma, foram retiradas, para posterior análise em gel de poliacrilamida 15%: t_1 = após 16 horas de incubação, t_2 = após 24 horas de incubação e t_3 = após 32 horas de incubação. As reações foram interrompidas adicionando-se 5,0µl de tampão de amostra e fervendo-se por 5 minutos. Aplicou-se no gel, o equivalente à 2,0µg de proteína para obtenção de uma boa separação entre as bandas de proteína recombinante (que não sofreu clivagem) e de proteína clivada (sem a cauda de histidina).

2.5.6 Sequenciamento de N-terminal

Uma vez definida a melhor condição para clivagem com a enzima EKMax, decidiu-se montar uma reação com o dobro dos reagentes utilizados para os ensaios, com o objetivo de identificar as bandas resultantes da clivagem, através do sequenciamento de N-terminal. Para tanto, uma reação contendo 40µg de ADSL recombinante para 8U de EKMax, num volume final de 60µl foi incubada a 18°C por 24 horas. Cerca de 50µl de amostra foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) e eletrotransferida para uma membrana de PVDF ("Polyvinylidene Fluoride"- Bio-Rad), utilizando um tampão específico para transferência (Tris-base 48mM, CAPS 39mM, SDS 0,035% (m/v), 800ml H₂O e 200ml metanol), por um período de 5 horas a 150V (Matsudaira, 1987). A membrana foi corada com Ponceau 0,5% em ácido acético 0,1% por 5 minutos e descorada com ácido acético 0,1%. As bandas de proteína imobilizadas foram recortadas da membrana e enviadas para análise da sequência de aminoácidos NH₂-Terminal, utilizando o método de degradação de Edman e o equipamento "Procise Model 491" (PE Applied Biosystems). O

seqüenciamento do N-terminal foi realizado pelo grupo do Prof. Dr. Lewis Joel Greene (Centro de Química de Proteínas da Escola de Medicina de Ribeirão Preto/USP).

2.5.7 Determinação do ponto isoelétrico (pI)

Para a realização deste experimento, com a ADSL-Lm pura, utilizou-se o equipamento de focalização isoelétrica “PhastSystem” (Pharmacia Biotech). O gel empregado foi o “Phast Gel IEF 3-9” (Amersham Biosciences) que permite a determinação de pIs situados na faixa entre pHs 3,0 a 9,0. Aplicou-se no gel 4,0µl de ADSL-Lm a 3,0mg/ml em tampão B. A corrida foi efetuada sob condições padrões do equipamento (descritas no manual) e o gel foi corado com 0,1% de “Comassie Blue” G-50, em solução aquosa de metanol 25% e ácido acético 5%. A distância percorrida, no gel, por cada uma das proteínas foi medida, a partir da extremidade do gel (cátodo), com o auxílio de um paquímetro. Os valores obtidos referentes às distâncias percorridas foram plotados *versus* o log do pH (ou pI) das proteínas padrões (tabela 5). Construiu-se um gráfico, do qual foi possível a obtenção de uma equação de reta. Esta equação foi empregada para o cálculo do pI da ADSL-Lm.

Tabela 5: “Kit” de proteínas padrão (Amersham Biosciences) utilizado para determinação de pI (ponto isoeletrico).

Proteínas	pI
Amilglucosidase	3.5
Corante “Methyl Red”	3.75
Inibidor de tripsina	4.55
β-Lactaglobulina A	5.2
Anidrase Carbônica B (bovina)	5.85
Anidrase Carbônica B (humana)	6.55
Mioglobulina banda ácida	6.85
Mioglobulina banda básica	7.35
Lentil Lectina ácida	8.15
Lentil Lectina	8.45
Lentil Lectina básica	8.65
Triptonogênio	9.30

2.5.8 Ensaios de atividade enzimática da ADSL-Lm para os substratos adenilosuccinato (ADS) e SAICAR

Para os ensaios de atividade enzimática da enzima ADSL-Lm, foi utilizada enzima pura, obtida do segundo passo de purificação (gel filtração em Superdex 200, descrito no item 2.3) e, portanto, eluída em tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,8 e NaCl 200mM.

As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-1650 PC (Schimadzu), a 25°C, monitorando-se o decréscimo na absorbância a 282nm por 1 minuto. A diferença no coeficiente de extinção entre adenilosuccinato (ADS - substrato) e AMP (produto) é 10000M⁻¹ cm⁻¹ (Lee *et al.*, 1997).

Com o intuito de trabalharmos sempre nas condições ótimas da enzima, ou seja, onde ela deveria apresentar maior atividade, buscamos identificar a melhor condição de reação antes de iniciarmos os testes para determinação dos parâmetros cinéticos (K_m , V_{max} e k_{cat}). Desta forma, algumas medidas foram realizadas variando-se:

i) Concentração da enzima ADSL-Lm

Partindo-se da mesma condição descrita por Lee *et al.* (1997), ao medirem a atividade enzimática da ADSL de *Bacillus subtilis* (tampão HEPES 50mM, pH 7,0 e 60 μ M de adenilosuccinato), 3,0 μ l da enzima ADSL- Lm foram utilizados em diferentes concentrações (0,5mg/ml; 0,25mg/ml; 0,125mg/ml e 0,06mg/ml).

ii) pH do tampão

Mantendo a concentração de enzima constante, foram testados tampões Tris/HCl 50mM, contendo 60 μ M de adenilosuccinato, em diferentes pHs (6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0).

iii) Temperatura

Fixando-se a concentração final da enzima em 1,6nM e o tampão de reação (Tris/HCl 50mM, pH 8,5), foram feitas medidas em distintas temperaturas (20°C; 25°C, 30°C e 37°C). No entanto, para este ensaio, primeiramente testamos a estabilidade da enzima nas temperaturas de 4°C; 10°C; 20°C; 25°C, 30°C e 37°C. Isto foi feito, com o auxílio de um termociclador, incubando-se a proteína por 2 minutos em cada uma das temperaturas e medindo-se sua atividade após este tempo.

Uma vez determinada a melhor condição de reação, ensaios variando-se a concentração do substrato ADS (1 μ M; 2 μ M; 4 μ M; 6 μ M; 8 μ M; 10 μ M; 15 μ M; 20 μ M; 30 μ M; 40 μ M; 50 μ M; 60 μ M; 80 μ M e 100 μ M) foram realizados, a fim de se calcular os parâmetros cinéticos da ADSL-Lm. O substrato foi diluído para atingir as diferentes concentrações no mesmo tampão das reações.

Foram realizadas pelo menos 3 medidas para determinação da velocidade em cada uma das concentrações do substrato estudada. O coeficiente angular das curvas foi

determinado por regressão linear e a média desses valores foi utilizada para construção dos gráficos de Michaelis-Menten ($V \times [S]$), que resulta numa curva do tipo hipérbole, e do duplo-recíproco ($1/V \times 1/[S]$), que resulta numa reta. O cálculo dos valores de K_m e V_{max} , partindo-se do gráfico de Michaelis-Menten, foram realizados através de regressão não linear utilizando o programa SigmaPlot (Charland, 1995). Do gráfico duplo-recíproco obtivemos a equação da reta que nos permitiu calcular tais valores.

Para os testes de atividade enzimática da ADSL-Lm com o composto SAICAR (que é substrato desta enzima na via de síntese *de novo*), foi utilizada enzima pura obtida do segundo passo de purificação (gel filtração em Superdex 200) e, portanto, eluída em tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,8 e NaCl 200mM.

As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-1650 PC (Schimadzu), a 25°C, monitorando-se o decréscimo na absorbância a 265nm por 1 minuto.

Com o objetivo de trabalharmos nas mesmas condições ótimas já estabelecidas para o substrato adenilosuccinato, a fim de comparações, o tampão da medida consistiu de 70μM de SAICAR em 50mM de Tris-HCl, pH=8,5. Três microlitros da enzima a 0,06mg/ml foram utilizados. Cabe ressaltar que foi feito um teste de atividade com o substrato adenilosuccinato, empregando-se a mesma amostra de ADSL-Lm utilizada para os ensaios com SAICAR, a fim de checar se a enzima estava ativa.

2.5.9 Cristalização da ADSL-Lm com cauda de histidina

Os primeiros ensaios de cristalização foram realizados com a ADSL-Lm contendo a cauda de histidina. Partindo-se de novas preparações, as frações provenientes

de cromatografia por gel filtração (~2,5ml) contendo enzima pura foram agrupadas e dialisadas contra quatro trocas de 250ml do tampão fosfato de potássio 5mM, pH 7,8 e NaCl 5mM. A amostra dialisada foi então concentrada até 10mg/ml. Com o intuito de buscar uma condição promissora para cristalização da ADSL-Lm recombinante, foi feita uma varredura com vários tampões, contendo diferentes agentes precipitantes dos Fatoriais “Crystal Screen Reagent Formulation I”, “Crystal Screen Reagent Formulation II”, “Grid Screen Ammonium Sulphate”, “Grid Screen PEG/6k”, “Grid Screen NaCl” e “Quik Screen” (Hampton Research). Além disto, também utilizamos as mesmas condições de cristalização já descritas para ADSLs de outros organismos (Redinbo *et al.*, 1996; Toth & Yeates, 2000; Toth *et al.*, 2000): *i*) 0,1M Ácido Cítrico pH 5,0 e 15% de PEG 4000; *ii*) 0,1M Acetato de Sódio pH 4,5 e (0,2%, 0,3% e 0,4%) de PEG 4000; *iii*) 1,5M Sulfato de Amônio e 0,1M de MES pH 5,8; *iv*) 0,1M Bicina pH 9,0, 5mM de AMP e 1,8M Sulfato de Amônio.

À cada poço de cristalização foram adicionados 500µl de solução precipitante. Em uma laminula siliconizada fez-se uma gota contendo 3µl de solução precipitante (solução do poço) mais 3µl da solução de proteína, sendo esta laminula vedada na borda do poço usando graxa de vácuo. Os primeiros ensaios de cristalização foram realizados a temperatura de 18°C.

Com base nos resultados desta primeira varredura, que resultou num total de 200 condições testadas, enfocamos os novos ensaios no refinamento de 4 condições (tabelas 6, 7, 8 e 9):

Tabela 6: Refinamento da condição fosfato de Na/K 1,4M, pH 6,3

pH/[M]Na/k	5,8	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8
[1,0M]						
[1,2M]						
[1,4M]						
[1,6M]						

Tabela 7: Refinamento da condição sulfato de amônio 1,6M, Tris 0,1M, pH 8,0

[M]SA/pH	[1,2M]	[1,4M]	[1,6M]	[1,8M]	[2,0M]	[2,2M]
7,0						
7,5						
8,0						
8,5						

Tabela 8: Refinamento da condição sulfato de amônio 1,6M, dioxano 10% (v/v), Mes 0,1M, pH 6,5

%diox/pH	6%	8%	10%	12%	14%	16%
5,5						
6,0						
6,5						
6,7						

Tabela 9: Refinamento da condição 0,1M Ácido Cítrico pH 5,0 e 15% de PEG 4000

pH/%PEG	12%	13%	14%	15%	16%	17%
4,5						
5,0						
5,5						
6,0						

Estes refinamentos (96 condições) foram realizados a 18°C e com gotas suspensas de 6,0µl (3,0µl de proteína + 3,0µl da solução do poço).

Na tentativa de obtenção de cristais da proteína melhor formados e que conseqüentemente difratassem à mais alta resolução, estas mesmas 96 condições de refinamento foram repetidas, mas desta vez concentrando-se a proteína na presença de AMP 100µM, que é um produto da reação catalisada pela enzima ADSL. Ainda com o

objetivo de obtermos melhores cristais foram também montadas 48 gotas, a 18°C, utilizando o “Screen Aditive 2” (Hampton Research): 24 gotas com a solução da condição nº 23 do “Crystal Screen II” e 24 gotas com a condição C3 do “Quik Screen”. Neste caso, utilizou-se a proteína recombinante à 10mg/ml em tampão fosfato de potássio 5mM, pH 7,8; NaCl 5mM e AMP 100µM, e foram feitas gotas sentadas de 10,0µl, seguindo instruções do fabricante:

- para aditivos não voláteis: no poço foi colocado 1ml da solução de uma das condições citadas acima e a gota sentada foi feita com 5µl da solução do poço: 4µl da proteína: 1µl do aditivo

- para aditivos voláteis: no poço foi colocado 900µl da solução de uma das condições citadas acima, juntamente com 100µl do aditivo e a gota sentada foi feita com 5µl da solução do poço: 5µl da proteína

Nesta etapa do projeto, iniciamos novos ensaios utilizando ADSL-Lm pura a 10mg/ml em tampão 5mM fosfato de potássio, pH 7,8, 5mM NaCl e 100µM de adenilosuccinato (ADS, substrato da reação catalisada pela enzima na via de recuperação).

Primeiramente, realizamos um teste sugerido pelo Dr. Alexander Golubev (Petersburg Nuclear Physics Institute, Rússia) para identificação da concentração de PEG que leva a precipitação da proteína e com isto rastrear condições de cristalização, utilizando concentrações de PEG abaixo da determinada. A idéia é diminuir o número de parâmetros em teste durante o ensaio de cristalização, o que pode facilitar na escolha do caminho a seguir. Este teste de precipitação consiste em misturar o PEG à proteína para

determinadas concentrações finais e verificar, após 30 minutos, a presença de precipitado na solução sob a luz de um microscópio.

Gotas de volumes de 6-10µl contendo diferentes proporções de proteína : 40% PEG 8000 (5:1, 5:2, 5:3, 5:4, 5:5) foram dispostas em lamínulas e as mesmas foram vedadas sobre poços da placa de cristalização, a fim de evitar evaporação durante o tempo de espera. Uma vez detectada a concentração final de PEG que gerou precipitado, foi feita uma placa com gotas de 6µl (3:3) a 18°C, mantendo-se fixa a concentração de PEG que não gerou precipitado “imediato” e variando-se, nas gotas, a força iônica do tampão e o pH da solução (tabela 10):

Tabela 10: Condição 8% PEG 8000 e variação da força iônica do tampão (horizontal) e do pH (vertical).

pH/[M] tampão	[0,2M]	[0,25M]	[0,3M]	[0,35M]	[0,4M]	[0,45M]
6,5						
7,0						
7,5						
8,0						

Com base nos resultados obtidos, optamos por investir em apenas uma condição (1,6M de sulfato de amônio, MES 0,1M, pH 6,5 e 10% dioxano), na qual cresciam cristais que difratavam até aproximadamente 3Å.

Na tentativa de se diminuir a taxa da velocidade de difusão de vapor (entre a gota e a solução do poço), reduzir a nucleação e, conseqüentemente, levar à formação de um cristal maior, o uso de óleos para cobrir a superfície da solução do poço e técnicas de “microseeding” e “macroseeding” foram empregadas.

Foram feitas gotas sentadas de 10,0µl em torno da condição 1,6M de sulfato de amônio, MES 0,1M, pH 6,5 e 10% dioxano: 800µl da solução de cristalização foram colocados no poço e após a retirada de 5µl desta solução que foram misturados com 5µl da proteína (10mg/ml em tampão fosfato de potássio 5mM, pH 7,8; NaCl 5mM e ADS 100µM), 200µl do óleo foram pipetados acima da superfície da solução do poço. Foram montadas 3 placas (tabela 11), a 18°C, cada uma, com um tipo de óleo diferente: parafina, silicone ou “Al’s” (Hampton Research). Este último é uma mistura 1:1 de parafina com silicone.

Tabela 11: Refinamento da condição sulfato de amônio 1,6M, dioxano 10% (v/v), Mes 0,1M, pH 6,5 para os testes com os 3 tipos diferentes de óleos

SA/%diox	[1,2M]	[1,3M]	[1,4M]	[1,5M]	[1,6M]	[1,7M]
8%						
9%						
10%						
11%						

Para os experimentos de semeadura, ADSL-Lm pura a 2,5mg/ml, 5mg/ml e 10mg/ml (tampão fosfato de potássio 5mM, pH 7,8; NaCl 5mM e ADS 100µM), foi utilizada na montagem das gotas que ficaram equilibrando por 16 horas, a 18°C, antes que as sementes fossem introduzidas.

Para “macroseeding”, foram feitas 6 gotas sentadas de 10,0µl (5µl de proteína : 5µl de solução 1,6M de sulfato de amônio, MES 0,1M, pH 6,5 e 10% dioxano). Em cada gota foi introduzido um cristal (previamente lavado) que havia crescido na mesma solução de cristalização, partindo-se de 10mg/ml de proteína.

Para “microseeding” utilizou-se o sistema “Seed Bead” (Hampton Research), conforme instruções do fabricante descritas abaixo :

i) 50µl da solução estabilizadora (no caso, a mesma condição de cristalização, porém sem proteína), foram pipetados em um tubo tipo “eppendorf” de 1,5ml, contendo o “seed bead”

ii) um cristal foi removido da gota original (solução 1,6M de sulfato de amônio, MES 0,1M, pH 6,5 e 10% dioxano com 10mg/ml de proteína) e colocado no tubo

iii) este tubo foi então vortexado por 90 segundos para trituração do cristal

iv) 450µl da solução estabilizadora foram pipetados no tubo contendo as sementes (diluição 1). Partindo-se desta solução, foram feitas mais 2 diluições consecutivas, utilizando-se a solução estabilizadora, nas proporções de 1:5 (diluição 2) e 1:10 (diluição 3).

Para estes ensaios foram feitas 6 gotas sentadas de 10,0µl (5µl de proteína : 5µl de solução 1,6M, MES 0,1M, pH 6,5 e 10% dioxano). Na primeira gota foi adicionado 0,2µl da solução diluição 1 (proteína a 2,5mg/ml), na segunda, 0,2µl da diluição 1 (proteína a 10mg/ml), na terceira da diluição 3 (proteína a 2,5mg/ml), na quarta da diluição 3 (proteína a 10mg/ml), na quinta da diluição 2 (proteína a 2,5mg/ml) e na última da diluição 2 (proteína a 10mg/ml).

Além destas estratégias, também foi realizado um refinamento mais acurado da condição 1,6M de sulfato de amônio, MES 0,1M, pH 6,5 e 10% dioxano (tabela 12), utilizando-se ADSL-Lm à 10mg/ml em tampão fosfato de potássio 5mM, pH 7,8; NaCl 5mM e ADS 100µM. Para tanto, duas placas com gotas suspensas de 6µl (3:3) foram feitas, uma foi colocada a 4°C e a outra a 18°C.

Tabela 12: Refinamento da condição sulfato de amônio 1,6M, dioxano 10% (v/v), Mes 0,1M, pH 6,5 para os ensaios a 4°C e 18°C.

SA/%diox	[1,35M]	[1,4M]	[1,45M]	[1,5M]	[1,55M]	[1,6M]
8%						
9%						
10%						
11%						

2.5.10 Cristalização da ADSL-Lm sem cauda de histidina

Embora a cauda de histidina não tenha dificultado a cristalização da enzima ADSL-Lm, os cristais não difrataram à alta resolução. Portanto, experimentos de clivagem da cauda de histidina com EKMax em grande escala, para posterior cristalização, foram também realizados.

Com base nos resultados dos ensaios de clivagem (item 2.4.5), foi feita uma reação contendo 8,0mg de proteína recombinante (em tampão B), 1.800U de EKMax, 1,8ml de tampão EKMax 10X e 8,35ml de H₂O milliQ. Esta reação foi mantida a 18°C por 24 horas.

Para purificação da ADSL clivada, foram acrescentados, ao tubo contendo o volume de reação, 6ml de resina “Ni-NTA Superflow” (Qiagen) já equilibrados em tampão B. O conteúdo foi homogeneizado lentamente, invertendo-se o tubo, a temperatura ambiente por 25 minutos. Em seguida, este volume foi colocado em uma coluna vertical de plástico de 20ml e aguardou-se até o empacotamento da resina. Coletou-se o “void”, no qual há proteína sem cauda de histidina e que portanto, não se ligou à resina. O volume total do “void” foi então dialisado, a 4°C, utilizando-se “Spectra/Por Molecularporous Dialysis Membrane” (Spectrum – 12 a 16kDa), contra

quatro trocas de 500ml do tampão B (fosfato de potássio 5mM, pH 7,8; NaCl 5mM e AMP 100 μ M), para retirada dos reagentes contidos no tampão EKMax. A amostra dialisada foi concentrada por ultracentrifugação até 7,0mg/ml. O volume final obtido foi suficiente para montarmos 101 gotas suspensas de 4,0 μ l cada uma (2,0 μ l de solução do poço + 2,0 μ l de proteína). Para os ensaios de cristalização foram empregados os Fatoriais “Crystal Screen Reagent Formulation I” e “Crystal Screen Reagent Formulation II” (Hampton Research) e 3 gotas foram montadas das 3 condições que foram refinadas por apresentarem cristais da ADSL-Lm com cauda de histidina. À cada poço de cristalização foram adicionados 500 μ l de solução precipitante e os ensaios foram realizados a temperatura de 18°C.

Levando-se em consideração os resultados desta primeira varredura, 24 gotas foram montadas com ADSL-Lm sem cauda, para refinar a condição nº 23 do “Crystal Screen II”- sulfato de amônio 1,6M, dioxano 10% (v/v), Mes 0,1M, pH=6,5, como descrito na tabela 12.

Considerando-se a cristalização da ADSL-Lm tanto com cauda quanto sem cauda de histidina mais de 720 gotas foram montadas, como pode ser observado na tabela 13.

Tabela 13: Resumo do número de experimentos realizados para a cristalização da ADSL-Lm, totalizando 721 gotas.

Número de Condições	Experimento de cristalização
194	Primeira varredura com os Fatoriais da Hampton
6	Condições de cristalização já descritas para ADSLs de outros organismos
96	Refinamentos de condições promissoras
96	Refinamentos de condições promissoras + 100µM AMP (produto)
48	“Kit” de aditivo da Hampton
24	Teste com PEG
72	Uso de óleos
12	Semeadura (“macro e microseeding”)
24	Refinamento mais acurado da condição sulfato de amônio, dioxano e MES a 18°C
24	Refinamento mais acurado da condição sulfato de amônio, dioxano e MES a 4°C
125	Cristalização da ADSL-Lm sem cauda de histidina

OBS: Para cada tentativa de obtenção de melhores cristais variando as condições de cristalização (tanto da ADSL-Lm com cauda, quanto sem cauda), foram realizadas novas preparações, com o intuito de utilizarmos sempre proteína pura e fresca, uma vez que a ADSL-Lm perde sua atividade se congelada a -20° ou -80°C (dados não mostrados).

Em todos os passos nos quais houve necessidade de se determinar a concentração protéica, foi empregado o método de “Bradford” (Bradford, 1976), usando uma curva padrão da proteína albumina bovina com concentrações conhecidas.

Os cristais foram montados em “loops” e mantidos constantemente em fluxo de nitrogênio gasoso, que foi soprado sobre o cristal com uma temperatura controlada de 100K. Para impedir a formação de gelo durante o resfriamento do cristal, a solução de crescimento do cristal foi substituída por solução crio protetora constituída pela mesma

solução mãe, mas acrescida de 20% de etilenoglicol. Condições com 10%, 15% e 20% de glicerol e etilenoglicol foram testadas.

2.5.11 Coleta e processamento de dados de difração de raios-X

As etapas de processamento dos dados e as que seguem até a resolução da estrutura cristalográfica da ADSL-Lm foram realizadas em colaboração com a Dra. Adriana Rojas e com o Dr. Ronaldo Nagem, que na época eram alunos do professor Dr. Igor Polikarpov, membro do nosso grupo.

Os cristais de ADSL-Lm foram congelados no nitrogênio líquido, com uma solução crioprotetora, contendo 20% de etilenoglicol e coletados a temperaturas criogênicas (100 K) em fluxo de nitrogênio. Foram preparados dois cristais derivados (um de cério e um de gadolínio), utilizando-se o método de *quick cryo-soaking* (Dauter *et al.*, 2000; Nagem *et al.*, 2001). Para o preparo do derivado de cério, os cristais foram mergulhados na solução crioprotetora contendo 0,5M de CsCl, por 4 minutos e para o preparo do derivado de gadolínio, os cristais foram mergulhados na solução crioprotetora contendo 0,125M de GdSO₄, por 10 minutos. As coletas de dados de difração de raios-X foram realizadas em três fontes de raios-X diferentes:

i) Um conjunto nativo foi coletado no Laboratório de Cristalografia de Proteínas do Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural - IFSC/USP (São Carlos), utilizando-se um gerador do tipo ânodo rotatório RIGAKU ultraX 18 e uma placa de imagem MAR345 dtb, a um comprimento de onda de 1,542Å (Cu-K_α);

ii) Três conjuntos (dois nativos e um derivado de gadolínio) foram coletados na linha de Cristalografia de Proteínas do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Polikarpov *et al.*, 1998), usando uma placa de imagem MAR345 dtb, a um comprimento de onda de 1,42Å.

iii) Um conjunto derivado de Césio foi coletado na linha 17 do APS (Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory USA), usando uma fonte de luz sincrotron e um detector do tipo Quantum 4, a um comprimento de onda de 1,77Å

Os conjuntos de dados foram obtidos através do método de rotação ($\Delta\phi = 1^\circ$). As imagens foram processadas com os programas MOSFLM/SCALA (Leslie, 1992; Evans, 1997), DENZO e SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997).

Uma vez definido o grupo pontual, a determinação do grupo espacial correto foi feita através da análise das extinções sistemáticas catalogadas na “International Tables for Crystallography” Vol. A (Kluwer Academic, 1996).

O número de moléculas presentes na unidade assimétrica foi estimado utilizando-se o programa Matthews_coeff (Collaborative Computational Project Number 4, 1994), que faz uso da metodologia proposta por Matthews (Matthews, 1968).

2.5.12 Obtenção das fases

Para o processo de substituição molecular, utilizamos três modelos de ADSLs, já resolvidas, que na época eram os únicos depositados no PDB (“Protein Data Bank”). ADSL de *Termotoga maritima* (código de acesso ao PDB 1c3c), ADSL de *Pyrobaculum aerophilum* (PDB 1dof) e *Bacillus subtilis* (PDB 1flo). Foram realizadas tentativas com monômeros, dímeros, neste caso com os dois tipos de dímeros (um formado pelos

monômeros A e B e o outro pelos monômeros A e C) e tetrâmeros das respectivas estruturas (ver figura 5), utilizando-se os programas AMoRe (Navaza, 1994), MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997) e BEAST (Read, 2001).

Figura 5. Modelos da ADSL usados na substituição molecular. Em a) monômero, em b) dímero composto pelas cadeias A e B, em c) dímero composto pelas cadeias A e C e em d) tetrâmero.

Figura 6. Domínio conservado da ADSL. Este “core” também foi empregado como modelo no processo de substituição molecular.

Embora a porcentagem de identidade sequencial entre a ADSL-Lm e as ADSLs citadas acima que se encontravam, na época, disponíveis no PDB seja menor que 40% (tabela 14), tem sido descrito um domínio bastante conservado (“core”) entre as estruturas das ADSLs (Toth & Yeates, 2000) e portanto, este domínio foi utilizado em novas tentativas de substituição molecular (figura 6). Além disto foi construída uma cadeia de polialaninas deste domínio, que foi também empregada como modelo.

Tabela 14: Porcentagem de identidade sequencial entre ADSL-Lm e as demais depositadas no PDB.

Alinhamento das seqüências de aminoácidos	Porcentagem de identidade sequencial
ADSL-Lm e ADSL-Tm (<i>Thermotoga maritima</i>)	27%
ADSL-Lm e ADSL-Pa (<i>Pyrobaculum aerophilum</i>)	26%
ADSL-Lm e ADSL-Bs (<i>Bacillus subtilis</i>)	26%

Para o processo de substituição isomorfa, com contribuição de sinal anômalo, foram utilizados os conjuntos derivados de cério e gadolínio e foram empregados os seguintes programas: *i)* SHELX (Schneider & Sheldrick, 2002), para encontrar as posições dos átomos pesados no cristal; *ii)* SHARP (La Fortelle & Bricogne, 1997) para determinar as fases; *iii)* DM e SOLOMON (Cowtan, 1994; Abrahams & Leslie, 1996) para melhorar a qualidade das fases; *iv)* RESOLVE (Terwilliger & Berendzen, 1999) e ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1999), para construir automaticamente o modelo da ADSL-Lm dentro do mapa de densidade. A visualização do mapa de densidade eletrônica e do modelo foi realizada com os programas gráficos “O” e COOT (Jones *et al.*, 1991; Emsley & Cowtan, 2004).

2.5.13 Construção e refinamento do modelo

Considerando-se que as fases foram obtidas para 2.8Å, uma vez que esta é a resolução do cristal derivado, os dados do cristal nativo coletado no IFSC foram usados para extensão do faseamento até 2.2Å, buscando melhorar a construção do modelo. Assim, através do uso de simetria cristalográfica e não cristalográfica foi possível montar vários modelos intermediários até a construção final do modelo.

Ciclos de refinamento com a programa REFMAC (Collaborative Computational Project Number 4) foram alternados com modificações manuais do modelo através da inspeção dos mapas de densidade eletrônica 2Fobs - Fcalc, α calc, e Fobs - Fcalc, α calc, usando os programas “O” e COOT. A verificação da qualidade da estereoquímica do modelo foi efetuada com o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Complementação funcional

Neste experimento o gene *adsl* de *L. major* foi introduzido na linhagem mutante de *E. coli* JK268, via plasmídeo recombinante pSK⁺/*adsl-Lm*. Para tanto, a fase aberta de leitura (ORF) do gene *adsl-Lm* (1440pb) foi amplificada através de PCR, como pode ser observado na figura 7.

Figura 7: Amplificação por PCR do gene *adsl-Lm* para experimentos de complementação funcional. Gel de agarose 1% TAE 1X mostrando um fragmento de aproximadamente 1440pb, referente à amplificação da fase aberta de leitura (ORF) do gene de interesse (coluna 2). Coluna 1: padrão de peso molecular em pares de base (pb).

O produto de PCR e o plasmídeo pBluescript II SK⁺ foram purificados do gel, submetidos à digestão com as mesmas enzimas de restrição (*Xba*I e *Hind*III) e então à reação de ligação. Células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas com o produto da reação de ligação (pSK⁺ + gene *adsl-Lm*). O sequenciamento de DNA dos

clones recombinantes positivos revelou que o gene estava em fase e livre de mutação (dados não mostrados); um dos clones foi escolhido para transformação de cepas JK268. A estratégia adotada para verificar se estas cepas continham o plasmídeo recombinante nos mostrou que as bactérias JK268 foram eficientemente transformadas e, portanto, passaram a ser portadoras do gene *adsl* de *L. major* (figura 8).

Figura 8: Bactérias JK268 contendo o plasmídeo recombinante (pSK⁺/*adsl*-Lm). Gel de agarose 1% TAE 1X. Coluna 1: padrão de peso molecular, em pares de bases. Colunas 2 a 8: produto de PCR indicando que estes clones contêm o inserto (seta *a*).

Bactérias JK268 transformadas com a construção recombinante (pSK/*adsl*-Lm) apresentaram um bom crescimento em meio mínimo M9 suplementado com 0,5% de glicose, 0,1% caseína ácida hidrolisada, 0,2µg/ml de tiamina e 50µg/ml de triptofano (figura 9). Estes resultados indicam que houve complementação funcional do gene *adsl*-Lm no genoma desta linhagem mutante de bactéria. Tais resultados são reforçados se comparados com a ausência de crescimento das bactérias JK268 transformadas apenas com o vetor (pSK⁺ sem o inserto) em meio mínimo (M9) contendo as mesmas suplementações (Figura 9).

Figure 9: Complementação funcional do gene *adsl-Lm* no genoma da bactéria mutante JK268. Crescimento da bactéria transformada com o plasmídeo recombinante ($pSK^{+}/adsl-Lm$) em meio mínimo M9 sólido (A) e líquido (B), contendo os antibióticos apropriados e suplementados com 0,5% de glicose, 0,1% caseína ácida hidrolisada, 0,2 μ g/ml de tiamina e 50 μ g/ml de triptofano após 24 horas de incubação a 37°C. Células JK268 transformadas apenas com o vetor (pSK^{+} sem o inserto) também foram inoculadas e não cresceram no mesmo meio. Estes resultados demonstram claramente que o gene *adsl-Lm* pode complementar efetivamente a mutação *purB58* das cepas de *E. coli* JK268.

Com o intuito de corroborar os resultados obtidos da complementação funcional e de verificar se a ADSL de *L. major* era capaz de converter o composto SAICAR (substrato da reação da enzima ADSL na via de síntese *de novo* de purinonucleotídeos), ensaios de atividade enzimática da ADSL-Lm também foram conduzidos, utilizando-se SAICAR (que nos foi gentilmente cedido pelo nosso colaborador). Estes resultados encontram-se apresentados e discutidos no item 3.3.5.

3.1 Expressão e purificação da enzima ADSL-Lm

Experimentos de otimização da expressão da proteína ADSL-Lm na fração solúvel envolveram variação na temperatura de indução (25°C e 37°C) e na concentração final do indutor IPTG (0; 10 μ M; 100 μ M; 500 μ M e 1mM). Os resultados revelaram que

embora a ADSL-Lm seja expressa na fração insolúvel, uma boa quantidade de ADSL-Lm presente no sobrenadante foi obtida após indução da expressão protéica com IPTG 100 μ M, por 5 horas, a 25°C. Uma vez determinada a melhor condição, partiu-se para a sua expressão em grande escala, utilizando-se um litro de meio de cultura. O sobrenadante do extrato bruto lisado foi submetido à técnica de IMAC, empregando-se a resina “Ni-NTA Superflow” (Qiagen). Este primeiro passo de purificação da ADSL-Lm mostrou-se bastante eficiente, pois grande quantidade de proteína recombinante pôde ser obtida, quando a coluna foi lavada com tampão de eluição (imidazol 500mM). Além disso, a amostra eluída apresenta um alto grau de pureza (figura 10). A quantidade total de proteína resultante desta etapa (ADSL-Lm + contaminantes), estimada por “Bradford”, foi de aproximadamente 45mg a partir de 1 litro de cultura.

A amostra eluída da coluna de afinidade foi dialisada contra tampão A (fosfato de potássio 50mM, pH 7,8 e NaCl 200mM), concentrada e submetida a um segundo passo de purificação, utilizando-se a coluna de gel filtração HiPrep 16/60XK Superdex 200 (última coluna da figura 10). O perfil cromatográfico apresentou um único pico que se inicia em 55ml e se estende até 68ml. O valor máximo da absorbância a 280nm foi registrado em 62,45ml (figura 11).

Figure 10: Expressão e purificação da ADSL-Lm. Gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE mostrando que a purificação da ADSL-Lm foi realizada usando primeiramente uma cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA e posteriormente uma gel filtração em coluna 16/60 XK Superdex 200. Coluna 1: marcador de peso molecular. Coluna 2: extrato bruto antes da indução. Coluna 3: fração insolúvel. Coluna 4: fração solúvel. Coluna 5: “void” da fração solúvel que passou pela resina da coluna de Ni-NTA. Colunas 6 e 7: lavagens com 25mM de imidazol. Coluna 8: eluição da proteína de fusão ADSL-Lm com 500mM de imidazol. Coluna 9: fração do pico de eluição da cromatografia de exclusão molecular. A seta indica o tamanho esperado da proteína ADSL-Lm recombinante em SDS-PAGE (~56kDa).

Figura 11: Cromatograma mostrando o perfil de eluição da proteína recombinante, proveniente da coluna HiPrep 16/60XK Superdex 200 (Amersham Biosciences). O topo do pico, cujo valor da absorbância a 280nm é máximo, se refere ao volume de eluição da ADSL-Lm equivalente a 62,45ml.

3.3 Caracterização bioquímica e estrutural da enzima recombinante ADSL-Lm.

3.3.1 Determinação do peso molecular da ADSL-Lm por cromatografia de exclusão molecular

A coluna HiPrep 16/60XK Superdex 200 (Amersham Biosciences) foi também empregada visando determinar o peso molecular aparente da enzima ADSL-Lm recombinante, e conseqüentemente, sua forma oligomérica. Para tanto, a coluna foi pré-calibrada com um conjunto de marcadores de peso molecular, como descrito na sessão de Materiais e Métodos e as corridas das proteínas padrões e da ADSL-Lm foram realizadas obedecendo às mesmas condições (de tampão, fluxo, volume de amostra aplicado à coluna e monitoração da absorbância a 280nm).

O volume de eluição do Blue Dextran 2000 foi de 48,43ml, determinando-se assim o “void” (V_o) da coluna. As proteínas utilizadas como padrões de peso molecular, seus respectivos volumes de eluição (V_e) e valores de K_{av} encontram-se na tabela 15.

Tabela 15: Proteínas utilizadas para calibração da coluna HiPrep 16/60XK Superdex 200 e seus respectivos volumes de eluição e valores de K_{av} .

Padrões de MW	MW (kDa)	V_e (ml)	K_{av}
Tireoglobulina	669	53,56	0,0716
Ferritina	440	58,99	0,1476
Catalase	232	69,30	0,2916
Aldolase	158	71,73	0,3255
Ovalbumina	43	86,35	0,5298
Ribonuclease A	13	101,77	0,7452

MW = “Molecular Weight” (peso molecular)

Partindo-se do K_{av} de cada proteína padrão e do log de seu peso molecular, construiu-se um gráfico de regressão linear, apresentando uma equação da reta que descreve o comportamento da curva como sendo $y = -2,5848x + 3,0396$ (figura 12).

Figura 12: Curva de calibração da coluna Superdex 200. Os quadradinhos pretos indicam os pontos na curva referentes às proteínas padrões e o asterisco vermelho referente a ADSL-Lm. A equação da reta é representada $y = -2,5848x + 3,0396$.

Utilizando-se a equação da reta, foi possível determinar o valor de LogMW, equivalente ao $V_e = 62,5\text{ml}$ e ao $K_{av} = 0,1958$ da ADSL-Lm. Desta forma, o peso molecular aparente desta enzima foi estimado como sendo de 341kDa, correspondente a um hexâmero, se considerarmos que o monômero possui 56kDa.

No entanto, a forma oligomérica hexamérica, estimada através deste procedimento, não é consistente com os dados disponíveis na literatura, os quais descrevem a ADSL como pertencente a uma família de enzimas homotetraméricas (Toth & Yeates, 2000). As estruturas tridimensionais desta mesma enzima de outros organismos como *Thermotoga maritima* e *Pyrobaculum aerophilum* já foram resolvidas e confirmam tratarem-se de homotetrâmeros (Toth & Yeates, op.cit; Toth *et al.*, 2000).

Esta inconsistência entre nossos dados experimentais (ADSL de *Leishmania major*) e os disponíveis na literatura, de proteínas homólogas, pode ser explicada pelo fato de que a metodologia comparativa empregada assume a mesma relação entre forma molecular e peso molecular para as proteínas que estão sendo analisadas e as proteínas padrões. Todas as proteínas fornecidas pelo “kit” de calibração da coluna apresentam, em uma boa aproximação, formas globulares. Assim, proteínas não globulares que estão sendo submetidas a este tipo de estudo, como pode ser o caso da ADSL-Lm, podem apresentar pesos moleculares aparentes que não se correlacionem bem com a curva de calibração empregada, portanto, o valor de peso molecular calculado para ADSL-Lm eluída da coluna de gel filtração não esteja se adequando perfeitamente ao esperado.

3.3.2 Estudo do estado de oligomerização da ADSL através de “Dynamic Light Scattering”(DLS)

Diferente da cromatografia por gel filtração, a determinação do peso molecular aparente e da forma oligomérica da enzima recombinante ADSL-Lm, através de DLS, foi consistente com os dados teóricos. As medidas de DLS, da amostra contendo ADSL, resultaram num raio hidrodinâmico médio de 6,03nm, como mostrado pelo histograma da figura 13A. A partir deste raio, foi possível estimar que o peso molecular da proteína é de 225kDa (figura 13B). Este valor é equivalente a uma forma oligomérica homotetramérica, uma vez que o monômero de ADSL-Lm recombinante possui um peso aproximado de 56kDa.

Além disso, esta metodologia também mostrou que a amostra se apresentou monodispersa, o que pode ser visto no perfil do histograma (figura 13A), podendo desta maneira ser posteriormente utilizada nos ensaios de cristalização.

Figura 13: Experimentos de DLS. A) Histograma representativo da média dos raios hidrodinâmicos (Rh) das moléculas da enzima recombinante ADSL-Lm, em solução, que são consideradas os centros espalhadores de luz, num experimento de DLS. B) Figura do programa utilizado para o cálculo do peso molecular da ADSL-Lm. Partindo-se do valor de R_H 6,03 obtém-se o peso molecular equivalente a 225kDa.

3.3.3 Estudo do estado de oligomerização da ADSL-Lm através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes)

Duas concentrações diferentes de proteína (1,86mg/ml e 3,0mg/ml) foram aplicadas no gel e apresentaram o mesmo perfil eletroforético (figura 14). Considerando-se a migração da ADSL-Lm, comparada à das proteínas padrões, foi possível observar que a banda encontra-se próxima de 232 kDa e, portanto, correspondente a um tetrâmero (monômero = 56kDa). A forma tetramérica evidenciada pelo gel nativo corrobora os dados disponíveis na literatura, bem como os obtidos com espalhamento dinâmico de luz (DLS).

Figura 14: Experimento de eletroforese não desnaturante (gel nativo). Gel nativo de poliacrilamida “PhastGel gradient media” 10-15%. A seta vermelha indica a banda referente à ADSL-Lm. Coluna 1: padrão de peso molecular. Coluna 2: ADSL-Lm a 1,86mg/ml. Colunas 3 e 4: ADSLLm a 3mg/ml.

3.3.3. Ensaios de clivagem da cauda de histidina com a enzima Enteroquinase e

Sequenciamento do N-terminal

Os experimentos de clivagem da cauda de histidina da ADSL recombinante, pela enzima EKMax (Invitrogen), resultaram em algumas bandas de clivagem inespecífica (mais claras) e em duas bandas mais aparentes no gel (figura 15). Estas duas bandas mais fortes foram submetidas ao sequenciamento N-terminal. Embora a melhor condição tenha sido estabelecida (18°C, 24 horas de incubação, 4U da enzima EKMax : 20µg da proteína ADSL-Lm recombinante), a clivagem não foi 100% eficiente.

Figura 15: Clivagem da cauda de histidina da ADSL-Lm recombinante. Gel de poliacrilamida 15%. Coluna 1: padrão de peso molecular. Coluna 2: Amostra da ADSL-Lm sem EKMáx, controle negativo, e possivelmente, a banda se refere à proteína com cauda (seta azul). Coluna 3: Amostra da ADSL, contendo EKMáx, após 24 horas de incubação, a 18°C. Como pode ser observado, há proteína, provavelmente, sem cauda (seta vermelha), mas a clivagem não foi 100% eficiente, pois ainda resta proteína recombinante (seta azul).

Como resultado do seqüenciamento do N-terminal, realizado no laboratório do Prof. Dr. Lewis Joel Greene (Centro de Química de Proteínas da Escola de Medicina de Ribeirão Preto/USP), obtivemos as seguintes seqüências de aminoácidos:

i) para a banda indicada pela seta azul (figura 15): MRGXH, sendo esta seqüência equivalente ao N-terminal de uma proteína recombinante expressa, que foi clonada ao vetor pCR T7/NT-TOPO, considerando que X equivale a uma S (serina). Desta forma, a banda seqüenciada é realmente da enzima ADSL-Lm recombinante.

ii) para a banda indicada pela seta vermelha (figura 15): DPTLMQLPSA, sendo a seqüência DPTL equivalente aos 4 aminoácidos após o sítio de clivagem de EKMáx (ver figura 1 do capítulo III). O restante, MXLPSA é coincidente com o N-terminal da proteína ADSL nativa (ver a seqüência da proteína na figura 10 do capítulo III), considerando X, como uma S (serina).

3.3.4 Determinação do ponto isoelétrico (pI)

O ponto isoelétrico da enzima recombinante ADSL-Lm determinado experimentalmente foi de 6,07. A distância no gel (figura 16), em relação ao cátodo, percorrida pela ADSL-Lm foi de 23,4mm. Utilizando-se a equação da reta (figura 17), foi possível determinar o valor de LogpH, equivalente ao pI=6,07. Este resultado corrobora o pI teórico da proteína (pI=6,04), que foi calculado com o programa “ProtParam” (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>).

Figura 16: Determinação do pI. Gel de poliacrilamida “Phast Gel IEF 3-9”, mostrando a migração da ADSL-Lm. M: marcadores de pI com variação de 3,0 a 9,0. ADSL: amostra pura da proteína, apresentando um pI de 6,07 (seta vermelha).

Figura 17: Gráfico do experimento de focalização isoelétrica da ADSL-Lm. Os quadradinhos pretos indicam os pontos na curva referentes às proteínas padrões e a cruzinha vermelha referente a ADSL-Lm. A equação da reta é representada por $\text{Log pH} = 0,99857 - 0,0092 \times D$, onde D são as distâncias, relativas ao cátodo, percorridas pelas proteínas.

3.3.5 Ensaios de atividade enzimática da ADSL-Lm para os substratos adenilosuccinato (ADS) e SAICAR

Para os testes de determinação dos parâmetros cinéticos (K_m , V_{max} e k_{cat}), primeiramente buscamos identificar a melhor condição de reação, ou seja, as condições ótimas da enzima, onde ela deveria apresentar maior atividade. Os dados obtidos, variando-se concentração da enzima, pH do tampão e temperatura, demonstraram que as reações (500 μ l) devem ser realizadas com 3 μ l da enzima a 0,06mg/ml (concentração final equivalente a 1,6nM de ADSL-Lm), à 25°C, em tampão Tris/HCl 50mM, pH 8,5 (resultados não mostrados).

Uma vez determinada a melhor condição de reação, ensaios variando-se a concentração do substrato ADS (1 μ M; 2 μ M; 4 μ M; 6 μ M; 8 μ M; 10 μ M; 15 μ M; 20 μ M; 30 μ M; 40 μ M; 50 μ M; 60 μ M; 80 μ M e 100 μ M) foram realizados, a fim de se calcular os parâmetros cinéticos (K_m , V_{max} , k_{cat} e eficiência catalítica) da ADSL-Lm.

Os parâmetros cinéticos K_m , V_{max} , k_{cat} e eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) foram obtidos do duplo-recíproco (figura 18A). A curva de Michaelis-Mentem evidenciou que a ADSL-Lm apresenta uma cinética de Michaelis-Mentem (figura 18B).

A

Figura 18: Cinética enzimática para o substrato ADS. A) Gráfico duplo-recíproco.
B) Gráfico de Michaelis-Menten.

Os resultados dos ensaios de atividade enzimática da ADSL-Lm para o composto SAICAR revelaram ausência de atividade catalítica desta enzima para o substrato da via de síntese *de novo* de purino-nucleotídeos. A mesma medida foi realizada com o composto adenilosuccinato, demonstrando não ser um problema da amostra, uma vez que a ADSL-Lm estava ativa para ADS (figura 19). Além disto, cabe ressaltar que com o intuito de checar a qualidade do composto SAICAR, foi realizado um ensaio controle com este substrato e a ADSL humana, a qual é capaz de convertê-lo em produto. A medida revelou atividade da ADSL-hum e portanto confirmou que a qualidade do SAICAR estava boa (dados não mostrados).

Estudos envolvendo inibição da enzima ADSL humana, descrevem que a inibição competitiva por AICAR e AMP em relação aos substratos sugere que um único sítio liga tanto SAICAR quanto ADS (Stone *et al.*, 1993). Entretanto, nossos dados revelam que embora a enzima ADSL de *L. major* tenha complementado eficientemente a deficiência da linhagem bacteriana JK268 (como discutido no item 3.1), esta complementação funcional possivelmente tenha ocorrido apenas na via de recuperação, uma vez que a ADSL-Lm não foi capaz de converter SAICAR em produto. Isto pode ser uma evidência de que o sítio ativo da ADSL-Lm tenha acumulado mutações durante a evolução e seja específico para o substrato adenilosuccinato. Assim, de acordo com a hipótese levantada no presente trabalho, podemos inferir que os protozoários parasitas tripanosomatídeos tenham evoluído para possuir apenas a via de recuperação de purinonucleotídeos e não que representem um caso de pré-existência da via síntese *de novo* e posterior perda.

Como atividades futuras, podemos apontar tentativas para obtenção de um complexo (cristal com o substrato ligado no sítio ativo), ou de modelagem molecular (“docking”) para simular o substrato no sítio ativo. Este tipo de abordagem nos permitiria fazer uma análise mais detalhada das interações entre os resíduos do sítio catalítico e os diferentes grupos químicos do substrato a fim de discutir com maior propriedade o mecanismo de catálise para ADSL-Lm e investigar se a ausência de atividade para o SAICAR pode estar relacionada com mudanças estruturais do sítio ativo desta enzima.

Figura 19: Ensaio de atividade enzimática para o substrato SAICAR. Curvas resultantes das medidas realizadas no espectrofotômetro com ADSL-Lm a 0,06mg/ml, por 1 minuto; a concentração de ambos substratos foi a mesma [70 μ M]. A curva rosa mostra o decréscimo de absorvância a 282nm, refletindo o consumo de ADS, o que demonstra que a enzima é ativa para este substrato. Já a curva azul escura mostra a ausência no decréscimo de absorvância a 265nm, evidenciando que a enzima não apresenta atividade catalítica para o substrato da via de síntese *de novo* de purino-nucleotídeos - SAICAR.

3.3.6 Cristalização da ADSL-Lm com e sem cauda de histidina

Os refinamentos das condições determinadas durante a primeira varredura, já discutidas na sessão de Materiais e Métodos deste capítulo, mostraram que tanto a proteína ADSL-Lm com a cauda de histidina quanto sem a cauda de histidina cristalizaram (figura 20). Entretanto, quando os cristais eram submetidos à difração de raios-X, estes não difratavam à alta resolução e sim por volta de 3 Å (figura 21).

Figura 20: Cristalização da proteína ADSL-Lm. A) Foto de cristais de ADSL-Lm com cauda de histidina, em tampão fosfato 5mM, pH 7,8, NaCl 5mM; AMP 100 μ M e solução precipitante fosfato de Na/K 1,4M, pH 6,3. Os cristais de aproximadamente 0,6 x 0,3mm (comprimento x largura) cresceram após 15 dias em gotas de 6 μ l (3 μ l de proteína: 3 μ l de solução precipitante), a 18°C. B) Foto de cristais de ADSL-Lm sem cauda de histidina, em tampão fosfato 5mM, pH 7,8, NaCl 5mM; AMP 100 μ M e solução precipitante sulfato de amônio 1,6M, Tris 0,1M, pH 8,0. Os cristais de aproximadamente 0,6 x 0,3mm (comprimento x largura) cresceram após 15 dias em gotas de 6 μ l (3 μ l de proteína: 3 μ l de solução precipitante), a 18°C.

Figura 21: Padrão de difração de raios-X do cristal da ADSL-Lm sem a cauda de histidina. O cristal (figura 17B) foi submetido à fonte de luz síncrotron da linha de Cristalografia de Proteínas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas e difratou até 2,9Å de resolução.

Dentre as condições de cristalização já descritas para ADSLs de outros organismos, apenas a condição 0,1 M Ácido Cítrico pH 5,0 e 15% de PEG 4000, referente à cristalização da ADSL de *Pyrobaculum aerophilum*, demonstrou-se promissora. Assim, uma placa de refinamento desta condição foi feita, variando-se a porcentagem de PEG 4000 e o pH do tampão. Este refinamento resultou na formação de cristais do tipo “barras finas” (figura 22), que difrataram à baixa resolução.

Figura 22: Cristalização da ADSL-Lm. Foto de cristais tipo barras finas, que cresceram a 18°C, na condição: 0,1 M Ácido Cítrico pH 5,0 e 13% de PEG 4000.

Pelo fato de não ter sido observada qualquer melhora na qualidade dos cristais sem cauda de histidina, em relação ao poder de resolução de difração, optamos por continuar as tentativas de obtenção de um cristal que difratasse até mais alta resolução utilizando-se a proteína com a cauda, pois isto nos resultaria em economia nos passos para aquisição de proteína pura.

Em relação ao teste sugerido pelo Dr. Alexander Golubev (Petersburg Nuclear Physics Institute, Rússia) para identificação da concentração de PEG que leva a precipitação da proteína e com isto rastrear condições de cristalização, não foi possível encontrar uma condição promissora. Embora tenha sido possível determinar a

porcentagem de PEG 8000, que leva à precipitação da proteína, nenhuma condição da placa de refinamento (mantendo-se a concentração de PEG constante em 8% e variando-se o pH e a força iônica do tampão) resultou em cristalização da ADSL-Lm.

Como descrito na sessão Material e Métodos, enfocamos nossos esforços na tentativa de se diminuir a velocidade de difusão de vapor (entre a gota e a solução do poço), reduzir a nucleação e, conseqüentemente, levar à formação de um cristal maior. Para isto, adotamos estratégias como o uso de óleos e técnicas de “microseeding” e “macroseeding”, utilizando-se ADSL-Lm a 10mg/ml com 100 μ M de substrato e a condição: sulfato de amônio 1,6M de sulfato de amônio, MES 0,1M, pH 6,5; e 10% dioxano.

Apesar de terem sido empregados 3 tipos de óleos (parafina, silicone e uma mistura 1:1 de cada um), não obtivemos diferenças no tamanho dos cristais (dados não mostrados).

Infelizmente, as duas metodologias de semeadura (“macro e microseeding”) também não resultaram no crescimento de cristais únicos e maiores (figuras 23 e 24).

Figura 23: “Macroseeding”. Foto de uma gota, contendo ADSL-Lm a 5mg/ml e previamente equilibrada, na qual foi introduzido um cristal, apontado pela seta azul, durante o experimento de “macroseeding”. Estes resultados mostram que as metas de diminuição da nucleação e conseqüentemente a de obtenção de um cristal maior não foram atingidas.

Figura 24: “Microseeding”. A) gota com ADSI-Lm a 2,5mg/ml, na qual foram introduzidos 0,2 μ l da diluição 1. B) gota com ADSI-Lm a 10mg/ml, na qual foram introduzidos 0,2 μ l da diluição 1. C) gota com ADSI- Lm a 2,5mg/ml, na qual foram introduzidos 0,2 μ l da diluição 2. D) gota com ADSI- Lm a 10mg/ml, na qual foram introduzidos 0,2 μ l da diluição 2. E) gota com ADSI- Lm a 2,5mg/ml, na qual foram introduzidos 0,2 μ l da diluição 3. F) gota com ADSI- Lm a 10mg/ml, na qual foram introduzidos 0,2 μ l da diluição 3. As diluições estão explicadas no item 2.4.9 (Material e Métodos).

Além destas estratégias, também foi realizado um refinamento mais “acurado” da condição sulfato de amônio 1,6M, MES 0,1M, pH 6,5 e 10% dioxano, utilizando-se ADSL-Lm à 10mg/ml em tampão fosfato de potássio 5mM, pH 7,8; NaCl 5mM e ADS 100 μ M. Duas placas foram igualmente preparadas: uma delas foi colocada a 4°C e a outra a 18°C. Estas preparações foram as que apresentaram os melhores cristais (figuras 25 e 26). Na placa a 18°C, os cristais atingiram seus tamanhos máximos em 1 semana. No entanto, somente em algumas gotas da placa a 4°C cresceram cristais únicos, com as faces bem definidas e de tamanhos maiores, após alguns meses.

Figura 25: Cristalização da ADSL-Lm - refinamento mais acurado (18°C). Foto dos cristais da ADSL-Lm que cresceram a 18°C, na condição 1,4M de sulfato de amônio, 0,1M MES, pH 6,5 e 9% dioxano.

Figura 26: Cristalização da ADSL-Lm - refinamento mais acurado (4°C). Fotos dos cristais da ADSL-Lm que cresceram a 4°C. A) condição 1,5M de sulfato de amônio, 0,1M MES, pH 6,5 e 9% dioxano. B) condição 1,6M de sulfato de amônio, 0,1M MES, pH 6,5 e 10% dioxano e C) condição 1,55M de sulfato de amônio, 0,1M MES, pH 6,5 e 11% dioxano

3.3.7 Coleta e processamento de dados de difração de raios-X

No total, foram coletados cinco conjuntos de dados. As coletas de dados de difração de raios-X foram realizadas em três lugares diferentes:

i) O cristal da condição 1,6M de sulfato de amônio, 0,1M MES, pH 6,5 e 10% dioxano (figura 26B) foi utilizado para coletar um conjunto nativo, no Laboratório de Cristalografia de Proteínas do Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural - IFSC/USP. Algumas estatísticas do processamento encontram-se na tabela 16.

Tabela 16: Estatísticas do processamento do cristal nativo coletado no IFSC.

Grupo espacial	I4 ₁ 22
Dimensões da cela unitária	a = b=130,023Å, c = 316,826Å, α = β= γ=90°
Resolução	2,2Å (2,25Å)
Multiplicidade	13
Completeza	99,7 (99,5)
Rsym (%)	8,0 (53,0)
I/σ	28,6 (3,8)

Entre parênteses são os valores para a última faixa de resolução

ii) Dois cristais da mesma gota (condição 1,5M de sulfato de amônio, 0,1M MES, pH 6,5 e 9% dioxano – figura 26A) foram utilizados para coletar um conjunto nativo e um conjunto derivado de gadolínio, na linha de Cristalografia de Proteínas do LNLS. Algumas estatísticas do processamento do cristal nativo estão na tabela 17 e do cristal derivado na tabela 18.

Tabela 17: Estatísticas do processamento do cristal nativo coletado no LNLS.

Grupo espacial	I4 ₁ 22
Dimensões da cela unitária	a = b=128,473Å, c = 311,002Å, α = β= γ=90°
Resolução	2,8Å (2,95Å)
Multiplicidade	8,1
Completeza	98,9 (98,9)
Rsym (%)	13,3 (47,6)
I/σ	5,0 (1,5)

Entre parênteses são os valores para a última faixa de resolução

Tabela 18: Estatísticas do processamento do cristal derivado de gadolínio coletado no LNLS.

Grupo espacial	I4 ₁ 22
Dimensões da cela unitária	a = b=128,353Å, c = 311,893Å, α = β= γ=90°
Resolução	2,85Å (2,95Å)
Multiplicidade	36,2
Completeza	100 (100)
Rsym (%)	12,6 (41,5)
I/σ	5,0 (2,0)

Entre parênteses são os valores para a última faixa de resolução

iii) Um cristal da condição 1,4M de sulfato de amônio, 0,1M MES, pH 6,5 e 9% dioxano (figura 25) foi utilizado para coleta de um conjunto nativo à baixa resolução, na linha de Cristalografia de Proteínas do LNLS. Algumas estatísticas do processamento encontram-se na tabela 19.

Tabela 19: Estatísticas do processamento do cristal nativo coletado à baixa resolução no LNLS

Grupo espacial	I4 ₁ 22
Dimensões da cela unitária	a = b = 128,51Å, c = 313,42Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Resolução	3,25Å (3,43Å)
Multiplicidade	15,9
Completeza	99,6 (97,6)
Rsym (%)	5,2 (13,7)
I/ σ	10,4 (4,1)

Entre parênteses são os valores para a última faixa de resolução

iv) Outro cristal da condição 1,4M de sulfato de amônio, 0,1M MES, pH 6,5 e 9% dioxano (figura 24) foi utilizado para coleta de um conjunto derivado de Césio, na linha 17 do APS. Algumas estatísticas do processamento deste cristal estão na tabela 20.

Tabela 20: Estatísticas do processamento do cristal derivado de césio coletado no APS

Grupo espacial	I4 ₁ 22
Dimensões da cela unitária	a = b = 130,193Å, c = 317,505Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Resolução	2,52Å (2,59Å)
Multiplicidade	4
Completeza	90,4 (75,2)
Rsym (%)	9,0 (23,0)
I/ σ	12,2 (3,2)

Entre parênteses são os valores para a última faixa de resolução

Estudos de difração de raios-X (figura 27), do melhor cristal nativo obtido (figura 26B), mostraram que a ADSL-Lm cristaliza-se no grupo espacial tetragonal $I4_122$, com parâmetros de cela $a = b = 130,023 \text{ \AA}$, $c = 316,826 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ e difrata até $2,2 \text{ \AA}$ de resolução. O cálculo do coeficiente de Matthews sugeriu a presença de um dímero na unidade assimétrica e um conteúdo de solvente de aproximadamente 51.7%.

Figura 27: Padrão de difração de raios-X do melhor cristal obtido. Cristal nativo coletado no IFSC, até $2,2 \text{ \AA}$ de resolução, usando um comprimento de onda de $1,54 \text{ \AA}$.

3.3.8 Obtenção das fases e do modelo da estrutura cristalográfica da ADSL-Lm

Primeiramente, discutiremos o processo de substituição molecular. As melhores soluções encontradas pelo programa AMoRe, utilizando o monômero da ADSL de *T. marítima* como modelo, estão apresentadas na Tabela 21.

Tabela 21: Oito primeiras soluções fornecidas pelo programa ROTFUN (AMoRe). Os ângulos alfa, beta e gama são os ângulos de rotação de Euler. T é a translação (sempre zero aqui) e CC são os coeficientes de correlação.

	Alfa	Beta	Gama	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F
SOLUTIONRC1	20.64	90.00	180.12	0.0000	0.0000	0.0000	25.0	56.5
SOLUTIONRC 2	69.29	90.00	-0.02	0.0000	0.0000	0.0000	25.0	56.5
SOLUTIONRC 3	27.81	90.00	-0.09	0.0000	0.0000	0.0000	24.9	56.6
SOLUTIONRC 4	62.16	90.00	180.01	0.0000	0.0000	0.0000	24.9	56.6
SOLUTIONRC 5	86.49	88.23	179.62	0.0000	0.0000	0.0000	24.5	56.6
SOLUTIONRC 6	3.63	88.06	-0.15	0.0000	0.0000	0.0000	24.4	56.7
SOLUTIONRC 7	68.32	71.12	3.70	0.0000	0.0000	0.0000	23.8	56.8
SOLUTIONRC 8	61.06	72.07	185.67	0.0000	0.0000	0.0000	23.8	56.8

Neste caso não existe contraste no coeficiente de correlação, o que mostra que o programa não conseguiu encontrar uma solução clara. Para a translação utilizou-se cada solução da função de rotação (tabela 21). A tabela 22 apresenta os resultados obtidos após a translação.

Tabela 22: Resultados obtidos depois da translação.

	Alfa	Beta	Gama	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F
SOLUTIONRC	20.76	89.74	180.34	0.9960	0.4992	0.0504	37.7	55.8
SOLUTIONRC	69.22	90.26	0.34	0.9990	0.4961	0.4496	37.6	55.8
SOLUTIONRC	27.76	90.31	-0.12	1.0038	0.4987	0.0504	37.2	55.9
SOLUTIONRC	62.17	89.64	179.97	-0.0040	0.5005	0.4496	37.1	55.9
SOLUTIONRC	63.44	65.78	180.69	0.5585	0.4407	0.4704	31.9	56.3
SOLUTIONRC	18.87	65.79	182.21	0.5599	0.4413	0.0293	31.8	56.3
SOLUTIONRC	27.52	64.63	-1.02	0.0590	0.4421	0.2779	31.3	56.5
SOLUTIONRC	60.91	72.11	185.71	0.0481	0.6058	0.2526	31.7	56.5
SOLUTIONRC	68.18	70.94	70.94	0.0481	0.6065	0.2522	31.5	56.6
SOLUTIONRC	28.96	71.98	354.06	0.8935	0.4518	0.2478	31.5	56.7

Este procedimento foi repetido para três modelos de ADSLs que se encontram depositados no PDB (Protein Data Bank): de *Thermotoga maritima*, de *Pyrobaculum aerophilum* e de *Bacillus subtilis*. Naquele momento, os modelos da ADSL de *Caenorhabditis elegans* e de *Plasmodium vivax* ainda não estavam disponíveis. Foram realizadas tentativas com o monômero, com os dois tipos de dímero e com o tetrâmero (ver figura 5) das respectivas estruturas, mas não foi possível encontrar um contraste significativo no coeficiente de correlação das possíveis soluções encontradas pelo programa AMoRe. Embora o contraste nos coeficientes de correlação não tenha sido expressivo, o empacotamento cristalino foi analisado pelo menos para as duas primeiras soluções obtidas de todas as tentativas. Para as soluções que não apresentavam sobreposições no empacotamento cristalino, foi efetuado um primeiro ciclo de refinamento com o programa REFMAC, mas nenhuma das soluções apresentou uma queda significativa no valor de Rfactor, indicando que não tínhamos uma solução clara.

Usando o domínio conservado (ver figura 6) novas tentativas de substituição molecular foram realizadas. Além disso, foi construída uma cadeia de polialaninas deste domínio para ser usada como modelo, mas infelizmente não foram obtidos resultados satisfatórios com nenhuma destas estratégias.

Adicionalmente outros programas de substituição molecular, MOLREP e BEAST foram utilizados. Apesar do programa BEAST ter apresentado soluções com um contraste maior no coeficiente de correlação, as tentativas de refinar estas soluções não foram bem sucedidas. O programa PHASER ainda não estava disponível na época, então não foi utilizado (Storoni *et al.*, 2004).

Desta forma, partimos então para o método de substituição isomorfa com uso de espalhamento anômalo para determinação das fases. Fases iniciais foram encontradas pelo método de SIRAS usando os conjuntos de dados do cristal nativo e do derivado de gadolínio coletados no LNLS. A posição dos átomos de gadolínio foi determinada por métodos diretos, usando o programa SHELX (tabela 23). O sinal anômalo do derivado de cério coletado no APS era muito baixo, não sendo possível determinar as posições dos átomos pesados neste cristal.

Tabela 23: Oito primeiras posições encontradas pelo programa SHELX para o derivado de gadolínio.

Átomo	X	Y	Z	Ocupância
GD01	0.882172	0.006378	0.042106	1.0000
GD02	0.742928	0.142409	0.056976	0.8872
GD03	0.782440	0.154869	0.256423	0.7215
GD04	0.573456	0.106101	0.095581	0.6502
GD05	0.726326	-0.193733	0.095573	0.5986
GD06	0.730804	0.198387	0.095405	0.4914
GD07	0.773682	-0.243317	0.122672	0.4507
GD08	0.594666	0.019028	0.128196	0.3638

Essas posições foram usadas pelo programa SHARP para a determinação das fases. “Solvent flattening” foi feito com SOLOMON, obtendo-se como resultado um mapa de densidade eletrônica que apresentava boa conectividade, sendo possível reconhecer as hélices- α , que são as estruturas secundárias esperadas para o modelo da ADSL-Lm (figura 28A). Entretanto, este mapa ainda não apresentava uma diferenciação clara para as cadeias laterais. De posse do conjunto referente ao cristal nativo coletado no IFSC, que difratava até 2,2Å, foi feita uma extensão das fases usando o programa

RESOLVE, que nos forneceu um mapa de melhor qualidade (figura 28B). Assim, através de construções automáticas feitas pelos programas RESOLVE e ARP/wARP, e também do uso de simetria cristalográfica e não cristalográfica foi possível montar manualmente vários modelos intermediários até a construção do modelo final, que consiste de um dímero (conteúdo da unidade assimétrica), com 893 resíduos, sendo todos aminoácidos correspondentes à sequência real da ADSL-Lm (figura 29). Para os 47 resíduos da porção N-terminal da proteína, tanto do monômero A, quanto do monômero B (A1-47; B1-47) não foi possível observar densidade eletrônica. Além disto, 20 resíduos do monômero A e 21 do monômero B distribuídos em regiões de “loops” são ausentes, ou pela falta de densidade eletrônica ou pela má qualidade do mapa nestas porções (A121; A167-170; A350-360; A471-474; B120-121; B167-173; B351-359; B470-472). Através da construção das moléculas simétricas no programa O, foi possível obter o empacotamento cristalino e verificar que os resíduos que faltam ser adicionados ao modelo se concentram numa região exposta ao solvente (figura 30). Como alternativa para checar a ausência de densidade, pelo menos para os primeiros 47 resíduos, uma amostra dos cristais da ADSL-Lm foi dissolvida e submetida ao sequenciamento do N-terminal, mas infelizmente não foi possível a interpretação da sequência por um problema na amostra.

Figura 28: Mapas de densidade eletrônica. A) O mapa foi calculado a partir das fases iniciais obtidas por SIRAS, com o derivado de gadolínio para 2,8Å. B) O mapa foi obtido após a extensão do faseamento ate 2,2Å e portanto apresentou uma melhor qualidade para definição das cadeias laterais. Mapas 2 Fobs-Fcalc contornados a 1,5 sigma.

Figura 29: Estrutura da ADSL-Lm. A) Dímero cristalográfico. B) Tetrâmero construído por simetria cristalográfica a partir do dímero. Cada monômero é representado por uma cor diferente. O tetrâmero possui quatro sítios ativos, sendo cada um formado por três subunidades distintas.

Figura 30: Empacotamento cristalino das moléculas da ADSL-Lm. A figura mostra regiões de solvente (seta vermelha), onde se posicionam os resíduos ausentes (na região N-terminal) e os “loops” do modelo da ADSL-Lm.

O monômero da ADSL-Lm é composto por três domínios arranjados de forma alongada (figura 31), que é típica das enzimas da superfamília de β -eliminação. O domínio 1 é constituído totalmente por hélices α (cinco pequenas) e contém os resíduos 48-182. O domínio 2 inclui os resíduos 183-430, é composto por um feixe alongado de 5 hélices α que constituem o “core” conservado das estruturas de ADSLs e é o único domínio do monômero que contém estruturas folha β (duas), sendo uma delas um grampo de cabelo. O domínio 3, também formado por 5 hélices α pequenas, compreende os resíduos 431-514. Quatro cadeias protéicas se unem para formar um homotetrâmero

(com quatro sítios ativos), o qual é construído por simetria cristalográfica, partindo-se do dímero cristalográfico (figura 29B).

Figura 31: Monômero da ADSL-Lm e resíduos envolvidos no sítio ativo. O monômero da ADSL-Lm é formado por 3 domínios. O domínio 1 está representado em laranja, o 2 em azul e o 3 em verde. As cadeias laterais dos cinco resíduos envolvidos no sítio ativo estão representadas em barras (stick). A His 153 encontra-se no domínio 1, próxima da Gln 308 que se localiza no domínio 2. Na outra extremidade do domínio 2 estão os resíduos His 231 (que se localiza na volta que forma o grampo de cabelo), Asn 364 e Glu 369.

Em relação ao sítio ativo, a catálise ocorre *via* um mecanismo ácido-base geral.

Ensaio de afinidade envolvendo a ADSL de *B. subtilis* evidenciaram que dois resíduos,

His68 e His141 são, respectivamente, o ácido e a base nesta reação (Lee *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998). Estudos estruturais da ADSL de *T. maritima* complementaram estes dados bioquímicos, permitindo a construção manual de um modelo para o substrato ligado e evidenciando a participação da His 68 e His 141 na catálise e dos resíduos Gln 212, Asn 270 e Glu 275 na ligação e orientação do substrato (Toth & Yeates, 2000). Os autores posicionaram o substrato de forma que o carbono β do grupo succínico ficou próximo da base geral (His 141), enquanto o grupo amida do AMP ficou a uma distância que possibilita uma interação tipo ponte de hidrogênio com o ácido geral (His 68). Ambos grupos carboxílicos do grupo succínico ficaram suficientemente próximos dos resíduos que contêm grupos amida (Gln212 e Asn 270), os quais atuariam na orientação do substrato. O papel do Glu 275 estaria relacionado ao favorecimento para a His 141 agir como base catalítica. Adicionalmente, neste modelo, apenas uma rotação de 180° na ligação indicada na figura 32 (painel c) explica a capacidade da ADSL de atuar em dois substratos distintos, o que não requer adaptações estruturais especiais da proteína.. Estes dados contribuem para a implicação biológica da versatilidade da ADSL de acomodar dois substratos, o que a torna única dentre as enzimas da superfamília de β -eliminação. Além disto, se considerarmos que mudanças estruturais peculiares não são requeridas para catálise das ADSLs sobre SAICAR e ADS, então por que a ADSL de *L. major*, enzima de interesse do presente trabalho, não exibiria atividade sobre o composto SAICAR? Isto pode reforçar a idéia de que o sítio ativo da ADSL-Lm tenha evoluído para converter apenas o substrato da via de recuperação e, portanto, tenha acumulado alguma diferenciação estrutural. Entretanto, na ausência do ligante, os contatos entre os resíduos do sítio ativo com o substrato não podem ser analisados com detalhes. Desta

forma, esta hipótese somente poderá ser elucidada quando obtivermos um complexo do cristal com o substrato e com algum intermediário estável da reação catalítica. Contudo, a modelagem do substrato no sítio ativo poderia nos fornecer elementos adicionais para o entendimento desta questão.

Figura 32: Introdução por inspeção manual dos substratos no sítio ativo da ADSL de *T. marítima*. a) Adenilosuccinato e b) SAICAR. Os asteriscos vermelhos indicam os átomos que diferem entre adenilosuccinato e SAICAR. c) Mecanismo pelo qual a ADSL é capaz de atuar sobre os dois substratos. Uma rotação de 180° deve ocorrer na ligação indicada (à esquerda do painel). O centro do painel mostra o mecanismo de catálise realizada pela ADSL. Figura extraída do artigo Toth & Yeates (2000).

Assim como nas demais ADSLs, o sítio ativo da ADSL-Lm é formado por mais de uma subunidade (Lee *et al.*, 1999; Toth & Yeates, 2000; Toth *et al.*, 2000). Três monômeros, dos quatro que compõem o homotetrâmero, são necessários para formar o sulco de um sítio ativo (figura 33). Na ADSL-Lm, os resíduos que participam do sítio

ativo são His 153 (ácido geral), His 231 (base geral), Gln 308, Asn 364 e Glu 369. Uma análise da superfície nos mostra que tanto a His 231 quanto o Glu 369 ficam mais “enterrados” no sulco, enquanto a His 153 fica exposta ao solvente (figura 34). Embora as ADSLs compartilhem apenas 25% de identidade sequencial, um alinhamento das seqüências das ADSLs depositadas no PDB e a ADSL-Lm nos mostrou que estes resíduos são estritamente conservados (figura 35).

Figura 33: Sítio ativo da ADSL-Lm. À esquerda superfície de contato mostrando que um sítio ativo é formado por 3 monômeros. O mais evidente é aquele composto pelos monômeros de cores amarela, verde e azul claro (indicado pela seta). À direita um detalhe do mesmo sítio ativo mostrando os resíduos em detalhe. His 153 (posicionada no domínio 1 do monômero verde), His 231 (localizada na volta que forma o grampo de cabelo no domínio 2 do monômero amarelo), Gln 308 (domínio 2 do monômero verde), Asn 364 e Glu 369 (domínio 2 do monômero azul claro).

Figura 34: Representação da superfície do dímero da ADSL-Lm. A figura mostra que a His 153 fica numa região mais exposta do sítio ativo, enquanto a His 231 e o Glu 369 ficam mais enterrados no sulco do sítio ativo.

C.elegans	-----MAS-----EDKFESVLSTRYCKN-SPLVSISETNKA	31
Humana	MHHHHHSSGVDLGTENLYFQSMAGGDHGSFDSYRSPLASRYAS--PEMCFVFSDRYKF	58
Tmaritima	-----MVERYSL--SPMKDLWTEEAKY	20
Bsubtilis	-----MIERYSR--PEMSAIWTDENRF	20
Paerophilum	-----MHVSPFDWRYGS--EEIRRLFTNEAII	25
Lmajor	--MSLPSAQEAAPSVTTTAHKAPAEISQDNPLYSLSPLDGRYKRDTAALRAYFSEYALF	58
Pvivax	-----MGSSHHHHHSSGLVPRGSEHLKNI SPIDGRYKKACGELSAFFSEHALI	49
	: ** : :	
C.elegans	TLWRQLWIWLAEAEKELGLKQVTQDAIDEM-----KSNRDVFDWPFIRSEERKLKH	82
Humana	RTWRQLWLWLAEAEQTLGLP-ITDEQIREM-----KSNLENIDFKMAAEEERKLKH	108
Tmaritima	RRWLEVELAVTRAYEELGMI---PKGVTTER-----IRNNAKIDVELFKKIEEKTNH	68
Bsubtilis	QAWLEVEILACEAWAELGVI---PKEDVKV-----MRENASFDINRILEIEKDRH	68
Paerophilum	NAYLEVERALVCALEELGVA---ERGCEK-----VNK-ASVSADEVYRLERETGH	72
Lmajor	KYRVQVEVLYFQALCKEVPVITQLRGVTDQLEKLRTATTENFTVDDARMKIDIEAVTNH	118
Pvivax	KHRIIVEVRWLLFLNEEE---LEFEKVTDHSVEVLN-QIATNITDSDIARVKAIEEETNH	105
	: . : : : *	
C.elegans	DVMAHNHAFGK-----LCPTAAGIIHLGATSCFVQDNADLIAYRDSI-DHILKRFAT	133
Humana	DVMAHVHTFGH-----CPKAAAGIIHLGATSCYVDNTDLIILRNAL-DLLLPKLAR	159
Tmaritima	DVVAFVEGIGS-----MIGEDSRFFHYGLTSSDVLDTANSLALVEAG-KILLESKE	119
Bsubtilis	DVVAFTRAVSE-----SLGEERKWWHYGLTSTDVVDLTALSLLKQAN-DILKDLER	119
Paerophilum	DILSLVLLLEQ-----KSG--CRYVHYGATSNIDIATAWALLIRRAL-AAVKEKARA	121
Lmajor	DIKAVEYLYKDKMSACG---LEAEKEFIHFGLTSDINNTSIPMLLRDALHHHYIPTLDQ	175
Pvivax	DVKAVEYFVKEKLKNSKREDLLKIKEYVHYLCTSEDINNVAATCLKACLNDDVVICLEK	165
	*: : . : . * ** : : : .	
C.elegans	VIDRLAAFLSKNKEVVTVGRTHYQTASLVTGKRGVLWAQELLMAFQSLSEFRDKMRFRG	193
Humana	VISRLADFAKERASLPTLGFTHFQPAQLTTVGKRCCLWIQDLCMDLQNLKVRDRLFRG	219
Tmaritima	FCDVLWEVANRYKHTPTIGRTHGVHAEPSTFGLKVLGWYSEMKNVQRLERAIEEVSYGK	179
Bsubtilis	FVDIIKEKAKEHYTVMGRTHGVHAEPSTFGLKLALWHEEMKRNLERFKQAKAGIEVGK	179
Paerophilum	VGDQLASMARKYKTELVGRTHGQWAEPTITLGFKFANYYYELYIACRQLALAEFIRA-K	180
Lmajor	LIAHLKSKLPEWD-VPMLARTHGQAPSTNLAKEFMVWIERLEEORTMLLSIPTNGKEFG	234
Pvivax	IMLKLKDLAVEYSHVPLLSRTHGQPASSTTFGKEMANFYARIHHHVGVIRRVKCAKENG	225
	. : . : . * * . . . : : :	
C.elegans	IKGATGTQDSFSLTFAGDESKVEALDELVTKKANFSNRFLITGQYTSRQDSQLVFSLSL	253
Humana	VKGTTGTQASFLQLFEGDDHKVEQLDKMTEKAGFKRAFIITGQYTRKVDIEVLSVLAS	279
Tmaritima	ISGAVG---NYANVP-----PEVEEKALSYLGLK-PEPVSTQVPRDRHAFYLSTLAI	228
Bsubtilis	ISGAVG---TYANID-----PFVEQYVCEKLGLK-AAPISTQTLQRDRHADYMATLAL	228
Paerophilum	IGGAVGTMASWGLG-----LEVRRRVAERLGLP-HHVITTQVAPRESFAVLASALAL	232
Lmajor	ATGNFNAHLCAYPGVN---WLEFGELFSLKYLGLR-RQRYTTQIEHYDNLAACDACAR	289
Pvivax	AVGNFNAHKVASKDTD---WVNTIGLFLKKHFNLT-YSIYCTQIQDHDYICELCDGLAR	280
	* . : . : . * . : :	
C.elegans	LGAAAKKVCCTDIRVLQA---FGELLEPFEDQIGSSAMPYKKNPMKSERCCALSRLINAP	311
Humana	LGASVHKICTDIRLLAN---LKEMEPEFEKQKIGSSAMPYKKNPMKSERCCALSRLHMTLV	337
Tmaritima	VAAGIERIAVEIRHLQRTVEVLEVEEPPKKGQSSAMPHKKNPITCERLTGLSRMMRAYV	288
Bsubtilis	IATSIKFAVEIRGLQKSETREVEEFAKQKQSSAMPHKKNPISGNMTGMARVIRGYM	288
Paerophilum	MAAVFERLAVEIRELSRPEIGEVVE---GGGSSAMPHKANPTASERIVSLARYVRALT	288
Lmajor	LHTILMDLAKDVWQYIS---LGYFDQKVKAGEVGSSAMPHKVNPIDFENAEAGNLGMSNAVL	347
Pvivax	ANGTLIDLCDVLIWYIS---NNLLKLKVKKEVGSSTMPHKVNPIDFENAEAGNLHIANAF	338
	. . : : . . * * * * * * * *	
C.elegans	QEALTILADQGLERTLDDSGRRMLIPDVLTLAEALLTLQNI FEGLSVQTDNVKKIVED	371
Humana	MDPLQASVQWFERTLDDSANRRICLAEAFLTADTILNTLQNI SEGLVVYPKVIERRIRQ	397
Tmaritima	DPSLENIA-LWHERDISHSSVERYVFPDATQTLYYMIVTATNVVRNMKVNEERMKNIDL	347
Bsubtilis	MTAYENVP-LWHERDISHSSAERIILPDATIALNYMLNRFNSNIVKNLTVFPENMKRNMDR	347
Paerophilum	HVAFENVA-LWHERDLTNSANERVWIPEALLALDEILTSALRVLKNVYIDEERITENLQK	347
Lmajor	GFLSAKLPI SRLQRDLTSDTVLRNLGVPLSHALIAFASLQRGIGK-LLLNDKDVIAADLEG	406
Pvivax	KLFSSKLPT SRLQRDLSDTVLRNLIGSSLAYCLIAKSVLKGKLNK-IDIDRRNLEEELNQ	397
	. : * : . * : * : . : : : :	
C.elegans	EIAFLGLEKAMMLTEEGVDRQQAHAVIRKTALEAKQLQATQKVD---IRQTMADPFDFS	428
Humana	ELPFMATENIIMAMVKAGSRQDCHEKIRVLSQQAASVVKQEGGDNLIERIQVDAYFSP	457
Tmaritima	TKGLVFSQRVLLKLEKGLTRKEAYDIVORNALKTWNSEK-----HFLEYLLEDEEVKK	401
Bsubtilis	TLGLIYSQRVLLALIDTGLTREEAYDTVQPKAMEAWKQV-----PFRELVEAEKITS	401
Paerophilum	ALPYILTEFHMNRMIKEGASRAEAYKKAKEVKALTFEYQK-----WPVERLIEDALSLK	401
Lmajor	NWAVVAEGIQTVLRREGYPKPYEALKDLTRGNAHVTEETVH-----RFIQQLEG-IT	457
Pvivax	NWSTLAEPIQIVMKRHHYVDAYEELKQFTRG-KVIDQKIMQ-----EFIKTKCAFLP	448
	: . : : .	

C.elegans	VRDRVVLVNNPINFTGRCVSQTESFIAKELKPTIDKYLDKSAGNVQLDV	478
Humana	IHSQLDHLLD-PSSFTGRASQQVQRFLEEEVYPLLKPY--ESVMKVKA-	503
Tmaritima	LVTKEELEELFDISYLYKHVDHIFERFEKE-----	431
Bsubtilis	RLSPEKIADCFDYNHLKNVDLIFERLGLA-----	431
Paerophilum	LC-----	403
Lmajor	EEVRQELLAITPFTYVGYTARP-----	479
Pvivax	QDVVDQLLELTPATYTGADYLAKNVERLSGERD-----	482

Figura 35: Alinhamento múltiplo sequencial das ADSLs depositadas no PDB e a ADSL-Lm. Os resíduos do sítio ativo são conservados para todas as seqüências de ADSLs mostradas (resíduos destacados em amarelo). O alinhamento foi realizado pelo programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

3.3.9 Refinamento da estrutura cristalográfica da ADSL-Lm

O refinamento do modelo apresentou valores de Rfactor = 22% e Rfree = 28%. O RMS dos valores dos ângulos foi equivalente a 1,964 e das distâncias de ligação foi igual a 0,021. Além disto, 362 moléculas de água (solvente estruturado que se encontra dentro do cristal), 13 moléculas de sulfato (provenientes da condição de cristalização) e 4 moléculas de etilenoglicol (da solução crioprotetora) também foram incluídas na estrutura final. Os valores dos parâmetros obtidos no refinamento do modelo são aceitáveis, considerando-se o tamanho da proteína e a resolução exibida.

A qualidade da estereoquímica do modelo pode ser verificada no diagrama de Ramachandran (figura 36) e os parâmetros do refinamento se encontram na tabela 24.

Tabela 24: Sumário do refinamento mostrando os parâmetros que dizem sobre a qualidade do modelo da ADSL-Lm.

Estatísticas Finais do Refinamentos	
Rfactor	0,22
Rfree	0,27
Média do fator B (total)	37,27 Å ²
RMS ângulos (°)	1,964
RMS distâncias (Å)	0,021
Número de moléculas de água	362
Análises de Ramachandran	
Regiões permitidas	85,1%
Regiões favoráveis	11,6%
Regiões generosamente permitidas	2,3%
Regiões não permitidas	1%

PROCHECK

Figura 36: Gráfico de Ramachandran. Este gráfico mostra a qualidade da estereoquímica do modelo.

O resultado obtido com o gráfico de Ramachandran revelou que 675 resíduos (85,1%) se localizam nas regiões permitidas, 92 nas regiões favoráveis adicionais (11,6%), 18 (2,3%) em regiões generosamente permitidas e 8 (1%) em regiões não permitidas. Dentre os resíduos que se encontram em regiões não permitidas, se pegarmos como exemplo a Arg 197 e o Glu 126 (círculos pretos), é possível verificar o motivo de suas localizações nestas porções do gráfico de Ramachandran. No caso da Arg 197, este resíduo encaixa-se perfeitamente dentro do mapa de densidade eletrônica, e portanto, este deve ser o rotâmero presente na estrutura cristalina da ADSL-Lm. Já no caso do Glu 126, este se encontra bem próximo de um “loop” e portanto, numa região onde o mapa de densidade eletrônica é de má qualidade (figura 37). O mesmo ocorre para a maioria dos outros resíduos que se posicionam nas regiões não permitidas (como por exemplo, Leu 125 e Lys 127).

Figura 37: Mapa de densidade eletrônica para alguns resíduos que se encontram fora da região permitida no gráfico de Ramachandran. O mapa é de boa qualidade para Arg 197, enquanto que o Glu 126 localiza-se próximo de uma região de “loop”, e assim, o mapa é de má qualidade.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. CONCLUSÕES

1.1 Sobre o papel da ADSL para a sobrevivência dos tripanosomatídeos investigado através de experimentos de RNAi em *Trypanosoma brucei*

A metodologia de RNAi mostrou-se eficiente para investigação do papel da ADSL para a sobrevivência do *T. brucei*. Além disto, os experimentos apontaram para uma possível extensão da aplicação de RNAi em análises genéticas, bioquímicas e metabólicas que correlacionam a ausência da proteína alvo com os fenótipos analisados. No presente trabalho, talvez a deficiência da ADSL estaria modulando o crescimento da cultura devido aos efeitos oriundos do acúmulo do substrato e seus intermediários dentro da célula, uma vez que o produto AMP é produzido por outra enzima da via (APRT). Os resultados obtidos demonstraram que esta enzima é essencial ao crescimento do parasita e portanto, pode ser considerada um alvo promissor para o desenho racional de fármacos contra tripanosomatídeos.

1.2 Sobre a caracterização molecular do gene *adsl-Lm*.

A caracterização molecular do gene *adsl-Lm* envolveu metodologias de eletroforese de campo pulsado (PFGE), “Southern Blot” e RT-PCR. Os resultados obtidos evidenciaram que *adsl-Lm* está localizado no cromossomo 4 do parasita e é um gene de cópia simples. Além disso, as regiões 5’ e 3’ não traduzidas do gene *adsl-Lm* foram definidas por RT-PCR o que nos possibilitou inferir que o RNA mensageiro maduro possui 2060 nucleotídeos, incluindo a sequência do “Spliced Leader”.

1.3 Sobre a caracterização bioquímica e estrutural da enzima recombinante ADSL-Lm.

Os experimentos de complementação funcional mostraram o surgimento de colônias em meio suplementado, indicando que a ADSL de *L. major* é capaz de complementar o genoma deficiente da linhagem de *E. coli* JK268.

A caracterização bioquímica e estrutural da ADSL-Lm revelou que esta enzima possui características compartilhadas com as demais ADSLs de outros organismos:

i) Os resultados de DLS e gel nativo evidenciaram uma forma oligomérica equivalente a um tetrâmero (~200kDa) para ADSL-Lm, corroborando os dados descritos na literatura, onde consta que estas enzimas apresentam alto peso molecular (200 a 300kDa) (Spector *et al.*, 1989; Casey & Lowenstein, 1987; Lee *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1993; Redinbo *et al.*, 1996; Toth & Yeates, 2000; Toth *et al.*, 2000).

ii) Os ensaios de atividade enzimática realizados com o substrato ADS mostraram uma atividade máxima da ADSL-Lm no pH 8,5 e possibilitaram a determinação dos valores de K_m (10 μ M), V_{max} (14,3 μ moles/min) e k_{cat} (33,2 s⁻¹), que são também concordantes com os dados disponíveis na literatura: pH ótimo de aproximadamente 8 e valores de K_m variando de 1 a 10 μ M para o substrato ADS (Woodward & Braymer, 1966; Bridger & Cohen, 1968; Brox, 1973; Barnes & Bishop, 1975; Brand & Lowenstein, 1978; Spector *et al.*, 1979; Spector *et al.*, 1982; Pinto *et al.*, 1983; Stone *et al.*, 1993; Redinbo *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997; Toth *et al.*, 2000; Kmoch *et al.*, 2000).

iii) A estrutura tridimensional cristalográfica da ADSL-Lm representa a primeira estrutura resolvida para os protozoários parasitas e mostrou-se bastante semelhante com as demais já depositadas no PDB (Toth, 1999; Toth & Yeates, 2000;

Toth *et al.*, 2000; Symersky *et al.*, submetido, Wernimont *et al.*, submetido, Stenmark *et al.*, submetido): quatro subunidades se juntam para formar um homotetrâmero (no caso da ADSL-Lm este é construído a partir do dímero cristalográfico); a estrutura é quase que exclusivamente composta por hélices- α e cada monômero é constituído por três domínios, sendo um deles (domínio 2) bastante conservado entre os membros que compõem a superfamília das enzimas que catalisam reações de β -eliminação; as regiões de “gaps” da estrutura ADSL-Lm são coincidentes com os “gaps” descritos para as demais estruturas resolvidas e os resíduos da ADSL-Lm que participam do sítio ativo são conservados e equivalentes aos já reportados.

Entretanto, esta complementação deve ocorrer na via de recuperação, pois os ensaios de atividade enzimática realizados com o composto SAICAR (substrato na via de síntese *de novo*) evidenciaram que a ADSL-Lm não retém atividade para este substrato. Assim, a “dualidade” das ADSLs de converter dois substratos distintos que se ligam ao mesmo sítio ativo não se aplica à ADSL-Lm e a grande contribuição para uma melhor compreensão desta particularidade pode decorrer de um estudo mais aprofundado envolvendo ambos substratos e a estrutura definida no presente trabalho.

1.4 Sobre a evolução da via de síntese *de novo* de purino-nucleotídeos em Kinetoplastida, averiguada através de estudos da enzima ADSL

A questão evolutiva levantada sobre a ausência da síntese *de novo* de purino-nucleotídeos em Kinetoplastida pôde ser abordada associando-se a complementação funcional com os ensaios de atividade enzimática da ADSL-Lm sobre o substrato SAICAR. Os resultados obtidos destes experimentos revelaram a falta de atividade

da enzima em converter o SAICAR em produto. Assim, embora a ADSL-Lm tenha complementado o genoma deficiente da bactéria JK268 (mutação *purB58*), podemos inferir que os kinetoplastida já tenham evoluído para possuir apenas a via de recuperação e provavelmente não representem um caso de perda da via de síntese *de novo* durante o processo evolutivo. Entretanto, uma análise mais detalhada das interações entre os resíduos do sítio ativo e os substratos, como citado acima, faz-se necessária para auxiliar nesta questão.

2. PERSPECTIVAS

Em relação aos experimentos de RNAi, um acompanhamento mais prolongado da cultura na ausência e presença do indutor (Tet), a adição de alta concentração de substrato ADS ao meio de cultura e o uso de um corante vital poderá nos fornecer maiores informações sobre a consequência da falta de ADSL para estes organismos.

Outra atividade futura é analisar com detalhes as interações entre os resíduos do sítio ativo da ADSL-Lm e os compostos ADS e SAICAR, a fim de investigar como e se o sítio ativo desta enzima difere dos sítios das ADSLs capazes de converterem ambos substratos. Para tanto, estudos preliminares de “docking” com SAICAR e ADS foram realizados pelo aluno de doutorado Rafael V. C. Guido (membro do nosso grupo), cujos resultados revelaram que o modelo ADS foi posicionado na região do sítio ativo de forma que as distâncias de interação favoreçam a catálise; enquanto o “docking” do SAICAR mostrou que as distâncias de interações entre os grupos químicos deste composto e os resíduos catalíticos não são favoráveis para que ocorra a reação catalítica (figura 1). Estes resultados iniciais

corroboram a ausência da atividade catalítica da ADSL-Lm para o substrato SAICAR.

Considerando-se que a estrutura da ADSL humana acaba de ser depositada no PDB, nosso enfoque será sobrepor e comparar estruturalmente as enzimas do parasito (ADSL-Lm) e do hospedeiro. Além disto, a busca por inibidores da ADSL-Lm também contribuirão para os estudos que visam avaliar o uso da ADSL como alvo para o desenho racional de fármacos contra tripanosomatídeos.

Figura 1: “Docking” dos substratos SAICAR e ADS no sítio ativo da ADSL-Lm. O posicionamento do ADS possibilita interação dos grupos químicos deste composto com os resíduos catalíticos (His 231 e His 153); enquanto os grupamentos carboxílicos do SAICAR estão posicionados à uma distância desfavorável (5,42Å - círculo vermelho) para que ocorra a interação com a His catalítica 231.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahams, J.P. & Leslie, A.G.W. (1996). Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F₁ ATPase. *Acta Crystallographica*, D52: 30-42.
- Aimi J, Badylak J, Williams J, Chen ZD, Zalkin H, Dixon JE. (1990). Cloning of a cDNA encoding adenylosuccinate lyase by functional complementation in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 265 (16):9011-9014.
- Allen, T.E.; Hwang, H.Y.; Jardim, A.; Olafson, R. & Ullman, B. (1995a). Cloning and expression of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 73: 133-143.
- Allen, T.; Hwang, H.Y.; Wilson, K.; Hanson, S.; Jardim, A. & Ullman, B. (1995b). Cloning and expression of the adenine phosphoribosyltransferase gene from *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 74 (1): 99-103.
- Allen, T.E. & Ullman, B. (1994). Molecular Characterization and Overexpression of the Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Gene from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 65:233-245.
- 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.
- Barnes, L.B. & Bishop, S.H. (1975). Adenylosuccinate lyase from human erythrocytes. *The International Journal of Biochemistry*, 6: 497-503.
- Basano, S.A. & Camargo, L.M.A. (2004). Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7(3): 328-337.
- Beck, J.T. & Wang, C.C. (1993). The hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase from *Tritrichomonas foetus* has unique properties. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 60 (2): 187-194.
- Berens, R.L.; Krug, E.C. & Marr, J.J. (1995). In Marr, J.J. and Muller, M. (eds.), *Biochemistry of Parasitic Organisms and its Molecular Foundations*. Academic Press, London.
- Bergmann, B.R.; Costa, S.S. & Moraes, V.L.G. (1997). Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. *Brazilian Journal Association for the Advancement of Science*, 49: 395-402.
- Bergfors, T. (2003). Seeds to crystals. *Journal of Structural Biology*, 142:66-76.
- Berne B. J. and Pecora R., Dynamic light scattering, (1976). *Wiley-interscience* publication.

- Bernstein, E.; Caudy, A.A.; Hammond, S.M. & Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409: 363-366.
- Beverley, S.M. (1988). Characterization of the "unusual" mobility of large circular DNAs in pulsed field-gradient electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 16: 925-938.
- Beverley, S.M. (1995). Identification of *Leishmania* genes by functional complementation: application to drug resistance and virulence. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90 (I):12-14.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brand, L.M. & Lowenstein, J.M. (1978). Inhibition of adenylosuccinase by adenylophosphonopropionate and related compounds. *Biochemistry*, 17: 1365-1370.
- Bridger, W.A. & Cohen, L.A. (1968). The kinetics of adenylosuccinate lyase. *The Journal of Biological Chemistry*, 24: 644-650.
- Brox, L.M. (1973). The cleavage of adenylosuccinate and 5-amino-4-imidazole-N-succino-carboxamide ribonucleotide by an adenylosuccinate lyase from Ehrlich ascites tumor cells. *Canadian Journal of Biochemistry*, 51: 1072-1076.
- Brunger, A.T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, 355: 472-475.
- Burchmore, R.J.S. & Barrett, M.P. (2001). Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *International Journal for Parasitology*, 31: 1311-1320.
- Casey, P.J. & Lowenstein, J.M. (1987). Purification of adenylosuccinate lyase from rat skeletal muscle by a novel affinity column. Stabilization of the enzyme, and effects of anions and fluoro analogues of the substrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 246: 263-269.
- Charland, M.B. (1995). *SigmaPlot for Scientists*. Wm. C. Brown Communications
- Chayen, N.E. (1997). The role of oil in macromolecular crystallisation *Structure*, 5: 1269-1274.
- Chayen, N.E. (2004). Turning protein crystallisation from an art into a science. *Current Opinion in Structural Biology*, 14: 577-583.
- Chu, G.; Vollrath, D. & Davis, R.W. (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*, 234: 1582-1585.

- Coburn, C.M.; Otteman, K.; McNeely, T.; Turco, S. & Beverley, S.M. (1991). Stable DNA Transfection of a wide range of trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 46: 169-179.
- Cowman, A.F. & Crabb, B.S. (2003). Functional genomics: identifying drug targets for parasitic diseases. *Trends in Parasitology*, 19 (11): 538-543.
- Cowtan, K. (1994). DM: an automated procedure for phase improvement by density modification. *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography*, 31: 34-38.
- Croft, S.L. (2001). Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Tropical, Medical and International Health*, 6: 899-905.
- Croft, S.L.; Barrett, M.P. & Urbina, J (2005). Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 21 (11):508-512
- Croft, S.L. & Coombs, G.H. (2003). Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, 19 (11): 502-508.
- Croft, S.L. & Yardley, V. (2002). Chemotherapy of Leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 319-342.
- Cruz, A. & Beverley, S.M. (1990). Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature*, 348: 171-173.
- Dauter, Z. (1999). Data-collection strategies. *Acta Crystallographica*, D55: 1703-1517.
- Dauter, Z., Dauter, M. & Rajashankar, K.R. (2000). Novel approach to phasing proteins: derivatization by short cryo-soaking with halides. *Acta Crystallographica*, D56: 232-237.
- Davies, C. R., Kaye, P., Croft, S.L. & Sundar, S. (2003) Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ*, 326: 377-382.
- Drenth, J. (1994). Principles of Protein X-ray crystallography. Springer-Verlag. New York.
- Elbashir, S.M.; Martinez, A.P.; Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *The EMBO Journal*, 20 (23): 6877-6888.
- Emsley P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica*, D 60: 2126-2132
- Evangelista, J.P.; Cerântola, N.C.M.; Mantovani, M. Nicoluci, R.; Kmoch, S. & Thiemann, O. (2005). Generation of site-directed mutations in the human

- Adenylosuccinate lyase – Determination of the structure-function relationship. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica-SBBQ, L-70.
- Evans, P.R. (1997). Scala. *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter*, 33: 22-24.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 132: 6-13.
- Fire, A.; Xu, S; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811.
- Fish, W.R.; Marr, J.J. & Berens, R.L. (1982). Purine metabolism in *Trypanosoma brucei gambiense*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 714 (3):422-428.
- Gallerano, R.H.; Marr, J.J. & Sosa, R.R. (1990). Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43 (2):159-166.
- Garfin, D. E. (1990). Isoelectric focusing. *Methods in Enzymology*, 182: 459-467.
- Gontijo, B. & Carvalho, M.L.R. (2003). Leishmaniose tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1):71-80.
- Green, D.W.; Ingram, V.M. & Perutz, M.F. (1954). The structure of haemoglobin. IV. Sign determination by The isomorphous replacement method. *The Royal Society of London. Proceedings. Series A.*, 225: 287-307.
- Hadar, R.; Slonim, A. & Kuhn, J. (1976). Role of D-tryptophan oxidase in D-tryptophan utilization by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 125 (3): 1096-1104.
- Hammond, S.M.; Bernstein, E.; Beach, D. & Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404: 293-296.
- Hampel, A.; Labananskas, M.; Connors, P.G.; Kirkegard, L.; Raj Bhandary, U.L. & Sigler, P.B. (1968). Single crystals of transfer RNA from formylmethionine and phenylalanine transfer RNA's. *Science*, 162:1384-1387.
- Handman, E. & Bullen, D (2002). Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, 18: 332-334.
- Hannaert, V.; Bringaud, F.; Oppendoes, F. & Michels, P. (2003) Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2: 11-41.

- Hassan, H.F. & Coombs, G.H. (1986). A comparative study of the purine- and pyrimidine-metabolising enzymes of a range of trypanosomatids. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 84 (2): 219-223.
- Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *The Lancet*, 354: 1191-1199.
- Hochstadt, J. (1978a). Adenine phosphoribosyltransferase from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*, 51: 558-567.
- Hochstadt, J. (1978b). Hypoxanthine phosphoribosyltransferase and guanine phosphoribosyltransferase from enteric bacteria. *Methods in Enzymology*, 51: 549-558.
- International Tables for Crystallography (1996). Vol. A. Space-Group Symmetry. 4ª edição. Editada por Th. Hahn Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Jaeken, J. & Van den Berghe, G. (1984). An infantile autistic syndrome characterized by the presence of succinylpurines in body fluids. *The Lancet*, 2: 1058-1061.
- Jiang, Y.; Allen, T.E.; Carter, D.; Ray, D.S. & Ullman, B. (1996). *Crithidia fasciculata*: Isolation, Sequencing, and Expression of the Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase. *Experimental Parasitology*, 82:73-75.
- Jones, T.A.; Zou, J.Y.; Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallographica*, A47: 110-119.
- Jorgensen, R.A.; Cluster, P.D.; English, J.; Que, Q. & Napoli, C.A. (1994). Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs antisense constructs and single copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Molecular Biology*, 31: 957-973.
- Kapler, G.M.; Coburn, C.M. & Beverley, S.M. (1990). Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Molecular and Cellular Biology*, 10: 1084-1094.
- Kmoch S.; Hartmannová H.; Stiburková B.; Krijt J.; Zikánová M. & Sebesta I. (2000). Human adenylosuccinate lyase (ASL), cloning and characterization of full-length cDNA and its isoform, gene structure and molecular basis for ASL deficiency in six patients. *Human Molecular Genetics*, 9 (10), 1501-1513.
- Kim, H.M.; Kim, L.I.; Lyu, Y.S.; Hwang, C.Y. & An, N.H. (1999). The nitric oxide-production properties of *Solanum lyratum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 67: 163-169.
- Kouni, M.H. (2003). Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacology & Therapeutics*, 99: 283-309.

- La Fortelle, E. & Bricogne, G. (1997). Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement in the MIR and MAD methods. *Methods in Enzymology*, 276: 472-494.
- Lafon, S.W.; Nelson, D.J.; Berens, R.L. & Marr, J.J. (1982). Purine and pyrimidine salvage pathways in *Leishmania donovani*. *Biochemical Pharmacology*, 31: 231-238.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S. & Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26: 283-291.
- Lee, T.T.; Worby, C.; Bao, Z.Q.; Dixon, J.E. & Colman, R.F. (1998). Implication of His⁶⁸ in the substrate site of *Bacillus subtilis* adenylosuccinate lyase by mutagenesis and affinity labeling with 2-[(4-bromo-2,3-dioxobutyl)thio]adenosine 5'-monophosphate. *Biochemistry*, 37: 8481-8489.
- Lee, T.T.; Worby, C.; Bao, Z.Q.; Dixon, J.E. & Colman, R.F. (1999). His⁶⁸ and His¹⁴¹ are critical contributors to the intersubunit catalytic site of adenylosuccinate lyase of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 38: 22-32.
- Lee, T.T.; Worby, C.; Dixon, J.E. & Colman, R.F. (1997). Identification of His¹⁴¹ in the active site of *Bacillus subtilis* adenylosuccinate lyase by affinity labeling with 6-(4-Bromo-2,3-dioxobutyl)thioadenosine 5'-Monophosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 458-465.
- 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*, 26.
- Lipardi, C.; Wei, Q. & Paterson, B.M. (2001). RNAi as random degradative PCR. SiRNAs primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, 107: 297-307.
- Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana (2000). Ministério da Educação. Fundação Nacional da Saúde – FUNASA (<http://www.saude.ms.gov.br/externo/downloads/LeishmanioseTegumentar.pdf>).
- Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (2003). Ministério da Saúde (http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/pdfs/manual_controle_lv.pdf).
- Martinez, S. & Maar, J.J. (1992). Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, 326: 741-744.
- Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Urlaub, H.; Lührmann, R. & Tuschl, T. (2002). Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi. *Cell*, 110: 563-574.

- Matthews, B.M. (1968). Solvent content of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 33: 491-497.
- Matthews, K.R.; Tschudi, C. & Ullu, E. (1994). A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes & Development*, 15; 8 (4): 491-501.
- Matsudaira, P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 262: 10035-10038.
- Momen, H. (1998). Update – Emerging Infectious Diseases – Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 4: 1-3.
- Morel, C.M. (2003). Neglected diseases: under-funded research and inadequate health interventions. Can we change this reality? *European Molecular Biology Organization*, 4: 35-38.
- Musick, W.D. (1981). Structural features of the phosphoribosyltransferases and their relationship to the human deficiency disorders of purine and pyrimidine metabolism. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 11 (1): 1-34.
- Nagem, R.A.P.; Dauter, Z. & Polikarpov, I. (2001). Protein crystal structure solution by fast incorporation of negatively and positively charged anomalous scatterers. *Acta Crystallographica*, D57: 996-1002.
- Nagem, R.A.P.; Polikarpov, I. & Dauter, Z. (2003). Phasing on rapidly soaked ions. *Methods in Enzymology - Macromolecular Crystallography*, 374: 120-137.
- Napoli, C.; Lemieux, C. & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes *In trans*. *The Plant Cell*, 2: 279-289.
- Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallographica A*, 50:157-163.
- Nelson, D. & Cox, M.M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. 3ª edição, cap 8.
- Ngô, H.; Tschudi, C; Gull, K. & Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings National Academic Science USA*, 95: 14687-14692.
- Nishikura, K. (2001). A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell*, 107: 415-418.
- Nykänen, A.; Haley, B. & Zamore, P.D. (2001). ATP Requirements and Small Interfering RNA Structure in the RNA Interference Pathway. *Cell*, 107: 309-321.

- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology*, 276: 307-326.
- Perrakis, A., Morris, R. & Lamzin, V.S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Structural and Molecular Biology*, 6: 458-463.
- Palella, T.D. & Fox, I.H. (1989). In Scriver, C.S., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D. (eds.). *The metabolic basis of inherited diseases*. MacGraw-Hill, New York, 965-1006.
- Pesole, G.; Liuni, S.; Grillo, G.; Licciulli, F.; Mignone, F.; Gissi, C. & Saccone, C. (2002). UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 30 (1): 335-340.
- Pinheiro, R.O. (2004). Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. *Infarma*, 16 (7-8): 79-82.
- Pinto, R.M.; Faraldo, A.; Fernández, A.; Canales, J.; Sillero, A. & Sillero, M.A.G. (1983). Adenylosuccinate lyase from *Artemia* embryos. *The Journal of Biological Chemistry*, 258 (20): 12513-12519.
- Ponte-Sucre, A. (2003). Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2: 14.
- Race, V.; Marie, S.; Vincent, M.F. & Van den Berghe, G. (2000). Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in adenylosuccinate lyase deficiency. *Human Molecular Genetics*, 9 (14): 2159-2165.
- Ratner, S. (1972). Argininosuccinases and adenylosuccinases. In *The enzymes* (ed. P.D. Boyer), 3ª edição. Vol. 7, pp. 167-197. Academic Press, New York.
- Read, R.J. (2001). Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallographica, D57*: 1373-1382.
- Redinbo, M.R.; Eide, S.M.; Stone, R.L.; Dixon, J.E. & Yeates, T.O. (1996). Crystallization and preliminary structural analysis of *Bacillus subtilis* adenylosuccinate lyase, an enzyme implicated in infantile autism. *Protein Science*, 5: 786-788.
- Rhodes, G. (1993). *Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models*. Academic Press, Inc.
- Robinson, K.A. & S. M. Beverley (2003). Improved methods for transient transfections and tests of RNAi approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 128: 217-228.

- Rossmann, M.G. & Blow, D.M. (1962). The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallographica*, 15: 24-31.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. (2000) *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. 3^a edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schneider, T.R., Sheldrick, G.M. (2002). Substructure solution with *SHELXD*. *Acta Crystallographica*, D58: 1772-1779.
- Schwartz, D.C. & Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-size DNAs by Pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37: 67-75.
- Schwarz, D.S.; Hutvagner, G.; Haley, B. & Zamore, P.D. (2002). Evidence that siRNAs Function as Guides, Not Primers, in the *Drosophila* and Human RNAi Pathways. *Molecular Cell*, 10: 537-548.
- Shi, H.; Djikeng, A.; Mark, T.; Wirtz, E.; Tschudi, C & Ullu, E. (2000). Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *RNA*, 6: 1069-1076.
- Sommer, J.M.; Ma, H. & Wang, C.C. (1996). Cloning, expression and characterization of an unusual guanine phosphoribosyltransferase from *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 78(1-2): 185-193.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98 (3): 503-517.
- Spector, T.; Berens, R.L. & Marr, J.J. (1982). Adenylosuccinate synthetase and Adenylosuccinate lyase from *Trypanosoma cruzi*. Specificity studies with potential chemotherapeutic agents. *Biochemical Pharmacology*, 31 (2): 225-229.
- Spector, T.; Jones, T.E. & Elion, G.B. (1979). Specificity of Adenylosuccinate Synthetase and Adenylosuccinate Lyase from *Leishmania donovani*: Selective Amination of an Antiprotozoal Agent. *The Journal of Biological Chemistry*, 254: 8422-8426.
- Stone, L.R.; Zalkin, H. & Dixon, J.E. (1993). Expression, Purification, and Kinetic characterization of Recombinant Human Adenylosuccinate Lyase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (26): 19710-19716.
- Storoni, L.C.; McCoy, A.J. & Read, R.J. (2004). Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Crystallographica*, D 60: 432-438/
- Symersky, J.; Schormann, N.; Lu, S.; Zhang, Y.; Karpova, E.; Qiu, S.; Huang, W.; Cao, Z.; Zhou, J.; Luo, M.; Arabshahi, A.; McKinstry, A.; Luan, C.-H.; Luo, D.; Johnson, D.; An, J.; Tsao, J.; Delucas, L.; Shang, Q.; Gray, R.; Li, S.; Bray, T. & Chen, Y.J. Structural genomics of *Caenorhabditis elegans*: adenylosuccinate lyase. *Sumetido*.

- Terwilliger, T.C., Berendzen, J. (1999). Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallographica*, D55: 849-861.
- Thakur, A. (2003) RNA interference revolution. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6.
- Thiemann, O.H., Maslov, D.A. & Simpson, L. (1994). Disruption of RNA editing in *Leishmania tarentolae* by the loss minicircle-encoded guide RNA genes. *The EMBO Journal*, 13 (23): 5689-5700.
- Toledo, V.P.C.P.; Mayrink, W.; Gollob, K.J.; Oliveira, M.A.P.; Costa, C.A.; Genaro, O.; Pinto, J.A. & Afonso, L.C.C. (2001). Immunochemotherapy in American Cutaneous Leishmaniasis: Immunological Aspects before and after Treatment. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (1): 89-98.
- Toth, E.A. (1999). *Structural studies of adenylosuccinate lyases*. Tese de doutorado. University of California, Los Angeles.
- Toth, E.A. & Yeates, O.T. (2000). The structure of adenylosuccinate lyase, an enzyme with dual activity in the *de novo* purine biosynthetic pathway. *Structure*, 8 (2): 163-174.
- Toth, E.A.; Worby, C.; Dixon, J.E.; Goedken, S.M. & Yeates, O.T. (2000). The crystal structure of adenylosuccinate lyase from *Pyrobaculum aerophilum* reveals an intracellular protein with three disulfide bonds. *Journal of Molecular Biology*, 301: 433-450.
- Trouiller, P.; Olliaro, P.; Torreele, E.; Orbinski, J.; Laing, R. & Ford, N. (2002). Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *The Lancet*, 359: 2188-2194.
- Trouiller, P.; Torreele, E.; Olliaro, P.; White, N.; Foster, S.; Wirth, D. & Pécoul, B. (2001). Drugs for neglected diseases: a failure of the market and a public health failure? *Tropical Medicine and International Health*, 6 (II): 945-951.
- Ullman, B. & Carter, D. (1995). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase as a therapeutic target in protozoal infections. *Infectious Agents and Diseases*, 4 (1): 29-40.
- Ullman, B. & Carter, D. (1997). Molecular and biochemical studies on the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases of the pathogenic haemoflagellates. *International Journal for Parasitology*, 27 (2): 203-213.
- Ullu, E.; Tschudi, C.; & Chakraborty, T. (2004). RNA interference in protozoan parasites. *Cellular Microbiology*, 6 (6): 509-519.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). *MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement*. *Journal of Applied Crystallography*, 30: 1022-1025.

- Van den Berghe, G., Bontemps, F. & Vincent, M.F. (1991). Purine nucleotide cycle, molecular defects and therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 309B: 281-286.
- Victor, J.; Greenberg, L.B. & Sloan, D.L. (1979). Studies of the kinetic mechanism of orotate phosphoribosyltransferase from yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 254: 2647-2655.
- Wang, Z.; Morris, J.C.; Drew, M.E. & Englund, P.T. (2000). Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (51): 40174-40179.
- Wincker, P.; Ravel, C.; Blaineau, C.; Pages, M.; Jauffret, Y.; Dedet, J.P. & Bastien, P. (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Research*, 24: 1688-1694.
- Wirtz, E.; Leal, S.; Ochatt, C. & Cross, G.A.M. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 99: 89-101.
- Woodward, D.O. & Braymer, H.D. (1966). Purification and properties of *Neurospora* adenylosuccinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 241 (3): 580-587.
- World Health Organization - WHO (<http://www.who.int/en/>).
- Zamore, P.; Tuschl, T.; Sharp, P. & Bartel, D. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101: 25-33.

APÊNDICE A

1. ATIVIDADES ACADÊMICAS REALIZADAS PELO ALUNO

1.1 Participação em congressos com apresentação de trabalho (resumos)

- i)* VII Conferência Internacional de Biologia e Radiação Sincrotron (“International Conference on Biology & Synchrotron Radiation”). 30 de julho a 04 de agosto de 2001. São Pedro/SP-Brasil.
- ii)* V Workshop de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos. 29 a 31 de agosto de 2001. São Carlos/SP-Brasil.
- iii)* XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 18 a 21 de maio de 2002. Caxambu/MG-Brasil.
- iv)* VI Workshop de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos. 25 a 27 de setembro de 2002. São Carlos/SP-Brasil.
- v)* XXIX Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doenças de Chagas e XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia. 4 a 6 de novembro de 2002. Caxambu/MG-Brasil.
- vi)* VII Workshop de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos. 22 a 26 de setembro de 2003. São Carlos/SP-Brasil.
- vii)* V Congresso IberoAmericano de Biofísica. 12 a 15 de outubro de 2003. Rio de Janeiro/RJ-Brasil.
- viii)* XXX Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doenças de Chagas e XIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia. 10 a 12 de novembro de 2003. Caxambu/MG-Brasil.
- ix)* 1st “Latin American Protein Society Meeting”. 8 a 12 de novembro de 2004. Angra dos Reis/RJ-Brasil.

1.2 Participação em congressos com apresentação de trabalho (oral)

i) “Preliminary structural characterization by X-ray diffraction of *Leishmania major* adenylosuccinate lyase-ADSL”, apresentação oral na XIII Reunião Anual de Usuários do LNLS, realizada em Campinas-SP, no período de 17 a 18 de fevereiro de 2003.

ii) “Use of RNAi in the validation of potential kinetoplastidae drug targets”, apresentação oral na XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, realizada em Águas de Lindóia-SP, no período de 2 a 5 de julho de 2005.

1.3 Participação em cursos

Curso Latinoamericano de Cristalografia de Macromoléculas, realizado na Fundação Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina, no período de 22/março a 6/abril de 2004.

1.4 Estágio realizado no exterior

Realização de um estágio de três meses (9/07/2004 a 8/10/2004) no laboratório do Prof. Dr. David A. Campbell, na “University of California, Los Angeles” (UCLA).

1.5 Co-orientação

Participação, como co-orientadora, no projeto de iniciação científica: “Caracterização molecular da enzima Adenilosuccinato Liase (ADSL) humana”, PIBIC-CNPq, conduzido pela aluna Jaqueline Pesciuti Evangelista.

1.6 Trabalhos elaborados para serem publicados

i) Molecular and biochemical characterization of *Leishmania major* Friedlin adenylosuccinate lyase – ADSL. Mantovani, M.; Pedrosa, A.L.; Cruz, A.K.; Sturm, N.R.; Campbell, D.A. & Thiemann, O.H. Concluído para submissão.

ii) Crystallization and Preliminary X-Ray Study of Adenylosuccinate Lyase (ADSL) from *Leishmania major* Friedlin. Mantovani, M.; Rojas, A.L.; Nagem, R.A.P.; Polikarpov, I.; Aguilar, C.F. & Thiemann, O.H. Em fase de conclusão.

iii) Elaboração de um artigo relacionado à estrutura cristalográfica da ADSL-Lm. Em andamento.

1.7 Outras atividades

Participação da seleção de alunos para as Olimpíadas de Ciências realizada no Instituto de Física de São Carlos, USP, no período de 31 de janeiro a 4 de fevereiro de 2005.