Enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase de Schistosoma mansoni: Estruturas cristalográficas, Estudos cinéticos e Descoberta de Novos Ligantes

Humberto d'Muniz Pereira

USP/IFSC/SBI

8-2-001561

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

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

São Carlos – 2003

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Pereira, Humberto d'Muniz

"Enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase de *Schistosoma mansoni*: Estruturas Cristalográficas, Estudos Cinéticos e Descoberta de Novos Ligantes"
Humberto d'Muniz Pereira – São Carlos, 2003

Tese (Doutorado) – Área de Física da Universidade de São Paulo, 2003 - Páginas: 202

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

1. Purina nucleosídeo fosforilase.

I. Título

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Av. Trabalhador São-carlense, 400
Caixa Postal 369
13560-970 - São Carlos - SP - Brasil

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE HUMBERTO D'MUNIZ PEREIRA APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 22-12-2003.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Richard Charles Garratt (Orientador e Presidente) – IFSC/USP

Profa. Dra. Gloria Regina Franco – UFMG

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann – IFSC/USP

Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Júnior – UNESP

Dr. Francisco Javier Medrano Martin – LNLS

Jamais para mim a bandeira abaixada,
jamais a última tentativa.

Sir Ernest Shackleton

Aos meus pais, Humberto e Nilda,

À Cíntia e ao Pedro,

Pelo amor, incentivo e paciência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Richard Charles Garratt pela dedicação e confiança que depositou em mim ao longo destes anos.

Ao Profa. Dra. Glória Regina Franco.

Aos amigos da empresa Astex Tecnology: Anne Cleasby, Harren Jhoti, José Cosme e Valerio Berdini.

À empresa Astex Technology por ter me recebido para a realização de parte desta tese, e pela oportunidade de coleta de dados no ESFR e SRS.

Aos amigos José Brandão e Romero Rocha, por terem feito minha estada na Inglaterra mais agradável e divertida.

Aos meus grandes amigos Paulo Sérgio (Paulão e Peninha)

Ao pessoal do grupo de Cristalografia.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação.

À FAPESP pelo auxilio financeiro (processo # 99/09304-3).

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de forma positiva para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS vii

LISTA DE TABELAS xvi

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS xviii

RESUMO xxi

ABSTRACT xxii

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 A esquistossomose 1

1.1.1 Ciclo de vida 2

1.1.2 Produção de Ovos e Patogenia da Doença 4

1.2 Projetos Genomas de *S. mansoni* 5

1.2.1 O primeiro projeto Genoma 5

1.2.2 O Projeto Genoma paulista de *S. mansoni* 7

1.2.3 O Projeto Genoma mineiro de *S. mansoni* 7

1.2.4 O Projeto Genoma de *S. mansoni* do TIGR 8

1.3 Metabolismo de Purinas em *S. mansoni* 9

1.3.1 Análogos de purina como tratamento da esquistossomose 13

1.4 A enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) 14

1.4.1 Mecanismo catalítico 18

1.4.2 Estruturas das PNPs 22

1.5 Utilização da cristalografia de proteínas na busca de ligantes..... 30

2 OBJETIVOS..... 37

3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 38

3.1 Expressão e Purificação da Proteína de fusão MBP-PNP..... 38

3.1.1 Sequenciamento do N-terminal da SmPNP..... 38

3.1.2 Clonagem do cDNA da SmPNP no vetor de expressão pMal c2g.... 39

3.1.2.1 Obtenção do DNA plasmidial do vetor pMALc2G..... 40

3.1.2.2 Transformação de bactérias competentes (Sambrook *et al.*, 1989)..... 40

3.1.2.3 Extração do DNA Plasmidial..... 40

3.1.2.4 Digestão do vetor pMAL c2G com *Bam* HI e *Pst* I..... 41

3.1.2.5 Digestão do vetor pMAL c2X-PNP com *Bam* HI e *Pst* I 42

3.1.2.6 Ligação do cDNA para a SmPNP no vetor de expressão pMAL c2G..... 43

3.1.2.7 Transformação, plaqueamento, seleção de colônias e extração de DNA plasmidial..... 43

3.1.3 Teste de Expressão..... 45

3.1.4 Expressão e purificação da Proteína de fusão MBP-SmPNP..... 46

3.1.4.1 Preparo da coluna e eluição da proteína de fusão..... 47

3.1.4.2 Quantificação da proteína pelo método do coeficiente de extinção..... 48

3.2 Clivagem da proteína de fusão com Fator Xa..... 48

3.3 Purificação da SmPNP..... 48

3.4. Cinética enzimática da enzima SmPNP..... 49

3.5 Cristalização da SmPNP..... 50

3.5.1 Refinamento da condição de cristalização da SmPNP..... 51

3.5.2 Influência do NDSB195 na cristalização da SmPNP..... 53

3.5.3 Influência do NDSB256 na cristalização da SmPNP..... 54

3.5.4 Sistema de soaking para a SmPNP..... 55

3.6. Coleta de dados..... 56

3.6.1. Coleta de dados no LNLS..... 57

3.6.2. Coleta de dados no ESRF..... 57

3.6.3. Coleta de dados no SRS..... 58

3.6.4. Coleta de dados utilizando uma fonte de raios X de ânodo rotatório..... 58

3.7. Resolução das estruturas e refinamento..... 59

3.7.1 Resolução e refinamento da SmPNP a 2,75 Å de resolução, oriundo dos dados coletados no LNLS..... 59

3.7.2 Resolução e refinamento da SmPNP a 1,75 Å de resolução, oriunda da coleta de dados no ESRF..... 61

3.7.3 Resolução e refinamento da SmPNP a 1,9 Å de resolução, oriundo da coleta de dados no SRS..... 62

3.7.4 Resolução e refinamento da SmPNP a 1,9 Å de resolução em complexo com AT2169, oriundo da coleta de dados no SRS..... 63

3.7.5 Resolução e refinamento da SmPNP a 2,0 Å de resolução em complexo com fosfato, oriundo de dados coletado numa fonte de ânodo rotatório..... 64

3.8 Virtual Screening..... 65

3.9 Ensaios de atividade da SmPNP com os compostos oriundos do VS..... 66

3.10. Determinação do valor de IC50 para alguns inibidores da SmPNP.... 67

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 68

4.1. Sequenciamento do N-terminal da SmPNP..... 68

4.2. Expressão e Purificação da proteina SmPNP..... 72

4.2.1. Clonagem do cDNA da SmPNP no vetor de expressão pMal c2G.. 72

4.2.2. Expressão e purificação da Proteína de fusão MBP-SmPNP..... 73

4.2.3. Clivagem da proteína de fusão com Fator Xa..... 73

4.2.4 Purificação da SmPNP..... 73

4.3 Cristalização da SmPNP..... 74

4.3.2. Influência do aditivo NDSB195 na cristalização da SmPNP..... 77

4.4. Coleta e processamento dos dados de difração..... 78

4.4.1 Coleta e processamento de dados de um cristal da SmPNP a 2.75Å de resolução no LNLS..... 78

4.4.2 Coleta e processamento de dados de um cristal da SmPNP crescido na presença de NDSB195 a 1,75Å de resolução no ESRF..... 81

4.4.3 Coleta e processamento de dados de um cristal da SmPNP a 1,9Å de resolução no SRS..... 83

4.4.4 Coleta e processamento de dados de um cristal da SmPNP em complexo com AT2169 a 1,9Å de resolução no SRS..... 84

4.4.5 Coleta e processamento de dados de um cristal da SmPNP em complexo com fosfato a 2,0Å de resolução em uma fonte de ânodo rotatório..... 86

4.5 Resolução e refinamento das estruturas da SmPNP..... 88

4.5.1. Resolução e refinamento da estrutura da SmPNP a 2,75Å..... 88

4.5.1.1 Resolução da estrutura da SmPNP a 2,75Å..... 88

4.5.1.1 Construção do modelo e refinamento da SmPNP a 2,75Å..... 91

4.5.2. Resolução e refinamento da estrutura da SmPNP a 1,75Å..... 94

4.5.3. Resolução e refinamento da estrutura da SmPNP a 1,9Å..... 100

4.5.4. Resolução e refinamento da estrutura da SmPNP em complexo com AT2169 a 1,9Å..... 102

4.5.5. Resolução e refinamento da estrutura da SmPNP em complexo com fosfato a 2,0Å..... 107

4.6 Análise da qualidade dos modelos..... 109

4.6.1 Análise da qualidade da estrutura da SmPNP refinada a 2,75Å..... 110

4.6.2 Análise da qualidade da estrutura da SmPNP refinada a 1.75Å..... 113

4.6.3 Análise da qualidade da estrutura da SmPNP refinada a 1,9Å..... 114

4.6.4 Análise da qualidade da estrutura da SmPNP refinada a 1,9Å em complexo com AT2169..... 116

4.6.5 Análise da qualidade da estrutura da SmPNP refinada a 2,0Å em complexo com fosfato 118

4.7 Análise das estruturas 120

4.7.1 A estrutura da SmPNP 120

4.7.2 O sítio ativo da SmPNP 123

4.7.2.1 O sítio de ligação a base 123

4.7.2.2 O sítio de ligação a ribose 128

4.7.2.3 O sítio de ligação ao fosfato 129

4.7.2.3.1 Comparação entre os sítios de ligação do fosfato da SmPNP e as PNPs bovina e humana 133

4.7.2.3.2 Comparação entre os sítios de ligação a base da SmPNP e as PNPs bovina e humana 136

4.8. Comparação entras as estruturas das SmPNPs 141

4.9. Comparação entras as estruturas da SmPNP e as PNP humana, bovina, de *Cellulomonas* e de *Mycobacterium tuberculosis* 148

4.10 Comparação entre as superfícies de potencial eletrostático da SmPNP e das PNPs bovina e humana 149

4.11.Cinética para a fosforólise de inosina para a SmPNP 155

4.12. Ensaios de atividade com a SmPNP 156

4.12.1. Ensaios de atividade da SmPNP com os compostos oriundos do VS contra a bovPNP 156

4.12.2. Ensaios de atividade da SmPNP com os compostos oriundos do VS contra a SmPNP 157

4.12.3. Determinação do IC50 para os compostos JFD1950 e Formicina B 159

4.13. Experimentos de docking com a SmPNP utilizando o programa GOLD 160

5. CONCLUSÕES 169

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 171

Apêndice A. Artigo Publicado 180

Apêndice B. Fator de Temperatura para a estrutura 2,75..... 185

Apêndice C. Fator de Temperatura para a estrutura NDSB..... 188

Apêndice D. Fator de Temperatura para a estrutura apo 1,9..... 192

Apêndice E. Fator de Temperatura para a estrutura AT2169..... 196

Apêndice F. Fator de Temperatura para a estrutura PO_4..... 199

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*. A- Vermes adultos acasalados, que vivem nas vênulas da parede intestinal. B- Os ovos são eliminados juntamente com as fezes dos pacientes. C- Os ovos eclodem na água, libertando um miracídio que nada até encontrar o hospedeiro (molusco do gênero *Biophalaria*). D- No interior deste, cada miracídio transforma-se em esporocisto primário, que gera esporocistos secundários (esporocistos-filhos), os quais formam cercárias no seu interior. E- Após abandonarem o molusco, as cercárias nadam em busca de novo hospedeiro (vertebrado), onde completarão sua evolução para chegar a vermes adultos 4

FIGURA 1.2 Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em *S. mansoni* (AD- adenosina desaminase, PNP- purina nucleosídeo fosforilase, HGPRT- hipoxantina guanina fosforibosiltransferase, APRT- adenina fosforibosiltraferase)..... 11

FIGURA 1.3 Reação catalisada pela enzima PNP..... 19

FIGURA 1.4 Mecanismo catalítico proposto para a PNP (Erion *et al.*, 1997b)..... 20

FIGURA 1.5 Modelo de fitas para a estrutura da PNP bovina colorida por gradiente de cadeia. O gradiente de cores vai de azul no N-terminal para vermelho no C-terminal, com as cores verde e amarelo como intermediárias..... 25

FIGURA 1.6 Alinhamento das seqüências das PNPs de eritrócitos humanos (huPNP) e de baço bovino (boPNP). Os resíduos que participam do sítio ativo estão sublinhados (Ealick *et al.* 1990)..... 26

FIGURA 1.7 Modo de ligação da immucilina-H no sítio ativo da mtPNP.... 29

FIGURA 3.1 Esquema dos vetores pMAL-c2. O cDNA da SmPNP foi retirado do vetor de fusão pMAL-c2X - SmPNP nos mesmos sítios utilizados na clonagem (*Bam*HI/*Pst*I), e inserido no vector pMAL-c2G digerido com as mesmas enzimas. A clivagem agora se dá no sítio para o Factor Xa que foi inserido durante a clonagem no vetor pMAL-c2X..... 39

FIGURA 4.1. Modelo esquemático da proteína de Fusão MBP-SmPNP. Neste esquema são visualizados os dois sítios para o Factor Xa..... 68

FIGURA 4.2. Gel de poliacrilamida 15%, com o resultado da verificação da clivagem da proteína de fusão pelo Factor Xa. Na banda 1 é visualizada a proteína de fusão (74 kDa). A banda 2 é a MBP (42 kDa), e no número 3 é possível observar a presença de duas bandas para a SmPNP. Canaleta 1- Padrão de peso molecular. Canaleta 2- Proteína de fusão clivada pelo Factor Xa (24 horas). Canaleta 3- Proteína de fusão clivada pelo Factor Xa (48 horas). Canaleta 4- Proteína de fusão clivada pelo Factor Xa (72 horas). Canaleta 5- Proteína de fusão clivada pelo Factor Xa (96 horas)..... 69

FIGURA 4.3. Gel de poliacrilamida 15%, com o resultado da clivagem da proteína de fusão pelo Factor Xa. Canaletas 1 a 4- Proteína de fusão + Factor Xa (300:1), 24, 48, 72 e 96 horas respectivamente. Canaleta 5 Padrão de peso molecular..... 70

FIGURA 4.4. Esquema do resultado do sequenciamento do N-terminal da SmPNP..... 71

FIGURA 4.5. SDS-PAGE com todas as etapas da produção da SmPNP. Canaleta 1- Padrão de peso molecular. Canaleta 2- Lisado de bactérias sem indução. Canaleta 3- Lisado de bactérias após indução com IPTG. Canaleta 4- Proteína de fusão (MBP-SmPNP) purificada da coluna de amilose. Canaleta 5- Proteína de fusão após clivagem com Factor Xa. Canaleta 6- Maltose binding protein (MBP) purificada na coluna Poros 20SP. Canaleta 7- SmPNP purificada na coluna Poros 20SP. Canaleta 8- Padrão de peso molecular..... 74

FIGURA 4.6. Cristais da SmPNP obtidos na condição 43 do fatorial *Crystal Screen Cryo*. A- Cristais de SmPNP (maior dimensão ~0,2 mm). B- Monocristal com maior dimensão de ~0,4 mm, infelizmente este cristal cresceu sobre uma fibra de papel. C- Monocristais da SmPNP (maior dimensão ~0,1 mm)..... 75

FIGURA 4.7. Cristais da SmPNP crescidos na ausência (A) e na presença (B) do aditivo NDSB195. O mesmo aumento foi utilizado em ambas as fotos..... 77

FIGURA 4.8. Formulas moleculares dos NDSB195 (A) e NDSB256 (B). A diferença entre estes NDSBs é a presença do grupo fenil no NDSB256..... 78

FIGURA 4.9. Alinhamento entre a SmPNP e a PNP bovina. A identidade sequencial é baixa tanto no N terminal como no C terminal. Os resíduos do sítio ativo estão sublinhados e as identidades estão indicadas com asteriscos..... 89

FIGURA 4.10. Empacotamento cristalino da SmPNP. Vista ao longo do eixo x. Os trímeros encontram-se arranjados em camadas perpendiculares ao eixo x, ou seja, o eixo de ordem 3 não cristalográfico está disposto paralelo ao eixo x..... 90

FIGURA 4.11. Empacotamento cristalino da SmPNP. Vista ao longo do eixo y. Os trímeros encontram-se arranjados em camadas perpendiculares ao eixo x..... 91

FIGURA 4.12. Pontes de hidrogênio entre loop de ligação ao fosfato (resíduos 61-67) da subunidade C (vermelho) e os resíduos 244, 265 e 268 de outra subunidade C (azul) relacionada por simetria. A ponte de hidrogênio entre os resíduos S62 e E261 é mediada por uma molécula de água..... 94

FIGURA 4.13. Mapa de densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 2,5σ para parte do sítio ativo da SmPNP. Pode-se observar uma densidade eletrônica compatível com o íon acetato presente como tampão na solução de cristalização. Os resíduos chaves do sítio de ligação a base (E203 e N245) são mostrados nesta figura. Observa-se também parte da densidade eletrônica para o aditivo NDSB195 utilizado na cristalização da SmPNP..... 95

FIGURA 4.14. Mapa de densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 2,5σ para parte do sítio ativo da SmPNP. É possível observar a densidade eletrônica compatível o aditivo NDSB195 utilizado na cristalização da SmPNP. Esta densidade eletrônica localiza-se nos sítios de ligação a ribose e ao fosfato. Pode-se observar a densidade eletrônica para o íon acetato (ACT)..... 96

FIGURA 4.15. Molécula do aditivo NDSB195 e seu mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ. O grupo sulfato da molécula de NDSB195 interage com os resíduos do sítio de ligação ao fosfato. As moléculas de água são representadas como esferas modificadas em vermelho..... 98

FIGURA 4.16. Pontes de hidrogênio entre o sítio de ligação ao fosfato da SmPNP e o NSDB195. Duas das pontes de hidrogênio são mediadas por moléculas de água (W255 e W 158)..... 99

FIGURA 4.17. Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc para parte do sítio de ligação a base da SmPNP na estrutura com NDSB195 a 1.75Å de resolução. O íon acetato interage diretamente com a cadeia lateral do resíduo E203 100

FIGURA 4.18. Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ para o sítio de ligação a base da subunidade B da SmPNP em complexo com o composto AT2169. A molécula AT2169 realiza 5 pontes de hidrogênio, duas com os resíduos E203 e N245 e uma com a molécula de água W215, a qual é ancorada pelos resíduos S247 e E203 103

FIGURA 4.19. Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ para o sítio de ligação a base da subunidade C da SmPNP. Devido a menor concentração do tampão acetato na solução de soaking, o acetato que interagia com o resíduo E203 em outras estruturas da SmPNP foi deslocado, e não mais está presente na estrutura. Observa-se duas moléculas de água (W167 e W63) interagindo com o grupo carboxílico do resíduo E203 104

FIGURA 4.20. Mapa de densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 3σ. Pode ser visualizada a densidade eletrônica correspondente a uma molécula de DMSO a qual inicialmente foi interpretada como sendo de uma molécula de glicerol 105

FIGURA 4.21. Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ para a região de ligação ao DMSO na subunidade A da SmPNP. O átomo de oxigênio do DMSO realiza uma ponte de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo R103 106

FIGURA 4.22. Sítio de ligação ao fosfato da subunidade A da SmPNP. A- Mapa de densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 3σ para a uma densidade presente no sítio de ligação ao fosfato. Esta densidade é compatível com uma molécula de fosfato. B- Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ para a molécula de fosfato adicionada na densidade eletrônica presente no sítio de ligação ao fosfato 108

FIGURA 4.23. Diagrama de Ramachandran para a o trímero da SmPNP refinada a 2,75Å de resolução 110

FIGURA 4.24. Diagrama de Ramachandran para a o trímero da SmPNP refinada a 1,75Å de resolução 113

FIGURA 4.25. Diagrama de Ramachandran para a o trímero da SmPNP refinada a 1,9Å de resolução 115

FIGURA 4.26. Diagrama de Ramachandran para a o trímero da SmPNP refinada a 1,9Å de resolução em complexo com AT2169..... 117

FIGURA 4.27. Diagrama de Ramachandran para a o trímero da SmPNP refinada a 2,0Å de resolução em complexo com fosfato..... 119

FIGURA 4.28. Estrutura do monômero da SmPNP na forma apo em modelo de fitas. Em vermelho são vistas as α-hélices e em azul as fitas beta. A estrutura da SmPNP contem um barril misto de 9 fitas, o qual pode ser visualizado na parte central da estrutura. 121

FIGURA 4.29. Estrutura do trímero da SmPNP (forma apo) em modelo de fitas. As fitas betas estão coloridas em azul, as α-hélices em vermelho e os loops em cinza. o maior loop (resíduos 144-169) da SmPNP o qual realiza grande parte dos contatos entre as subunidades do trímero está colorido em verde..... 122

FIGURA 4.30. Grupamento de metioninas situado no centro da estrutura da SmPNP. Na formação deste grupamento participam as metioninas 210 e 214 de cada subunidade. O eixo de ordem três passa pelo centro da Figura..... 123

FIGURA 4.31. Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ para os resíduos Y202 (A) e I246 e S247(B) da SmPNP em complexo com NDSB. Estes resíduos participam do sítio de ligação a base e são mutados quando comparados as huPNP e boPNP. O resíduo S247 somente é encontrado na SmPNP quando comparado a PNPs de outras 14 espécies..... 124

FIGURA 4.32. Posicionamento do resíduo Y202 com relação ao composto AT2169. A- O grupo fenil de Y202 está a 34^0 com relação a um plano perpendicular ao plano do anel do composto AT2169. B- Vista a 90^0 com relação a AT2169, o grupo fenil de Y202 encontra-se deslocado com relação ao centro do composto AT2169..... 125

FIGURA 4.33. Parte do sítio de ligação a base da SmPNP em complexo com acetato (SmPNP a 1,75Å). A cadeia lateral do resíduo S247 aponta diretamente para o interior do sítio. Pode-se visualizar a interação entre S247 e E203 por pontes de hidrogênio via uma molécula de água. A molécula de água W70 é ancorada por três pontes de hidrogênio. A presença de S247 é uma característica única da SmPNP quando comparada a PNPs de outras espécies..... 127

FIGURA 4.34. Pontes de hidrogênio no sítio ativo da SmPNP. O resíduo E203 interage com o resíduo N197 e com a água W50 via pontes de hidrogênio. Na boPNP o resíduo correspondente a N197 é L195, e o resíduo E201 realiza uma ponte de hidrogênio com uma água situada aproximadamente na mesma posição do átomo Nδ do resíduo N197 na SmPNP..... 128

FIGURA 4.35. Sítio de ligação ao fosfato da SmPNP em complexo com fosfato (subunidade A). Uma extensa rede de pontes de hidrogênio com participação de 5 moléculas de água é observada na interação do fosfato. O resíduo Y90 participa da interação com o fosfato via a molécula de água W279. Ao todo o fosfato realiza 12 pontes de hidrogênio com o seu sítio de ligação..... 130

FIGURA 4.36. Sobreposição das subunidades A (vermelho), B (azul) e C (amarelo) para o sítio de ligação ao fosfato. Pode-se observar que na subunidades A e C a posição do fosfato é basicamente a mesma, enquanto que na subunidade B ocorre um desvio quando comparada as outras subunidades. O loop 34-38 possui a mesma conformação nas subunidades A e C, enquanto na subunidade B este loop adota outra conformação 131

FIGURA 4.37. Sobreposição dos sítio de ligação ao fosfato da SmPNP (azul) e da boPNP (vermelho) (3pnp). As moléculas de água conservadas nas duas estruturas estão em W1: W116(301) e W102(302). Na Figura e na legenda o primeiro número corresponde ao resíduo na SmPNP e o número entre parênteses ao correspondente na boPNP..... 134

FIGURA 4.38. Sobreposição do sítio de ligação do fosfato da SmPNP (azul) e da huPNP (vermelho). Na Figura o primeiro número corresponde ao resíduo na SmPNP e o segundo número ao correspondente na huPNP. Diferentemente da estrutura da boPNP, a huPNP não possui nenhuma água no sitio de ligação com o fosfato..... 135

FIGURA 4.39. Sobreposição de parte do sitio de ligação a base da SmPNP (azul) e da huPNP (vermelho). As principais diferenças entre estes dois sítios são: as mutações I246K244 e S247V245; o deslocamento da cadeia principal dos resíduos 244-247 (242-245); o diferentes rotâmeros para o resíduo E203 (E201); o posicionamento das moléculas de água W50 (SmPNP) e W294 (huPNP), além da presença do acetato na SmPNP. Na Figura o primeiro número corresponde a numeração na SmPNP e o número entre parênteses a huPNP..... 137

FIGURA 4.40. Sobreposição de parte do sitio de ligação a base da SmPNP (azul) e da huPNP (vermelho). Podem ser observadas as diferentes conformações para os resíduos Y202(F200) e especialmente para o resíduo H259(257). O resíduo Y202 realiza uma ponte de hidrogênio com H259..... 139

FIGURA 4.41. Sobreposição de parte do sítio de ligação a base da SmPNP (azul) e da boPNP em complexo com hipoxantina (vermelho). Em ambas as estruturas o resíduo E203(201) aponta para o centro do sítio ativo, e realiza pontes de hidrogênio com as moléculas de água W50 (SmPNP) e W401 (boPNP)..... 140

FIGURA 4.42. Sobreposição de parte do sitio de ligação a base da SmPNP (azul) e da boPNP (vermelho). As conformações dos resíduos Y202(F200) e H259(257) são bastante semelhantes..... 141

FIGURA 4.43. Sobreposição de parte do sítio ativo da SmPNP em complexo com NDSB195 (azul) e a SmPNP na forma apo a 1,9 Å de resolução (vermelho). Pode-se observar a diferença na cadeia lateral do resíduo M211 nas duas estruturas. Quando ligado ao NDSB195 e na ausência de um ligante no sitio de ligação a ribose. Podem ainda serem observadas as diferenças nas cadeias laterais dos resíduos N245 e Y203 nas duas estruturas..... 144

FIGURA 4.44. Sobreposição do sítio ativo da SmPNP em complexo com NDSB195 (azul) e a forma apo a 1,9Å de resolução (vermelho). Nesta Figura pode ser observado o deslocamento do resíduo H259 na SmPNP em complexo com NDSB195 e sem este ligante. Este deslocamento ocorre afim de ser possível acomodar o NDSB195..... 145

FIGURA 4.45. Sobreposição de parte do sítio ativo das estruturas da SmPNP em complexo com AT2169 (azul), em complexo com NDSB195 (vermelho), e na forma apo (amarelo). Pode-se observar o deslocamento dos resíduos 244-246, possibilitando a ligação do composto AT2169. O maior deslocamento ocorre para o resíduo N245 e o menor para o S247. São visualizados dois conjuntos de moléculas de água conservadas em todas as estruturas. Não é observada a sobreposição da SmPNP em complexo com fosfato pois esta estrutura é muito semelhante à forma apo..... 146

FIGURA 4.46. Sítio de ligação ao fosfato nas estruturas da SmPNP em complexo com NDSB195 (vermelho) e em complexo com fosfato (amarelo). O loop de ligação ao fosfato (resídulos 34-36) apresenta duas conformações diferentes nestas estruturas da SmPNP. Entretanto ainda ocorre a ponte de hidrogênio entre o S35 N e o grupo sulfato (do NDSB) ou com o fosfato. 147

FIGURA 4.47- Alinhamento da seqüências das PNPs de *S. mansoni* e bovina. Neste alinhamento é visualizada a distribuição dos resíduos carregados. Os resíduos positivos são coloridos em azul e os negativos em vermelho. O sítio ativo está sublinhado e em amarelo tem-se as duas diferenças do sítio ativo da SmPNP com relação a boPNP..... 150

FIGURA 4.48 Superfície de potencial eletrostático para as duas faces da SmPNP (olhando ao longo do eixo de ordem três), calculado com o programa GRASP. Na sua maioria as cargas na superfície da SmPNP são positivas, diferentemente da huPNP e boPNP 152

FIGURA 4.49 Superfície de potencial eletrostático para as duas faces da boPNP (olhando ao longo do eixo de ordem três), calculado com o programa GRASP. Na sua maioria as cargas na superfície da boPNP são negativas, e semelhante a huPNP 153

FIGURA 4.50 Superfície de potencial eletrostático da huPNP (olhando ao longo do eixo de ordem três), calculado com o programa GRASP. Na sua maioria as cargas na superfície da huPNP são negativas..... 154

FIGURA 4.51. Gráfico de Michaelis-Menten para fosforólise de inosina pela SmPNP, absorbância está expressa em mU..... 155

FIGURA 4.52. Complexo entre a SmPNP e inosina, obtido através do programa GOLD..... 162

FIGURA 4.53. Comparação do modo de ligação da inosina na SmPNP(azul) (docking) e na boPNP (vermelho) (cristalográfico). A inosina liga-se de modo similar nas duas estruturas, o que valida este experimento de docking..... 163

FIGURA 4.54. Complexo entre a SmPNP e a base de hipoxantina, obtido através do programa GOLD..... 164

FIGURA 4.55. Comparação do modo de ligação da hipoxantina na SmPNP (azul) e na boPNP (vermelho) (1a9q), quando comparada ao complexo da boPNP, a hipoxantina na smPNP encontra-se deslocada, entretanto são mantidas as mesmas interações nas duas estruturas..... 165

FIGURA 4.56 Complexo entre a SmPNP e guanosina, obtido através do programa GOLD..... 166

FIGURA 4.57 Complexo entre a SmPNP e immucinlina-G (A) e immucilina-H (B). O modo de ligação destes composto e bastante similar, entretanto a imm-g como realiza mais uma ponte de hidrogênio com o E203..... 167

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 Análogos de purinas utilizados contra esquistossomose (Senft & Crabtree; 1977)..... 13

TABELA 4.1. Estatísticas do escalonamento da SmPNP a 2,75Å de resolução..... 80

TABELA 4.2. Parâmetros e valores finais do processamento dos dados da SmPNP a 2,75Å de resolução..... 81

TABELA 4.3. Estatísticas do escalonamento da SmPNP a 1,75Å de resolução..... 82

TABELA 4.4 Parâmetros e valores finais do processamento dos dados da SmPNP a 1,75Å de resolução..... 82

TABELA 4.5 Estatísticas do escalonamento da SmPNP a 1,9Å de resolução..... 83

TABELA 4.6 Parâmetros e valores finais do processamento dos dados da SmPNP a 1,9Å de resolução..... 84

TABELA 4.7 Estatísticas do escalonamento da SmPNP em complexo com AT2169 a 1,9Å de resolução..... 85

TABELA 4.8 Parâmetros e valores finais do processamento dos dados da SmPNP em complexo com AT2169 a 1,9Å de resolução..... 86

TABELA 4.9 Estatísticas do escalonamento da SmPNP a 2,0Å de resolução em complexo com fosfato a 2,0Å de resolução..... 87

TABELA 4.10 Parâmetros e valores finais do processamento dos dados da SmPNP em complexo com fosfato a 2,0Å de resolução..... 87

TABELA 4.11 Desvio médio quadrático (em angstrons) para os Cα dos trímeros da SmPNP. NDSB corresponde a SmPNP em complexo com NDSB195; Apo 1,9Å a SmPNP na forma apo; Apo 2,75Å a SmPNP refinada a 2,75Å; PO_4 a SmPNP em complexo com fosfato e AT2169 a SmPNP em complexo com AT2169 142

TABELA 4.12. Valores para a sobreposição dos monômeros em cada estrutura da SmPNP 142

TABELA 4.13. Valores para o desvio médio quadrático para as estruturas da SmPNP e da huPNP humana (1m73), boPNP (4pnp), de *Cellulomonas* (1c3x) e de *Micobacterium tuberculosis* (1g2o) 149

TABELA 4.14. Comparação dos valores das constantes catalíticas para SmPNP, boPNP e huPNP 156

TABELA 4.15. Compostos selecionados e porcentagem de inibição para a SmPNP 157

TABELA 4.16. Resultado para os melhores ensaios de atividade da SmPNP usando os compostos selecionados no VS para a SmPNP 158

TABELA 4.17. Valores do goldscore para substratos e inibidores da SmPNP 161

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ - comprimento de onda

°C – graus Celsius

μL – microlitro

Å – Angstrons

AD - Adenosina desaminase

ADP – Difosfato de adenosina

AMP- Monofosfato de adenosina

AP -Adenosina fosforilase

APRT - Adenina fosforibosiltransferase

ATP – Trifosfato de adenosina

boPNP - Purina nucleosídeo fosforilase de baço bovino

CCP4 - Collaborative Computing Project Number 4

cDNA – DNA complementar

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa

DMSO- Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ESRF- European Synchronton Radiation Facility

ESTs - Expressed Sequence Tags ou Etiquetas de Seqüências Transcritas

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

FIOCRUZ- Fundação Instituto Osvaldo Cruz

FMRP-USP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

GDP - Difosfato de guanosina

GMP - Monofosfato de guanosina

GTP - Trifosfato de guanosina

HGPRT - Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

huPNP – Purina nucleosídeo fosforilase de eritrócitos humanos

ICB/UFMG – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Minas Gerais

IMP - Monofosfato de inosina

IPTG - Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo

LNLS - Laboratório Nacional de Luz Sincrontron

M – molar

MBP-PNP - Maltose binding protein – purina nucleosídeo fosforilase

meio 2XYT - 16g de triptona, 10g de extrato de levedura, 5g NaCl / L

meio LB - 10g de triptona, 10g de extrato de levedura, 10g NaCl / L

MES - Ácido 2-[N-Morfolino]etanosulfônico

min – minutos

mL – mililitro

mM – milimolar

MTAP - 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase

NBMPR -Nnitrobenziltioinosina

NDSB195 - non-detergent sulphobetaine 195

NDSB256 - non-detergent sulphobetaine 195

PDB - Protein Data Bank

PEG - polietilenoglicol

PNP - Purina nucleosídeo fosforilase

PRPP - 5-fosforribosil-1-pirofosfato

RNA – Ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SmPNP - Purina nucleosídeo fosforilase de Schistosoma mansoni

SRS - Synchronton Radiation Source

Tris- [Tris(hidoximetil)aminoetano] -

UV-VIS – ultra violeta - visível

VS – virtual screening

RESUMO

O parasita *Schistosoma mansoni* não possui a via de síntese de bases púricas e depende integralmente da via de salvação de purinas para o seu requerimento de purinas. Uma das enzimas participantes desta via é a Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) (E.C. 2.4.2.1). A PNP catalisa a fosforólise reversível de nucleosídeos de purina para gerar a base correspondente e ribose-1-fosfato. No Projeto Genoma de *Schistosoma mansoni*, o gene para esta enzima foi identificado. O cDNA para a PNP de *S. mansoni* (SmPNP), possui 1055pb e codifica para uma proteína de 287 aminoácidos, que possui 49% de identidade quando comparada a PNP de eritrócitos humana ou de baço bovino. O gene foi clonado no vetor de expressão pMAL C2G, e expresso na forma de uma proteína de fusão, com MBP (80 mg/L). Após a purificação da proteína de fusão, a clivagem proteolítica das duas proteínas foi realizada utilizando-se o Factor Xa. A SmPNP foi então purificada utilizando uma coluna de troca cationica. Foram determinadas as constantes catalíticas para a fosforólise de inosina pela SmPNP, as quais são 3μM para o K_M e 222 s^{-1} para o k_{cat}. O valor para o K_M é o menor já descrito para uma PNP de baixa massa molecular. Foram obtidos cristais da SmPNP utilizando 18-24 % de PEG 1500, 20% de glicerol em 32mM de tampão acetato de sódio pH 4,9-5,0. Quando utilizado o aditivo NDSB195 na cristalização da SmPNP a solução de cristalização foi 28-30% de PEG 1500, 20% de glicerol em 32mM de tampão acetato de sódio pH 4,9-5,0. Cinco conjunto de dados de difração de raios X foram obtidos tanto na presença como na ausência de ligantes. A resolução deste conjuntos de dados variou de 2,75Å a 1,75Å. Todas estas estruturas foram resolvidas pelo método da substituição molecular, sendo que na primeira estrutura resolvida (a 2,75Å) foi utilizado a estrutura da PNP bovina como modelo de busca, e na resolução das estruturas subsequentes foi utilizado a estrutura da SmPNP como modelo de busca. A estrutura da SmPNP a 1,75Å de resolução foi obtida a partir de um cristal crescido na presença de NDSB195, e após sua resolução foi encontrado este composto ligado em todos os sítios ativos da SmPNP via a sítio de ligação do fosfato. Foram também obtidas as estruturas da SmPNP na forma apo a 1,9Å de resolução e em complexo com fosfato a 2,0Å de resolução. Todas as estruturas foram utilizadas na comparação com outras PNPs de baixa massa molecular. Utilizando a estrutura da SmPNP a 1,75Å de resolução, foi realizada uma busca por compostos (Virtual Screening) que ligassem a SmPNP. Nesta busca foi utilizando o programa GOLD, utilizando uma base de dados de cerca de 36000 compostos com peso molecular inferior a 280 Da. Vinte e dois compostos foram selecionados com base no escore de docking e pelas interações (pontes de hidrogênio) com os resíduos chave do sítio ativo. Utilizando PNP bovina e a mesma abordagem de docking foram selecionados 19 compostos. Estes compostos foram ensaiados contra a SmPNP e 12 compostos se mostraram capazes de inibir a SmPNP. Um complexo entre a SmPNP e o composto AT2169 (oriundo do VS) foi obtido e refinado. Esta abordagem foi validada utilizando ligantes conhecidos das PNPs.

ABSTRACT

The parasite *Schistosoma mansoni*, unlike its mammalian hosts, lacks the "de novo" pathway for purine biosynthesis and depends on the salvage pathways for its purine requirements. One component of this pathway is Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) (E.C. 2.4.2.1). PNP catalyzes the reversible phosphorolysis of purine nucleosides to generate the corresponding purine base and ribose 1-phosphate. In the *Schistosoma mansoni* Genome Project the gene for this enzyme was isolated. The SmPNP cDNA was sequenced, corresponding to 1055 bases that code for a 287 amino acid protein with 49% sequence identity to its human erythrocyte homologue. The SmPNP gene was cloned into the pMAL C2G expression vector and the recombinant fusion protein was produced and purified using an amylose affinity column (approx. 80mg/mL). The fusion protein is composed of a Maltose Binding Protein adjoined to the SmPNP. After cleavage with Factor Xa, the cleavage product was purified using a cation exchange column. The K_M and k_{cat} of SmPNP for inosine phosphorolisis was determined to be 3μM and 222 s^{-1} respectively. This corresponds to the lowest value for KM yet described for a low molecular mass PNP. SmPNP crystals were obtained by the hanging drop method, using 18-24% PEG 1500, 20% glycerol in the presence of 32mM sodium acetate buffer (pH 4.9-5.0). When NDSB195 was used as an additive in the SmPNP crystallization the solution used was 28-30% PEG 1500, 20% glycerol and 32mM sodium acetate buffer (pH 4.9-5.0).Five datasets were obtained in the presence and absence of ligands, varying in resolution from 2,75 to 1,75Å. All structures were solved by the molecular replacement method. The first structure (at 2,75Å) was solved using the bovine PNP as the search model and in the remaining structures the search model was the SmPNP structure itself. The 1,75Å structure was obtained from a crystal grow in the presence of the additive NDSB195, and after its determination NDSB195 was observed bound to the SmPNP active site via its phosphate binding site.Structures were also obtained for the apo SmPNP at 1,9Å and its complex with phosphate at 2,0Å resolution. All structures were used in the comparison with other low molecular mass PNPs. The SmPNP structure at 1,75Å resolution was used in the search small molecule ligands, which potentially bind to SmPNP via virtual screening. For this purpose the program Gold together with a database of 36000 compounds with MW lower than 280Da was used.As a result 22 compounds were selected using the docking score and the H-bonding interaction with the key residues of the SmPNP active site. Using the bovine PNP and same docking approach 19 compounds were selected. These 41 compounds were assayed against SmPNP enzyme and 12 compounds were active against the SmPNP. One complex between SmPNP and one of these compound (AT2169) was obtained and refined. This virtual screening approach was validated using known ligands of PNPs including inosine, guanosine, immucilins, etc.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A esquistossomose mansônica

A esquistossomose é um dos maiores problemas em saúde pública nos países em desenvolvimento. Ela é endêmica em 76 países e territórios e com relação às doenças tropicais situa-se em segundo lugar em termos de impacto social e econômico (Shuhua *et al.*, 2002). É uma doença parasitária crônica, debilitante e, em muitos casos fatal, que afeta indivíduos principalmente em áreas rurais, sendo endêmicas em países tropicais e subtropicais (WHO; 1991), e está associada diretamente às condições sócio-econômicas da população. A Organização Mundial de Saúde estima que em 1999, 625 milhões de pessoas estão situadas em áreas de risco, com 193 milhões de pessoas infectadas (WHO, 1999). A esquistossomose é causada por platelmintos trematodos do gênero *Schistosoma*, sendo a espécie *S. mansoni* o mais prevalente e a única encontrada no Brasil (Johnston *et al.*, 1993).

Na América do Sul e no Caribe estima-se vários milhões de casos. No Brasil, admite-se existir mais de 10 milhões de indivíduos infectados. A gravidade que assume a doença em muitos casos e o déficit orgânico que produz fazem da esquistossomose um

dos mais sérios problemas da saúde pública, e pesado fardo para as populações das áreas endêmicas (Rey; 1991).

Já que não existe ainda uma vacina contra esquistossomose, a população em risco tem que ser tratada após infecção com as drogas existentes, tais como oxamniquina, praziquantel, niridazol, etc. Oxamniquina é a droga de escolha no tratamento da doença no país. Apesar da sua eficiência, apresenta alguns efeitos colaterais sendo os mais graves alucinações, tonturas e mudança de comportamento. É uma droga que deve ser usada com muito critério em pacientes com distúrbios neuropsíquicos (Neves; 1991). Já foram relatados casos de cepas de *S. mansoni* resistentes a oxamniquina justificando a continuidade de pesquisas para o desenvolvimento de novas drogas. Embora estas drogas ajam de maneira efetiva contra a esquistossomose, não houve até o momento uma redução no número de casos, e tem se expandido em certas áreas como a periferia dos centros urbanos. Este aumento tem se dado principalmente pela reinfecção dos indivíduos após o tratamento, sendo necessário a repetição do tratamento em intervalos de tempo variáveis (Rey; 1991).

1.1.1 Ciclo de vida

O *S. mansoni* possui um ciclo de vida heteroxênico, que se alterna entre dois hospedeiros distintos (Figura 1.1): hospedeiro intermediário representado principalmente pelo caramujo do gênero *Biomphalaria* (*B. glabrata* no Brasil), onde ocorre a

reprodução assexuada e hospedeiro definitivo vertebrado representado pelo homem, onde ocorre a fase sexuada da reprodução (Pessoa & Martins; 1977).

A infecção tem início quando o indivíduo se expõe à água contaminada com a forma laval (cercária) liberada pelo caramujo. As cercárias penetram ativamente na pele, perdem a cauda e se transformam em vermes imaturos. Os mesmos migram para o sistema sanguíneo ou linfático e chegam aos pulmões onde passam para o sistema porta intra-hepática e atingem a maturidade sexual. Os machos e fêmeas vivem acasalados e migram até as veias mesentéricas inferiores onde ocorre a oviposição. Os ovos eliminados nas fezes eclodem em contato com a água liberando o miracídio que penetra o caramujo se transformando em esporocistos que dão origem às cercárias, reiniciando o ciclo (uma parte dos ovos liberados pelos vermes adultos se alojam na mucosa intestinal e posteriormente nos capilares do sistema porta levando a formação de granulomas ou provocam hemorragias e ulcerações durante a sua passagem para a luz intestinal (Pessoa & Martins; 1977).

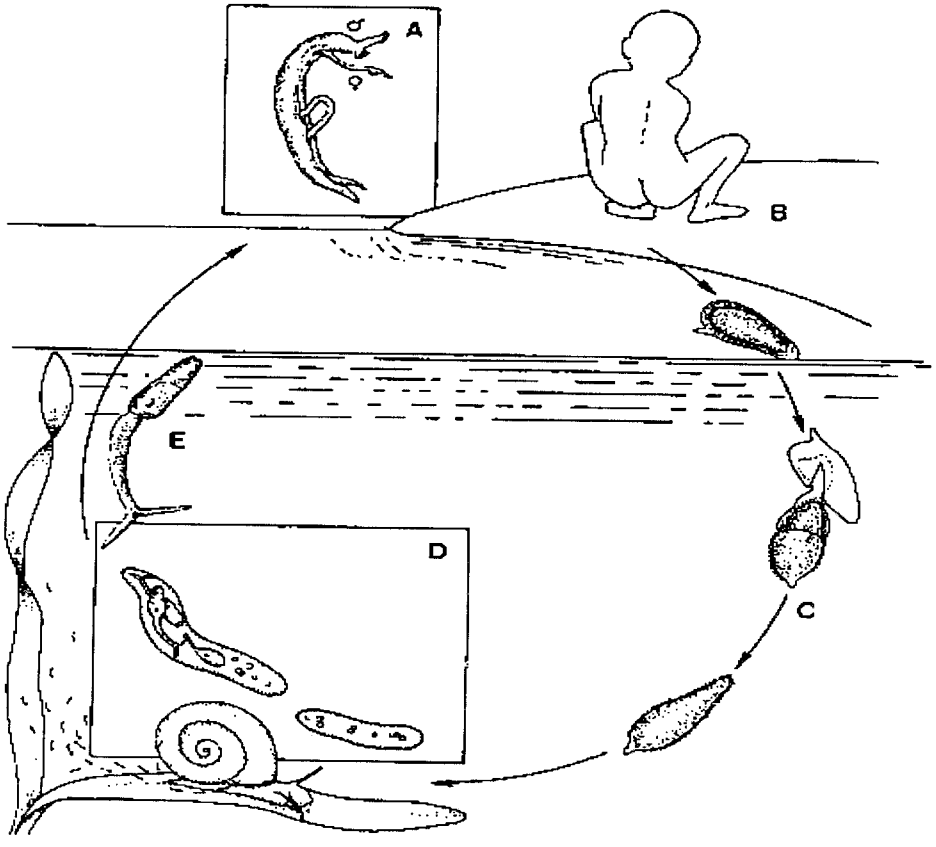


FIGURA 1.1- Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*. A- Vermes adultos acasalados, que vivem nas vênulas da parede intestinal. B- Os ovos são eliminados juntamente com as fezes dos pacientes. C- Os ovos eclodem na água, libertando um miracídio que nada até encontrar o hospedeiro (molusco do gênero *Biophalaria*). D- No interior deste, cada miracídio transforma-se em esporocisto primário, que gera esporocistos secundários (esporocistos-filhos), os quais formam cercárias no seu interior. E- Após abandonarem o molusco, as cercárias nadam em busca de novo hospedeiro (vertebrado), onde completarão sua evolução para chegar a vermes adultos (Rey; 1991).

1.1.2 Produção de ovos e patogenia da doença

A produção de ovos é o aspecto mais significante do parasitismo e a maior causa da patologia da esquistossomose, estes ovos tanto provocam hemorragias e ulcerações durante a passagem pela luz intestinal como provocam a formação de granulomas no

intestino, fígado ou em outros locais onde se alojam. A estimativa da produção de ovos fertilizados pelo parasita é de centenas a milhares de ovos/dia. Acredita-se que esta fecundidade persista por anos e representa um exemplo notável de uma capacidade biossintética altamente especializada (Senft *et al.,* 1972). Segundo Rey (1991), cada fêmea põe um ovo por vez, com uma média diária em roedores infectados de 300 ovos. A longevidade dos esquitossomulos não parece ultrapassar, em geral, 3 a 5 anos no caso do *S. haematobium*. Quanto ao *S. mansoni*, deduz-se que a longevidade seja o dobro (existem relatos de pacientes eliminando ovos até 30 anos depois de deixar a área endêmica).

Desta forma, esta impressionante capacidade biosintética requer uma ativo metabolismo de nucleotídeos de purina, tanto como fonte de energia, na forma de ATP, como para o suprimento de bases de purina nas sínteses de DNA e RNA (Senft *et al.* 1972).

1.2 Projetos Genoma de *S. mansoni*

1.2.1 O primeiro projeto Genoma

O "Projeto Genoma de *Schistosoma mansoni*", iniciou-se em 1992 como iniciativa conjunta entre três laboratórios, dois no Brasil: laboratório do Prof. Sérgio Danilo Pena (ICB/UFMG) e do Dr. Andrew Simpson (René Rachou, FIOCRUZ) e um nos EUA "The Institute for Genome Research". Foi montado um programa de descoberta gênica baseada em ESTs (Expressed Sequence Tags ou Etiquetas de

Seqüências Transcritas) obtidos de uma biblioteca de cDNA de vermes adultos. Após sequenciamento intensivo, foram produzidas as primeiras 600 ESTs, correspondentes a 169 genes distintos do parasita (Franco *et al.*, 1995). ESTs são seqüências parciais de cDNA obtidas aleatoriamente de bibliotecas. Ela é uma etiqueta do gene, sendo usada para a identificação deste por pesquisa de homologia em bancos de dados de DNA ou proteína. A obtenção das ESTs consiste em uma única corrida eletroforética dos produtos de seqüenciamento do cDNA, num seqüenciador automático, que produz seqüências em torno de 400 bases de DNA (Adams *et al.*, 1993).

Desde o inicio do projeto vários outros colaboradores se juntaram ao grupo e têm produzidos centenas de ESTs por ano com o apoio financeiro da organização mundial de saúde (TDR-WHO).

O objetivo principal deste programa de seqüenciamento é a descoberta de genes de interesse para um melhor entendimento da biologia do parasita, assim como para a obtenção de novos antígenos para desenvolvimento de vacinas ou alvos protéicos para quimioterapia. Entre as primeiras ESTs produzidas até o momento, foram identificados transcritos correspondendo a enzimas de diferentes vias metabólicas, proteínas citoplasmáticas estruturais e regulatórias, proteínas de membrana, proteínas nucleares, etc. Um dos genes identificados codifica uma enzima que participa da via de salvação de purinas, a Purina Nucleosídeo Fosforilase (Franco *et al.*, 1995).

1.2.2 O Projeto Genoma paulista de *S. mansoni.*

O projeto genoma paulista de *S. mansoni* começou em abril de 2001 e teve como meta sequenciar em 18 meses cerca de 120.000 ESTs geradas pela técnica ORESTES (Dias-Neto *et al.*, 2000), de diferentes estágios de vida do parasita. O custo estimado do projeto foi de US$ 840.000,00 financiado pela FAPESP. Era esperado gerar 40 a 50 milhões de bases do cDNA de *S. mansoni*, o que representa uma cobertura estimada de 1 a 1,5 vezes o transcriptoma do parasita.

Como resultado foram obtidos ao todo 163.586 ESTs utilizando a técnica ORESTES e 11.902 a partir de uma biblioteca não normalizada. Estas seqüências foram filtradas e resultaram em 124.640 reads o que resultou na montagem de 30.988 conjuntos de ESTs, as quais geraram 12.322 contigs. Este valor representa uma cobertura estimada de 92% do transcriptoma de *S. mansoni*, sendo o número de genes total estimado em 14.000 (Verjovski-Almeida *et al.*, 2003). Todo material produzido no projeto pode ser acessado "on-line" e possui várias ferramentas de busca (http://cancer.lbi.ic.unicamp.br/schisto6/).

1.2.3. O Projeto Genoma mineiro de *S. mansoni*

Foi criada em 2002, a Rede Genoma do Estado de Minas Gerais, a partir de um edital da FAPEMIG específico para a criação de uma rede para o estudo do genoma do *S. mansoni* no estado de Minas Gerais. Neste projeto a FAPEMIG investiu R$ 2 milhões e o CNPq R$ 1,8 milhão. Como Minas Gerais é uma região endêmica de

esquistossomose, com quase 1 milhão de pessoas infectadas, e concentra alguns dos maiores especialistas brasileiros no assunto, o *S. mansoni* foi considerado o objeto de estudo para dar início aos trabalhos. O parasita foi eleito o melhor modelo para a rede também pela experiência já acumulada por dois grupos de pesquisa do Estado: um no CPqRR/Fiocruz, e outro na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

O objetivo geral do projeto é caracterizar o transcriptoma do organismo *S. mansoni* em diversos estágios do desenvolvimento e com isso implementar a Rede Genoma do Estado de Minas Gerais. Serão produzidas cerca de 100.000 seqüências de cinco estágios de desenvolvimento : miracídio, ovo, cercária, fase pulmonar e vermes adultos, até o final de 2003. Será ainda realizado o sequenciamento completo de 500 genes selecionados pelo seu interesse biológico. Além disto será disponibilizada na Internet uma base de dados curada (análoga ao UniGene) onde cada registro represente um gene distinto e contenha: (i) acesso às seqüências de ESTs e à seqüência de mRNA modelada ou à seqüência determinada experimentalmente; (ii) a fonte de isolamento; (iii) a identificação do produto gênico inferida pela homologia a genes ortólogos; (iv) imagem 3D da proteína deduzida modelada por homologia com ortólogas já resolvidas, se houver; (v) o número de acesso dos clones estocados para distribuição.

1.2.4 O Projeto Genoma de *Schistosoma mansoni* do TIGR

O TIGR iniciou um projeto de sequenciamento em larga escala do genoma do *Schistosoma mansoni*. A estratégia empregado consiste de duas fases: na primeira fase 13 Mb de seqüências genômicas descontinuas serão geradas e cerca de 8Mb de

seqüência completa de cormossomos selecionados. Neta fase cerca de 27000 seqüências de cerca de 500 pb cada serão obtidas a partir do sequenciamento das extremidades de duas bibliotecas de BACs. Estas seqüências não apenas aumentará a descoberta gênica inicial, mas também será utilizada como marcadores para a construção de um mapa de seqüências de alta resolução. A Segunda fase do projeto envolve um sequenciamento altamente acurado e minucioso de varias regiões genomicas do *S. mansoni*, pela seleção interativa de BACs com sobreposições minimas para um sequenciamento completo. Para este trabalho uma biblioteca de BACs com grandes insertos (tamanho médio dos insertos ~100kb, equivalentes a 8,5X o genoma haploide) já disponível, construída a partir da linhagem Porto Rico pelo Dr. Denis Le Paslier, bem como de outra biblioteca de BACs a ser construída pelo Dr. Pieter de Jong. O TIGR espera a conclusão deste projeto em dois anos.

1.3 Metabolismo de Purinas em *S. mansoni*

Nucleotídeos de purina são requeridos em todos os organismos para síntese de DNA, RNA e outros metabólitos. Estes nucleotídeos podem ser obtidos pela via de síntese "de novo" ou pela via de salvação de purinas. A via "de novo" utiliza precursores simples para a síntese de vários nucleotídeos. Por outro lado, a via de salvação de purinas é a reutilização de vias pelas quais o organismo pode satisfazer seu requerimento de purinas pré-formados (El Kouni *et al.* 1987).

Senft *et al.* (1972), em seu trabalho sobre metabolismo de purinas em *S. mansoni*, mostraram uma rápida incorporação de adenina em nucleotídeos e não

conseguiram demonstrar a incorporação de ^{14}C-glicina e ^{14}C-glicose no anel púrico. Esta evidência tanto mostra uma grande dependência de um suprimento externo de bases pré formadas para a síntese de nucleotídeos, como demonstra a perda da via "de novo" de síntese de purinas. Esta evidência foi confirmada por Dovey *et al.* (1984), fato que mostra a dependência do parasita pela via de salvação de purinas. Deste modo, o *S. mansoni* ao contrário do seu hospedeiro não possui a via biossintética de purinas "de novo" e depende da via de salvação para seu requerimento de purina (Senft & Crabtree; 1983). Senft *et al.* (1973a) estudando a deposição de adenosina em *S. mansoni*, sugeriram que a via preferencial utilizada para o anabolismo de *S. mansoni* seria utilizando as enzimas adenosina fosforilase (AP) e adenina fosforibosiltransferase (APRT).

Senft *et al.* (1973b) identificaram várias enzimas de via de salvação em extratos de *S. mansoni*, entre elas fosforibosiltransferases, quinases, difosfoquinase, desaminases, e uma fosforilase.

Stegman *et al.* (1973) demonstraram que a adenosina pode ser processada por dois mecanismos, uma via direta utilizando a adenosina quinase que produz diretamente AMP, e a via indireta: adenosina →inosina →hipoxantina →IMP →AMP, sendo que a via indireta é muito mais ativa que a via direta utilizando a quinase.

Extratos de *S. mansoni* convertem mais da metade da adenosina utilizada como substrato convertendo-a para inosina e hipoxantina *in vitro*, utilizando as enzimas adenosina desaminase (AD) e purina nucleosídeo fosforilase (PNP) (Crabtree & Senft; 1974; Senft & Crabtree; 1977). Uma parte da adenosina é clivada em adenina via adenosina fosforilase, quando PRPP (5-fosforribosil-1-pirofosfato) está presente, com

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

posterior formação de AMP pela fosforibosilação da adenina pela enzima APRT (Crabtree & Senft; 1974).

Miech *et al.* (1975) reportaram que extratos e o vômito de *S.mansoni* possuem uma atividade enzimática que catalisa a fosforólise de adenosina produzindo adenina e ribose-1-fosfato, e que esta atividade é devido a enzima adenosina fosforilase. Esta atividade é inteiramente separada da enzima purina nucleosídeo fosforilase.

Senft & Crabtree (1977), esquematizaram as várias vias pelas quais a adenosina é convertida em nucleotídeos em *S. mansoni*. Este esquema é mostrado na Figura 1.2.

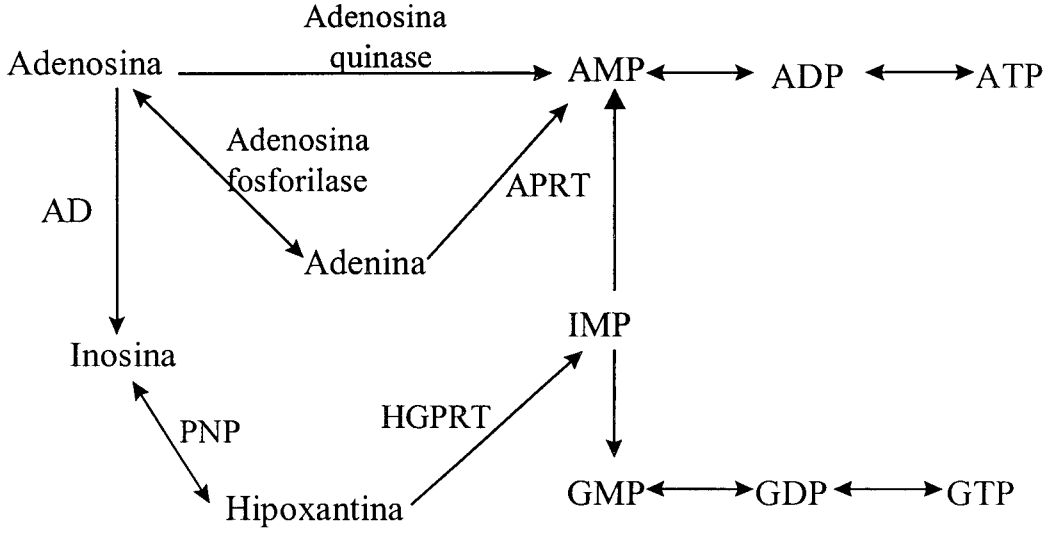


FIGURA 1.2- Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em *S. mansoni* (AD- adenosina desaminase, PNP- purina nucleosídeo fosforilase, HGPRT- hipoxantina guanina fosforibosiltransferase, APRT- adenina fosforibosiltraferase).

Uma das vantagens da via de salvação é o fato de que a via "de novo" requer grande quantidade de energia para síntese de bases púricas (Voet & Voet; 1995). Com relação à via de salvação de purinas vale ressaltar que ao contrário da biosíntese de

purinas, que é idêntica em todas as células, a via de salvação é diversa em características e distribuição.

Verjovski-Almeida *et al.*, (2003), produziram cerca de 163.000 ESTs de bibliotecas de cDNA normalizadas de seis estágios de vida do parasita. Estes autores também tornaram disponível na internet todas as seqüências e as análises de cluster produzidas (http://cancer.lbi.ic.unicamp.br/schisto6/). Foi então realizada um busca para as enzimas da via de salvação de purina, para verificar ou não a presença das enzimas relatadas por Senft & Crabtree (1977). Foram encontradas seqüências correspondentes as enzimas adenosina desaminase (10 reads), adenosina quinase (5 reads), purina nucleosídeo fosforílase (26 reads), adenina fosforibosiltransferase (9 reads) e para hipoxantina fosforibosiltransferase (18 reads).

Um fato que chama a atenção é a ausência de seqüências para a enzima adenosina fosforilase, porem foram encontradas 16 reads para a enzima 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase ou MTAP. A MTAP é especifica para o análogo de nucleosídeo 5'-deoxi-5'metiltioadenosina e tem sido isolada e caracterizada em bactérias e em humano. Desta forma ainda resta uma dúvida quanto a presença da enzima adenosina fosforilase em *S. mansoni*, pois as características reportadas por Crabtree & Senft (1974), diferem bastante da enzima MTAP.

Para as enzimas da via de salvação de purina sequenciados por Verjovski-Almeida *et al.*, (2003), o maior número de reads foi para a enzima PNP o que pode indicar uma grande nível de expressão e por conseguinte uma grande atividade da PNP em *S. mansoni*.

1.3.1 Análogos de purina como tratamento da esquistossomose

Senft & Crabtree; (1977) testaram *in vitro*, vários análogos de purinas, que inibem enzimas da via de salvação, com o intuito de utilizá-los no tratamento da esquistossomose, como é mostrado na Tabela 1.1.

TABELA 1.1- Análogos de purinas utilizados contra esquistossomose (Senft & Crabtree, 1977).

Análogo	**Enzima inibida**
Formicina	Adenosina fosforilase e PNP
Tubercidina	PNP e Adenosina desaminase
2-Fluoro-2'-deoxiadenosina	Adenosina fosforilase e adenosina desaminase
6-tioguanosina	Adenosina desaminase e PNP

Ross & Jaffe; (1972) mostraram que contra *S. mansoni in vitro,* tubercidina causa separação dos casais de *S. mansoni*, perda da capacidade de sucção da ventosa ventral, alteração do padrão de atividade muscular e inibição da postura de ovos em concentrações menores que 10^{-7}M. Jaffe *et al.* (1973) citados por Senft & Crabtree; (1977) mostraram que tubercidina pode ser usada como agente anti-esquistossomose em macacos.

Como a tubercidina é bastante tóxica para o hospedeiro, uma terapia alternativa foi relatada por El Kouni *et al.* (1983), onde uma parte do sangue do hospedeiro era retirada, incubada com tubercidina, e reinjetada no hospedeiro. Porém, este tratamento muito interessante do ponto de vista acadêmico, é inviável para tratamento da população por resultar em vários riscos para o paciente.

El Kuoni *et al.* (1983) mostraram que um potente inibidor do transporte de nucleosídeos (nitrobenziltioinosina, NBMPR) quando coadministrado com tubercidina inibe o transporte de tubercidina em camundongos, protegendo assim os animais das doses letais deste análogo, mas não interfere com captação de tubercidina em *S. mansoni*. Deste modo, altas doses de tubercidina quando administrado com NBMPR é seletivamente tóxico para esquistossomos, mas não para seu hospedeiro. Dovey *et al.* (1985) trabalhando com tubercidina e outros análogos em esquistossomulos confirmaram este fato.

El Kouni & Cha; (1987) demonstraram após 4 horas de incubação, a incorporação em *S. mansoni* de tubercidina, nebularina, 9-deazaadenosina, 5'-deoxi-5'iodo-2-fluoroadenosina, 7,9 dideaza-7-thiaadenosina e toyocamicina. Porém, em contraste com os mamíferos, a adição de inibidores do transporte de nucleosídeos (como NBMPR) não alterou o padrão de incorporação dos análogos de adenosina e sugerem que o transporte de nucleosídeos de purina em esquitossomas é diferente do seu hospedeiro, tornando possível a coadministração de um análogo de purina e um inibidor do transporte de nucleosídeos que protege o hospedeiro da toxicidade destes análogos. Esta abordagem foi utilizada também por El Kuoni *et al.* (1987).

1.4 A enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP)

As nucleosídeos fosforilases foram primeiro reconhecidas como um grupo distinto de enzimas nos estudos de Kalckar (Parks & Agarwal; 1972). Previamente acreditava-se que a clivagem enzimática da ligação glicosídica dos nucleosídeos era

resultado de hidrólise, e as enzimas que catalisavam esta reação eram referidas como nucleosidases. Duas evidências sugeriram que a fosforólise e não hidrólise era a responsável pela clivagem do nucleosídeo. Em 1935, Klein (Parks & Agarwal; 1972) descobriu que a clivagem de nucleosídeos era estimulada por fosfato ou arsenato, e em 1937, Cori e colaboradores relataram uma descoberta histórica, que glicogênio fosforilase catalisa a despolimerização do glicogênio pela liberação de glicose-1-fosfato, a forma pela qual a energia da ligação glicosídica é retida. Esta descoberta foi a chave para o entendimento do mecanismo pelo qual as ligações glicosídicas dos nucleosídeos são enzimaticamente clivadas de maneira reversível. Desta forma, foi identificado e purificado o produto da reação ribose-1-fosfato, o que se assemelha a glicose-1-fosfato (Parks & Agarwal; 1972).

A Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) (EC 2.4.2.1), é a enzima que catalisa a fosforólise reversível de desoxi e ribonucleosídeos de purinas para gerar a base púrica correspondente e ribose-1-fosfato (Erion *et al.* 1997a), bem como muitos nucleosídeos análogos.

Termodinamicamente, o equilíbrio da reação é deslocado em favor da síntese de nucleosídeos, e no caso das enzimas de mamíferos a constante de equilíbrio de ~50. Entretanto, *in vivo* a fosforólise e favorecida, devido ao acoplamento com duas reações enzimáticas adicionais, a oxidação e a fosforibosilação das bases liberadas pela xantina oxidase e hipoxantina fosforibosiltransferase respectivamente (Bzowska *et al.*, 2000).

A PNP tem sido considerada com um alvo para uma intervenção quimoterápica desde a descoberta feita por Giblett *et al.*, (1975), de que uma criança sofrendo de lifopenia, e com células T seriamente defeituosas, mas com uma imunidade normal

mediada por células B, exibia uma total ausência de atividade de PNP. Estes sintomas da deficiência de PNP imediatamente sugeriram a possibilidade de aplicações quimioterápicas de potentes inibidores da PNP, como agentes imunosupressores seletivos para suprimir a resposta imune em transplante de órgãos, tratamento de leucemias de células T, doenças auto-imunes mediadas por células T, como lupulus eritrematoso e artrite reumatóide (Stoeckler., 1984).

Duas grandes classes de PNP têm sido caracterizadas, uma chamada de "baixa massa molecular" ou inosina-guanosina fosforilases (~90kDa), são enzimas triméricas, específicas para nucleosídeos 6-oxopurina e encontrada principalmente, mas não exclusivamente, em mamíferos (Stoeckler *et al.* 1978, Stoeckler; 1984, Bzowska *et al.* 1990). Algumas PNPs de microorganismos se encaixam nesta classe como as de *Bacillus stearothermophilus* PNP I (Hamamoto *et al.* 1997a) e a de *Bacillus cereus* (Gilpin; Sadoff; 1971). As estruturas das PNPs de eritrócitos humano e de baço bovino são conhecidas, nas quais existe uma conservação total dos resíduos envolvidos no sítio ativo (Ealick *et al.* 1990, Koellner *et al.* 1997, Narayana *et al.* 1997), também foram determinadas as estruturas das PNPs de *Cellulomonas* sp. (Tebbe *et al.*, 1999) e de *Mycobacterium tuberculosis* (Shi *et al.*, 2001).

As PNPs de diversos microorganismos são a segunda classe de PNPs, a chamada de "alta massa molecular" com peso molecular entre 110kDa e 150kDa (Robertson & Hoffee; 1973, Jensen & Nygaard; 1975, Hori *et al.* 1989). A especificidade das PNPs desta classe é muito menor que as PNPs de baixa massa molecular, e seus substratos incluem os nucleosídeos 6-oxo- e 6-aminopurina como também alguns nucleosídeos não

purinas (Bzowska *et al.* 1990). Em alguns casos, a adenosina é melhor substrato do que guanosina ou inosina como na adenosina fosforilase de *Bacillus subtilis* (Jensen; 1978).

Existem ainda PNps que nãoi encaixam na classificação acima como as PNPs de *E. coli* (Jensen & Nygaard; 1975), *S. typhimurium* (Robertson & Hoffee; 1973, Jensen & Nygaard; 1975), *Sulfolobus sulfataricus* (Cacciapuoti *et al.* 1994) e de *Bacillus subtilis* (Jensen; 1978), são hexâmeros de subunidades idênticas. A PNP II de *Bacillus stearothermophilus* (Hamamoto *et al.* 1997b), possui quatro subunidades. Desta classe, somente a estrutura da PNP de *E. coli* é conhecida (Mao *et al.* 1997, Koellner *et al.* 1998).

Stoeckler *et al.* (1997) em um estudo de mutagênese sítio dirigida na PNP humana, modificaram a especificidade para as bases de purina. A mutação Asn243Asp levou a uma preferência de adenosina sobre inosina de 2,4 vezes, como também um aumento de 5000 vezes no k_{cat} para adenosina e um acréscimo de 4300 vezes na eficiência catalítica geral. Neste mesmo artigo foi demonstrada a dependência do pH na fosforólise de adenosina na enzima nativa e mutada (Asn243Asp). A enzima mutante retêm 20-60% da atividade catalítica da enzima nativa para bases 6-oxopurinas e 4-10% para os seus nucleosídeos. Foi utilizado 500μM de adenosina em pHs que variavam de 5,5 a 8; e como resultado foi obtido que a enzima nativa mantêm alta atividade em pH 7,5, enquanto a mutante exibe um declínio na atividade em pHs superiores a 7. Ambas as enzimas exibiram uma taxa de declínio na atividade similar em pHs abaixo de 6,5. Ainda foi preparado um duplo mutante Glu201Gln:Asn243Asp, este duplo mutante teve um aumento de 190 vezes na eficiência catalítica para adenosina, uma preferência para adenosina 480 vezes superior que para inosina.

Zimmerman *et al.* (1971) mostraram que PNPs de quatro fontes (cérebro e fígado de rato, eritrócitos humanos e baço bovino) apresentam uma baixa atividade intrínseca de síntese de adenosina a partir de ribose-1-fosfato e adenina. Esta atividade é de 274 a 1630 vezes menor de que a produção de inosina a partir de hipoxantina e ribose-1-fosfato.

Senft *et al.* (1973a) relataram uma pequena produção de adenina a partir de adenosina em *S. mansoni* inteiros e Miech *et al.* (1975), demonstraram a capacidade de clivagem de nucleosídeos mediada por fosfato em *S. mansoni*, e que o parasita possui as enzimas Adenosina Fosforilase e a PNP. Os mesmos autores testaram a atividade da PNP de *S. mansoni* para a formação de hipoxantina a partir de inosina marcada em diversos pH e foi observado que a PNP tem uma alta atividade em pH 6,0, a qual declina rapidamente em pHs superiores a 7,0.

1.4.1 Mecanismo catalítico

Como citado anteriormente a enzima purina nucleosídeo fosforilase catalisa a fosforólise reversível de nucleosídeos de purinas para gerar a base púrica correspondente e ribose-1-fosfato (Figura 1.3) (Erion *et al.* 1997a).

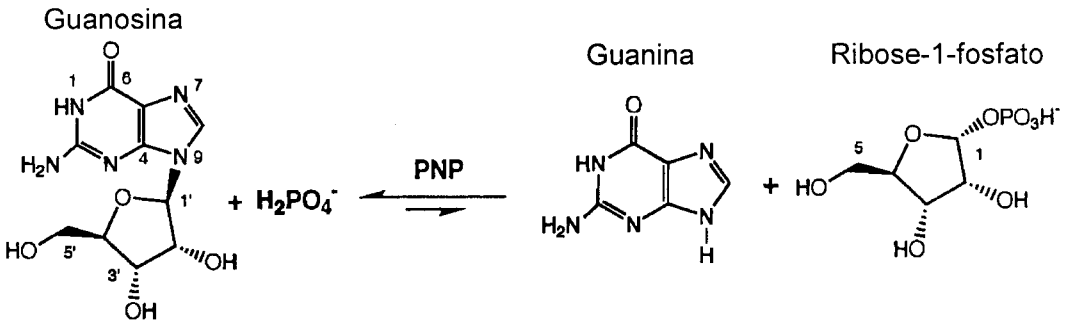


FIGURA 1.3 Reação catalisada pela enzima PNP.

Estudos caracterizando a reação por cinética enzimática indicaram que a catálise requer a formação de um complexo ternário da enzima, do nucleosídeo e do ortofosfato, e que a reação procede sem envolvimento de intermediários fosforilados ou ribosilados da enzima (Erion *et al.*, 1997b).

O mecanismo catalítico tem sido exaustivamente estudado por cinética enzimática. A PNP é específica para nucleosídeos de purina na conformação β e cliva a ligação glicosídica com inversão da configuração para produzir α-ribose-1-fosfato. Postula-se que a clivagem da ligação procede por um mecanismo tipo S_N1 baseado em 20-30% de efeito isotópico cinético de α-deutério observado durante a fosforólise ou arsenolise de 1'-[^{2}H]inosina. Estes resultados implicam que a quebra da ligação está a frente da formação da ligação na direção fosforolítica, e que o estado de transição tem uma considerável característica de íon de oxocarbenio (Erion *et al.*, 1997b).

A estabilização pela enzima do caractere de íon de oxocarbenio do anel da pentose no estado de transição (TS) é suportado pela ligação extremamente potente das immucilinas (K_i na faixa de picomolar), que são inibidores análogos ao estado de transição nas quais a caraterística de íon ribooxocarbenio são providas pelo iminoribitol. A característica de ion de oxocarbenio do TS, entretanto, foi encontrada como uma

característica catalítica comum das purina N-ribohidrolases, fosforilases e transferases, chamadas de enzimas "cortadoras" de N-ribose. (Bzowska *et al.*, 2000).

Dados estruturais gerados por cristalografia de raios X e modelagem molecular e dados de cinética enzimática gerados para mutantes da PNP e uma variedade de pseudosubstratos sugerem que a PNP catalisa a fosforólise de nuceosídeos de purina utilizando uma mecanismo catalítico assitido pelo substrato como mostrado na Figura 1.4. A eficiente catálise é obtida pela formação de um complexo de alta energia e pela utilização de resíduos do sítio ativo e o cosubstrato fosfato para estalilizar o TS (Erion *et al.*, 1997b).

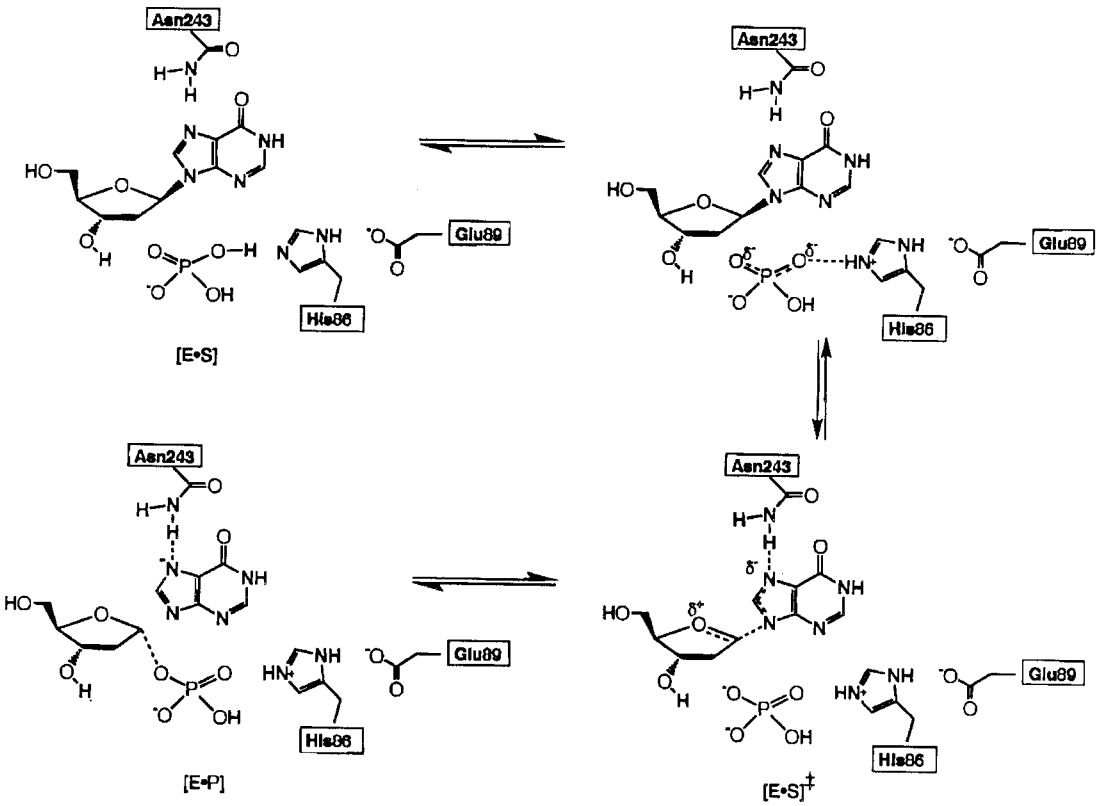


FIGURA 1.4 Mecanismo catalítico proposto para a PNP (Erion *et al.*, 1997b).

Na direção fosforolítica, a clivagem da ligação glicosídica é facilitada pela ligação do nucleosídeo numa conformação de alta energia (+ac) e do envolvimento eletrostático do estado basal. Este envolvimento eletrostático surge pela desprotonação do fosfato monoânion para diânion pelo residuo H86. A H86 carreagado positivamente é estabilizado pelo E89 através de um sistema de transferencia de carga reminescente da tríade catalítica encontrada nas serino proteases e em outras enzimas. A desprotonação do fosfato aumenta a nucleofilicidade e posiciona uma grande carga negativa nas proximidades do oxigênio ribosil endociclico. Como a carga positiva do fosfato aumenta, a repulsão eletrônica entre o oxigenio carregado negativamente do fosfato e o par eletrônico do oxigênio ribosil endociclico leva a um estiramento eletrostático e enfraquecimento da ligação glicosídica. Como ocorre a quebra da ligação glicosídica, um ion oxocarbenio intermediário é formado e simultaneamente estabilizado pelo fosfato diânion. Portanto o mecanismo catalítico assistido pelo substrato utiliza o fosfato para tanto iniciar a clivagem da ligação como para estabilizar o íon oxocarbenio através da formação de par iônico forte. O uso do fosfato para a estabilização do íon oxocarbenio intermediário é a característica estrutural chave que diferencia as fosforilases das glicosidades e das nucleosidades (Erion *et al.*, 1997b).

A clivagem da ligação glicosídica resulta numa acumulação de densidade eletrônica no anel de purina. A delocalização da carga negativa dos átomos N9 e N7 é predita a partir de cálculos de mecânica quântica para os três possíveis tautomeros de guanina. No mecanismo catalítico proposto, a base de purina carregada negativamente resultante, é estabilizada por uma ponte de hidrogênio formada entre amináocido N243 e o átomo N7. Esta ponte de hidrogênio preferencialmente estabiliza o TS referente ao

estado basal devido a grande forca das pontes de hidrogênio envolvendo os grupos carregados (Erion *et al.*, 1997b).

Na direção sintética, o mecanismo catalítico é esperado ser reverso aos passos para a fosforólise de nucleosídeos. Além disto como a reação catalisada pela PNP é reversível, o TS estabilizado pela PNP é postulado como idêntico tanto para a síntese como para a fosforólise de nucleosídeos (Erion *et al.*, 1997b).

1.4.2 Estruturas das PNPs

Com relação as PNPs de baixo peso molecular são conhecidas as estruturas cristalográficas das PNPs de baço bovino (boPNP) (Ealick *et al.* 1990, Koellner *et al.* 1997), de eritrócitos humanos (huPNP) (Narayana *et al.* 1997), de *Cellulomonas* sp. (Tebbe *et al.*, 1999) e de *Mycobacterium tuberculosis* (Shi *et al.*, 2001).

A estrutura da PNP humana foi resolvida a 3,2 Å de resolução por Ealick *et al.* (1990). A PNP humana é trimérica no estado cristalino, no qual as subunidades são relatadas por um eixo de ordem três cristalográfico. O mesmo autor também relata que cada subunidade na proteína possui uma estrutura α/β como folha aberta tipo "doubly wound". A característica geral na subunidade é a estrutura folha β mista, a qual é formada por uma folha β mista composta de 8 fitas β (Folha A) e uma folha β mista composta de 5 fitas β (Folha B), resultando num β-Barril distorcido. Sete α-hélices com tamanhos variando entre 9 a 17 resíduos, circundam a folha-β mista.

Com base na estrutura cristalográfica da PNP humana foi calculado que seu conteúdo de α-hélices é 30%, e de folhas-β 22%, estes valores corrigiram os dados

obtidos de dicroismo circular, o qual tinha previsto que a estrutura da PNP humana possuía cerca 32% de folhas-β e uma quantidade desprezível de α-hélice (Ealick *et al.* 1990).

O sítio ativo da huPNP foi caracterizado na presença de 5'-iodoformicina B e 8-iodoguanina. O sítio ativo é localizado próximo a interface entre duas subunidades. Oito segmentos são envolvidos na ligação do substrato, sendo um da subunidade adjacente (resíduos 32-33, 84-88, 115-118, 200-201, 217-220, 243-244, 257 e o resíduo 159 da subunidade adjacente) (Ealick *et al.* 1990).

Narayana *et al.* (1997), publicaram a estrutura da PNP de eritrócitos humanos a 2,75 Å de resolução. A estrutura proposta é similar à estrutura de mais baixa resolução reportada por Ealick *et al.* (1990), mas revela detalhes sobre as cadeias laterais e a estrutura da água envolvida no sítio de ligação do substrato. As coordenadas da huPNP e huPNP em complexo com guanina estão disponíveis no Protein Data Bank (coordenadas 1ula e 1ulb, respectivamente).

Koellner *et al.* (1997), relatam que a estrutura da huPNP (Ealick *et al.* 1990; Narayana *et al.* 1997) foi obtida a partir de cristais crescidos com sulfato de amônio em pH 5,5, condições onde a atividade da huPNP é bastante diminuída e o sítio de ligação ao fosfato é ocupado por um íon sulfato, impossibilitando estudos com inibidores que interagem com o sítio de ligação ao fosfato. Além disto, a enzima humana é inerentemente instável, e é composta de uma mistura de variantes isoelétricas, o que em parte justifica a limitada qualidade dos cristais obtidos.

Azevedo Jr *et al.*, (2003), utilizando a PNP humana produzida de forma recombinante, cristalizou e obteve a estrutura da huPNP a 2,3Å de resolução, a qual

quando sobreposta a huPNP em complexo com guanina possui um desvio médio quadrático de 1.4Å. Segundo os mesmos autores a qualidade estereoquímica é superior as huPNP anteriormente disponíveis. Esta estrutura permitiu a visualização das moléculas de água no sítio ativo, e definiu o posicionamento correto do resíduo K244, o qual não faz parte do sítio ativo. O N_{ζ} da K244 forma duas pontes de hidrôgenio com os resíduos F124 e N121 indicando que a cadeia de K244 é firmemente "travada" nesta região.

Koellner *et al.* (1997), resolveram a estrutura da PNP de baço bovino (boPNP) em complexo com hipoxantina a 2,15Å de resolução. Os autores optaram em utilizar a boPNP devido aos problemas observados com a huPNP. A enzima bovina é estável em solução, não exibe variantes isoelétricas, enquanto suas características físico-química e propriedades cinéticas, bem como a resposta para inibidores, difere apenas minimamente das da PNP humana. Além disto, como as PNPs de mamíferos, a forma ativa da PNP de baço bovino é trimérica.

O centro da enzima é formado por um β-barril estendido, e este é caracterizado por um β-barril retorcido, composto de nove fitas estendidas, o qual é circundado por nove α-hélices e duas pequenas hélices 3_{10}. Estes elementos são conectados por loops, uma característica da molécula de PNP. A maioria dos contatos entre os monômeros consiste no loop composto dos resíduos 142-167 (maior loop) de um monômero com outras regiões do outro monômero. Estes contatos são acompanhados de interações mediadas por moléculas de água (Koellner *et al.*, 1997). Na Figura 1.5 pode-se observar a estrutura da PNP bovina em esquema de fitas.

FIGURA 1.5. Modelo de fitas para a estrutura da PNP bovina colorida por gradiente de cadeia. O gradiente de cores vai de azul no N-terminal para vermelho no C-terminal, com as cores verde e amarelo como intermediárias.

A seqüência de aminoácidos da PNP de baço bovino difere em 38 resíduos ao logo da seqüência (incluindo os 6 resíduos do C-terminal), que são trocados por outros tipos de aminoácidos, comparado com a PNP de eritrócitos humanos (Figura 1.6), o que equivale a uma identidade seqüencial de 87%.

```
                  10        20        30        40        50        60
HuPNP     MENGYTYEDYKNTAEWLLSHTKHRPQVAIICGSGLGGLTDKLTQAQIFDYSEIPNFPRST
BovPNP    MANGYTYEDYQDTAKWLLSHTEQRPQVAVICGSGLGGLVNKLTQAQTFDYSEIPNFPEST
Consenso  * ********  ** ******  ***** *********  ****** ********** **

                  70        80        90       100       110       120
HuPNP     VPGHAGRLVFGFLNGRACVMMQGRFHMYEGYPLWKVTFPVRVFHLLGVDTLVVTNAAGGL
BovPNP    VPGHAGRLVFGILNGRACVMMQGRFHMYEGYPFWKVTFPVRVFRLLGVETLVVTNAAGGL
Consenso  *********** ******************** ********** **** ***********

                 130       140       150       160       170       180
HuPNP     NPKFEVGDIMLIRDHINLPGFSGQNPLRGPNDERFGDRFPAMSDAYDRTMRQRALSTWKQ
BovPNP    NPNFEVGDIMLIRDHINLPGFSGENPLRGPNEERFGVRFPAMSDAYDRDMRQKAHSTWKQ
Consenso  ** ******************** ************ *********** *** * *****

                 190       200       210       220       230       240
HuPNP     MGEQRELQEGTYVMVAGPSFETVAECRVLQKLGADAVGMSTVPEVIVARHCGLRVFGFSL
BovPNP    MGEQRELQEGTYVMLGGPNFETVAECRLLRNLGADAVGMSTVPEVIVARHCGLRVFGFSL
Consenso  **************  ** ******** *  ****************************

                 250       260       270       280       290
HuPNP     ITNKVIMDYESLEKANHEEVLAAGKQAAQKLEQFVSILMASIPLPDKAS
BovPNP    ITNKVIMDTESQGKANHEEVLEAGKQAAQKLEQFVSLLMASIPVSGHTG
Consenso  ******** **  ******** ************** ******
```

FIGURA 1.6. Alinhamento das seqüências das PNPs de eritrócitos humanos (huPNP) e de baço bovino (boPNP). Os resíduos que participam do sítio ativo estão sublinhados (Ealick *et al.* 1990).

A maioria das modificações são localizadas ou na superfície do trímero ou na região envolvida nos contatos entre os monômeros. A maioria das mudanças são conservativas de forma que as características fisico-químicas dos resíduos são mantidas. No geral, a estrutura da PNP bovina é extremamente similar a PNP humana , e nenhuma mudança é localizada no sítio ativo (resíduos sublinhados na Figura 1.6). Uma maior mudança conformacional é observada na região dos resíduos 195 a 200. Na huPNP este segmento é um loop randômico, enquanto que na boPNP há mudanças de resíduos nas posições 195, 196 e 199, e a conformação cis da prolina 198 permite a formação de uma volta β tipo IV (Koellner *et al.* 1997).

Mao *et al.* (1998) obtiveram cristais de boPNP em PEG 400 (pH 7,4-8,2), e refinaram a estrutura a 2,0 Å de resolução. Também foram obtidos cristais livres de fosfato, o que permitiu a obtenção de várias estruturas de complexos da bovPNP com ligantes (fosfato; 9-deazainosina e fosfato; inosina; inosina e sulfato; 9 deazahipoxantina e ribose-1-fosfato; e hipoxantina). As estruturas das bovPNPs obtidas são similares a huPNP e essencialmente as mesmas das estruturas de complexos de bovPNP reportadas por Bzowska *et al.* (1995) e Koellner *et al.* (1997).

Podemos dividir o sítio ativo da PNP em três partes: o sítio de ligação a base, que é composto dos resíduos (na PNP bovina e humana): Phe200, Glu201, Asn243, Lys244, mais o resíduo Phe159 de outra subunidade, o sítio de ligação do fosfato que é composto dos resíduos Gly32, Ser33, Arg84, His86, Tyr88, Ser220, e por fim o sítio de ligação a ribose composto pelos resíduos: Asn115, Ala116, Ala117, Gly118, Val217, Gly218, Met219 e His257 (Koellner *et al.* 1997).

Não existem diferenças na composição de aminoácidos entre os sítios ativos das PNPs bovina e humana. Entretanto Koellner *et al.* (1997), relataram que a ligação peptídica entre os resíduos Asn243 e Lys244 da bovPNP esta na conformação *cis* e a cadeia lateral desta lisina está dirigida para fora do sítio ativo, possivelmente formando uma ligação de hidrogênio intramolecular com o resíduo Gly119. Ligações peptídicas na conformação *cis* são raramente descritas em estruturas de proteínas e se elas ocorrem, geralmente são encontradas em regiões invariantes envolvidas na função da proteína. Esta foi a única diferença significante observada entre estes dois sítios.

Também estão disponíveis dois pares de estruturas da PNP de baço bovina a alta resolução no PDB. O primeiro par é formado pelo complexo da bovPNP com

immucilina-G (1b8o), resolvido a 2.0 Å de resolução e do complexo bovPNP com immucilina-H (1b8n), resolvido a 1.5 Å de resolução (Fedorov *et al.*, 1999). O segundo par é formado por duas estruturas do complexo bovPNP 9-deazainosina em um caso e fosfato no outro. Na estrutura da boPNP (3pnp) uma parte da molécula não foi encontrada no mapa de densidade eletrônica (resíduos 246 a 267). A estrutura restante (4pnp) foi resolvida a 1.8 Å de resolução (Pugmire *et al.*, 1999).

Tebbe *et al.* (2000) determinaram a estrutura da PNP de *Cellulomonas* sp. Esta PNP possui cerca de 33% de identidade quando comparada a PNP bovina, e também é uma PNP trímerica. Quando sobrepostas as duas estruturas, o desvio médio quadrático foi de cerca de 4Å para os átomos da cadeia principal. Apesar da baixa porcentagem de identidade o sítio de ligação a base e ao fosfato são praticamente conservados com uma única diferença no sítio de ligação a base (a mutação F200Y203). Apesar da grande conservação dos resíduos do sítio de ligação a base, uma diferença quanto ao modo de ligação a base foi encontrado: o resíduo N246 (N243 nas PNPs humana e bovina) não forma pontes de hidrogênio com a base, a ligação com o O6 da guanina é mediada por uma molécula de água, este fato contrasta significativamente quando comparada as PNPs de mamíferos, onde o resíduo N243 tem sido considerado responsável pela especificidade das PNPs de baixo peso molecular para 6-oxopurinas (Koellner *et al.* 1997, Narayana *et al.* 1997). Outra diferença da PNP de *Cellulomonas* é a capacidade desta PNP em se ligar a adenosina e a formicina-A. Tebbe *et al.* (2000) sugerem que a adenosina e a formicina-A se ligariam a N246 através de uma molécula de água, entretanto a afinidade de ligação é menor que para inosina e formicina-B.

Shi *et al.* (2001) descreveram a estrutura a PNP de *Mycobacterium tuberculosis* (mtPNP) em complexo com immucilina-H (immH) e fosfato (Figura 1.7) . A estrutura é um homotrímero com um arranjo de subunidades semelhante as PNPs bovina e humana. Os autores comparam o complexo da PNP de *M. tubeculosis* com immH com a PNP bovina em complexo com immH. A mtPNP realiza uma ponte de hidrogênio entre Y188 e O5' do immH, que a PNP bovina não realiza pois o resíduo correspondente é F200. Os autores propõem que esta diferença poderá ser utilizada no desenho de inibidores específicos da mtPNP.

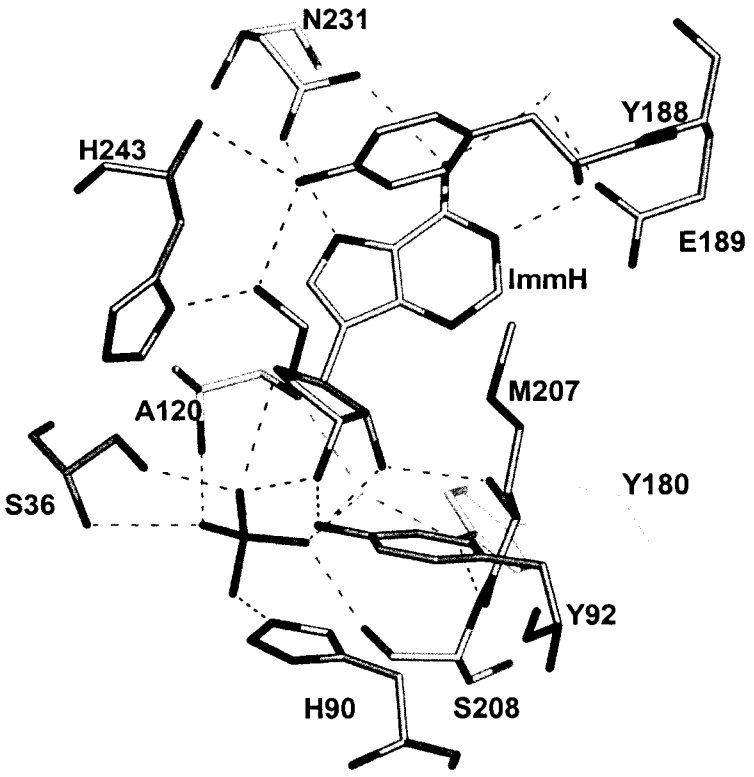


FIGURA 1.7. Modo de ligação da immucilina-H no sítio ativo da mtPNP.

1.5 Utilização da cristalografia de proteínas na busca de ligantes

Recentes avanços na cristalografia de raios X de macromoléculas fundamentam uma sólida base, na qual uma linha de montagem para a determinação de um grande número de estruturas pode ser construída. A industrialização do processo requer a montagem de uma série de etapas em larga escala, da escolha do alvo a interpretação da estrutura, em qual cada passo tem que ser completado com sucesso antes do próximo ser tentado. Tudo isto requer a automação, miniaturização, paralelização, e otimização das abordagens cristalográficas existentes. Melhorias nestes processos têm levado a um significante impacto tanto na eficiência como na efetividade das técnicas experimentais em biologia estrutural. Estes desenvolvimentos são críticos para esforços como genomas estruturais, bem como a descoberta racional de drogas utilizando cristalografia de macromoléculas em larga escala. Quando implementadas, estas técnicas levam a uma nova era na descoberta de drogas baseadas em estrutura (Abola *et al.*,2000).

Desde 1990 os seis principais desenvolvimentos na determinação de estruturas alcançaram a maturidade e mudaram complemente o cenário para uma rápida determinação de estruturas. Estas são: onduladores como fontes intensas de raios X, detetores CCD, criopreservação, dispersão anômala a múltiplos comprimentos de onda (MAD), proteínas contendo seleniometionina e resolução automática de estruturas (Hendrickson, 2000).

Onduladores tornaram-se possíveis em síncrotons de terceira geração. Feixes de raios X provenientes de onduladores são semelhantes a laser e excepcionalmente

brilhantes, e são utilizados em conjunto com detetores CCD, pois estes são rápidos em virtude da gravação e leitura das imagens serem eletrônicas (Hendrickson, 2000).

Outro avanço crítico surgiu a partir das técnicas de criopreservação de cristais de macromoléculas através de rápido congelamento. A resistência a danos causados por radiação que o congelamento proporciona é importante em fontes convencionais de raios X, e se torna um fator crucial em estudos com radiação síncroton, de grandes estruturas ou em casos de pequenos cristais e facilita em muito experimentos de MAD (Hendrickson, 2000).

A determinação de estruturas a partir de dados de difração tem se tornado cada vez mais automatizada e efetiva. Um rico repertório de programas facilita estes cálculos. Entre as mais recentes adições estão os procedimentos para resolver selênios mega-sítios com o Shake-and-Bake (SnB), programas gerais para a determinação de fases como SOLVE e SHARP e o programa ARP/wARP para o traçado automático da cadeia e construção do modelo dentro dos mapas de densidade eletrônica resultantes (Hendrickson, 2000).

Outros fatos relevantes foram que a montagem, bem como a coleta de dados em cristalografia de proteínas foram automatizadas. Muchmore, *et al.* (2000), desenvolveram um sistema robótico para a montagem, alinhamento do cristal no feixe de raios X e coleta de dados de cristais de proteínas. Neste sistema os cristais são montados manualmente e transferidos para um reservatório criogênico (são suportados 63 cristais), onde um robô multieixo encarrega-se de pegar um cristal (mantendo-se a temperatura criogênica) e colocá-lo na cabeça goniométrica. Após esta etapa, o alinhamento automático do cristal é realizado, através da análise das imagens obtidas da câmara

posicionada na base do detetor, seguindo-se então a coleta de dados. Após a coleta de dados ter sido finalizada, um sinal é enviado ao robô para remover o cristal, colocá-lo de volta no recipiente de armazenamento e montagem de um novo cristal. Este sistema de montagem e alinhamento automático foi utilizado para a obtenção de dados de difração de raios X de qualidade de mais de 500 cristais. Estes dados foram utilizados para a identificação de potenciais compostos líderes, utilizando a técnica de triagem (screening) cristalográfico, bem como para a aquisição de dados de complexos proteína-ligante em larga escala para o desenho de drogas baseado em estrutura.

Adams & Grosse-Kunstleve (2000), relatam os recentes desenvolvimentos em programas para a automação da determinação de estruturas cristalográfica de macromoléculas. Como métodos probabilísticos para a análise dos dados; os programas Solve, CNS, Shake-and-Bake (SnB) e SHELX para a localização de átomos pesados e cálculo das fases experimentais. A modificação de densidade, como o achatamento do solvente podem ser aplicados a densidade eletrônica para melhorar a estimativa das fases iniciais.

Recentemente foram desenvolvidos métodos para a automação da substituição molecular, uma abordagem é a aplicação exaustiva dos métodos tradicionais de rotação e translação, para executar uma busca completa em seis dimensões (Sheriff *et al.*, 1999). Métodos menos "consumidores de tempo" tem sido desenvolvidos utilizando novos algoritmos baseados em buscas evolucionárias (Kissinger *et al.*, 1999), ou procedimentos estocásticos (Glykos & Kokkinidis, 2000), ambos os quais são aptos a realizar uma busca em seis dimensões dirigida em relativamente pouco tempo. No futuro, métodos similares poderão permitir que dados experimentais sejam

exaustivamente testados contra todas as estruturas conhecidas para a determinação de qual estrutura homologa poderá ser utilizada para ajudar a determinação da estrutura (Adams & Grosse-Kunstleve, 2000).

Na interpretação dos mapas de densidade eletrônica, a subjetividade da reconstrução manual tem sido removida incorporando informações de bancos de dados de estrutura conhecidas (Kleywegt & Jones, 1998), entretanto tem ocorrido significantes avanços na construção de processos totalmente automatizados para a interpretação dos mapas e construção do modelo. Uma rota para automatizar a análise dos mapas de densidade eletrônica é o reconhecimento de grandes elementos estruturais, como α hélices e folhas β. A localização destes elementos podem freqüentemente serem obtidas, mesmo em mapas de densidade de baixa qualidade, utilizando buscas exaustivas tanto no espaço real como no espaço recíproco. Para a completa automação do processo de construção do modelo, um método tem sido desenvolvido, que combina a identificação de potenciais sítios atômicos no mapa com o refinamento do modelo (Perrakis *et al.*, 1997). Os sítios atômicos são então analisados para determinar tanto o traçado da cadeia principal como para a identificação dos resíduos. A partir destas informações e da seqüência da proteína um modelo pode ser automaticamente construído. Esta técnica poderosa conhecida como warpNtrace (Perrakis *et al.*, 1997), pode gradualmente construir um modelo mais completo a partir de mapas de densidade eletrônica, e em muitos casos, é capaz de construir a maioria das estruturas de proteínas de uma forma completamente automática (Adams & Grosse-Kunstleve, 2000).

Infelizmente a limitação deste método é a necessidade de uma resolução relativamente alta ($d_{min} < 2{,}0$Å). Para estender a aplicabilidade da automação na

interpretação dos mapas a menor resolução, experimentos tem sido realizados utilizando métodos de reconhecimento de padrões. O resultado é o programa TEXTAL (Holton *et al.*, 2000), o qual é uma grande promessa para a interpretação automática de mapas, mesmo quando a resolução dos dados é de cerca de 3.0Å (Adams & Grosse-Kunstleve, 2000).

Todos estes fatores acima citados tornam possível uma nova abordagem para o desenvolvimento de drogas, a descoberta de novos ligantes utilizando busca em cristalografia de raios X de larga escala.

Nienaber *et al.* (2000), relatam que a necessidade de reduzir a escala do tempo para a descoberta de compostos clínicos, têm levado a inovações em diversos estágios do projeto, incluindo genoma/proteoma para identificação de alvos, identificação de compostos líderes por ensaios em ultra-larga escala, desenho de drogas baseado em estrutura e química combinatória para a otimização de compostos líderes. A junção crítica deste processo é a identificação apropriada de um composto líder, pois uma escolha pobre pode gerar custosas dificuldades nos próximos estágios. Compostos de partida são comumente identificados em ensaios em larga escala de grandes bibliotecas de compostos, derivadas de substratos/inibidores conhecidos, ou identificados em screening computacionais e utilizando a estrutura cristalina do alvo. A informação estrutural é freqüentemente consultada para otimização eficiente de líderes, mas sobre este paradigma, estes dados requerem a pré-identificação e confirmação de ligação do composto.

Uma nova metodologia empregada é uma técnica de screening dirigida por cristalografia de raios X, que combina os passos de identificação de líderes, avaliação

estrutural e otimização. Este método é rápido, eficiente, e de larga escala, o que resulta em uma informação cristalográfica detalhada. A utilidade deste método foi demonstrado pela descoberta e otimização de uma nova classe (oralmente disponíveis) de inibidores da uroquinase para o tratamento de câncer (Nienaber *et al.*, 2000).

O método de screening cristalográfico consiste em varias etapas, numa aplicação ideal do método, o sítio ativo da macromolécula alvo é aberto para os canais de solvente do cristal, para permitir a formação do complexo proteína-ligante durante e técnica de soaking. O mapa de densidade eletrônica do cristal antes dos experimentos de soaking é analisada para a identificação da estrutura do solvente e da proteína sem ligante. O método de screening cristalográfico é iniciado pela exposição do cristal a uma mistura de compostos com estruturas diversas. Os mapas de densidade eletrônica teóricos de cada componente na mistura teste utilizada no estudo são calculados, o que possibilita uma identificação de cada composto por sua forma, sem ambigüidades. Misturas de até 100 compostos tem sido utilizadas com sucesso no screening. A identificação do composto e da forma do seu mapa de densidade eletrônica são possíveis se diversidade da biblioteca de inicio é razoavelmente alta. O ligante mais potente na mistura liga-se ao sítio ativo da macromolécula cristalina, e análise de raios X rendem um mapa de densidade eletrônica Fo-Fc inicial. A forma do mapa permite então a identificação do composto (Nienaber *et al.*, 2000).

Com o uso desta técnica, milhares de compostos podem ser testados por dia (em misturas de 100), quando acoplados a equipamentos de coleta de dados "estado da arte" incluindo detetores CCD e robótica de aquisição de dados. Screening em fontes síncroton podem aumentar essa taxa em uma ordem de grandeza (Nienaber *et al.*, 2000).

O método de screening cristalográfico (CrystaLEAD), tem sido utilizado para testar bibliotecas de muitos compostos (>10.000), e detectar ligantes monitorando mudanças no mapa de densidade eletrônica relativas a forma não ligada . O mapa de densidade eletrônica rende uma figura do complexo proteína ligante, que provê uma informação chave no processo de descoberta de drogas baseados em estrutura. A utilidade do screening é alta, devido ao fato de que a ligação do ligante é diretamente visualizada no mapa de densidade eletrônica. Ligantes que se ligaram longe do sítio alvo podem ser eliminados, e isto é uma vantagem sobre outros métodos de detecção como espectroscopia de massa, e sobre métodos de ressonância magnética nuclear. Além disto, detalhes das interações proteína-ligante obtidas diretamente de dados de raios X, ajudam a tomar rápidas decisões a respeito da conveniência do potencial líder para a otimização dirigida por estrutura. Estes dados estruturais não são disponíveis em nenhuma outra técnica de screening (Nienaber *et al.*, 2000).

2 OBJETIVOS

O objetivos principais do nosso trabalho são: a determinação da estrutura tridimensional da enzima purina nucleosídeo fosforilase de *S. mansoni*, por difração de raios X e a descoberta de novos ligantes para a SmPNP. Para atingirmos estes objetivos foram propostos os seguintes itens:

- Expressão e purificação da proteína SmPNP.
- Determinação das constantes catalíticas para a fosforólise de inosina pela SmPNP.
- Cristalização da SmPNP.
- Determinação da estrutura da SmPNP por difração de raios X.
- Realização de virtual screening (VS) para a descoberta de novos ligantes para a SmPNP.
- Obtenção dos valores de inibição para os compostos selecionados pelo virtual screening.
- Obtenção de complexos com compostos oriundos do VS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Expressão e Purificação da Proteína de fusão MBP-PNP

3.1.1 Sequenciamento do N-terminal da SmPNP

Durante o mestrado (Pereira *et al.*, 2003) o gene da SmPNP foi clonado no vetor pMAL-C2X para a expressão em de uma proteína de fusão MBP-SmPNP. Após a separação proteolítica das duas proteínas pelo Fator Xa, foi observado que a SmPNP possuía duas bandas em torno de 30 kDa. Para verificar qual origem desta heterogeneidade, foi realizado o sequenciamento do N-terminal da SmPNP. A proteína de fusão possui dois sítios para o Factor Xa: um do próprio vetor e outro adicionado por PCR durante a amplificação do gene da SmPNP, realizada para a clonagem no vetor de expressão pMAL-c2x. Foi adicionado este sítio adicional para que a SmPNP produzida não possua nenhum resíduo extra no N-terminal.

Foi realizado um gel de policarilamida 15% (Laemmli, 1970), com o produto da clivagem. Após 165 minutos o gel foi retirado da cuba e as bandas foram transferidas para uma membrana de PVDF. Esta membrana foi então revelada com coomasie blue, e seca. As bandas de interesse foram cortadas com uma auxílio de um

bisturi e colocadas em tubos eppendorffs de 1,5 mL, e enviadas para sequenciamento do N-terminal no Centro de Química de Proteínas da FMRP-USP.

3.1.2 Clonagem do cDNA da SmPNP no vetor de expressão pMal c2g

Como o sequenciamento do N-terminal demostrou-se que a SmPNP era produzida com um N-terminal heterogêneo, foi idealizada a seguinte solução: clonagem da SmPNP no vetor pMAL-c2G, que possui um sítio para genenase e não para o Factor Xa (Figura 3.1), desta forma é novamente produzida uma proteína de fusão MBP-SmPNP, e a clivagem se dá pelo Factor Xa, produzindo uma SmPNP sem nenhuma resíduo a mais o N-terminal.

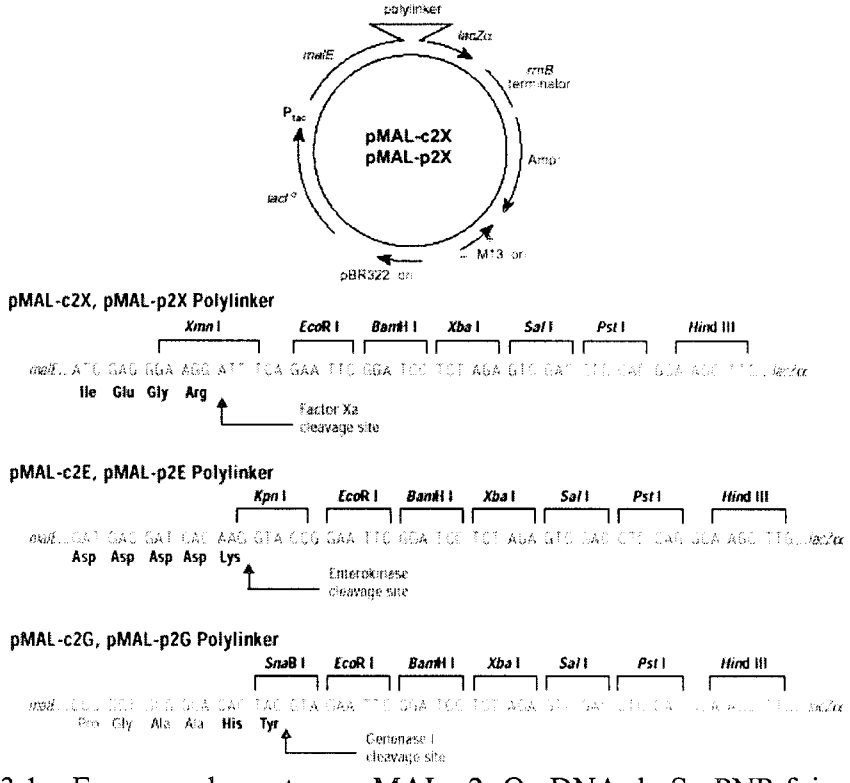


FIGURA 3.1 - Esquema dos vetores pMAL-c2. O cDNA da SmPNP foi retirado do vetor de fusão pMAL-c2X - SmPNP nos mesmos sítios utilizados na clonagem (*Bam*HI/*Pst*I), e inserido no vector pMAL-c2G digerido com as mesmas enzimas. A clivagem agora se dá no sítio para o Factor Xa que foi inserido durante a clonagem no vetor pMAL-c2X.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

3.1.2.1 Obtenção do DNA plasmidial do vetor pMALc2G

O vetor pMAL c2G foi obtido da New England Biolabs. Para obtermos maiores quantidades deste plasmídio, bactérias DH5α foram transformadas de acordo com o método de Sambrook *et al.* (1989).

3.1.2.2 Transformação de bactérias competentes (Sambrook *et al.*, 1989)

Colocou-se em um tubo eppendorf de 1,5 mL:

- 100 μL de bactérias competentes DH5α e cerca de 40 ng de DNA plasmidial.
- Misturou-se por pipetação.
- Incubou-se por 30 minutos a 0°C, 90 segundos a 42°C e 1 minuto a 0°C
- Adicionou-se 1mL de meio 2XYT.
- Incubou-se a 37°C sob agitação à 180 rpm por 45 minutos para a expressão da resistência à ampicilina. Plaqueou-se, em média, 200 μL por placa contendo meio 2XYT ágar suplementado com ampicilina (100 μg/mL).
- Incubou-se em estufa 37°C "overnight"

3.1.2.3 Extração do DNA Plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial, 5 colônias escolhidas aleatoriamente foram incubadas em 5 mL de meio LB suplementado com ampicilina (100 μg/mL), por 16 horas. Também foram crescidos três tubos de meio LB inoculados com

bactérias contendo o vetor de fusão pMAL c2X-PNP, para o obtenção de DNA necessário para a clonagem.

Para a extração do DNA plasmidial de fita dupla foi utilizado o Kit Quiaprep Miniprep (QUIAGEM), todo o procedimento de extração de DNA foi realizado seguindo-se as instruções do fabricante. Após a extração do DNA alíquotas de 2μL foram visualizadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

3.1.2.4 Digestão do vetor pMAL c2G com *Bam* HI e *Pst* I

Na digestão com *Bam* HI foi utilizado 2 μg do plasmídio pMAL c2G, a solução de digestão utilizada foi a seguinte:

PMal g2G (100 ng/μL)	20 μL
Bam HI (Gibco-BRL) 10 U/μL	1 μL
Tampão (React 3) 10X	3 μL
Água deionizada	6 μL
Total	30 μL

Incubou-se a 37°C por 3 horas.

Adicionou-se 15 μL de acetato de amônio 7,5 M e 3 volumes de etanol 100% (90μL) e incubou-se a -20°C por 18 horas. Depois deste período, centrifugou-se por 20 minutos a 14000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 300 μL de etanol 70 %, centrifugando por 5 minutos a 14000 rpm, descartou-se o sobrenadante e secou-se o pellet em estufa a 37 ^{0}C. Para a digestão com *Pst*I o pellet foi resuspendido em 17 μL de água deionizada para a digestão:

DNA	17 μL
*Pst*I (Gibco-BRL) (10 U/μL)	1 μL
Tampão React 2 10X	2μL
Total	30 μL

Incubou-se a 37°C por 4 horas.

Precipitou-se o DNA como descrito anteriormente e o pellet foi ressuspendido em 15 μL de água.

3.1.2.5 Digestão do vetor pMAL c2X-PNP com *Bam* HI e *Pst* I

Para a obtenção do inserto a ser clonado no vetor pMAL c2G (*Bam* HI/*Pst* I), o plasmídio de fusão foi digerido com *Bam* HI e *Pst* I, desta forma o inserto contém além do cDNA da SmPNP apenas um sítio de clivagem pelo Fator Xa.

Na digestão com *Pst*I foram utilizados:

PMAL c2X-PNP 200 ng/μL	20 μL
*Pst*I (Gibco-BRL) 10 U/μL	1 μL
Tampão React 2 (10X)	3 μL
Água	6 μL
Total	30 μL

Incubou-se a 37°C por 4 horas.

Após 4 horas, precipitou-se o DNA como descrito anteriormente.

Para a digestão com *Bam*HI, o pellet foi resuspendido em 17 μL de água:

DNA	17 μL
Bam HI (Gibco-BRL) (10 U/μl)	1 μL
Tampão React 3 (10X)	2 μL
Total	20 μL

Incubou-se a 37°C por 4 horas.

Foi adicionado 5 μL de tampão de amostra 10X, e aplicou-se tudo em gel de agarose 1% (TAE 1X) corado com brometo de etídio, o fragmento de interesse foi recuperado e purificado utilizando-se o kit Gene Clean (BIO 101), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi ressuspendido em 15 μL de água.

3.1.2.6 Ligação do cDNA para a SmPNP no vetor de expressão pMAL c2G

PMAL c2G *Pst*I/*Bam*HI 100 ng/μL	1 μL
Inserto	13 μL
T4 DNA Ligase	1 μL
Tampão 10X	2 μL
Total	20 μL

Incubou-se a 8°C por 16 horas.

3.1.2.7 Transformação, plaqueamento, seleção de colônias e extração de DNA plasmidial

Na transformação de bactérias DH5α foram utilizados 20 μL do produto da ligação SmPNP/pMAL, utilizando o método já descrito anteriormente.

Foram utilizados 200 μL do inoculo por placa contendo somente meio 2XYT-ágar e ampicilina.

17 colônias selecionadas aleatoriamente foram submetidas à PCR de colônia para verificação da presença do inserto de acordo com o seguinte protocolo:

As colônias, foram isoladas ao acaso, direto da placa de transformação (utilizando-se um palito estéril) e inoculadas primeiramente à mistura de PCR e depois em 5mL de meio LB suplementado com ampicilina (100 μg/mL). Os tubos de cultura foram incubados a 37°C por 16 horas sob agitação a 250 rpm.

A mistura para PCR continha por tubo:

Tampão 10X	1 μL
dNTPs 10 mM	0,2 μL
Iniciadores PNPF e PNPREV	1 μL
Taq DNA polimerase 5 U/μL	0,1 μL
Água deionizada	7,7 μL
$MgCl_2$ 25mM	1 μL
Total	10 μL

A termociclagem foi realizada de acordo com o seguinte programa:

- primeira desnaturação a 95°C por 5 min. E em seguida 25 ciclos de:
- desnaturação a 95°C por 1 min;
- anelamento a 62°C por 1 min;
- extensão a 72°C por 2 min;
- anelamento final a 62°C por 1 mim
- extensão final a 72°C por 8 min

Após completar o programa PNP no termociclador, verificou-se a amplificação por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

Após crescimento por 16 horas as colônias positivas foram estocadas a –80^{0}C em 20% de glicerol.

3.1.3 Teste de expressão

Quatro colônias positivas foram utilizadas neste experimento. Retirou-se uma pequena parte da colônia congelada a –80 ^{0}C com um palito estéril e inoculou-se em 5 mL de meio 2XYT com 2% de glicose e 3 μL de ampicilina (100 mg/mL). Incubou-se a 250 rpm, 37°C por 16 horas.

Em quatro tubos de 50 mL estéreis adicionou-se 10 mL de meio 2XYT com 2% de glicose e 10 μL de ampicilina (100 mg/mL) e 100 μL do inóculo crescido durante a noite (1:100). Os tubos foram então incubados a 37°C, sob agitação (250 rpm) e periodicamente foi verificado o crescimento da cultura por leitura da densidade ótica a 600 nm. Quando a absorbância alcançou o valor de 0,5 a 0,6 (aproximadamente 2,5 horas), retirou-se 1 mL para o tempo zero (T0) e adicionou-se IPTG até uma concentração final de 0,3 mM para a indução da expressão da proteína. De hora em hora foi retirado 1 mL até tempo quatro (T4).

Estas alíquotas foram centrifugadas por 2 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 30 μL de Loading Buffer para gel de SDS 3X (188mM Tris-Cl pH 6,8, 5% β-Mercaptoetanol, 6% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 30% glicerol) e as amostras foram fervidas por 5 min. A amostras foram novamente centrifugadas por 2 min a 14000 rpm e utilizou-se 10 μL do lisado para eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15% (Laemmli, 1970). O resultado foi visualizado após coloração com Coomassie Blue (Sambrook *et al.*, 1989), e foi

determinado que o tempo ótimo de expressão para a proteína de fusão é de 2,0 horas após indução com IPTG.

3.1.4 Expressão e purificação da Proteína de fusão MBP-SmPNP

Para a expressão de grandes quantidades de proteína de fusão foi utilizado o protocolo do manual do vetor pMAL com pequenas modificações.

Em dois tubos de 15 mL adicionou-se 5 mL de meio 2XYT acrescido de 2% de glicose e 5 μL de ampicilina (100 mg/mL) em cada tubo. Inoculou-se com as bactérias da colônia 1 contendo o plasmídio de fusão congeladas a -80°C. O crescimento foi realizado por agitação a 250 rpm por 16 horas a 37°C.

Em dois frascos de cultura de células com tampa de rosca de 3 L, adicionou-se por frasco 500 mL de meio 2XYT acrescido com 2% de glicose e 500 μL de ampicilina (100 mg/mL) e um dos pré-inóculos cultivados. O crescimento foi realizado sob agitação a 250 rpm por 2,5 horas a 37°C, checando-se periodicamente a absorbância a 600 nm. Quando a absorbância alcançou o valor entre 0,5 a 0,6, adicionou-se IPTG para uma concentração final de 0,6 mM.

Os frascos foram colocados novamente sob agitação a 250 rpm e 37°C por 1,5 horas. As bactérias foram então centrifugadas a 4000 g por 20 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante.

As células foram ressuspendidas em 50 mL de tampão de coluna (20mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM azida sódica e 10 mM β-Mercaptoetanol) e congeladas a –20 °C por 16 horas.

Após o término do congelamento, as bactérias foram sonicadas em banho de gelo, com 6 pulsos de 30 segundos à aproximadamente 50% da potência. Centrifugou-se a 9000 g por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL, e armazenado a 4°C.

3.1.4.1 Preparo da coluna e eluição da proteína de fusão

Empacotou-se a coluna em um tubo de vidro com 2,5 cm de diâmetro e 12 cm de altura com 15 mL de resina de amilose (New England Biolabs). A coluna foi lavada com tampão de coluna (8 vezes o volume da resina), e o extrato bruto foi diluído 1:5 com tampão de coluna.

O extrato bruto foi cromatografado na coluna de amilose a um fluxo de 1 mL/min. Após todo o extrato ter sido cromatografado, a coluna foi lavada com tampão de coluna por aproximadamente 16 horas a um fluxo de 0,5 mL/min, afim de serem eluídos os contaminantes.

A proteína de fusão foi eluída com tampão de coluna contendo 10 mM de maltose, com alíquotas de 1mL sendo coletadas monitorando-se a corrida a 280 nm. Após a eluição da proteína de fusão, a coluna foi regenerada com 45mL de água, 30mL de SDS 0,1 %, 15 mL de água e 45 mL de tampão de coluna.

As alíquotas coletadas tiveram sua absorbância a 280 nm medida, foram retiradas alíquotas de 10 μL, adicionou-se 5 μL de Loading Buffer para gel de SDS 3X e estas alíquotas foram visualizadas após eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15% corados por Coomassie Blue. Nesta purificação foi utilizado o sistema de cromatografia convencional da Pharmacia, e todo procedimento de purificação foi

realizado a 4 °C. A cada nova purificação, a coluna (já empacotada) era inicialmente lavada com 60 mL de tampão de coluna.

3.1.4.2 Quantificação da proteína pelo método do coeficiente de extinção

A proteína de fusão foi quantificada pelo coeficiente de extinção molar a 280nm de acordo com o protocolo de Gill & Von Hippel (1989), o qual consiste no cálculo da extinção molar de proteínas baseado na sua seqüência primária. Este método foi calibrado contra 18 proteínas globulares, com extinções molares conhecidas experimentalmente, e a média dos erros foi de cerca de 11%.

3.2 Clivagem da proteína de fusão com Fator Xa

Para a clivagem da proteína de fusão foi utilizada 1 μg de Fator Xa (1mg/mL New England Biolabs) para 200 μg de proteína de fusão (1 mg/mL). Incubou-se a 4°C por 96 horas.

3.3 Purificação da SmPNP

Para a purificação da SmPNP, o produto da clivagem foi dialisado contra 100 volumes de 20mM MES pH 6 + 10mM de β-mercaptoetanol, utilizando-se um centriprep com cutoff de 10 kDa (Milipore) e concentrado até cerca de 2 mg/mL. A amostra era centrifugada e o sobrenadante aplicado na coluna de troca catiônica

(Poros 20SP). Os tampões utilizados foram: A- 20mM MES pH 6 + 10mM de β-mercaptoetanol e B- 20mM MES pH 6 e 1M NaCl + 10mM de β-mercaptoetanol.

O produto de diálise era aplicado na coluna Poros 20SP com posterior eluição com gradiente salino 0 - 1 M de NaCl em 30mL.

O método utilizado em todas as purificações foi :

Equilíbrio da coluna com 16 mL de tampão A.

Injeção da amostra.

Lavagem da coluna com 5 mL para retirar a proteína não ligada.

Início do gradiente salino (0 a 100% do Tampão B em 30 mL).

As frações de 1 mL foram coletadas a partir da injeção e a corrida foi monitorada a 280 nm utilizando um ÄKTA System (Pharmacia Biotech).

A SmPNP foi quantificada pelo coeficiente de extinção molar a 280nm de acordo com o protocolo de Gill & Von Hippel (1989).

Alíquotas de 10 μL de uma das purificações acrescidas de 5 μL de Loading Buffer para gel de SDS 3X foram visualizadas após eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15% corados por Coomassie Blue.

3.4 Cinética enzimática da enzima SmPNP

Foi realizada a cinética enzim'aticada SmPNP a fim de serem obtidas as constantes catalíticas para a fosforólise de inosina. Para isto foi utilizado o método da Kalckar (1947), o qual consiste na medida da hipoxantina liberada durante a fosforólise da inosina indiretamente pelo monitoramento da produção de ácido úrico produzida pela oxidação da hipoxantina pela xantina oxidase. A mistura de reação (volume final 1mL) contêm 50mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0, quantidade

variável de inosina e 0,04 unidades de xantina oxidase. A reação era iniciada pela a adição de 1,81 ng de SmPNP na mistura e a OD293 era imediatamente monitorada em um UV-VIS espectrofotômetro por 2 minutos.

A mistura de reação foi como descrita abaixo:

	Volume (μL)	Concentração Final
Tampão fosfato 500 mM	100	50 mM
Xantine oxidase (0,4 U/mL)	100	0,04 U
Inosina	10	15,0 - 0,625 μM
Água	780	
SmPNP	10	1,81 ng

As medidas foram realizadas em duplicata, e o valor do K_M foi determinado a partir dos dados cinéticos coletados utilizando-se o programa estatístico para cinética enzimática SigmaPlot 2001, que contém um sistema iterativo integrado para desempenhar a análise gráfica não-linear de melhor ajuste.

3.5 Cristalização da SmPNP

Todas as tentativas de cristalização da SmPNP contendo os resíduos extra no N-terminal forma infrutíferas. Como a SmPNP agora produzida não possui mais nenhum resíduo extra no N-terminal, foi reiniciado todo o processo de busca de condições que cristalização da SmPNP. Nestes ensaios de cristalização foi utilizado o método de difusão de vapor em gota suspensa.

A SmPNP purificada da coluna Poros 20SP foi dialisada contra 100 volumes de água e 10mM β-mercaptoetanol e concentrada utilizando um Centricon 10 até aproximadamente 10 mg/mL.

Foram testadas as seguintes condições:

Fatorial Crystal Screen 1 - 50 condições (Hampton Research)

Fatorial Crystal Screen 2 - 48 condições (Hampton Research)

Fatorial *Crystal Screen Cryo* - 50 condições (Hampton Research)

Fatorial Sulfato de amônio - 24 condições (Hampton Research)

Fatorial 2-metil-2,4-pentanediol - 24 condições (Hampton Research)

Fatorial PEG/Li - 24 condições (Hampton Research)

Fatorial NaCl - 24 condições (Hampton Research)

Fatorial Fosfato de Sódio/Potássio - 48 condições (montado no laboratório).

Nestes experimentos as gotas consistiam de 2 μL de proteína e 2 μL da solução do poço. O volume de solução do poço foi, em todos os experimentos, 500 μL. As gotas foram montadas em placas de cultura de tecido do tipo Limbro e mantidas à temperatura constante (18°C).

Destas 292 condições testadas foram obtidos cristais na condição 43 do Fatorial *Crystal Screen Cryo* a qual consiste em 24% de PEG 1500 e 20% glicerol.

3.5.1 Refinamento da condição de cristalização da SmPNP

Após o aparecimento de cristais em uma condição, esta deve ser feita novamente a fim de se verificar se é possível repetir a condição de cristalização.

Desta forma a condição 43 do Fatorial *Cryo* foi repetida e também montada no laboratório utilizando PEG 1500 da Hampton Research, e o glicerol da Gibco BRL.

Como não existe nenhum tampão nesta condição somente PEG 1500 e glicerol, o pH pode variar muito entre soluções prontas (Hampton Research) e preparadas no laboratório. O pH destas soluções foi medido e mostrou-se bastante diferente: 4,4 para a condição 43 *cryo* feita no laboratório e 5,4 para a condição 43 *cryo* feita pela Hampton Research.

A fim de avaliar a influência do pH no aparecimento de cristais de SmPNP foi realizado um refinamento do pH utilizando 24% de PEG 1500 e 20% de glicerol nos seguintes tampões e pH:

32 mM de tampão Tris pH 8,0.

32 mM de Tris pH7,5.

32 mM Tris pH 7,0.

32 mM Cacodilato de sódio pH 6,0.

32 mM Acetato de sódio pHs 5,6, 5,3 5,0 e 4,0.

A concentração de SmPNP utilizada nesta série de experimentos foi de 10 a 6 mg/mL, com gotas de 2 μL de SmPNP + 2 μL da solução do poço, sendo o volume de solução no poço foi de 500 μL. As gotas foram montadas em placas de cultura tipo Limbro em duplicata e mantidas a temperatura constante de 4 ^{0}C e 18 ^{0}C.

Um segundo refinamento de pH foi realizado utilizado o tampão acetato de sódio nos pHs 5,5 a 4,8 em incrementos de 0,1 unidade de pH, foram mantidas a concentração de PEG 1500 (24%) e a de glicerol (20%), a concentração de SmPNP utilizada foi de 10 a 4 mg/mL, com gotas de 2 μL de SmPNP + 2 μL da solução do poço, o volume de solução no poço foi de 500 μL. As gotas foram montadas em

placas de cultura tipo Limbro, mantidas a temperatura constante de 4 ^{0}C, pois esta temperatura demonstrou-se mais adequada para a cristalização da SmPNP.

Por fim foi otimizado a concentração de PEG 1500. Oito novas soluções de cristalização foram preparadas utilizando 18-24% de PEG 1500 em passos de 2%, 20% de glicerol, no tampão acetato de sódio pH 4,9 e 5,0. A concentração de SmPNP utilizada foi de 5,0 - 6,0 mg/mL, com gotas de 2 μL de SmPNP + 2 μL da solução do poço, o volume de solução no poço foi de 500 μL. As gotas foram montadas em placas de cultura tipo Limbro, mantidas a temperatura constante de 4 ^{0}C. Após uma semana os cristais possuíam ~0.3mm em sua maior dimensão.

3.5.2 Influência do NDSB195 na cristalização da SmPNP

Utilizando-se 24% PEG 1500, 20% glicerol e 32mM tampão acetato de sódio pH 4,9-5,0, e uma solução de SmPNP 10-18mg/mL, apenas microcristais com dimensões máximas de 0.05mm forma obtidos. Foi então sugerido o uso de aditivo "non-detergent sulphobetaine 195" (NDSB195) um agente solubilizante de proteínas (Vuillard *et al.*, 1996) na cristalização da SmPNP.

Quando é utilizado o aditivo NDSB195 na cristalização é necessário um ligeiro acréscimo na quantidade de precipitante utilizado (no nosso caso o PEG 1500). Desta forma 6 novas soluções foram preparadas:

1- 26% PEG 1500, 20% glicerol em 32mM tampão acetato de sódio pH 4.9.

2- 28% PEG 1500, 20% glicerol em 32mM tampão acetato de sódio pH 4.9.

3- 30% PEG 1500, 20% glicerol em 32mM tampão acetato de sódio pH 4.9.

4- 26% PEG 1500, 20% glicerol em 32mM tampão acetato de sódio pH 5.0.

5- 28% PEG 1500, 20% glicerol em 32mM tampão acetato de sódio pH 5.0.

6- 30% PEG 1500, 20% glicerol em 32mM tampão acetato de sódio pH 5.0.

100μL de SmPNP (15mg/mL) mais 25μL de NDSB195 (3M) foram incubados por 1 minuto antes dos experimentos de cristalização. A concentração final de NDSB195 utilizado foi de 600mM.

Duas caixinhas de cristalização foram feitas, 8 condições idênticas para cada solução de cristalização. As gotas consistiam de 2μL de SmPNP +NDSB195 e 2μL da solução do poço. As caixinhas foram incubadas a 4^0C. Cristais de SmPNP com ~0.7mm em sua maior dimensão foram obtidos após três dias. 10 cristais foram congelados para a coleta de dados.

3.5.3 Influência do NDSB256 na cristalização da SmPNP

Quatro conjunto de dados de difração de raios X foram coletados no ESRF na estação 14.1 com os cristais crescidos na presença do NDSB195. Após a resolução das quatro estruturas (a redução de dados, substituição molecular e refinamento serão discutidas posteriormente), foi encontrado o NDSB195 ligado em todos os sítios ativos da SmPNP no sítio de ligação do fosfato via o grupo sulfato do NDSB195 em todas as 4 estruturas resolvidas. Para obtermos cristais da SmPNP sem NDSB195 ligado, outro sulfobetaine foi utilizado: o NDSB265. O NDSB256 possui um grupo fenil e esperávamos que devido a este volume extra quando comparado ao NDSB195 o NDSB256 não se ligasse ao sítio ativo da SmPNP.

Três diferentes concentrações de NDSB256 foram utilizadas: 750mM, 500mM e 100mM. A solução de cristalização utilizada foi 28-30% PEG 1500, 20% glicerol em 32mM acetato de sódio pH 4.9-5.0.

Apenas uma caixinha foi feita e as gotas consistiam de 2μL de SmPNP +NDSB256 e 2μL da solução do poço, sendo incubadas a 4^0C.

Cristais com tamanho máximo de ~0.3mm apareceram após uma semana. Três conjuntos de dados foram coletados dos quais apenas dois são de boa qualidade. Após a resolução destas duas estruturas não foi encontrada a molécula de NDSB256 ligada ao sítio ativo da SmPNP. Todavia os cristais de SmPNP crescidos na presença de NDSB195 ou 256 não puderam ser utilizados em experimentos de soaking.

3.5.4 Sistema de soaking para a SmPNP

Para obtermos complexos de proteína ligante, basicamente dois métodos são utilizados, a co-cristalização e o soaking. A co-cristalização consiste na preparação de uma solução de proteína com o composto de interesse (substrato, cofatores, inibidor, etc). Esta solução é utilizada na cristalização, como anteriormente estabelecido para a proteína sem ligantes. Desta forma se espera que os cristais formados contenha o complexo. No soaking cristais nativos já formados são transferidos para a solução do soaking, a qual é basicamente a solução de cristalização mais o composto de interesse. A solução de soaking também pode conter outras substancias como solventes orgânicos, glicerol, etileno glicol, etc. O que se espera é que o composto difunda-se através dos canais de solvente do cristal, atingindo assim o sítio ativo da proteína no estado cristalino (no caso de um inibidor ou substrato).

Para os cristais da SmPNP obtidos com 24% de PEG 1500, 20% glicerol e 32mM de acetato de sódio a solução de soaking foi:

25% PEG 1500, 20% glicerol, 28mM de acetato de sódio pH 5,0 ou 4,9 e 10% DMSO (onde o composto foi diluido de uma solução mãe também em DMSO).

Os cristais da SmPNP podem ser mantidos na solução de soaking por longos períodos de tempo (4-5 dias) sem danificar os cristais.

Os cristais de SmPNP obtidos na presença de NDSB195 são maiores que os obtidos na ausência destes compostos e os maiores já obtidos para a SmPNP, (0.7mm na maior dimensão). Entretanto com os cristais crescidos na presença dos NDSB195 ou NDSB256, não foi possível estabelecer um protocolo robusto de soaking para estes cristais. Os cristais de SmPNP crescidos com NDSBs quando submetidos ao soaking quebravam, devido a ausência de NDSBs na solução de soaking. Esta ausência de NDSBs será esclarecida nos resultados.

Para os cristais crescidos em 18-20% PEG 1500, 20% glicerol e 32mM de acetato de sódio pH 5,0 ou 4,9 a solução de soaking foi: 20% PEG 1500, 20% Glicerol, 10mM acetato de sódio pH 4,9 ou 5,0, e 10% DMSO (onde o composto foi diluído de uma solução mãe também em DMSO). A concentração dos compostos utilizado foi de 5 a 10mM.

3.6. Coleta de dados

Serão descritas neste tópico apenas as coletas de dados dos cristais que foram utilizados nesta tese. Ao todo aproximadamente 40 conjuntos de dados de difração foram coletados. Os dados de difração foram coletados em três fontes de luz síncrontron, ESRF em Grenoble-França, SRS em Daresbury-UK e LNLS Campinas-Brasil. Também foi utilizado uma fonte de raios X de ânodo rotatório.

3.6.1. Coleta de dados no LNLS

A primeira coleta de dados foi realizada na estação CPr do LNLS. Um cristal da SmPNP com 0.1mm na sua maior dimensão crescido em 24% PEG1500, 20% de glicerol e 32mM acetato de sódio pH 5,0 foi montado em um crio-loop e congelado. Foram coletadas 95 imagens de oscilação utilizando uma oscilação de 1 grau. O tempo de coleta de cada imagem foi de 10 minutos. O comprimento de onda utilizado foi de λ=1,544 Å. As imagens de difração foram registradas por uma placa de imagem MAR345 da Mar Research. Os dados foram reduzidos e escalonados ate 2,75Å usando o pacote de programas HKL (Otwinowski, 1993).

3.6.2. Coleta de dados no ESRF

Foi coletado um conjunto de dados para um cristal da SmPNP crescido na presença do aditivo NDSB195. Um cristal com cerca de 0,7 mm na sua maior dimensão foi congelado e utilizado na coleta de dados na estação ID 14.1 do ESRF, utilizando um λ=0,934 Å. 190 imagens foram coletadas utilizando uma oscilação de $0{,}5^0$. O tempo de coleta de cada imagem foi de 15 segundos e as imagens foram registadas utilizando um detetor CCD ADSC. Os dados foram reduzidos com o programa MOSFLM e escalonados até 1,75Å de resolução com o programa SCALA presente no pacote CCP4 (Collaborative Computer Project Number 4, 1994).

3.6.3. Coleta de dados no SRS

Dois conjuntos de dados foram coletados na estação 14.2 do SRS utilizando um λ=0,980 Å. O primeiro destes para um cristal da SmPNP "nativo" ou seja sem ligantes. Este cristal foi crescido em 18% PEG1500, 20% de glicerol e 32mM acetato de sódio pH 5,0. O cristal foi congelado para a coleta de dados. 180 imagens foram coletadas utilizando uma oscilação de $0,5^0$. O tempo coleta de cada imagem foi de 30 segundos e, os dados foram registados utilizando um detetor CCD ADSC. Os dados foram reduzidos com o programa MOSFLM e escalonados até 1,9Å de resolução com o programa SCALA presente no pacote CCP4 (Collaborative Computer Project Number 4, 1994).

O segundo conjunto coletado foi para um cristal oriundo de soaking com um inibidor da SmPNP descoberto por "Virtual Screening" (AT2169) o qual será descrito *a posteriori*. Este cristal foi crescido em 18% PEG1500, 20% de glicerol e 32mM acetato de sódio pH 5,0. Após o soaking o cristal foi congelado para a coleta de dados. 65 imagens foram coletadas utilizando uma oscilação de 1^0. O tempo coleta de cada imagem foi de 30 segundos os dados foram registados utilizando um detetor CCD ADSC. Os dados foram reduzidos com o programa MOSFLM e escalonados até 1,9Å de resolução com o programa SCALA presente no pacote CCP4 (Collaborative Computer Project Number 4, 1994).

3.6.4. Coleta de dados utilizando uma fonte de raios X de ânodo rotatório

Foi realizados experimentos de co-cristalização com inibidores da PNP humana e bovina oriundo da empresa Biocryst, todos os inibidores com inibição na

ordem de nanomolar (para a PNP bovina). Foram coletados ao todo cerca de 10 conjuntos de dados para cristais com estes inibidores, entretanto após a resolução das estruturas não foi encontrado nenhum inibidor ligado no sítio ativo da SmPNP. Entretanto quando foi utilizado o inibidor BCX821 na co-cristalização, apesar do mesmo não estar ligado foi observado uma clara densidade eletrônica no sitio de ligação do fosfato. A seguir segue a descrição da coleta de dados para este cristal.

Foi coletado um conjunto de dados utilizando uma fonte de raios X de anodo rotatório UltraX 18 equipada com espelho confocal OSMIC e detetor MAR345dtb do Grupo de Cristalografia do IFSC-USP.

Um cristal com cerca de 0,5mm em sua maior dimensão crescido em 20% PEG1500, 20% de glicerol e 32mM acetato de sódio pH 5,0 foi congelado para a coleta de dados. 217 imagens foram coletadas utilizando uma oscilação de 1^0. O tempo coleta de cada imagem foi de 360 segundos. Os dados foram registados utilizando um detetor MAR345dtb. Os dados foram reduzidos com o programa MOSFLM e escalonados até 2.0Å de resolução com o programa SCALA presente no pacote CCP4 (Collaborative Computer Project Number 4, 1994).

3.7. Resolução das estruturas e refinamento

3.7.1 Resolução e refinamento da SmPNP a 2,75 Å de resolução, oriundo dos dados coletados no LNLS

Para a resolução da estrutura da SmPNP foi empregado o método da substituição molecular implementado no programa AMoRe (Navaza & Saludjian.,

1997). O modelo de busca utilizado foi a estrutura cristalográfica da PNP bovina resolvida a 1.8 Å de resolução (4PNP). Foi utilizado um trímero como modelo de busca pois esta solução se aproximava mais do valor médio do coeficiente de Matthews (V_M). Para a SmPNP o V_M é 1,98 $Å^3$/Da.

Foi encontrada uma solução única para a substituição molecular. Esta solução foi inspecionada visualmente quanto ao empacotamento cristalino no programa gráfico O, para verificar possíveis choques entre as moléculas, como não havia nenhum choque a solução foi dada como correta.

O programa utilizado no refinamento da SmPNP foi o CNS 1.0 e CNS 1.1 (Brunger *et al.*, 1998). De posse do alinhamento das seqüências primarias da PNP bovina e de *S. mansoni*, todos os resíduos não conservados entre as duas proteínas foram mutados para alanina com exceção das prolinas e glicinas na PNP bovina resultante da substituição molecular, retirando desta forma todos ao átomos "espúrios" do modelo, os quais poderiam trazer problemas nos passos seguintes do refinamento. Estas coordenadas foram submetidas a um refinamento de corpo rígido com todas as reflexões entre 20 e 2.75 Å, e subsequentes ciclos de refinamento com anelamento simulado utilizando restrições de simetria não cristalográfica (NCS) do tipo "Restrained".

Após cada ciclo de anelamento simulado eram calculados os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc. Estes mapas foram então visualizados e o modelo foi construído utilizando-se o programa O versão 8.0 (Jones *et al.*, 1990). Após cada ciclo de modificação o modelo foi submetido a mais um ciclo de anelamento simulado. No momento que os valores dos fatores R e R_{free} não mais eram alterados pelo ciclo de refinamento e o modelo estava praticamente construído foi iniciada a adição de moléculas de água através da rotina water_pick do programa

CNS. Após a adição das moléculas de água, eram calculados os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc, para a inspeção de cada molécula de água adicionada pelo programa CNS. O refinamento foi dado como encerrado quando os valores de R e R_{Free} assumiram valores compatíveis com a resolução do modelo (Kleywegt & Jones., 2002).

3.7.2 Resolução e refinamento da SmPNP a 1,75 Å de resolução, oriunda da coleta de dados no ESRF

O método utilizado para a resolução da estrutura da SmPNP a 1,75 Å de resolução foi o da substituição molecular. O modelo de busca utilizado foi o modelo da SmPNP refinada a 2,75 Å de resolução. As funções de rotação e translação foram calculadas utilizando o programa MOLREP (Vagin Teplyakov., 1997) presente no pacote CCP4 (Collaborative Computer Project Number 4, 1994) . A substituição molecular neste caso é basicamente um refinamento de corpo rígido pois os cristais são isomórficos

Após a substituição molecular, foi utilizado o programa CNX (www.accelrys.com/products/cnx) nos passos de refinamento de corpo rígido e anelamento simulado. Para a busca de ligantes os mapas de densidade eletrônica Fo-Fc e 2Fo-Fc foram criados após o ciclo de corpo rígido e inspecionados no sítio ativo para a identificação de alguma densidade adicional. Se existisse uma densidade o programa X-Ligand (Oldfield., 2001) presente no pacote Quanta (www.accelrys.com/products/quanta) era utilizado para o posicionamento automático

do ligante utilizando o mapa de densidade eletrônica Fo-Fc como mapa de busca. Desta forma foram adicionadas as moléculas de acetato e de NDSB195.

Após o posicionamento dos ligantes o refinamento era continuado com ciclos de construção do modelo com o programa Quanta e refinamento de dinâmica molecular com anelamento simulado com o programa CNX. Devido a alta resolução deste conjunto de dados não foi utilizado nenhuma restrição de simetria não cristalográfica.

As moléculas de água foram adicionadas com o auxilio do programa Quanta utilizando o mapa de densidade eletrônica Fo-Fc como mapa de busca. Além disto foi utilizado o programa ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1999) para a adição de mais moléculas de água. Por fim foi realizado um último ciclo de refinamento empregando o programa Refmac (Collaborative Computer Project Number 4, 1994) com a utilização de TLS. O refinamento foi dado como encerrado quando os valores de R e Rfree assumiram valores compatíveis com a resolução do modelo (Kleywegt & Jones., 2002).

3.7.3 Resolução e refinamento da SmPNP a 1,9 Å de resolução, oriundo da coleta de dados no SRS

Para a resolução da estrutura da SmPNP nativa a 1,9Å de resolução foi utilizada a estrutura da SmPNP refinada a 2,1Å de resolução, como modelo para o refinamento de corpo rígido. Foi utilizado o refinamento de corpo rígido ao invés de realizarmos a substituição molecular, devido ao fato dos cristais serem isomórficos. No refinamento de corpo rígido foi utilizado o programa Refmac presente do pacote CCP4 (Collaborative Computer Project Number 4, 1994). Subseqüentemente foi

utilizado o programa CNS (Brunger *et al.*, 1998) para o refinamento e o programa O (Jones *et al.*, 1990) para a construção do modelo. As moléculas de água foram adicionadas através do programa ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1999). Por fim foi realizado um último ciclo de refinamento empregando o programa Refmac (Collaborative Computer Project Number 4, 1994) com a utilização de TLS. O refinamento foi dado como encerrado quando os valores de R e R_{Free} assumiram valores compatíveis com a resolução do modelo (Kleywegt & Jones., 2002).

3.7.4 Resolução e refinamento da SmPNP a 1,9 Å de resolução em complexo com AT2169 oriundo da coleta de dados no SRS

O método utilizado para a resolução do complexo SmPNP AT2169 a 1,9Å de resolução foi o da substituição molecular. O modelo de busca utilizado foi o modelo da SmPNP refinada a 2,75 Å de resolução. As funções de rotação e translação foram calculadas utilizando o programa MOLREP (Vaguine *et a*l.,1999) presente no pacote CCP4 (Collaborative Computer Project Number 4, 1994).

Após a substituição molecular foi utilizado o programa CNX para o refinamento de corpo rígido. Para a busca de ligantes os mapas de densidade eletrônica Fo-Fc e 2Fo-Fc foram criados após o ciclo de corpo rígido e inspecionados no sítio ativo. O ligante AT2169 foi posicionado automaticamente utilizando o mapa de densidade Fo-Fc pelo programa X-Ligand (Oldfield., 2001) presente no pacote Quanta.

Subseqüentemente foi utilizado o programa CNS (Brunger *et al.*, 1998) para o refinamento e o programa O (Jones *et al.*, 1990) para a construção do modelo. As moléculas de água foram adicionadas através da rotina water_pick do programa CNS

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

(Brunger *et al.*, 1998). Foi encontrada uma densidade eletrônica compatível com uma molécula de DMSO por subunidade. A molécula de DMSO foi posicionada através do programa O (Jones *et al.*, 1990).

Após o posicionamento do ligante o refinamento era continuado com ciclos de construção do modelo com o programa Quanta e refinamento com o programa CNX. Devido a alta resolução deste conjunto de dados não foi utilizada nenhuma restrição de simetria não cristalográfica. O refinamento foi dado como encerrado quando os valores de R e R_{Free} assumiram valores compatíveis com a resolução do modelo (Kleywegt & Jones., 2002).

3.7.5 Resolução e refinamento da SmPNP a 2,0 Å de resolução, oriundo de dados coletado numa fonte de ânodo rotatório

Para a resolução da estrutura da SmPNP a 2,0Å de resolução foi utilizada a estrutura da SmPNP refinada a 1,9Å de resolução, como modelo para o refinamento de corpo rígido. No refinamento de corpo rígido foi utilizado o programa Refmac presente do pacote CCP4 (Collaborative Computer Project Number 4, 1994). Foram então utilizados o programa CNS (Brunger *et al.*, 1998) para o refinamento e o programa O para a construção do modelo. Foi observada uma densidade eletrônica no sítio de ligação ao fosfato compatível com um grupo fosfato ou sulfato, decidiu-se então modelar esta densidade como sendo um fosfato. Também foi encontrada nesta estrutura uma densidade eletrônica compatível com uma molécula de DMSO por subunidade. A molécula de DMSO foi posicionada através do programa O (Jones *et al.*, 1990).

As moléculas de água foram adicionadas através do programa ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1999). Por fim foi realizado um último ciclo de refinamento empregando o programa Refmac (Collaborative Computer Project Number 4, 1994) com a utilização de TLS. O refinamento foi dado como encerrado quando os valores de R e R_{Free} assumiram valores compatíveis com a resolução do modelo (Kleywegt & Jones., 2002).

3.8 Virtual Screening

Foram realizados dois "virtual screening" (VS), um utilizando a estrutura da PNP bovina e o outro com a estrutura da SmPNP refinada a 1.75 Å de resolução, para e descoberta de novos ligantes para a boPNP e para a SmPNP.

No VS com a PNP bovina foi utilizado a estrutura da boPNP em complexo com deazainosina e fosfato (1A9P). Os resíduos chave do sítio ativo foram identificados e assinalados para o VS. Foi utilizado um banco de dados com cerca de 36000 compostos com peso molecular menor que 280Da, o programa utilizado foi o GOLD (Jones et al., 1997). Após a conclusão do programa as melhores soluções encontradas foram inspecionadas e 19 compostos que interagiram com o resíduos chave do sítio ativo foram selecionados para o ensaio de atividade.

Utilizando a estrutura da SmPNP em complexo com NDSB195 refinada a 1.75 Å foi realizado o VS para encontrar compostos que se ligassem a SmPNP. Os resíduos chave do sítio ativo foram identificados e assinalados para o VS. Foram utilizados um banco de dados de cerca de 36000 compostos com peso molecular de no máximo 280Da, o programa utilizado foi o GOLD. Após a conclusão do programa as melhores soluções encontradas foram inspecionadas e 22 compostos que

interagiram com o resíduos chave do sítio ativo foram selecionados para o ensaio de atividade.

3.9 Ensaios de atividade da SmPNP com os compostos oriundos do VS.

Para o ensaio de atividade com os compostos oriundos do Vs foi utilizado o método da Kalckar (1947), e uma concentração fixa do composto oriundo do VS (100μM). Esta medidas foram feitas para verificar a capacidade dos compostos do VS em inibir a SmPNP.

A mistura de reação foi:

	Volume (μL)	Concentração Final
Tampão fosfato 500mM	100	50mM
Xantine oxidase (0,2U/mL)	100	0,02U
Inosina 5mM	20	100μM
DMSO	100	10%
10mM composto em DMSO	10	100μM
Água	660	
SmPNP 35μg/mL	10	350ng

3.10. Determinação do valor de IC50 para alguns inibidores da SmPNP

Os valores de IC_{50} dos compostos Formicina-B, Tubercidina e 6-mercaptoguanosina para a enzima PNP de *S. mansoni* foram determinados. Estes compostos segundo Senft & Crabtree. (1983), são capazes de inibir a SmPNP.

Em cada ensaio independente foi utilizado 5 ou 6 concentrações diferentes de inibidor, empregando-se inosina 10 μM e fosfato 50 mM como substratos. As medidas foram feitas usualmente a concentrações 4,0-5,0 nM da PNP *S. mansoni*. Todas as medidas foram feitas à 25^0C e pH 7,4 (mantido com solução tampão de Tris-HCl 100 mM). As reações empregando inosina como substrato foram monitoradas a 293 nm.

O valor de IC50 foi determinado a partir dos dados cinéticos coletados utilizando-se o programa estatístico para cinética enzimática SigmaPlot 2001, que contém um sistema iterativo integrado para desempenhar a análise gráfica não-linear de melhor ajuste.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sequenciamento do N-terminal da SmPNP

Na clonagem as SmPNP no vetor de expressão pMAL-c2X, foram utilizados dois iniciadores para a amplificação do cDNA da SmPNP, o SmPNPRev que possui um sítio para *Pst*I, e o SmPNPpMAL, que além do sítio de restrição para *Bam*HI, possui um sítio para clivagem pelo Factor Xa. Este segundo sítio foi adicionado após a análise da estrutura da PNP de eritrócitos humanos, onde foi observado que o N-terminal da PNP situa-se próximo da região de interface entre as subunidades do trímero, desta forma resíduos extras podem dificultar ou até impossibilitar a formação do trímero e por conseguinte obtenção de monocristais da SmPNP.

Desta forma era produzida uma proteína de fusão com dois sítios para o Factor Xa como é observado na Figura 4.1 abaixo:

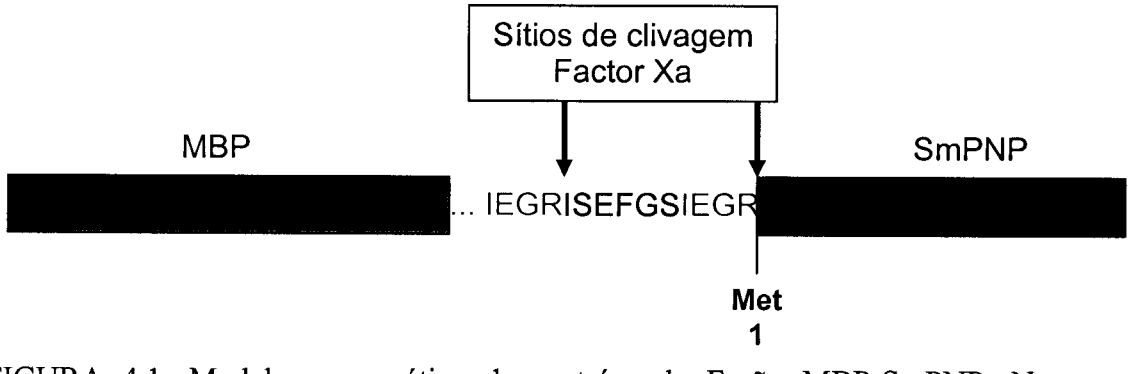


FIGURA 4.1. Modelo esquemático da proteína de Fusão MBP-SmPNP. Neste esquema são visualizados os dois sítios para o Factor Xa.

Entretanto não havia nenhuma garantia de que o Factor Xa clivaria a proteína de fusão nos dois sítios, produzindo assim uma população de moléculas com homogeneidade no N-terminal. Acreditando que a SmPNP assim produzida não possuiria heterogeneidade no N-terminal, toda a SmPNP produzida durante o trabalho de mestrado (Pereira *et al.*, 2003) não foi submetida ao sequenciamento do N-terminal, porém não foi possível a obtenção de monocristais de SmPNP em todas as ~1500 condições de cristalização testadas (somente foram obtidos cristais com pequeno tamanho ~0.05mm). Durante a preparação da dissertação de mestrado, este problema foi levantado como possível causador da não obtenção de cristais.

Porém, ainda faltava a confirmação de que a SmPNP produzida possuía um N-terminal heterogêneo, e em um gel de SDS-PAGE do produto da clivagem foi possível observar duas bandas muito próximas em torno de 30 kDa (Figura 4.2).

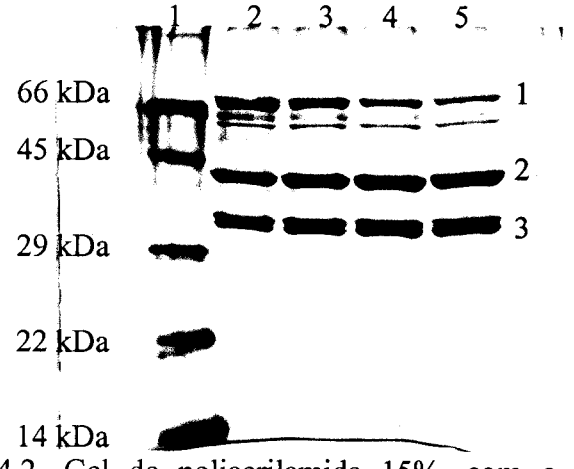


FIGURA 4.2. Gel de poliacrilamida 15%, com o resultado da verificação da clivagem da proteína de fusão pelo Factor Xa. Na banda 1 é visualizada a proteína de fusão (74 kDa). A banda 2 é a MBP (42 kDa), e no número 3 é possível observar a presença de duas bandas para a SmPNP. Canaleta 1- Padrão de peso molecular. Canaleta 2- Proteína de fusão clivada pelo Factor Xa (24 horas). Canaleta 3- Proteína de fusão clivada pelo Factor Xa (48 horas). Canaleta 4- Proteína de fusão clivada pelo Factor Xa (72 horas). Canaleta 5- Proteína de fusão clivada pelo Factor Xa (96 horas).

O peso molecular calculado a partir da seqüência da SmPNP é de 31161.3 Da, enquanto que o peso da SmPNP mais os resíduos extras no N-terminal é de 32237.3 Da, uma diferença de 1.08 kDa (se houver a clivagem no primeiro sítio).

Para verificar se o N-terminal destas duas bandas correspondiam a SmPNP com diferentes sítios de clivagem, foi realizado o sequenciamento do N-terminal no Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Para isto uma amostra da SmPNP foi submetida a um SDS-PAGE (Laemmli; 1970), com um tempo de corrida de 165 minutos, para uma maior separação das bandas de interesse. Após a corrida as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF, a qual foi corada por coomassie blue. As bandas de interesse foram cortadas e sequenciadas. A Figura 4.3 mostra a metade do gel que serviu como controle e as bandas correspondentes as que foram sequenciadas estão apontadas no destaque da Figura 4.3.

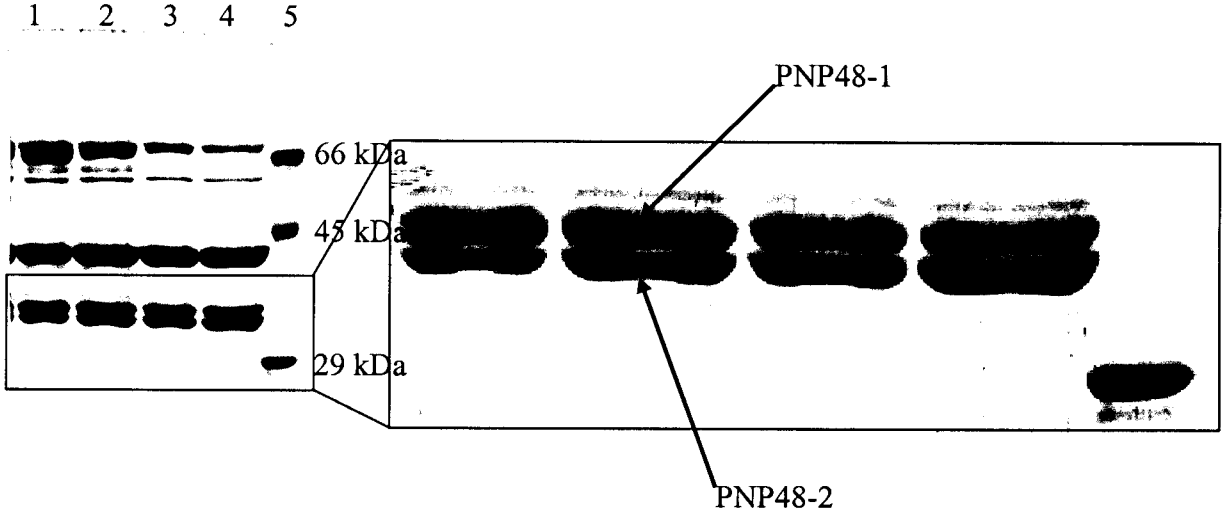


FIGURA 4.3. Gel de poliacrilamida 15%, com o resultado da clivagem da proteína de fusão pelo Factor Xa. Canaletas 1 a 4- Proteína de fusão + Factor Xa (300:1), 24, 48, 72 e 96 horas de clivagem respectivamente. Canaleta 5- Padrão de peso molecular. No destaque as duas bandas, nomeadas de PNP48-1 e PNP48-2 que foram sequenciadas.

Como resultado do sequenciamento temos que a SmPNP era produzida com um N-terminal heterogêneo com mostrado no esquema da Figura 4.4:

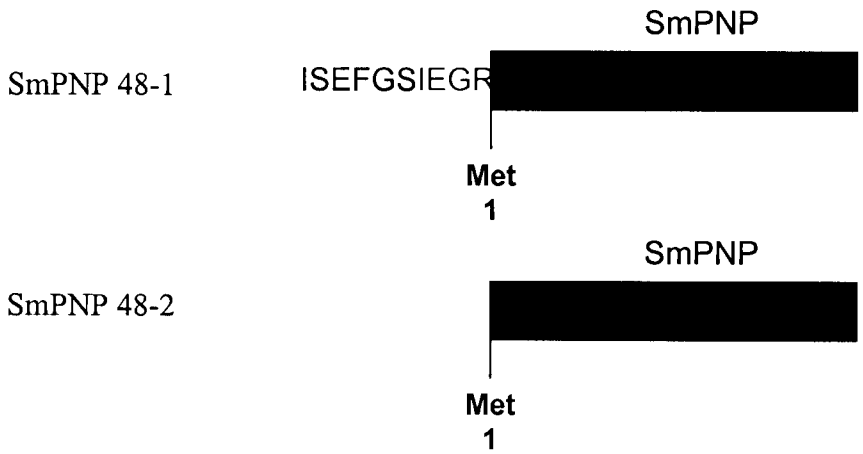


FIGURA 4.4. Esquema do resultado do sequenciamento do N-terminal da SmPNP.

A seqüência do N-terminal da banda SmPNP 48-1 foi ISEFGSIEGRMH, onde os resíduos MH correspondem ao início da SmPNP, enquanto que a banda SmPNP 48-2 tem como seqüência do N-terminal MHESVTANIE correspondente a seqüência dos primeiros 10 aminoácidos da SmPNP, seqüência obtida através do sequenciamento do cDNA da SmPNP.

Desta forma foi confirmada a produção da SmPNP com um N-terminal heterogêneo, entretanto necessitava-se de uma solução para produzir a SmPNP sem nenhum resíduo extra no N-terminal.

O gel da figura 4.3 fornece uma evidência de que a banda de menor massa molecular (PNP48-2) aumenta com o tempo de clivagem (canaleta 4 em comparação a 1). Uma solução possível para a produção da SmPNP sem resíduos a mais no N-terminal seria um aumento do tempo da clivagem e/ou o aumento na quantidade de Factor Xa utilizado. Entretanto essas opções não garantiriam a total ausência de

heterogeneidade no N-terminal, como no caso do aumento da quantidade de Factor Xa um aumento expressivo no custo de produção da SmPNP.

Uma solução mais econômica e elegante seria bloquear, deletar ou trocar o primeiro sítio de clivagem. Estudando os vetores pMAL disponíveis foi idealizada a seguinte solução: retirar o cDNA da SmPNP do vetor pMAL-C2X utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Pst*I com posterior clonagem deste fragmento no vetor pMAL-C2G, o qual possui um sítio para Genenase. Desta forma a clivagem se dá no sítio para o Factor Xa que foi adicionado pelo iniciador SmPNPpMAL, produzindo assim uma SmPNP sem nenhum resíduo extra no N-terminal .

4.2. Expressão e Purificação da proteína SmPNP

4.2.1. Clonagem do cDNA da SmPNP no vetor de expressão pMal c2G

17 colônias foram selecionadas ao acaso para a confirmação do inserto utilizando o PCR de colônia. Das colônias avaliadas, 10 colônias possuíam o cDNA da SmPNP, e destas 4 colônias foram escolhidas para a curva de crescimento.

4.2.2. Expressão e purificação da Proteína de fusão MBP-SmPNP

A expressão da proteína de fusão foi realizada utilizando as mesmas condições obtidas durante o mestrado (Pereira *et al.*, 2003) e descritas na metodologia. O rendimento médio por expressão foi de 50-80mg/L de meio 2XYT. A proteína de fusão foi purificada por afinidade em uma coluna de amilose com um ótimo grau de pureza (Figura 4.5, canaleta 4).

4.2.3. Clivagem da proteína de fusão com Fator Xa

A clivagem da proteína de fusão com apenas um sítio de clivagem pelo Factor Xa teve um rendimento menor que a proteína de fusão produzida com dois sítios de clivagem. Isto pode ser explicado supondo-se que o segundo sítio esteja mais inacessível ao Factor Xa.

4.2.4 Purificação da SmPNP

Para a purificação da SmPNP o produto da clivagem foi dialisado contra 100 volumes de 20mM MES pH 6,0, e concentrado até cerca de 2 mg/mL. O produto da diálise foi então aplicado na coluna de troca catiônica Poros 20SP. Nestas condições a MBP e o Factor Xa e outros contaminantes menores (em quantidade) são eluídos durante a injeção da amostra, enquanto que a SmPNP é retida pela coluna sendo posteriormente eluída durante o gradiente salino. As alíquotas referentes a SmPNP pura foram dializadas contra 100 volumes de água e 10 mM de β-Mercaptoetanol e concentradas até aproximadamente 10 mg/mL.

No gel da Figura 4.5, é possível observar todas as etapas da produção e purificação da SmPNP. A SmPNP purificada apresentou um excelente grau de pureza necessário para a etapa de cristalização.

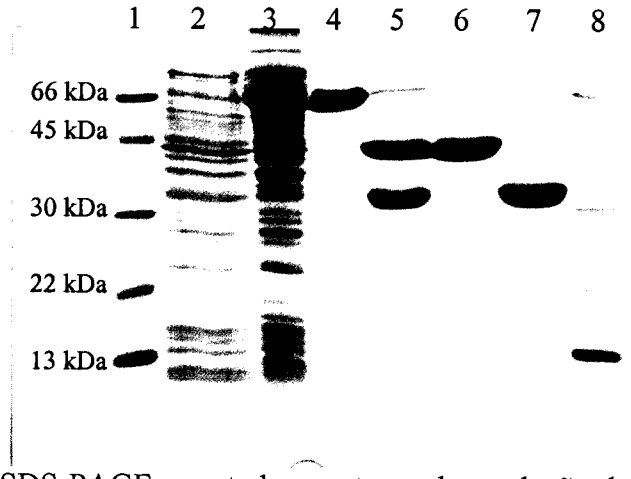


FIGURA 4.5. SDS-PAGE com todas as etapas da produção da SmPNP. Canaleta 1- Padrão de peso molecular. Canaleta 2- Lisado de bactérias sem indução. Canaleta 3- Lisado de bactérias após indução com IPTG. Canaleta 4- Proteína de fusão (MBP-SmPNP) purificada da coluna de amilose. Canaleta 5- Proteína de fusão após clivagem com Factor Xa. Canaleta 6- Maltose binding protein (MBP) purificada na coluna Poros 20SP. Canaleta 7- SmPNP purificada na coluna Poros 20SP. Canaleta 8- Padrão de peso molecular.

4.3 Cristalização da SmPNP

Como a SmPNP produzida não possui nenhum resíduo extra no N-terminal foi reiniciado a busca por condições que possibilitassem a obtenção de monocristais, utilizando os kits de matriz esparsa da Hampton Research.

Em 292 condições testadas foi possível a obtenção de monocristais de SmPNP em uma condição: a solução 43 do Kit *Cristal Screen Cryo* da Hamptom Research, a qual consiste em 24% de PEG 1500 e 20% de glicerol. Os cristais obtidos nestas condições podem ser visualizados na Figura 4.6.

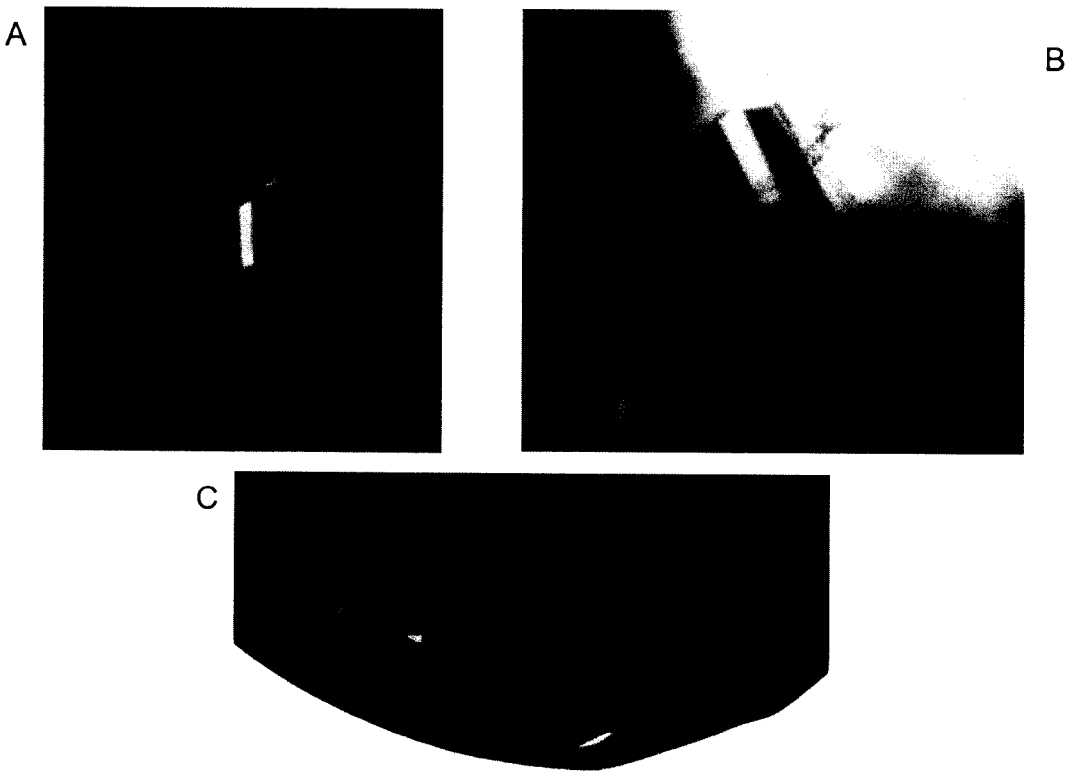


FIGURA 4.6. Cristais da SmPNP obtidos na condição 43 do fatorial *Crystal Screen Cryo*. A- Cristais de SmPNP (maior dimensão ~0,2 mm). B- Monocristal com maior dimensão de ~0,4 mm, infelizmente este cristal cresceu sobre uma fibra de papel. C- Monocristais da SmPNP (maior dimensão ~0,1 mm).

Segundo McPherson (1998), o surgimento de cristais, representa o ponto mais importante para alcançar o objetivo final: a determinação da estrutura da macromolécula por difração de raios X. Também produz duas informações importantes: a primeira diz que a macromolécula pode ser cristalizada e a segunda que produz uma série de condições físico e químicas que servem de ponto de partida para o último ciclo de otimizações para o crescimento dos cristais. A otimização do crescimento dos cristais pode ser a parte mais exigente de todo o processo de cristalização.

Um fato importante é que a SmPNP cristaliza numa solução já sabidamente crioprotetora, pois existe a presença de 20% de glicerol. A condição onde houve o aparecimento de cristais foi repetida a fim de serem obtidos um maior número de

cristais, tanto utilizando a solução 43 *Cryo* da Hampton Research, como também utilizando a mesma condição feita no laboratório. Os cristais somente surgiram na condição 43 do fatorial *Cristal Screeen Cryo* da Hampton Research, e não na condição feita no laboratório. Isto nos levou a medir o pH das duas soluções, que demosntrou que o pH da solução 43 *Cryo* de Hampton Research é 5,4 e a solução feita no laboratório é 4,4.

Como não havia nenhum tampão que controlasse o pH na solução 43, foi montado um experimento para verificar qual a faixa de pH na qual ocorre a formação de cristais da SmPNP, onde foram avaliados 8 pHs (8,0, 7,5, 7,0, 6,0, 5,6, 5,3, 5,0 e 4,0). Foram obtidos cristais da SmPNP em pHs 5,6, 5,3 e 5,0 utilizando-se de 32mM de acetato de sódio como tampão, em ambas as temperaturas testadas (4^0C e 18^0C), e em todas as concentrações de SmPNP utilizadas (10 a 6 mg/mL). A 4 ^{0}C os cristais são mais bem formados que a 18 ^{0}C e em pH 5,0 são observados os melhores cristais.

Como forma de obter uma faixa mais fina de pH para o surgimento dos cristais de SmPNP, um novo refinamento de pH foi realizado, utilizando 32mM de acetato de sódio em pHs 4,8 a 5,5 em acréscimos de 0,1 unidades de pH. Os cristais da SmPNP surgem em apenas em pHs 5,0 a 4,8, porém ainda com pequeno tamanho (menores que 0,1 mm na maior dimensão).

Como última otimização nas condições de cristalização da SmPNP foi realizado um refinamento na concentração do preciptante utilizado (neste caso o PEG 1500), onde foram testadas as concentrações de PEG1500 de 18 a 24% em passos de 2% e utilizando uma concentração de SmPNP de 5,0-6,0 mg/mL. Desta forma foi determinado que as condições ótimas de cristalização da SmPNP são 18-20% PEG 1500, 20% glicerol em 32mM de tampão acetato de sódio pH 4,9-5,0.

4.3.1. Influência do aditivo NDSB195 na cristalização da SmPNP

O uso do NDSB195 como aditivo teve um grande efeito na cristalização da SmPNP como pode ser observado na Figura 4.7. O NDSB195 levou a uma redução do número dos cristais formados por gota, e um expressivo aumento no tamanho dos cristais formados (de 0,05mm na figura 4.7 A, para 0,7mm em 4.7 B).

Entretanto quando a estrutura da SmPNP oriunda de um cristal crescido na presença de NDSB195 foi resolvida, uma clara densidade eletrônica foi encontrada no sítio ativo da SmPNP, a qual corresponde em forma a molécula de NDSB195 e foi possível inequivocamente modelá-la nesta densidade eletrônica (a estrutura cristalina da SmPNP será discutida adiante assim como a razão do crescimento de grandes cristais da SmPNP na presença de NDSB195). Devido a grande quantidade de NDSB195 utilizado na cristalização da SmPNP não foi possível utilizar estes cristais para experimentos de soaking, estes cristais quando submetidos a solução de soaking, a qual não possuía o aditivo, levavam a quebra dos cristais, a razão disto é o deslocamento do NDSB195 do sitio ativo da SmPNP, levando a movimentos na estrutura da SmPNP.

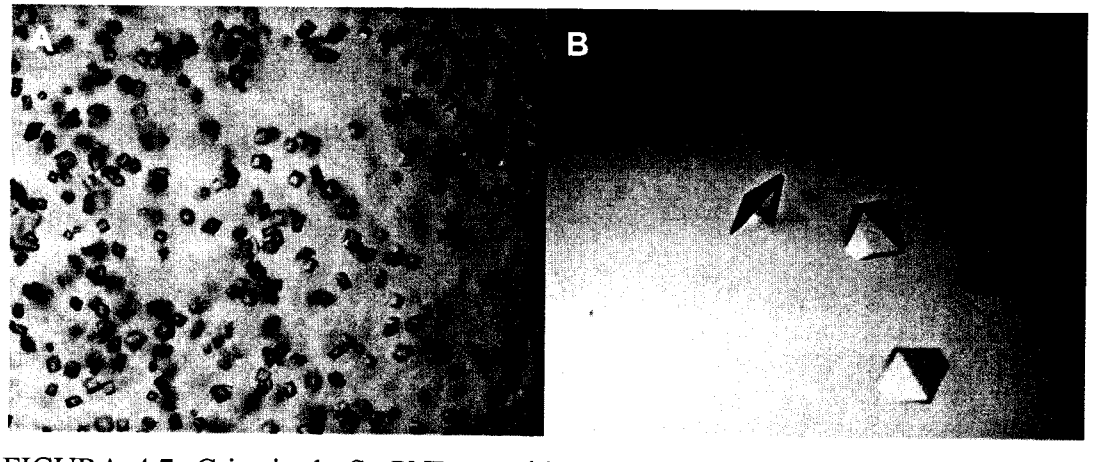


FIGURA 4.7. Cristais da SmPNP crescidos na ausência (A) e na presença (B) do aditivo NDSB195. O mesmo aumento foi utilizado em ambas as fotos.

Para tentar solucionar este problema o uso do aditivo NDSB256 foi investigado. A diferença entre NDSB195 e NDSB256 é o fato que o NDSB256 possui um grupo fenil em oposição ao grupo sulfato (Figura 4.8). Esperava-se que devido ao maior tamanho do NDSB256, o mesmo não se ligaria ao sítio ativo da SmPNP.

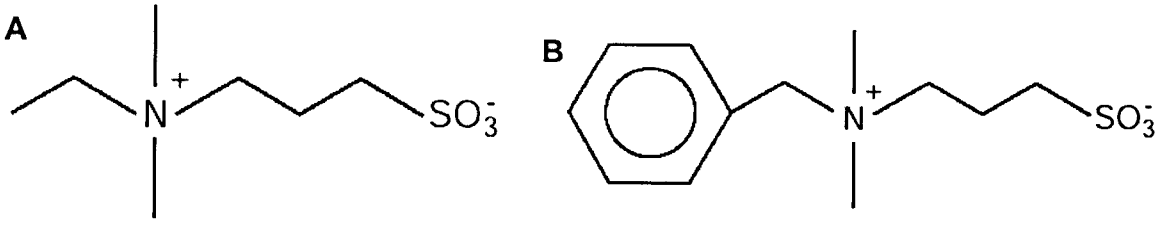


FIGURA 4.8. Formulas moleculares dos NDSB195 (A) e NDSB256 (B). A diferença entre estes NDSBs é a presença do grupo fenil no NDSB256.

Os cristais da SmPNP crescidos na presença do NDSB256 são menores que os crescidos com NDSB195, possuindo cerca de 0,3mm em sua maior dimensão. Foram coletados dois conjuntos de dados para dois cristais da SmPNP crescidos na presença da NDSB256, e após a resolução das estruturas não foi observado nenhum NDSB256 ligado no sítio ativo da SmPNP. Entretanto, assim como os cristais da SmPNP crescidos com NDSB195, não foi possível utilizar estes cristais em experimentos de soaking. Devido a alta concentração destes compostos na solução de cristalização, todos os cristais quebraram durante os experimentos de soaking, pois o deslocamante

4.4. Coleta e processamento dos dados de difração

4.4.1 Coleta e processamento de dados de difração de um cristal da SmPNP a 2,75Å de resolução no LNLS

Utilizando a estação CPr do LNLS foi coletado um conjunto de dados para um cristal da SmPNP até 2,75Å de resolução. O cristal foi centrado no feixe de raios X e foi coletada uma imagem para a realização do indexamento, ou seja a descoberta dos parâmetros da rede e do sistema cristalino com o auxilio do programa Denzo. Com resultados tem-se que a SmPNP possui uma rede de Bravais primitiva ortorrômbica. Este fato indica que quatro grupos espaciais são permitidos: o P222, $P2_122$, $P2_12_12$ ou $P2_12_12_1$. Impondo arbitrariamente o grupo espacial P222, foi realizada a estratégia para a coleta de dados. 95 imagens com oscilação de 1^0 foram coletadas, estas imagens foram integradas e escalonadas através do pacote de programas HKL (Otwinowski, 1993).

A determinação do grupo espacial correto foi realizado através da presença ou não das extinções sistemáticas ao longo de cada eixo do espaço recíproco. Esta análise foi realizada utilizando-se o programa hklview presente no pacote de programas CCP4 (Collaborative Computer Project Number 4, 1994). Foi observada somente a presença de reflexões com índices h = 2n e l = 2n (para reflexões do tipo $h00$ e $00l$ respectivamente). Reflexões do tipo $0k0$ não foram registradas neste conjunto de dados devido a orientação do cristal. Estas ausências sistemáticas ao longo dos eixos h e l indicam que somente existem duas possibilidades para o grupo espacial da SmPNP: $P2_12_12$ e $P2_12_12_1$. Para solucionar esta ambigüidade foi analisada as extinções sistemáticas em outro conjunto de dados da SmPNP coletado

no LNLS, o qual está incompleto, mas que foi coletado a partir de um cristal da SmPNP em outra orientação. O arquivo de reflexões foi visualizado no programa hklview onde foi possível observar somente a presença de reflexões $k = 2n$ (para reflexos do tipo $0k0$). Indicando que o grupo espacial da SmPNP é o $P2_12_12_1$. O conjunto de dados foi novamente escalonado impondo este grupo espacial. Na Tabela 4.1 encontram-se algumas estatísticas divididas por faixa de resolução geradas pelo programa Scalepack do pacote HKL (Otwinowski, 1993).

TABELA 4.1. Estatísticas do escalonamento da SmPNP a 2,75Å de resolução.

Faixa de resolução (Å)	Fator R linear	Fator R quadratico	I/σ(I)	Completeza (%)
20,00 - 6,70	0,041	0,043	19,81	92,2
6,70 - 5,35	0,070	0,067	14,18	96,3
5,35 - 4,69	0,058	0,056	16,56	97,1
4,69 - 4,26	0,060	0,060	17,24	98,2
4,26 - 3,96	0,066	0,063	15,11	98,1
3,96 - 3,73	0,081	0,093	13,12	98,5
3,73 - 3,54	0,102	0,100	10,93	97,6
3,54 - 3,39	0,115	0,109	9,18	97,7
3,39 - 3,26	0,147	0,136	7,32	96,6
3,26 - 3,15	0,183	0,166	5,86	96,6
3,15 - 3,05	0,207	0,191	5,21	96,0
3,05 - 2,96	0,238	0,208	4,41	95,4
2,96 - 2,88	0,281	0,250	3,68	95,7
2,88 - 2,81	0,296	0,248	3,51	96,4
2,81 - 2,75	0,317	0,279	3,13	95,0
Todas reflexões	**0,096**	**0,080**	**10,56**	**96,5**

Os parâmetros, estatísticas e valores finais do processamento dos dados coletados para a SmPNP a 2,75Å de resolução encontram-se na Tabela 4.2.

O número de moléculas na unidade assimétrica foi estimado utilizando o programa Matthews_coeff presente no CCP4. Foram calculados os valores o coeficiente de Matthews um monômero (V_M=5,93 Å^3/Da que eqüivale a 79,08% de solvente), um dímero (V_M=2,96 Å^3/Da que eqüivale a 58,16% de solvente) e um trímero (V_M=1,97 Å^3/Da que eqüivale a 37,24% de solvente), dentre estes o que mais se aproxima do valor médio para o V_M e o valor de 1,97 Å^3/Da para o trímero, sendo

estimado a presença de um trímero por unidade assimétrica. Alem disto não é possível a formação de um trímero a partir de monômeros com as operações de simetria do grupo espacial $P2_12_12_1$, implicando a presença de um triméro por unidade assimétrica.

TABELA 4.2. Parâmetros e valores finais do processamento dos dados da SmPNP a 2,75Å de resolução.

Parâmetros	SmPNP a 2,75Å
Local da coleta	CPr. LNLS
Tipo de Radiação	síncrontron (λ = 1.544 Å)
Detector	placa de imagem MAR345
Grupo espacial	$P2_12_12_1$
Parâmetros da cela unitária (Å)	a = 47,30, b = 119,19, c= 130,94
Mosaicidade	0,54°
Faixa de resolução (última camada)	20,0 - 2,75 Å (2,81 - 2,75 Å)
Total de imagens ($\Delta\varphi=1^0$)	95
Reflexões totais	69972
Reflexões únicas	19267
Redundância	3,5
R factor linear (última camada)	9,6 %(31,7 %)
R factor quadrático (última camada)	8,0 % (27,9 %)
Completeza total (última camada)	96,5 (95,0)
$I/\sigma(I)$ (última camada)	10,56 (3,13)

4.4.2 Coleta e processamento de dados de difração de um cristal da SmPNP crescido na presença de NDSB195 a 1,75Å de resolução no ESRF

Foi coletado na estação ID 14.1 do ESRF um conjunto de dados de um cristal da SmPNP crescido na presença do aditivo NDSB195, utilizando um comprimento de onda de 0,934Å e um detetor CCD ADSC. O cristal da SmPNP foi posicionado no feixe de raios X onde foram coletadas duas imagens de difração (0° e 90°). Estas imagens foram processadas com o programa MOSFLM para a realização do

indexamento e construção da estratégia de coleta de dados. Foram coletadas 190 imagens com uma oscilação de 0,5°, perfazendo um total de 95°. Este cristal também pertencia ao grupo espacial $P2_12_12_1$, com os parâmetros da cela unitária semelhantes ao coletado no LNLS. Os dados foram integrados utilizando o programa MOSFLM e escalonados até 1,75 Å de resolução com o programa SCALA presente no pacote de programas CCP4. Na Tabela 4.3 encontram-se algumas estatísticas divididas por faixa de resolução geradas pelo programa SCALA.

TABELA 4.3. Estatísticas do escalonamento da SmPNP a 1,75Å de resolução.

Faixa de resolução (Å)	R_{meas}	R_{sym}	$I/\sigma(I)$	Completeza
45,5 - 5,53	0,073	0,061	8,9	94,7
5,53 - 3,91	0,072	0,062	8,4	99,6
3,91 - 3,20	0,080	0,070	7,4	99,9
3,20 - 2,77	0,090	0,078	7,1	99,9
2,77 - 2,47	0,104	0,090	6,4	99,8
2,47 - 2,26	0,121	0,105	5,9	100,0
2,26 - 2,09	0,139	0,120	5,2	99,9
2,09 - 1,96	0,173	0,149	4,4	99,9
1,96 - 1,84	0,240	0,207	2,8	99,8
1,84 - 1,75	0,352	0,298	2,5	97,1
Todas reflexões	**0,094**	**0,081**	**4,7**	**99,3**

[a] $R_{sym}(F) = \sum_{hkl}\sum_{i}\left|F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}\right| \Big/ \sum_{hkl}\sum_{i} F_i(hkl)$: discrepância entre os fatores de estrutura simetricamente relacionados

[b] $R_{meas}(F) = \sum_{hkl}\sum_{i}\sqrt{\frac{N}{N-1}}\left|F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}\right| \Big/ \sum_{hkl}\sum_{i} F_i(hkl)$: discrepância corrigida pela multiplicidade do conjunto

[c] $\langle I/\sigma(I)\rangle$: intensidade média dividido pelo erro médio associado a cada medida

Os parâmetros, estatísticas e valores finais do processamento dos dados coletados para a SmPNP a 1,75Å de resolução encontram-se na Tabela 4.4.

TABELA 4.4. Parâmetros e valores finais do processamento dos dados da SmPNP a 1,75Å de resolução.

Parâmetros	SmPNP a 1,75Å
Local da coleta	ID14.1 ESRF
Tipo de Radiação	síncrontron (λ = 0,934)
Detetor	CCD ADSC Quantum 4
Grupo espacial	$P2_12_12_1$
Parâmetros da cela unitária (Å)	a = 48,75, b = 122,06, c= 129,76
Mosaicidade	0,46
Faixa de resolução (última camada)	45,5 - 1,75Å (1,84 - 1,75Å)
Total de imagens ($\Delta\varphi$=0,5^0)	190
Reflexões totais	286686
Reflexões únicas	78422
Redundância	3,6
R_{meas} (última camada)	9,4 %(35,2 %)
R_{sym} (última camada)	8,1 % (29,8 %)
Completeza total (última camada)	99,3 (97,1)
I/σ(I) (última camada)	4,7 (2,5)

4.4.3 Coleta e processamento de dados de difração de um cristal da SmPNP a 1,9Å de resolução no SRS

Foi coletado na estação ID14.2 do SRS um conjunto de dados de um cristal da SmPNP "nativo" ou seja sem ligantes, utilizando um comprimento de onda de 0,980Å e um detetor CCD ADSC. O cristal da SmPNP foi posicionado no feixe de raios X onde foram coletadas duas imagens de difração (a 0° e 90°). Estas imagens foram processadas com o programa MOSFLM para a realização do indexamento e construção da estratégia de coleta de dados. Foram coletadas 180 imagens com uma oscilação de 0,5°, perfazendo um total de 90°. Este cristal também pertence ao grupo espacial $P2_12_12_1$, com os parâmetros da cela unitária semelhantes aos anteriormente coletados. Os dados foram integrados utilizando o programa MOSFLM e escalonados até 1,9Å de resolução com o programa SCALA presente no pacote de

programas CCP4. Na Tabela 4.5 encontram-se algumas estatísticas divididas por faixa de resolução geradas pelo programa SCALA.

TABELA 4.5. Estatísticas do escalonamento da SmPNP a 1,9Å de resolução.

Faixa de resolução (Å)	R_{meas}	R_{sym}	I/σ(I)	Completeza
55,0 - 6,01	0,050	0,042	8,4	98,2
6,01 - 4,25	0,042	0,036	15,6	99,1
4,25 - 3,47	0,044	0,038	12,5	98,8
3,47 - 3,00	0,056	0,048	12,3	98,7
3,00 - 2,69	0,076	0,065	10,2	99,7
2,69 - 2,45	0,102	0,088	7,6	99,9
2,45 - 2,27	0,137	0,117	4,1	99,9
2,27 - 2,12	0,175	0,149	5,1	100,0
2,12 - 2,00	0,262	0,224	3,4	100,0
2,00 - 1,90	0,453	0,381	2,0	94,8
Todas as reflexões	**0,069**	**0,059**	**7,0**	**98,9**

[a] $R_{sym}(F) = \sum_{hkl}\sum_{i}\left|F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}\right| \Big/ \sum_{hkl}\sum_{i} F_i(hkl)$: discrepância entre os fatores de estrutura simetricamente relacionados

[b] $R_{meas}(F) = \sum_{hkl}\sum_{i}\sqrt{\frac{N}{N-1}}\left|F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}\right| \Big/ \sum_{hkl}\sum_{i} F_i(hkl)$: discrepância corrigida pela multiplicidade do conjunto

[c] ⟨I/σ(I)⟩: intensidade média dividido pelo erro médio associado a cada medida

Os parâmetros, estatísticas e valores finais do processamento dos dados coletados para a SmPNP a 1,9Å de resolução encontram-se na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Parâmetros e valores finais do processamento dos dados da SmPNP a 1,9Å de resolução.

Parâmetros	SmPNP a 1,9Å
Local da coleta	ID14.2 SRS
Tipo de Radiação	síncrontron (λ = 0,980)
Detetor	CCD ADSC Quantum 4
Grupo espacial	$P2_12_12_1$
Parâmetros da cela unitária (Å)	a = 49,22, b = 120,20, c= 131,92
Mosaicidade	0,37
Faixa de resolução (última camada)	55,0 - 1,9Å (2,0 - 1,9Å)
Total de imagens ($\Delta\varphi=0,5^0$)	180
Reflexões totais	219732
Reflexões únicas	61830
Redundância	3,6
R_{meas} (última camada)	9,4 %(35,2 %)
R_{sym} (última camada)	8,1 % (29,8 %)
Completeza total (última camada)	99,3 (97,1)
I/σ(I) (última camada)	4,7 (2,5)

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

4.4.4 Coleta e processamento de dados de difração de um cristal da SmPNP em complexo com AT2169 a 1,9Å de resolução no SRS.

Foi coletado na estação ID14.2 do SRS um conjunto de dados de um cristal da SmPNP oriundo de um soaking com o composto AT2169 (um dos compostos selecionados no virtual screening, o qual será descrito mais adiante), utilizando um comprimento de onda de 0,980Å e um detetor CCD ADSC. O cristal da SmPNP foi posicionado no feixe de raios X onde foram coletadas duas imagens de difração (a 0° e 90°). Estas imagens foram processadas com o programa MOSFLM para a realização do indexamento e construção da estratégia de coleta de dados. Foram coletadas 65 imagens com uma oscilação de 1°. Os dados foram integrados utilizando o programa MOSFLM e escalonados até 1,9Å de resolução com o programa SCALA presente no pacote de programas CCP4. Na Tabela 4.7 encontram-se algumas estatísticas divididas por faixa de resolução geradas pelo programa SCALA.

TABELA 4.7. Estatísticas do escalonamento da SmPNP em complexo com AT2169 a 1,9Å de resolução.

Faixa de Resolução (Å)	R_{meas}	R_{sym}	$I/\sigma(I)$	Completeza (%)
54,0 - 6,01	0,038	0,031	11,6	88,2
6,01 - 4,25	0,036	0,030	17,8	91,7
4,25 - 3,47	0,042	0,035	17,0	93,8
3,47 - 3,00	0,058	0,048	13,3	94,8
3,00 - 2,69	0,084	0,069	9,8	94,7
2,69 - 2,45	0,117	0,095	7,5	95,3
2,45 - 2,27	0,156	0,125	5,7	94,5
2,27 - 2,12	0,201	0,161	4,5	94,9
2,12 - 2,00	0,279	0,220	3,3	94,8
2,00 -1,90	0,400	0,314	2,3	89,3
Todas as reflexões	**0,077**	**0,063**	**9,2**	**93,5**

[a] $R_{sym}(F) = \sum_{hkl}\sum_{i}\left|F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}\right| \Big/ \sum_{hkl}\sum_{i} F_i(hkl)$: discrepância entre os fatores de estrutura simetricamente relacionados

[b] $R_{meas}(F) = \sum_{hkl}\sum_{i}\sqrt{\frac{N}{N-1}}\left|F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}\right| \Big/ \sum_{hkl}\sum_{i} F_i(hkl)$: discrepância corrigida pela multiplicidade do conjunto

[c] $\langle I/\sigma(I)\rangle$: intensidade média dividido pelo erro médio associado a cada medida

Os parâmetros, estatísticas e valores finais do processamento dos dados coletados para a SmPNP em complexo com AT2169 a 1,9Å de resolução encontram-se na Tabela 4.8.

TABELA 4.8. Parâmetros e valores finais do processamento dos dados da SmPNP em complexo com AT2169 a 1,9Å de resolução.

Parâmetros	SmPNP em complexo com AT2169
Local da coleta	ID14.2 SRS
Tipo de Radiação	síncrontron (λ = 0,980)
Detetor	CCD ADSC Quantum 4
Grupo espacial	$P2_12_12_1$
Parâmetros da cela unitária (Å)	a = 47,80, b = 120,14, c= 130,81
Mosaicidade	0,50
Faixa de resolução (última camada)	55,0 - 1,9Å (2,0 - 1,9Å)
Total de imagens ($\Delta\varphi=1^0$)	65
Reflexões totais	142332
Reflexões únicas	55948
Redundância	2,5
R_{meas} (última camada)	7,7 %(40,0 %)
R_{sym} (última camada)	6,3 % (31,4 %)
Completeza total (última camada)	93,5 % (89,3 %)
$I/\sigma(I)$ (última camada)	9,2 (2,3)

4.4.5 Coleta e processamento de dados de difração de um cristal da SmPNP em complexo com fosfato a 2,0Å de resolução em uma fonte de ânodo rotatório.

Por fim foi coletado um conjunto de dados para um cristal da SmPNP oriundo de um experimento de co-cristalização com o inibidor BCX821, O cristal da SmPNP foi montado e posicionado para coleta de dados numa fonte de raios X de ânodo rotatório UltraX 18 da Rigaku equipado com espelhos confocais e detetor MAR345dtb. Foi coletada uma imagem de difração. Esta imagem foi processada com o programa MOSFLM para o indexamento e construção da estratégia de coleta de dados. Foram coletadas 217 imagens com uma oscilação de 1°. Os dados foram integrados utilizando o programa MOSFLM e escalonados até 2,0Å de resolução

com o programa SCALA presente no pacote de programas CCP4. Na Tabela 4.9 encontram-se algumas estatísticas divididas por faixa de resolução geradas pelo programa SCALA.

TABELA 4.9. Estatísticas do escalonamento da SmPNP em complexo como fosfato a 2,0Å de resolução

Faixa de resolução (Å)	R_{meas}	R_{sym}	$I/\sigma(I)$	Completeza
26,6 - 6,32	0,052	0,046	11,3	98,7
6,32 - 4,47	0,058	0,050	11,3	100,0
4,47 - 3,65	0,070	0,060	9,6	99,8
3,65 - 3,16	0,080	0,066	9,4	99,8
3,16 - 2,83	0,096	0,077	8,8	99,4
2,83 - 2,58	0,126	0,100	7,2	98,2
2,58 - 2,39	0,179	0,142	5,1	95,5
2,39 - 2,24	0,244	0,195	3,7	93,6
2,24 - 2,11	0,325	0,261	2,8	90,3
2,11 - 2,00	0,495	0,397	1,8	89,7
Todas as reflexões	**0,085**	**0,071**	**7,3**	**95,5**

[a] $R_{sym}(F) = \sum_{hkl}\sum_{i}\left|F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}\right| \Big/ \sum_{hkl}\sum_{i} F_i(hkl)$: discrepância entre os fatores de estrutura simetricamente relacionados

[b] $R_{meas}(F) = \sum_{hkl}\sum_{i}\sqrt{\frac{N}{N-1}}\left|F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}\right| \Big/ \sum_{hkl}\sum_{i} F_i(hkl)$: discrepância corrigida pela multiplicidade do conjunto

[c] $\langle I/\sigma(I)\rangle$: intensidade média dividido pelo erro médio associado a cada medida

Os parâmetros, estatísticas e valores finais do processamento dos dados coletados para a SmPNP em complexo com fosfato a 2,0Å de resolução encontram-se na Tabela 4.10.

TABELA 4.10. Parâmetros e valores finais do processamento dos dados da SmPNP em complexo com fosfato a 2,0Å de resolução.

Parâmetros	SmPNP a 2,0Å
Local da coleta	Ânodo rotatório Rigaku UltraX 18
Tipo de Radiação	Cu-Kα (λ = 1,5418Å)
Detetor	Placa de imagem MAR345dtb
Grupo espacial	$P2_12_12_1$
Parâmetros da cela unitária (Å)	a = 48,96, b = 120,20, c= 131,95
Mosaicidade	0,6
Faixa de resolução (última camada)	26,6 - 2,0Å (2,11 - 2,00Å)
Total de imagens ($\Delta\varphi=1^0$)	217
Reflexões totais	244996
Reflexões únicas	50988
Redundância	4,8
R_{meas} (última camada)	8,5 %(49,5 %)
R_{sym} (última camada)	7,1 % (39,7 %)
Completeza total (última camada)	95,5 % (89,7 %)
I/σ(I) (última camada)	7,3 (1,8)

4.5 Resolução e refinamento das estruturas da SmPNP

4.5.1. Resolução e refinamento da estrutura da SmPNP a 2,75Å

4.5.1.1 Resolução da estrutura da SmPNP a 2,75Å

Para a resolução da estrutura da SmPNP a 2.75Å de resolução foi empregado o método da substituição molecular implementado no programa AMoRe (Navaza & Saludjian., 1997), utilizando a estrutura da PNP bovina refinada a 1,8Å como modelo de busca (4PNP). Esta estrutura foi escolhida por possuir alta resolução quando comparada a outras PNPs bovinas depositadas no Protein Data Bank. Como o arquivo de coordenadas para esta estrutura somente contem um monômero, foi necessário construir o trímero empregando as operações de simetria do grupo espacial da PNP bovina ($P2_13$). Desta forma foi empregado um trímero como modelo

de busca para a substituição molecular. A SmPNP possui 49% de identidade quando comparada a PNP bovina. O alinhamento entre a SmPNP a PNP bovina pode ser visto na Figura 4.9 abaixo.

```
                  10        20        30        40        50        60
Smpnp     MHESVTANIENVKKVAHHIQKLTSIVPEIGIICGSGLGKLADGVKDKITIPYTKIPNFPQ
BovPNP    MANGYT--YEDYQDTAKWLLSHTEQRPQVAVICGSGLGGLVNKLTQAQTFDYSEIPNFPE
Consrvd   *    *   *     *      *   *    ******* *        *  *  *****

                  70        80        90       100       110       120
Smpnp     TSVVGHSGNLIFGTLSGRKVVVMQGRFHMYEGYSNDTVALPIRVMKLLGVKILMVSNAAG
BovPNP    STVPGHAGRLVFGILNGRACVMMQGRFHMYEGYPFWKVTFPVRVFRLLGVETLVVTNAAG
Consrvd     * ** * * ** * **  * ***********    *  * **  ****  * * ****

                 130       140       150       160       170       180
Smpnp     GLNRSLKLGDFVILKDHIYLPGLGLNNILVGPNQEAFGTRFPALSNAYDRDLRKLAVQVA
BovPNP    GLNPNFEVGDIMLIRDHINLPGFSGENPLRGPNEERFGVRFPAMSDAYDRDMRQKAHSTW
Consrvd   ***     **     *** ***    * * *** * ** **** * ***** *  *

                 190       200       210       220       230       240
Smpnp     EKNGFGNLVHQGVYVMNGGPCYETPAECTMLLNMGCDVVGMSTIPEVVIARHCGIQVFAV
BovPNP    KQMGEQRELQEGTYVMLGGPNFETVAECRLLRNLGADAVGMSTVPEVIVARHCGLRVFGF
Consrvd      *       * *** ***  ** ***  * * * * ***** ***  *****  **

                 250       260       270       280       290
Smpnp     SLVTNISVLDVESDLKPNHEEVLATGAQRAELMQSWFEKIIEKLPKD----
BovPNP    SLITNKVIMDTESQGKANHEEVLEAGKQAAQKLEQFVSLLMASIPVSGHTG
Consrvd   ** **    * **  * ******  * * *
```

FIGURA 4.9. Alinhamento entre a SmPNP e a PNP bovina. A identidade sequencial é baixa tanto no N terminal como no C terminal. Os resíduos do sítio ativo estão sublinhados, e as identidades estão indicadas com asteriscos.

Foi encontrada uma única solução para a substituição molecular, esta solução possui um coeficiente de correlação de 33,3 % e um R_{factor} de 45,5 %, , apresentando um trímero por unidade assimétrica. A solução é indicada por α, β, γ, x, y e z:

	α	β	γ	x	y	z
#	185.2	96.6	314.3	21.0	21.7	25.5

Sendo os α, β, γ, os parâmetros correspondentes aos ângulos de rotação e x, y, z os parâmetros correspondentes ao vetor de translação (em angstrons). A solução da substituição molecular foi inspecionada visualmente com o auxílio do programa gráfico O, onde foram geradas as moléculas relacionadas por simetria a fim de serem verificados possíveis sobreposições ou impedimentos estéricos entre as moléculas.

Como não havia nenhum choque entres as moléculas a solução foi tratada como correta. O empacotamento cristalino da SmPNP pode ser observado nas Figuras 4.10 e 4.11 abaixo.

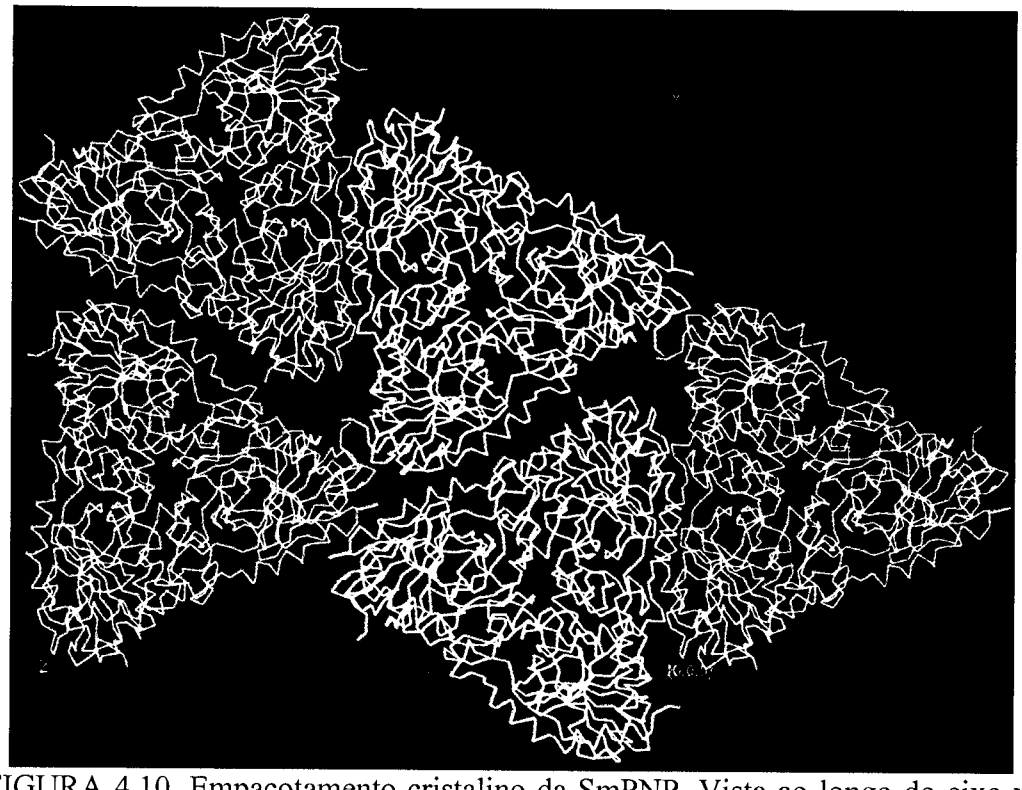


FIGURA 4.10. Empacotamento cristalino da SmPNP. Vista ao longo do eixo x. Os trímeros encontram-se arranjados em camadas perpendiculares ao eixo x, ou seja, o eixo de ordem 3 não cristalográfico está disposto paralelo ao eixo x.

O empacotamento cristalino mostra que os três monômeros que formam a trímero estão localizados na unidade assimétrica do grupo espacial ortorômbico $P2_12_12_1$, como previsto pelo V_M. Os trímeros estão ordenados em camadas perpendiculares ao eixo x, ou seja o eixo de ordem 3 não cristalográfico esta disposto paralelo ao eixo x.

Nestas figuras é possível observar a baixa presença de canais de solvente e de espaços vazios entre as moléculas do cristal da SmPNP, justificando o baixo conteúdo de solvente para este cristal (~37%).

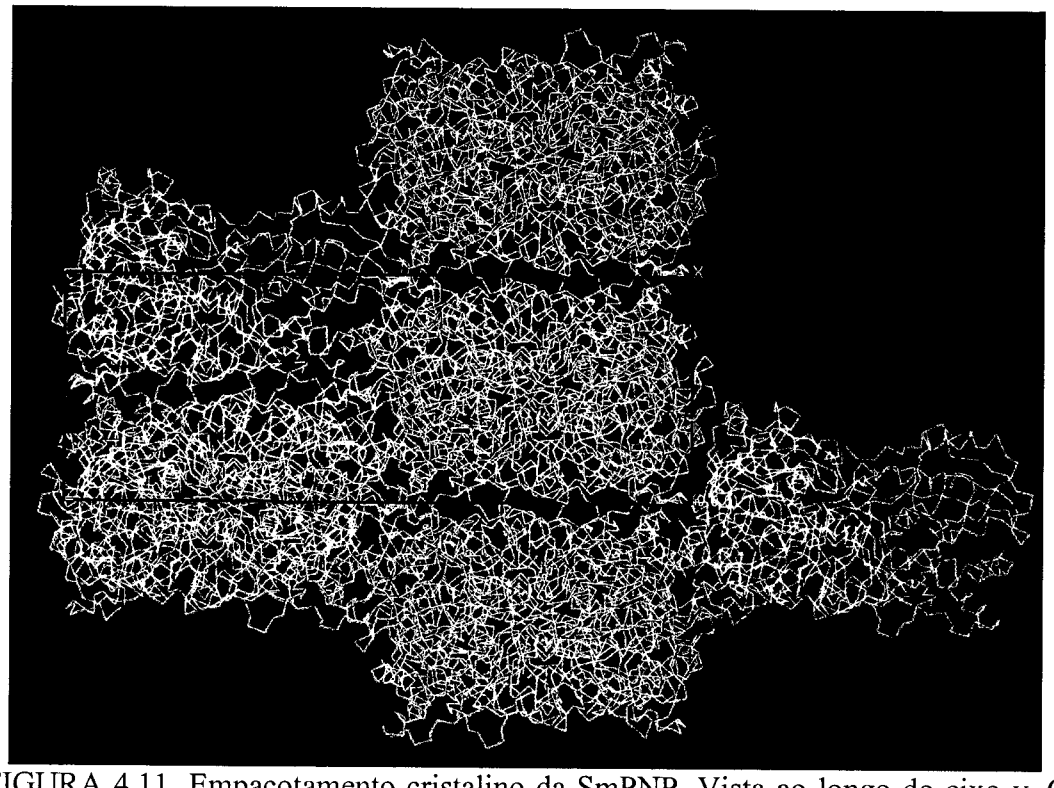


FIGURA 4.11. Empacotamento cristalino da SmPNP. Vista ao longo do eixo y. Os trímeros encontram-se arranjados em camadas perpendiculares ao eixo x.

4.5.1.2 Construção do modelo e refinamento da SmPNP a 2,75Å

Como a solução da substituição molecular parecia correta, foi iniciado o refinamento da estrutura da SmPNP. Todos os resíduos não conservados entre o modelo gerado pelo programa AMoRe e a SmPNP foram mutados para alanina com exceção de glicinas e prolinas. O refinamento foi realizado utilizando-se o pacote programa CNS o qual realiza o refinamento pelo algoritmo de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood, *Adams et al.*, 1997) com fatores de estrutura isotrópicos. Inicialmente foi realizado um refinamento de corpo rígido com subsequente refinamento utilizando dinâmica molecular por anelamento simulado.

O arquivo de reflexões obtido possuía apenas 19267 reflexões, impossibilitando o refinamento individual de cada posição atômica, desta forma em todo o refinamento foi incorporado restrições de simetria não cristalográfica (NCS) do tipo "restraint". Neste tipo de restrição não cristalográfica, o modelo consiste de todos os protômeros, onde a relação entre estes é definida pele seleção de átomos equivalentes. Estas relações são usadas para sobrepor todas as moléculas relacionadas e calcular desvios com relação a estrutura média. As relações entre os protômero não são fixas devido ao fato que as matrizes usadas para sobrepor os protômeros são constantemente alteradas durante o refinamento.

O peso para o valor de NCS determina o quão fortemente os protômeros são restringidos a serem semelhantes. Um valor de 300 a 500 resulta em protômeros que são próximos do idêntico após sobreposição. Um valor de 10 põe um peso muito baixo em restrições de NCS do tipo "restraints" e grandes desvios entre as moléculas relacionadas são permitidos. Idealmente e melhor utilizar valores altos no início do refinamento e usar o valor de R_{free} para determinar se um valor mais baixo é apropriado. O uso de simetria não cristalográfica reduziu o números de parâmetros a serem refinados a praticamente 1/3. No refinamento da SmPNP inicialmente foi utilizado um peso de 300 sendo reduzido gradualmente durante os ciclos de refinamento para um valor de 50.

Após cada ciclo de refinamento com o programa CNS eram calculados os mapas de densidade eletrônica 2Fo-fc e Fo-Fc. Estes mapas juntamente com o modelo resultante de cada ciclo de refinamento eram visualizados com o programa O, onde era realizada a construção do modelo, mutando-se os resíduos de alanina do modelo inicial para o resíduo correspondente na SmPNP. Estas substituições somente eram realizadas caso existisse uma densidade eletrônica compatível com o resíduo a

ser mutado. Também foram realizadas manipulações de cadeia principal em regiões de loops. Após percorremos todas as três cadeias realizando as substituições e manipulações. O modelo resultante era mais uma vez submetido a um ciclo de refinamento por dinâmica molecular com anelamanto simulado, onde eram gerados os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc, e todo processo de construção do modelo era reiniciado. O progresso do refinamento era avaliado pela queda dos valores do R_{factor} e do R_{free}, quando os valores para estes parâmetros se estabilizaram e o modelo estava praticamente construído foi adicionadas moléculas de água através da rotina water_pick do programa CNS.

Após da adição das moléculas de água foram os gerados os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc, para a inspeção das moléculas de água adicionadas. Neste caso foram visualizados os mapas 2Fo-Fc e especialmente o mapa Fo-Fc contornado a pelo menos 2,5 σ para avaliar cada água adicionado pelo programa, caso esta água não seja apropriada a mesma é retirada. Após dois ciclos de adição de moleculas de água foi realizada uma minimização de energia e um refinamento do fator de temperatura utilizando o programa CNS, e o refinamento desta estrutura foi dado como encerrado. Os valores final para o R_{factor} e o R_{free} são 21,05% e 25,01% respectivamante.

O modelo final contém:

- 6193 átomos de proteína em 823 aminoácidos
- 169 moléculas de água
- 3 moléculas de acetato

Estão ausentes na estruturas os resíduos:

- 63-67 da subnidade A
- 60-67 e 251-268 da subunidade B

Estes resíduos foram retirados por não apresentarem nenhuma densidade eletrônica, mesmo após algumas tentativas de modificação de densidade. A região dos resíduos 60-67 que está ausente nas subunidades A e B corresponde a um loop de ligação do fosfato, que é extremamente móvel (como em outras PNPs). A presença deste loop na subunidade C deve-se ao empacotamento cristalino que leva a formação de ligações de hidrogênio como pode ser visto na Figura 4.12 abaixo.

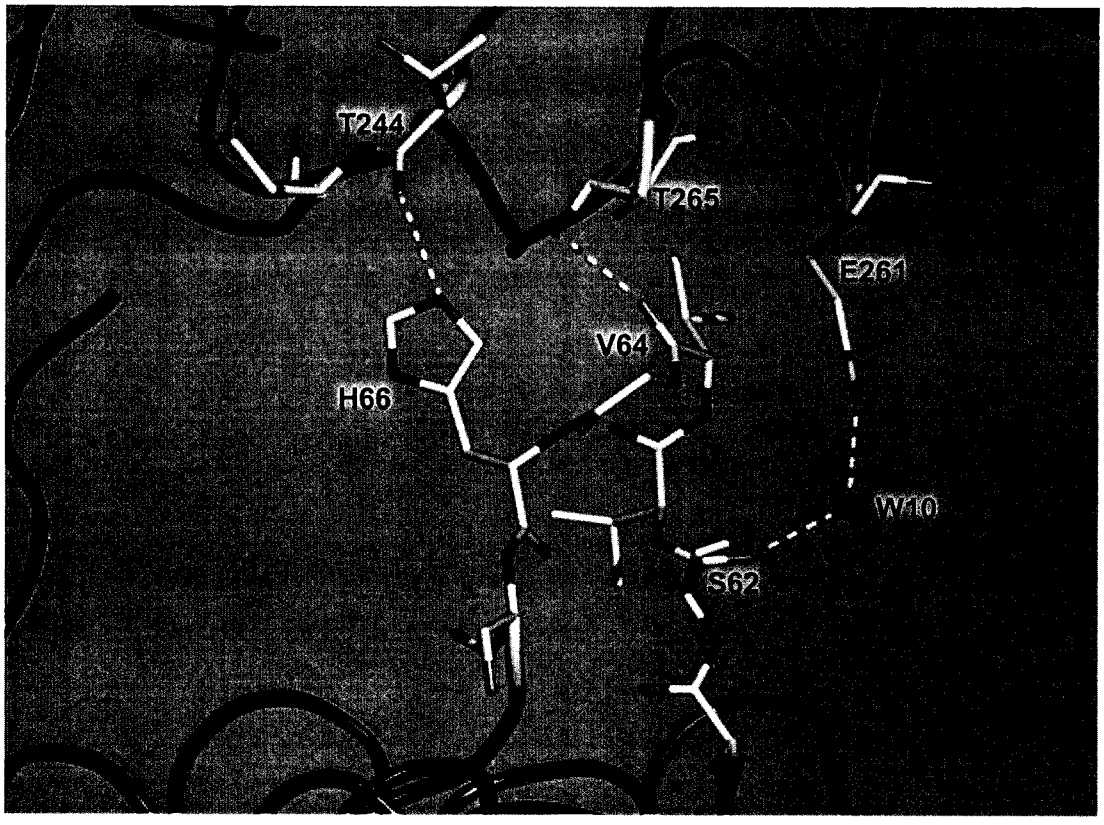


FIGURA 4.12. Pontes de hidrogênio entre loop de ligação ao fosfato (resíduos 61-67) da subunidade C (vermelho) e os resíduos 244, 265 e 268 de outra subunidade C (azul) relacionada por simetria. A ponte de hidrogênio entre os resíduos S62 e E261 é mediada por uma molécula de água.

4.5.2. Resolução e refinamento da estrutura da SmPNP a 1,75Å

Na resolução da estrutura da SmPNP a 1.75Å de resolução também foi utilizado o método da substituição molecular, utilizando como modelo de busca a estrutura da SmPNP refinada a 2,75Å de resolução. Uma solução única foi

prontamente obtida, a qual corresponde basicamente a um movimento de corpo rígido da estrutura da SmPNP utilizada como modelo de busca.

A solução resultante foi submetida a um refinamento de corpo rígido e um ciclo de dinâmica molecular com anelamento simulado utilizando o programa CNX (versão comercial do CNS) onde foram gerados os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc. A estrutura e os mapas resultante deste ciclo de refinamento foram visualizados com o programa Quanta. Foram observadas duas densidades eletrônicas no sítio ativo da SmPNP, uma no sítio de ligação a base (Figura 4.13), compatível com o íon acetato utilizado como tampão, e um segunda densidade eletrônica nos sítios de ligação a ribose e ao fosfato (Figura 4.14).

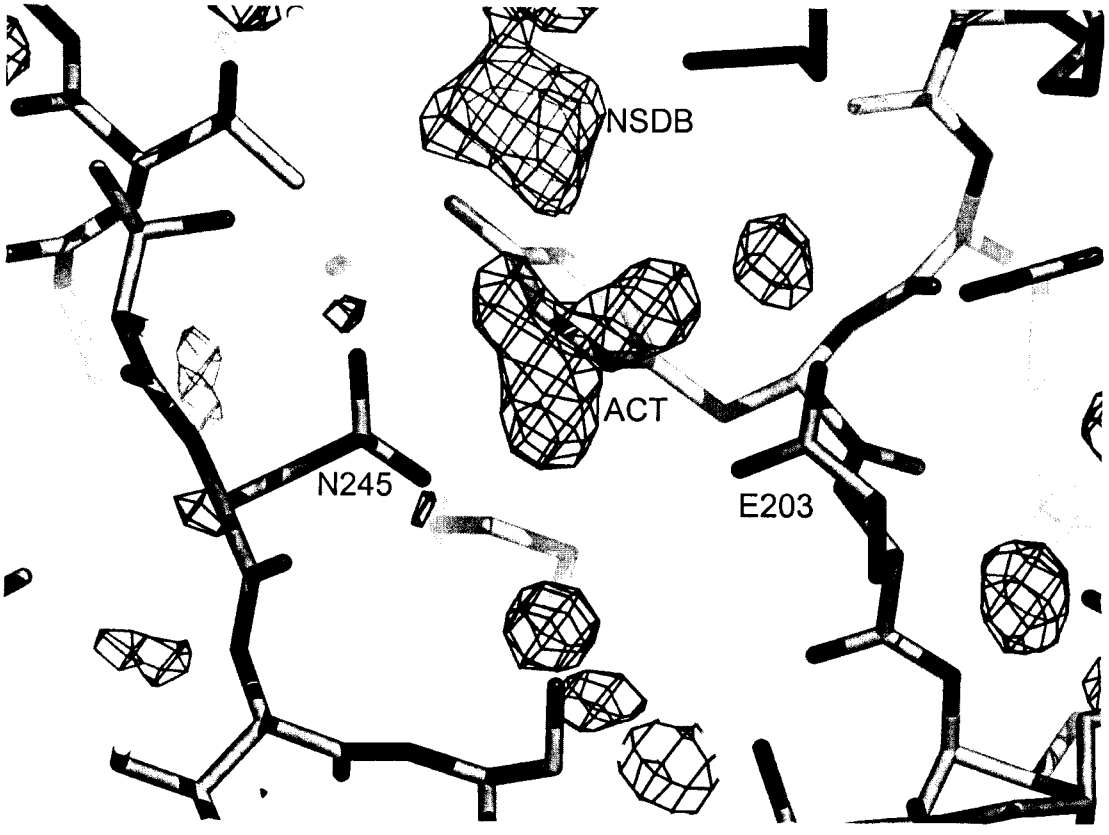


FIGURA 4.13. Mapa de densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 2,5σ para parte do sítio ativo da SmPNP. Pode-se observar uma densidade eletrônica compatível com o íon acetato presente como tampão na solução de cristalização. Os resíduos chaves do sítio de ligação a base (E203 e N245) são mostrados nesta figura. Observa-se também parte da densidade eletrônica para o aditivo NDSB195 utilizado na cristalização da SmPNP.

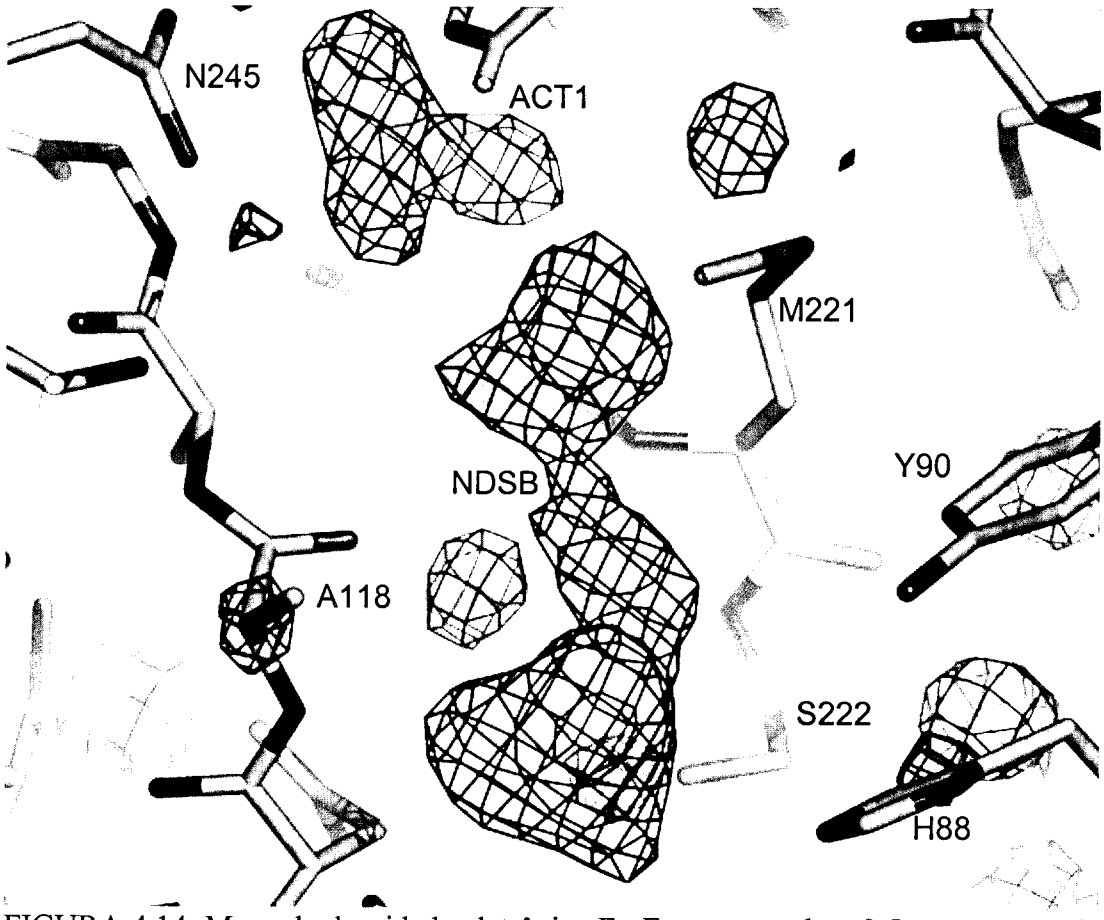


FIGURA 4.14. Mapa de densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 2,5σ para parte do sítio ativo da SmPNP. É possível observar a densidade eletrônica compatível com o aditivo NDSB195 utilizado na cristalização da SmPNP. Esta densidade eletrônica localiza-se nos sítios de ligação a ribose e ao fosfato. Pode-se observar a densidade eletrônica para o íon acetato (ACT).

Utilizando-se do modulo X-Ligand do programa Quanta foram adicionados o íon acetato e o aditivo NDSB195. Estes ligantes estão presentes em todas as três subunidades da SmPNP. Após a adição destes ligantes foi continuado o refinamento da SmPNP, o qual consistia de manipulações do modelo como: ajuste de rotâmeros para os aminoácidos, ajuste de loops e do N e C terminal, e subsequentes ciclos de refinamento de dinâmica molecular com anelamento simulado utilizando o programa CNX onde eram gerados novos mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc, os quais eram novamente visualizados como o programa Quanta para novas manipulações no modelo. O andamento do refinamento era feito acompanhando os valores de R e R_{free}, com relação ao ciclo de refinamento anterior. Quando os valores

dos fatores R se estabilizaram foi iniciado a adição de moléculas de água com o programa Quanta e também com o programa ARP-wARP. Após a adição das moléculas de água eram calculados os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc para a inspeção das moléculas de água adicionadas. Por fim foi realizado um ultimo ciclo de refinamento utilizando o programa Refmac com parâmetros de TLS. Os valores finais de R e R_{free} são 17,9% e 20,1%, respectivamente.

O modelo final contém:

- 6265 átomos de proteína em 824 aminoácidos
- 725 moléculas de água
- 3 moléculas de acetato
- 3 moléculas de NDSB195

Estão ausentes na estruturas os resíduos:

- 1-2, 63-65 e 255-265 da subnidade A
- 1-3, 63-66 e 253-269 da subunidade B
- 1-3, 62-65 da subunidade C

Estes resíduos foram retirados da estrutura por não apresentarem densidade eletrônica.

Na Figura 4.15, podemos observar a molécula de NDSB195 modelada na estrutura da SmPNP. A ligação do aditivo NDSB195 em proteínas é um fato não descrito na literatura, os autores que descrevem o uso do NDSB195 como aditivo na cristalização (Vuillard *et al.*, 1996), reportam que o NDSBs não se ligam a proteínas. O caso especial da SmPNP foi devida ao fato da complementaridade tanto química quanto da forma entre o sítio ativo e o aditivo. O sítio ativo das PNPs podem ser divididos em três sítios: o sítio de ligação a base, o sítio de ligação a ribose e o sítio

de ligação ao fosfato, sendo o sítio de ligação a ribose é a parte mais hidrofóbica e invariante da SmPNP quando comparada às PNPs de mamíferos (humana e bovina).

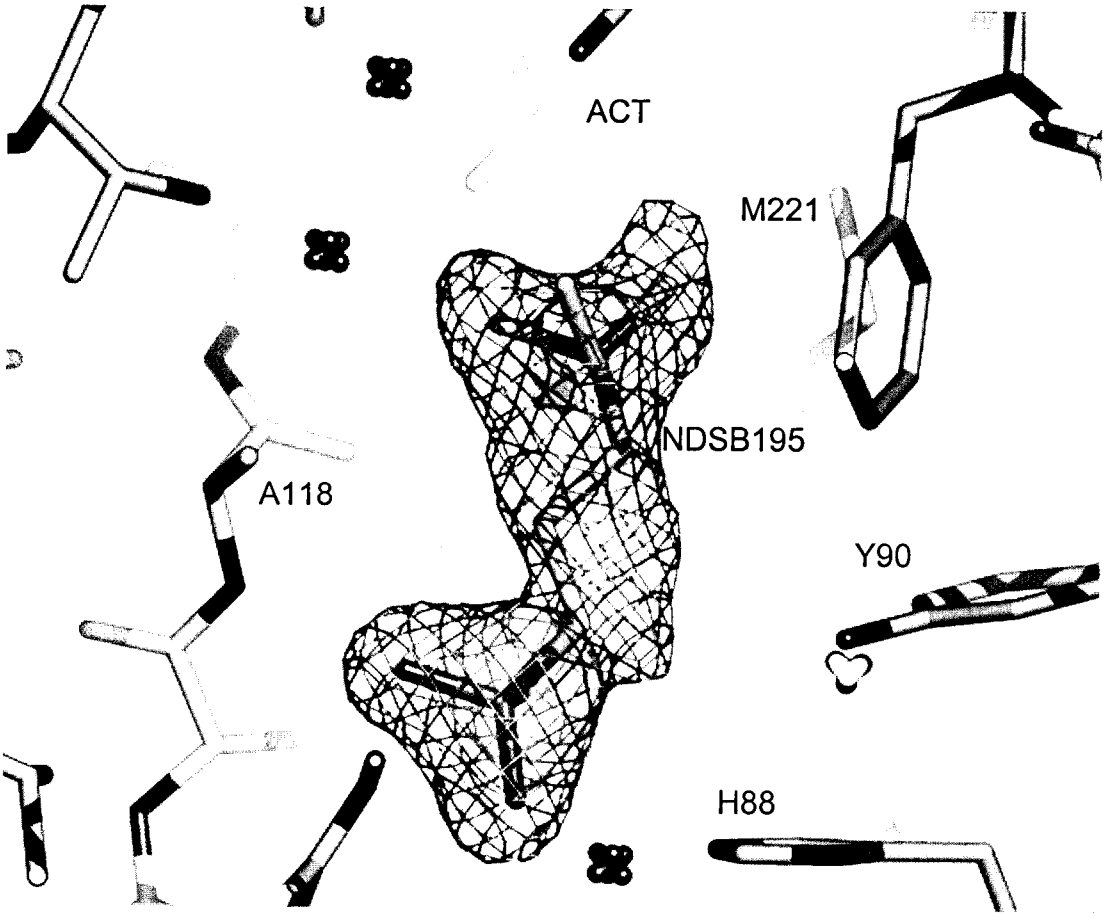


FIGURA 4.15. Molécula do aditivo NDSB195 e seu mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ. O grupo sulfato da molécula de NDSB195 interage com os resíduos do sítio de ligação ao fosfato. As moléculas de água são representadas como esferas modificadas em vermelho.

Nas estruturas das PNPs bovina e humana em complexo com sulfato, o mesmo se liga no sítio de ligação ao fosfato, que não é surpreendente devido ao fato de que o sulfato imita a estereoquímica do fosfato. A molécula de NDSB195 encontrou um sítio de ligação quimicamente favorável, onde o grupo sulfato é coordenado pelos resíduos envolvidos na ligação com o fosfato (Figura 4.16), e a parte hidrofóbica da molécula foi acomodada no sítio de ligação a ribose. Na Figura

4.16 pode-se observar as pontes de hidrogênio entre o NDSB195 e o sítio de ligação ao fosfato da SmPNP.

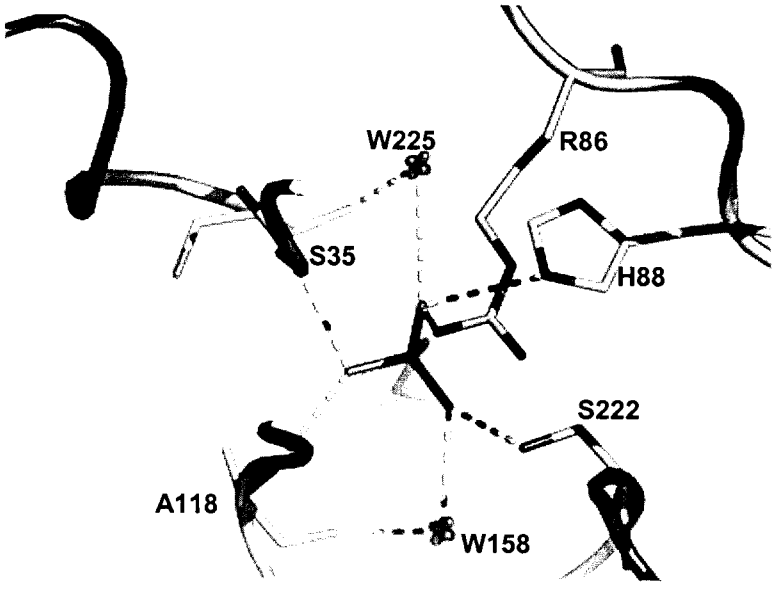


FIGURA 4.16. Pontes de hidrogênio entre o sítio de ligação ao fosfato da SmPNP e o NDSB195. Duas das pontes de hidrogênio são mediadas por moléculas de água (W225 e W158).

A alta resolução desta estrutura permitiu a identificação inequívoca do íon acetato no sítio de ligação a base como pode ser observado na Figura 4.17. Este fato resolveu uma dúvida quanto a densidade eletrônica presente no sítio de ligação a base na primeira estrutura obtida (SmPNP a 2,75Å), cuja média resolução não permitia uma clara identificação do ligante. O íon acetato interage diretamente com com o resíduo E203. Esta interação pouco comum se tornou possível pelo baixo pH da solução de cristalização (4,9-5,0). Na Figura 4.17, observamos uma continuidade da densidade eletrônica entre o íon acetato e a cadeia lateral do resíduo E203, o que indica uma forte interação entre o acetato e o E203.

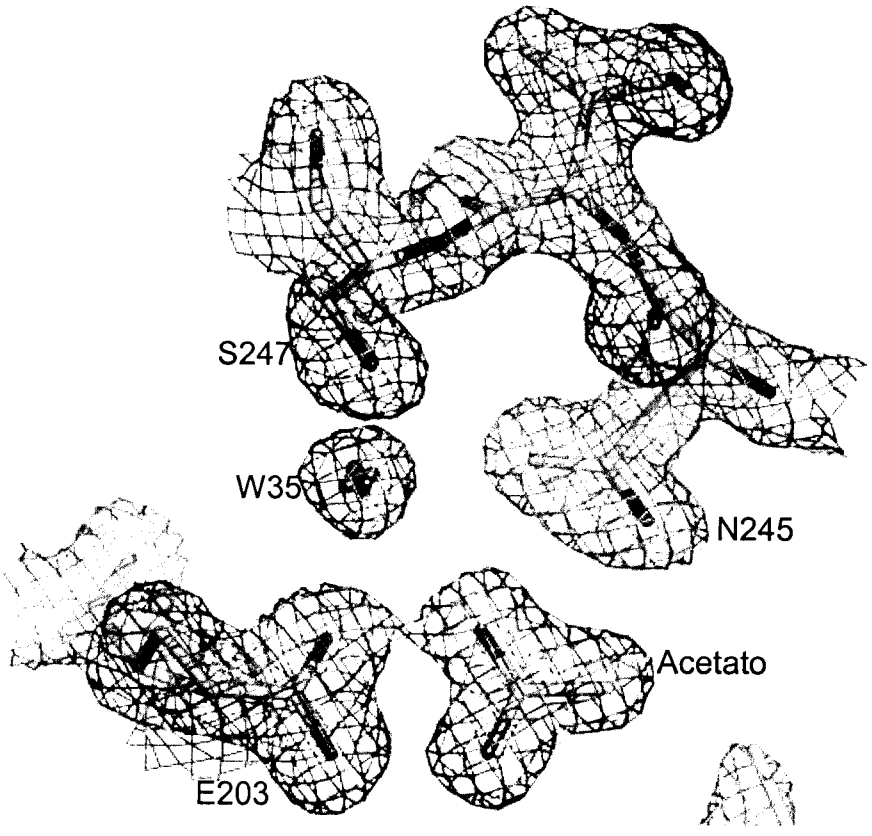


FIGURA 4.17. Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc para parte do sítio de ligação a base da SmPNP na estrutura com NDSB195 a 1,75Å de resolução. O íon acetato interage diretamente com a cadeia lateral do resíduo E203.

4.5.3. Resolução e refinamento da estrutura da SmPNP a 1,9Å

Para a resolução da SmPNP a 1,9Å de resolução foi realizado um refinamento de corpo rígido utilizando a estrutura da SmPNP refinada a 2,1Å de resolução, a qual foi resultante de uma coleta de dados no LNLS, e até a obtenção da estrutura da SmPNP a 1,9Å era a estrutura na forma apo de referência. Como a resolução foi aumentada utilizando um cristal da SmPNP coletado no SRS esta estrutura foi resolvida e refinada tornando-se a estrutura apo de referência.

Após o ciclo de refinamento de corpo rígido o modelo resultante foi submetido a um ciclo de dinâmica molecular com anelamento simulado utilizando o programa CNS onde foram gerados os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc. O modelo e os mapas de densidade eletrônica foram visualizados utilizando-se o programa O onde eram realizadas as modificações no modelo. Após percorremos todas as três cadeias na construção do modelo, o mesmo era mais uma vez submetido a um ciclo de dinâmica molecular com anelamento simulado com o programa CNS. Quando os valores dos fatores R e R_{free} se estabilizaram foram adicionadas as moléculas de água utilizando-se o programa Arp-Warp. Após a adição das moléculas de água eram calculados os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc para a inspeção das moléculas de água adicionadas. Por fim foi realizado um ciclo de refinamento utilizando o programa Refmac com parâmetros de TLS. Os valores finais de R e R_{free} são 18,8% e 21,0%, respectivamente.

O modelo final contém:

- 6342 átomos de proteína em 839 aminoácidos
- 580 moléculas de água
- 3 moléculas de acetato

Estão ausentes na estruturas os resíduos:

- 1-2, e 63-65 da subnidade A
- 1-2, e 253-267 da subunidade B
- 1-2 da subunidade C

Estes resíduos foram retirados da estrutura por não apresentarem densidade eletrônica.

4.5.4. Resolução e refinamento da estrutura da SmPNP em complexo com AT2169 a 1,9Å

O composto AT2169 foi identificado no virtual screening para a SmPNP, e demostrou uma grande capacidade de inibição da SmPNP em ensaios de atividade. O intuito do VS para a SmPNP é a descoberta de novos ligantes para a SmPNP e será discutido mais adiante.

Na resolução da estrutura da SmPNP em complexo com AT2169 a 1,9Å de resolução foi utilizado o método da substituição molecular, utilizando como modelo de busca a estrutura da SmPNP refinada a 2,75Å de resolução. Uma solução única foi prontamente obtida, esta solução corresponde basicamente um movimento de corpo rígido da estrutura da SmPNP utilizada como modelo de busca.

A solução resultante foi submetida a um refinamento de corpo rígido onde foram gerados os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc. A estrutura e os mapas resultante deste ciclo de refinamento foram visualizados com o programa Quanta. Foi observada uma densidade eletrônica no sítio ativo da SmPNP, mais especificamente no sítio de ligação a base da subunidade B, compatível com o composto AT2169. O mesmo foi automaticamente posicionado utilizando o mapa Fourier diferença utilizando o modulo X-Ligand do programa Quanta. Após a adição do ligante o refinamento foi realizado alternando-se ciclos de manipulação do modelo com o programa O e construção e ciclos de refinamento de dinâmica molecular com anelamento simulado utilizando o programa CNS onde foram gerados novos mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc. O andamento do refinamento era feito acompanhando os valores de R e R_{free}, com relação ao ciclo de refinamento anterior. Quando os valores dos fatores R se estabilizaram foi iniciado a adição de

moléculas de água com a rotina water_pick do programa CNS. Após a adição das moléculas de água eram calculados os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc para a inspeção das moléculas de água adicionadas. Por fim foi realizado um ciclo de refinamento utilizando o programa Refmac com parâmetros de TLS. Os valores finais de R e R_{free} são 19,6% e 21,5% respectivamente.

Na Figura 4.18 abaixo podemos visualizar o ligante AT2169 no sítio ativo da SmPNP, interagindo diretamente com os resíduos E203 e N245.

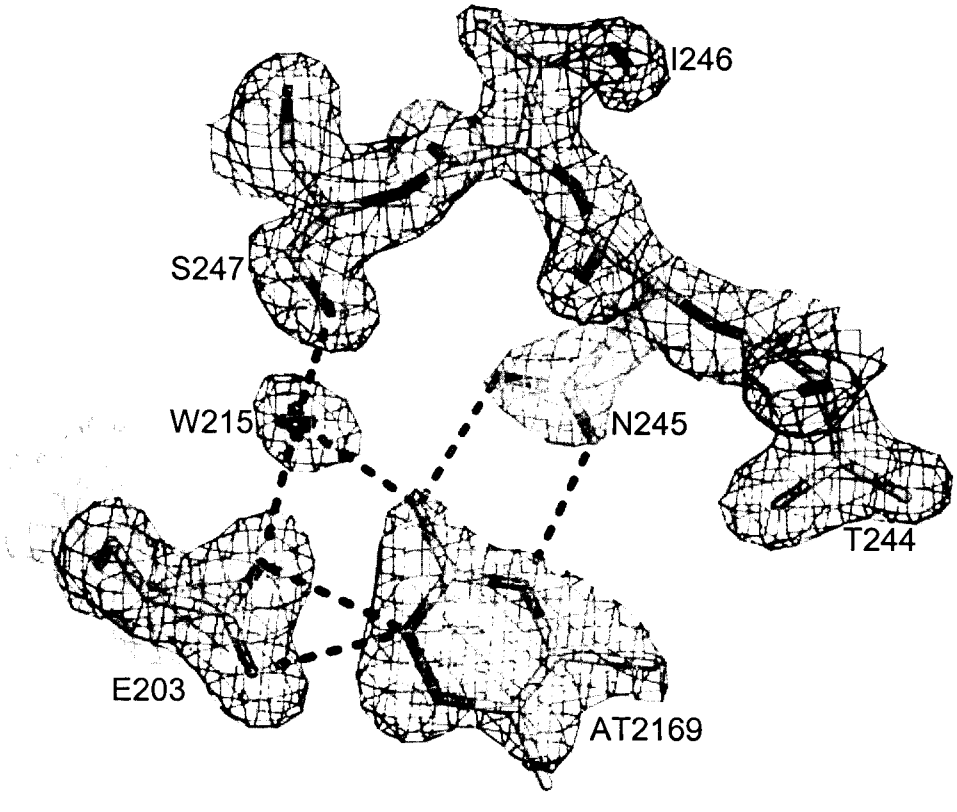


FIGURA 4.18. Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ para o sítio de ligação a base da subunidade B da SmPNP em complexo com o composto AT2169. A molécula AT2169 realiza 5 pontes de hidrogênio, duas com os resíduos E203 e N245 e uma com a molécula de água W215, a qual é ancorada pelos resíduos S247 e E203.

Devido ao fato de ter sido usado 10mM de tampão acetato na solução de soaking reduzindo a concentração deste íon em 22mM em comparação com a solução de cristalização, não foi encontrado o íon acetato ligado nas subunidades A e

C. Nestes sítios o local correspondente aos oxigênios do íon acetato são ocupados por moléculas de água como podemos observar no sítio da subunidade C na Figura 4.19 abaixo. Este fato indica que a ligação do acetato não é tão forte com supúnhamos anteriormente , sendo facilmente deslocada em uma concentração mais baixa do tampão.

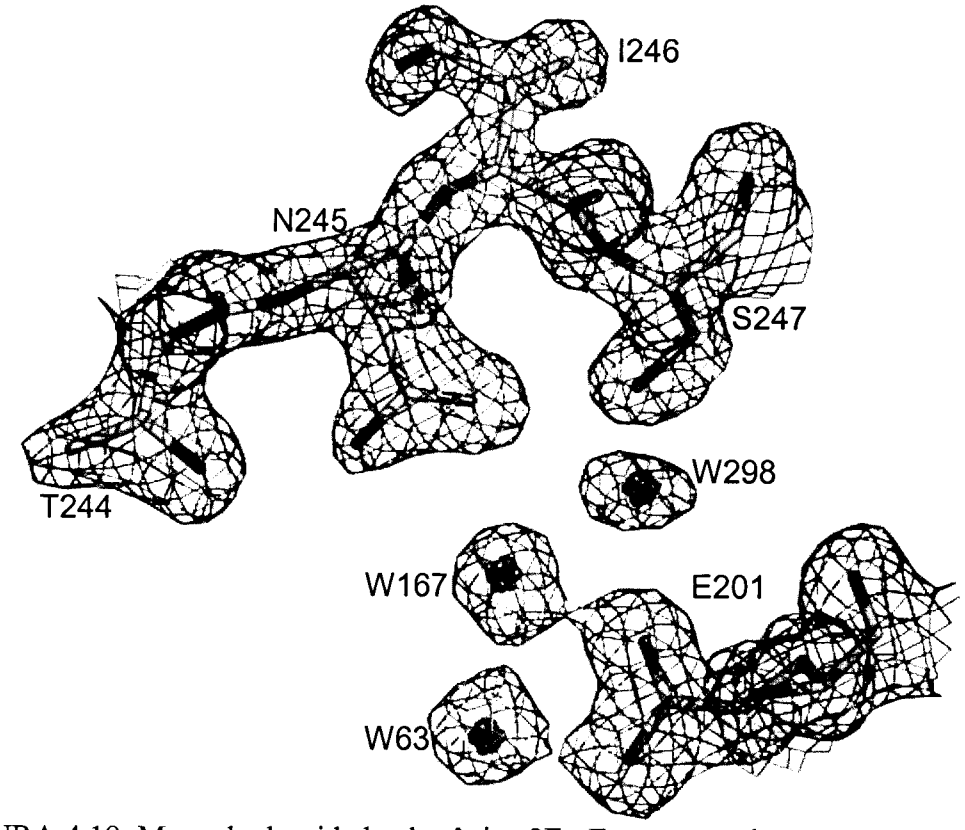


FIGURA 4.19. Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ para o sítio de ligação a base da subunidade C da SmPNP. Devido a menor concentração do tampão acetato na solução de soaking, o acetato que interagia com o resíduo E203 em outras estruturas da SmPNP foi deslocado, e não mais está presente na estrutura. Observa-se duas moléculas de água (W167 e W63) interagindo com o grupo carboxílico do resíduo E203.

Foi observado durante a construção do modelo uma forte densidade eletrônica (acima de 3σ no mapa de densidade eletrônica Fo-Fc), nas proximidades dos resíduos 103 e 154 em todas as subunidades (Figura 4.20), inicialmente foi modelado nesta densidade uma molécula de glicerol. Entretanto quando visualizados os mapas

de densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 3σ e -3σ após a inclusão do glicerol, existia uma forte densidade eletrônica negativa para parte da molécula de glicerol, indicando que a escolha desta molécula tinha sido incorreta, além disto em outras estruturas da SmPNP já refinadas não havia sido encontrado nesta região nenhuma densidade eletrônica além de moléculas de água, indicando mais uma vez que a escolha do glicerol provavelmente foi incorreta.

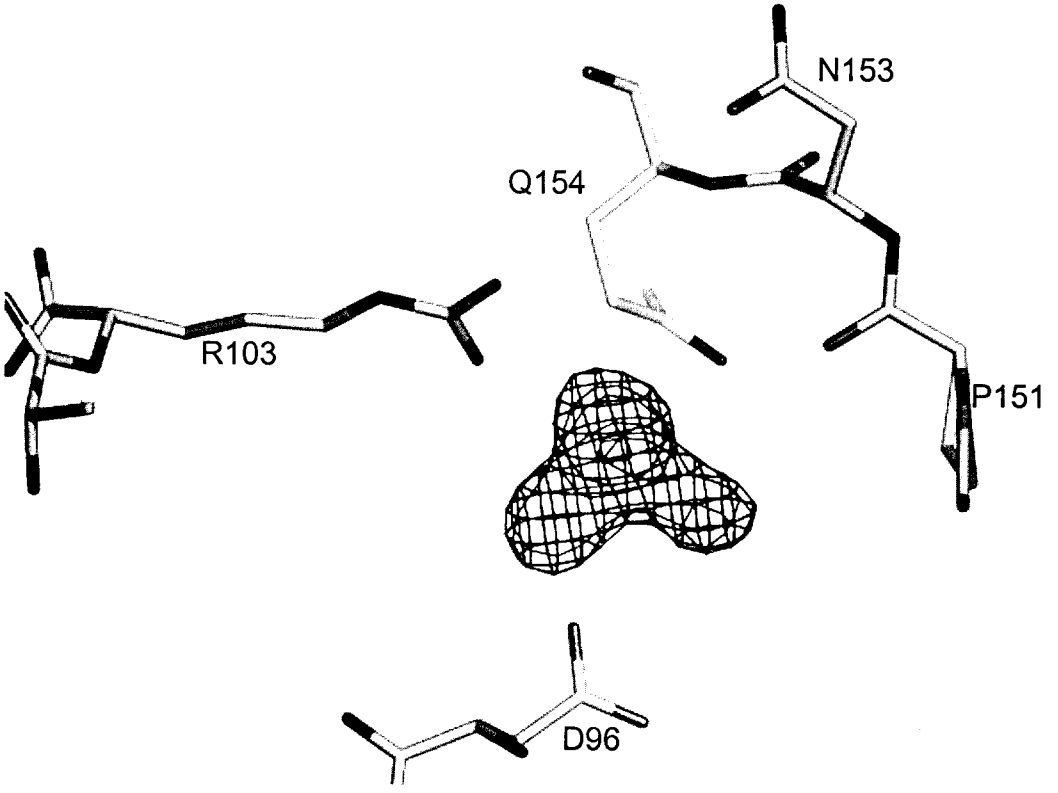


FIGURA 4.20. Mapa de densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 3σ. Pode ser visualizada a densidade eletrônica correspondente a uma molécula de DMSO, a qual inicialmente foi interpretada como sendo de uma molécula de glicerol.

A explicação mais provável e que seja uma molécula do solvente orgânico DMSO presente (10% v/v) na solução do soaking para manter solúvel o composto AT2169. Foi então adicionado o DMSO nas três subunidades utilizando o programa O. Na Figura 4.21 podemos observar o mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ para a região de ligação do DMSO.

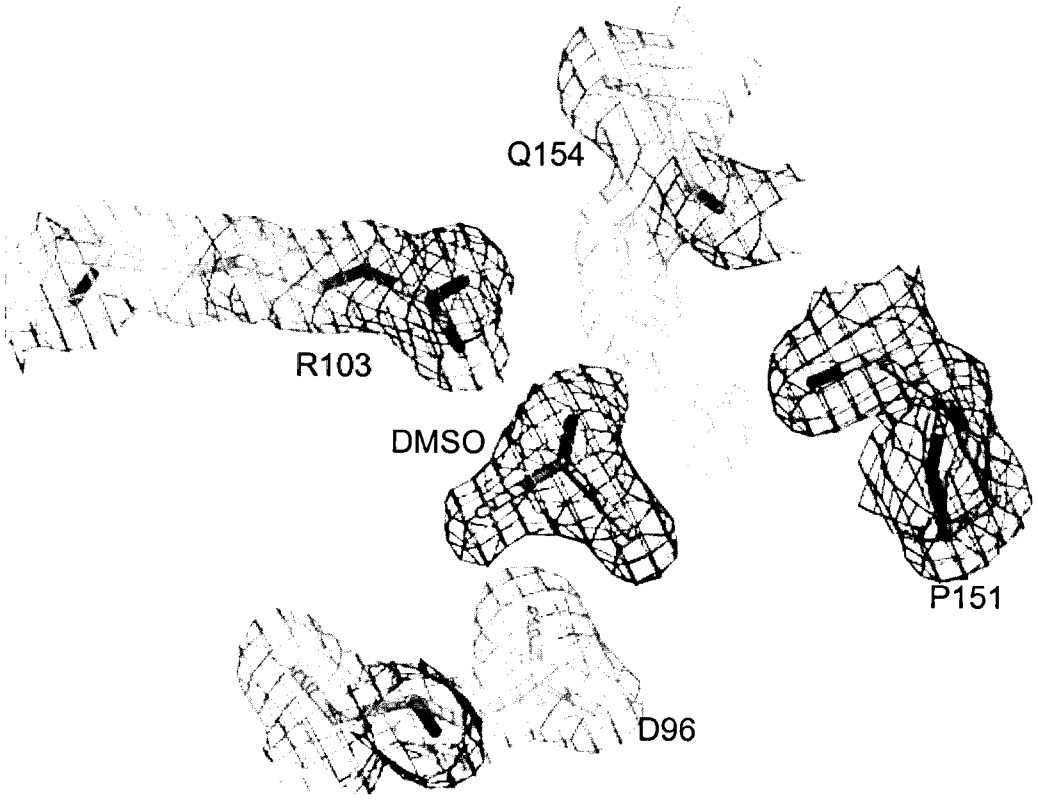


FIGURA 4.21. Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ para a região de ligação ao DMSO na subunidade A da SmPNP. O átomo de oxigênio do DMSO realiza uma ponte de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo R103.

O modelo final contém:

- 6268 átomos de proteína em 828 aminoácidos
- 1 molécula de AT2169
- 443 moléculas de água
- 3 moléculas de DMSO

Estão ausentes na estruturas os resíduos:

- 1-3, e 62-66 da subunidade A
- 1-3, 62-65 e 253-267 da subunidade B
- 1-2 e 287 da subunidade C

4.5.5. Resolução e refinamento da estrutura da SmPNP em complexo com fosfato a 2,0Å

Para a resolução da SmPNP a 2,0Å de resolução foi realizado um refinamento de corpo rígido utilizando a estrutura da SmPNP na forma apo refinada a 1,9Å de resolução. Após o ciclo de refinamento de corpo rígido o modelo resultante foi submetido um ciclo de dinâmica molecular com anelamento simulado utilizando o programa CNS onde foram gerados os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc. O modelo e os mapas de densidade eletrônica foram visualizados utilizando-se o programa O onde eram realizadas as modificações. Após percorrer todas as três cadeias na construção do modelo, o mesmo era mais uma vez submetido um ciclo de dinâmica molecular com anelamento simulado com o programa CNS.

O cristal da SmPNP que deu origem a esta estrutura foi obtido de um experimento de co-cristalização com o inibidor da PNP humana BCX821, após a resolução da estrutura não foi encontrado o inibidor ligado ao sítio ativo de nenhuma das três subunidades. Entretanto foi observada uma forte densidade eletrônica no sítio de ligação ao fosfato (acima de 5σ no mapa de densidade eletrônica Fo-Fc), a qual era compatível com uma molécula de fosfato ou sulfato (Figura 4.22). Foi adicionado uma molécula de fosfato por subunidade com o auxílio do programa O. Após a adição do fosfato foi continuado o refinamento alternando-se ciclos de manipulação e construção com o programa O com ciclos de de dinâmica molecular com anelamento simulado com o programa CNS.

Quando os valores dos fatores R e R_{free} se estabilizaram foram adicionadas as moléculas de água utilizando-se o programa Arp-Warp. Após a adição das moléculas de água eram calculados os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc para a

inspeção das moléculas de água adicionadas. Por fim foi realizado um ciclo de refinamento utilizando o programa Refmac com parâmetros de TLS. Os valores finais de R e R_{free} são 18,8% e 21,1%, respectivamente.

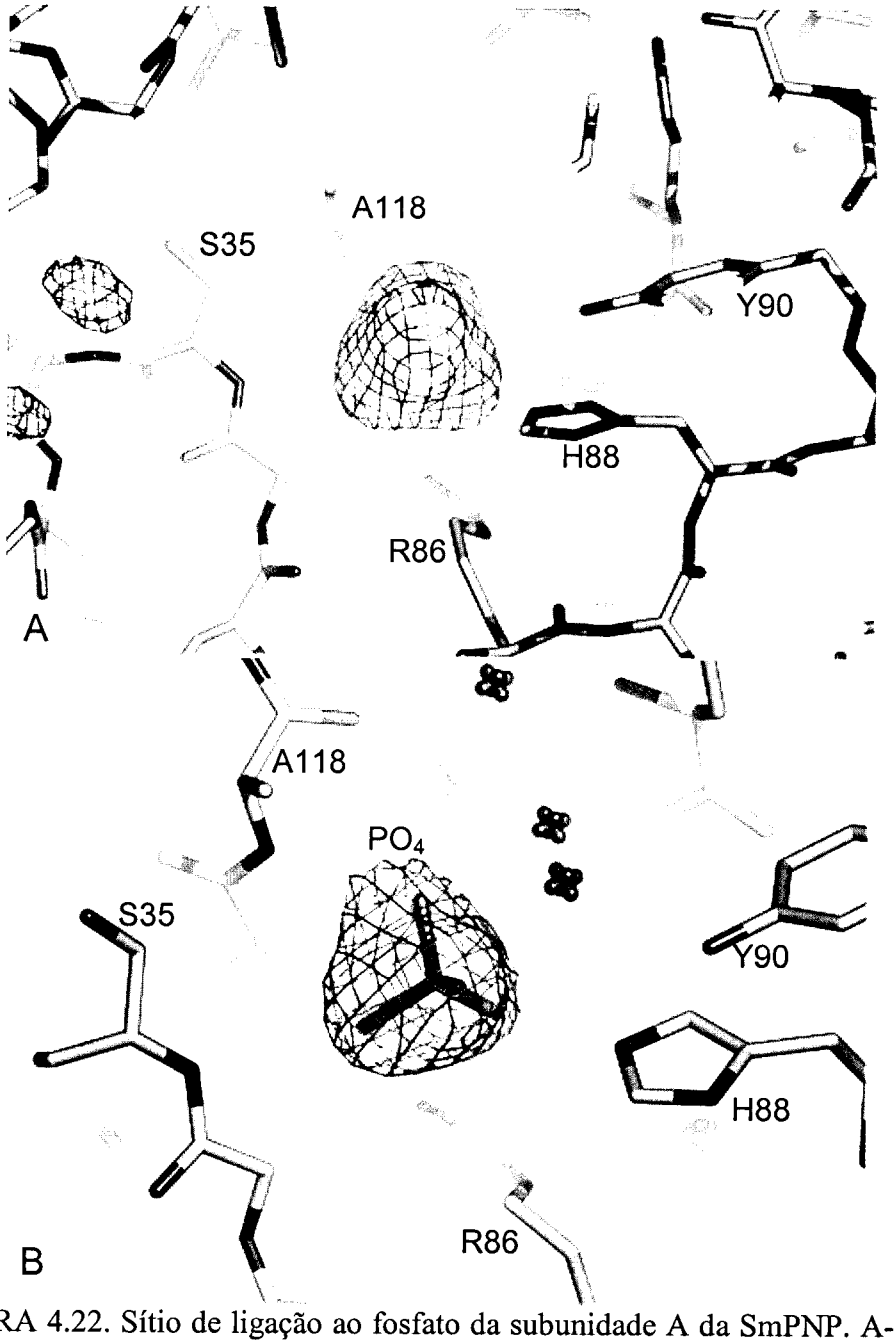


FIGURA 4.22. Sítio de ligação ao fosfato da subunidade A da SmPNP. A- Mapa de densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 3σ para a uma densidade presente no sítio de ligação ao fosfato. Esta densidade é compatível com uma molécula de fosfato. B- Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ para a molécula de fosfato adicionada na densidade eletrônica presente no sítio de ligação ao fosfato.

Nesta estrutura também foi encontrada uma forte densidade eletrônica na mesma região onde foi observada a densidade correspondente a molécula de DMSO na estrutura da SmPNP em complexo com AT2169. Como foi utilizado DMSO na solubilização deste composto, modelamos uma molécula de DMSO por subunidade.

O modelo final contém:

- 6341 átomos de proteína em 839 aminoácidos
- 3moleculas de acetato
- 3 moléculas de fosfato
- 610 moléculas de água
- 3 moléculas de DMSO

Estão ausentes na estruturas os resíduos:

- 1-3, e 62-66 da subunidade A
- 1-3, 62-65 e 253-267 da subunidade B
- 1-2 e 287 da subunidade C

4.6 Análise da qualidade dos modelos

Na validação das estruturas foram empregados o programa Procheck (Laskowski *et al.*, 1993), Verify3D (Lüthy *et al.*, 1992) e a rotina OLDQUA do modulo QUALTY do programa WHATIF (Vried & Sander., 1993).

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

4.6.1 Análise da qualidade da estrutura da SmPNP refinada a 2,75Å

Segundo o programa Procheck o modelo possui uma boa estereoquímica possuindo um fator G-global de 0,3 (valores aceitáveis devem ser maiores que –0,7), demonstrando que a estrutura está melhor em termos estereoquímicos que a média das estruturas resolvidas a mesma resolução.

A Figura 4.23 mostra o diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros da cadeia principal para o trímero da SmPNP.

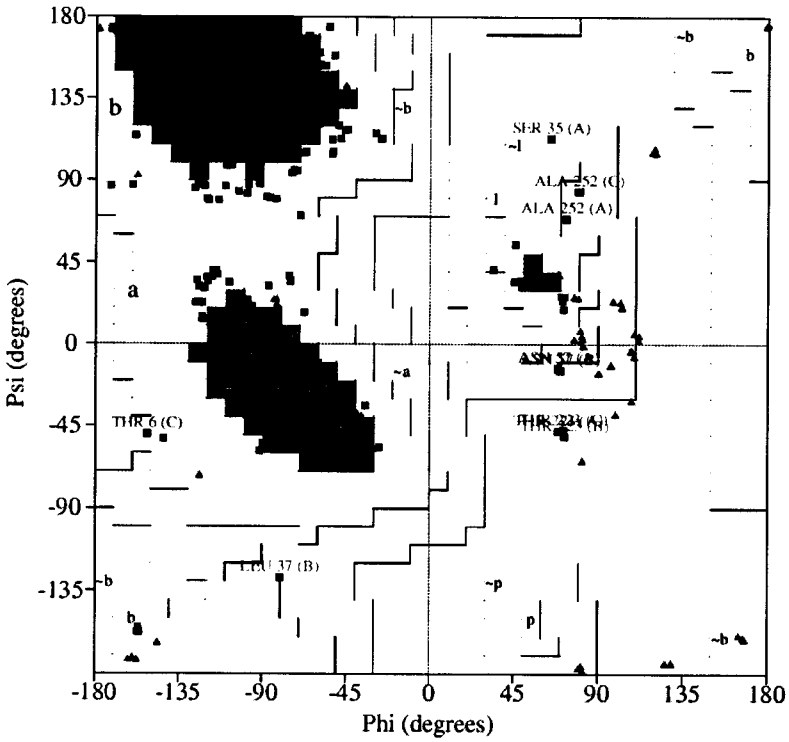


FIGURA 4.23. Diagrama de Ramachandran para a o trímero da SmPNP refinada a 2,75Å de resolução.

De acordo com o diagrama de Ramachandran apenas três resíduos estão em regiões não permitidas: o resíduo T223 em todas as três subunidades, entretanto o mesmo apresenta uma clara densidade eletrônica para a cadeias principal e lateral. Na PNP bovina este resíduo encontra-se também com aproximadamente os mesmos ângulos diedros. O resíduo T233 está situado na vizinhança do sítio de ligação ao

fosfato e sua cadeia lateral realiza duas pontes de hidrogênio com os resíduos R84 e S220 os quais participam da ligação do substrato fosfato, portanto sua conformação energeticamente desfavorável é provavelmente funcionalmente importante.

Através da análise do diagrama de Ramachandran realizada pelo programa Procheck, 86,3% dos resíduos encontram-se nas regiões mais favoráveis, 12,3% dos resíduos encontram-se nas regiões adicionais permitidas, 1% nas regiões generosamente permitidas e 0,4% nas regiões desfavoráveis, excluindo os resíduos de glicina (mostrados como triângulos na Figura 4.23) sendo estes resultados comum para estruturas resolvidas a média resolução.

Outra avaliação foi feita utilizando o programa Verify 3D desenvolvido por Lüthy *et al.* (1992). Este programa mede a compatibilidade de um modelo de proteína com sua seqüência de aminoácidos utilizando um perfil 3D. Cada resíduo no modelo tridimensional é caracterizado por seu ambiente químico. Cada ambiente químico (são 18 utilizados, baseados na estrutura secundária, contatos polares e acessibilidade do resíduo), pode ser caracterizado pela preferência estatística do ambiente (chamados escore 3D-1D) para cada um dos 20 aminoácidos. O escore do perfil 3D (S) para a compatibilidade do modelo com sua seqüência é a soma dos escores 3D-1D para todos os resíduos da proteína. O programa também calcula o valor estatisticamente esperado para a mesma seqüência de aminoácidos. A estrutura é considerada coerente se o valor obtido (S) for maior que 45% do valor estatisticamente esperado.

O escore do perfil 3D (S) para a estrutura da SmPNP a 2,75Å foi de 418,36 sendo este valor superior até mesmo ao valor esperado (378,66) para a mesma seqüência de aminoácidos, indicando que o modelo construído está quimicamente coerente .

Foi também utilizada a rotina OLDQUA do modulo QUALTY do programa WHATIF (Vried & Sander., 1993), o qual avalia a qualidade dos contatos atômicos entre um resíduo e os átomos próximos a este. Este método reporta a normalidade da conformação residual, e não sua acuidade. É um método empírico e seus resultados baseiam-se em interpretações estatísticas que estão relacionadas com o tamanho do banco de dados que serve como espaço amostral. Resíduos com baixo índice de qualidade nem sempre estão incorretos, pois podem fazer parte de sítios funcionais, ou em regiões de contato entre subunidades, uma vez que o cálculo pode ser feito para monômeros individuais (Vried & Sander., 1993). O módulo Qualty (OLDQUA) fornece um valor final (cálculo total de todos os índices parciais de contatos atômicos), que é usado como um critério de avaliação global da estrutura. Segundo este valor, modelos são considerados basicamente corretos quando atingem valores superiores a –1,5. O valor final da rotina OLDQUA para o modelo da SmPNP refinada a 2,75Å foi -0,392, demonstrando mais uma vez que o modelo está de boa qualidade em termos de contatos atômicos.

Uma última avaliação foi realizada utilizando o programa SFCHECK implementado no pacote de programas CCP4. O SFCHECK realiza a comparação entre o modelo e os dados experimentais através da correlação entre o resíduo modelado e sua densidade eletrônica. A correlação dos átomos do modelo com a densidade eletrônica esta boa para toda a molécula, entretanto é pior quando comparada as outras SmPNP refinadas a alta resolução. O valor do fator de temperatura para a estrutura é 29,7 $Å^2$. Com relação ao fator de temperatura esta estrutura quando comparada com as outras SmPNP possui comparativamente um maior fator de temperatura para todos os resíduos especialmente na região do C-terminal para todas as cadeias (Apêndice B).

4.6.2 Análise da qualidade da estrutura da SmPNP refinada a 1.75Å

O modelo apresenta boa estereoquímica na avaliação do programa Procheck com fator G-global de 0,2 (valores aceitáveis devem ser maiores que –0,3, para eata resolução), demonstrando que a estrutura está melhor em termos estereoquímicos que a média das estruturas resolvidas a mesma resolução.

A Figura 4.24 mostra o diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros da cadeia principal para o trímero da SmPNP. De acordo com o diagrama de Ramachandran apenas três resíduos estão em regiões não permitidas: é o resíduo T223 em todas as três subunidades, como na estrutura da SmPNP a 2,75Å. E novamente a densidade eletrônica está bastante coerente para estes resíduos.

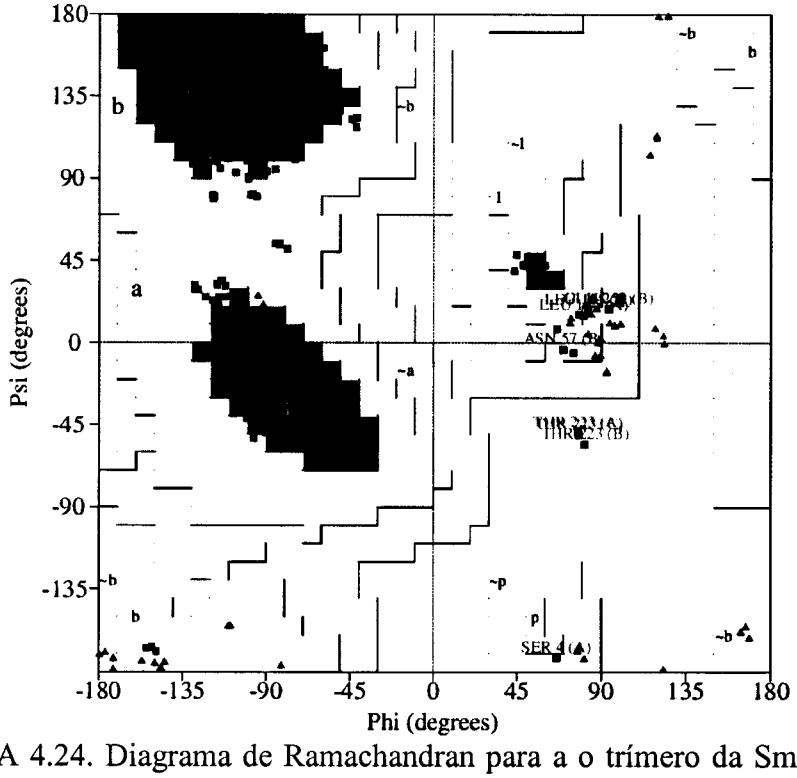


FIGURA 4.24. Diagrama de Ramachandran para a o trímero da SmPNP refinada a 1,75Å de resolução.

Através da análise do diagrama de Ramachandran realizada pelo programa Procheck, 92,2% dos resíduos encontram-se nas regiões mais favoráveis, 6,75 % dos resíduos encontram-se nas regiões adicionais permitidas, 0,7% nas regiões generosamente permitidas e 0,4% nas regiões desfavoráveis, excluindo os resíduos de glicina (mostrados como triângulos na Figura 4.24).

Segundo o programa Verify3D, o escore do perfil 3D (S) para a estrutura da SmPNP a 1,75Å foi de 430,96 sendo este valor superior a valor esperado de (379,11) para a mesma seqüência indicando que o modelo está quimicamente coerente.

De acordo com a rotina OLDQUA do programa WHATIF, o modelo esta auto-consistente em termos de contatos atômicos, possuindo um valor de -0,287.

Segundo o programa SFCHECK, a correlação dos átomos do modelo com a densidade eletrônica está muito boa para toda a molécula. O valor do fator de temperatura para a estrutura é 24,4 $Å^2$. Com relação ao fator de temperatura a subunidade B possui maiores valores para o fator de temperatura quando comparada com as outras subunidades especialmente na região dos resíduos 32-64 (Apêndice C).

4.6.3 Análise da qualidade da estrutura da SmPNP refinada a 1,9Å

Segundo o do programa Procheck o modelo apresenta boa estereoquímica com um fator G-global de 0,2 (valores aceitáveis devem ser maiores que –0,3), demonstrando que a estrutura está melhor em termos estereoquímicos que a média das estruturas resolvidas a mesma resolução.

A Figura 4.25 mostra o diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros da cadeia principal para o trímero da SmPNP.

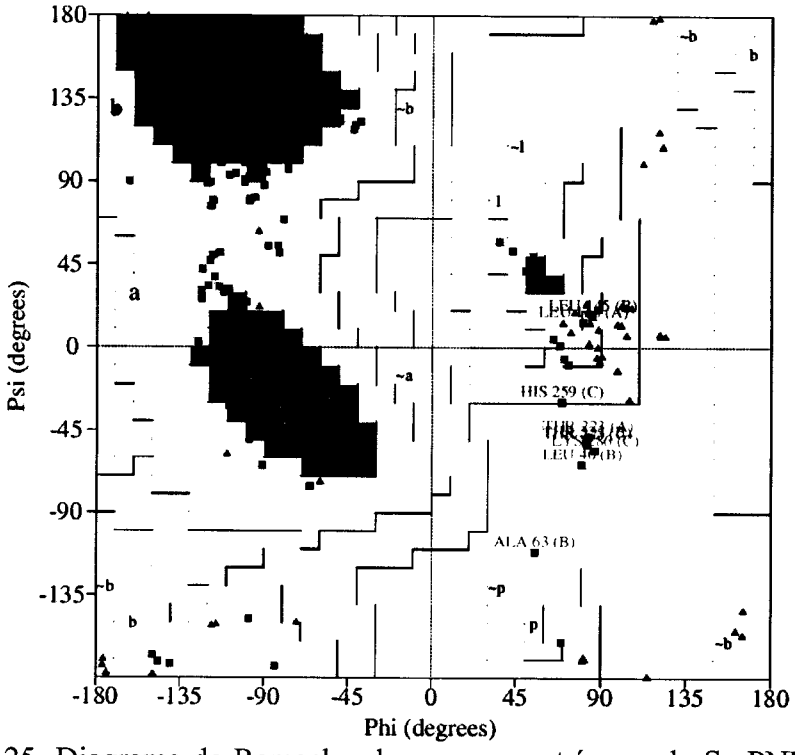


FIGURA 4.25. Diagrama de Ramachandran para a o trímero da SmPNP refinada a 1,9Å de resolução

De acordo com o diagrama de Ramachandran seis resíduos estão em regiões não permitidas, os resíduos T223 das três subunidades, além dos resíduos 63 e 40 da subunidade B, e o K286 da cadeia C, os quais não possuem uma densidade eletrônica que possibilitasse o correto posicionamento destes resíduos.

Através da análise do diagrama de Ramachandran realizada pelo programa Procheck, 90,8% dos resíduos encontram-se nas regiões mais favoráveis, 7,9% dos resíduos encontram-se nas regiões adicionais permitidas, 0,4% nas regiões generosamente permitidas e 0,8% nas regiões desfavoráveis, excluindo os resíduos de glicina (mostrados como triângulos na Figura 4.25).

De acordo com o programa Verify3D, o escore do perfil 3D (S) para a estrutura da SmPNP a 1,9Å foi de 425,35 sendo este valor superior ao valor esperado (386,08), indicando a coerência química do modelo produzido.

Segundo a rotina OLDQUA do programa Whatif o modelo está consistente en termos dos contatos atômicos com um valor -0,375.

Segundo o programa SFCHECK, a correlação dos átomos do modelo com a densidade eletrônica está muito boa para toda a molécula. O valor do fator de temperatura para a estrutura é 26,0 $Å^2$. Como na estrutura da SmPNP refinada a 1.75Å a subunidade B possui maiores valores para o fator de temperatura quando comparada com as outras subunidades. Em geral há um aumento dos valores do fator de temperatura para os resíduos 247 a 261 indicando uma maior mobilidade desta região da molécula (Apêndice D).

4.6.4 Análise da qualidade da estrutura da SmPNP refinada a 1,9Å em complexo com AT2169

Na avaliação do programa Procheck o modelo apresenta boa estereoquímica com um fator G-global de 0,2 (valores aceitáveis devem ser maiores que –0,3, para esta resolução), demonstrando que a estrutura está melhor em termos estereoquímicos que a média das estruturas resolvidas a mesma resolução.

De acordo com o diagrama de Ramachandran apenas os três resíduos T223 das três subunidades estão em regiões não permitidas, como nas outras SmPNP refinadas. Através da análise do diagrama de Ramachandran realizada pelo programa Procheck, 92,6% dos resíduos encontram-se nas regiões mais favoráveis, 6,5% dos resíduos encontram-se nas regiões adicionais permitidas, 0,3% nas regiões generosamente permitidas e 0,4% nas regiões desfavoráveis, excluindo os resíduos de glicina (mostrados como triângulos na Figura 4.26).

A Figura 4.26 mostra o diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros da cadeia principal para o trímero da SmPNP.

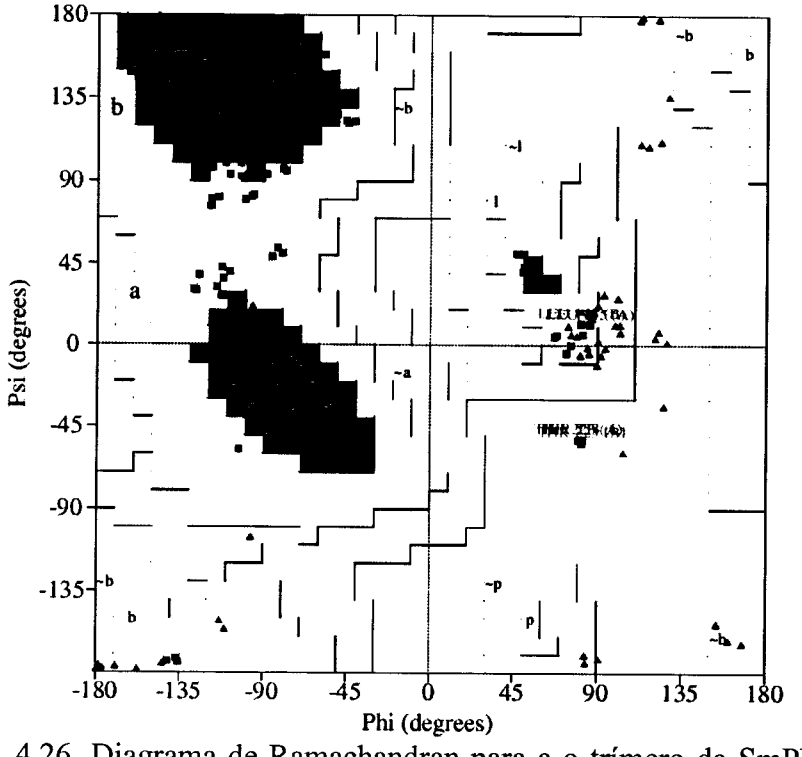


FIGURA 4.26. Diagrama de Ramachandran para a o trímero da SmPNP refinada a 1,9Å de resolução em complexo com AT2169

De acordo com o programa Verify3D estrutura da SmPNP em complexo com AT2169 esta quimicamente coerente possuindo um valor para o escore do perfil 3D (S) de 421,89 sendo este valor superior ao valor esperado (380,97). Segundo a rotina OLDQUA do programa Whatif, o modelo possui um valor de -0,308.

Segundo o programa SFCHECK, a correlação dos átomos do modelo com a densidade eletrônica está muito boa para toda a molécula. O valor do fator de temperatura para a estrutura é 18,9 $Å^2$. Como na estrutura da SmPNP refinada a 1.75Å e a 1,9Å a subunidade B possui maiores valores para o fator de temperatura quando comparada com as outras subunidades. Em geral há um aumento dos valores do fator de temperatura para os resíduos 247 a 261 indicando uma maior mobilidade

desta região da molécula. A subunidade C possui os menores valores para o fator de temperatura quando comparado as outras duas cadeias (Apêndice E).

4.6.5 Análise da qualidade da estrutura da SmPNP refinada a 2,0Å em complexo com fosfato

Segundo a avaliação do programa Procheck o modelo apresenta boa estereoquímica com um fator G-global de 0,2 (valores aceitáveis devem ser maiores que –0,4, para esta resolução), demonstrando que a estrutura está melhor em termos estereoquímicos que a média das estruturas resolvidas a mesma resolução.

A Figura 4.27 mostra o diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros da cadeia principal para o trímero da SmPNP. De acordo com o diagrama de Ramachandran seis resíduos estão em regiões não permitidas , os resíduos T223 das três subunidades, além dos resíduos 63 e 40 da subunidade B, e o K286 da cadeia C, como na estrutura da SmPNP refinada a 1,9Å de resolução.

Através da análise do diagrama de Ramachandran realizada pelo programa Procheck, 91,1% dos resíduos encontram-se nas regiões mais favoráveis, 7,5% dos resíduos encontram-se nas regiões adicionais permitidas, 0,6% nas regiões generosamente permitidas e 0,8% nas regiões desfavoráveis, excluindo os resíduos de glicina (mostrados como triângulos na Figura 4.27).

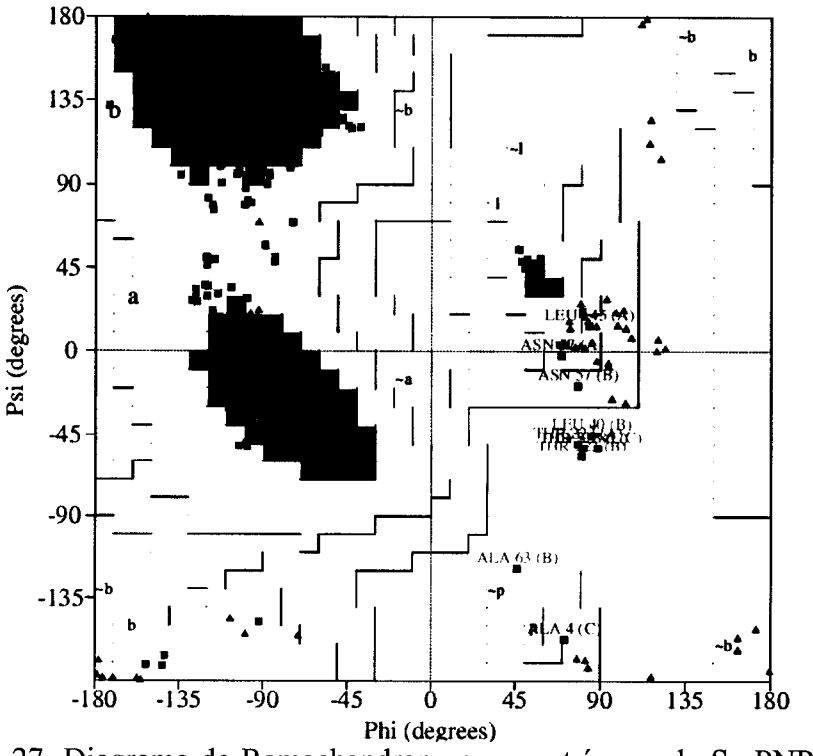


FIGURA 4.27. Diagrama de Ramachandran para a o trímero da SmPNP refinada a 2,0Å de resolução em complexo com fosfato.

Neste modelo de acordo com o programa Verify3D, o escore do perfil 3D (S) foi 432,24 sendo este valor superior ao valor esperado de 386,08 para a mesma seqüência indicando mais uma vez a coerência dos modelos produzidos. Na avaliação da rotina OLDQUA para o modelo esta auto-consistente com relação aos contatos atômicos com um valor de -0,383.

Segundo o programa SFCHECK , a correlação dos átomos do modelo com a densidade eletrônica está muito boa para toda a molécula. O valor do fator de temperatura para a estrutura é 26,9 $Å^2$. Os maiores valores para o fator de temperatura foram encontrados para os resíduos 34-45 e 59-62 da subunidade B. Como nas outras estruturas da SmPNP a subunidade B possui maiores valores para o fator de temperatura quando comparada com as subunidades A e B, indicando um maior liberdade para esta subunidade (Apêndice F).

4.7 Análise das estruturas

4.7.1 A estrutura da SmPNP

A estrutura da SmPNP é similar as outras estruturas de PNPs de baixo peso molecular já determinadas. A estrutura do monômero da SmPNP possui um barril misto de 9 fitas no centro da estrutura formados pelos resíduos 29-32, 45-51, 69-75, 78-84, 112-121, 131-138, 189-186, 218-220 e 236-246, envolvido por oito α-hélices formadas pelos resíduos 9-22, 38-42, 95-108, 140-143, 170-182, 205-213, 224-232 e 260-283 e três hélices 3_{10} formados pelos resíduos 52-54, 89-91, 186-188.

A estrutura do monômero da SmPNP da forma apo pode ser visualizada na Figura 4.28.

FIGURA 4.28. Estrutura do monômero da SmPNP na forma apo em modelo de fitas. Em vermelho são vistas as α-hélices, em amarelo as hélices 3_{10} e em azul as fitas beta. A estrutura da SmPNP contem um barril misto de 9 fitas, o qual pode ser visualizado na parte central da estrutura.

As três subunidades do trímero da SmPNP estão relacionadas por um eixo de ordem três não cristalográfico (Figura 4.29) e possuem uma área de contato de 2100Å^2 por subunidade. 20 pontes de hidrogênio formadas pelos átomos: Y90A O - G151B N, D136A $O_{\delta 2}$ - A206C N, H137A O - T204C $O_{\gamma 1}$, Y139A N - E207C $O_{\varepsilon 1}$, L143A 0 - G198C N, N146A 0 - G 144B O, G151A N - Y90C O, R160A NH1 - E91C $O_{\varepsilon 2}$, P161A O - Y202C N, G198A N - L143B O, Y202A N - P162B O, T204A $O_{\gamma 1}$ - H137B O, E207A $O_{\varepsilon 2}$ - Y139B N, V251A O - R170B NH2, Y90B O - G151C N, G198B N - L143C O, T204B $O_{\gamma 1}$ - H137C O, A206B N - D136C $O_{\delta 1}$, E207B $O_{\varepsilon 2}$ - Y139C N, M210B S_{δ} - M214C S_{δ}, estabilizam a interface entre os monômeros.

Grande parte dos contatos entre os monômeros é realizada pelo loop 144-169, o qual é o maior loop da SmPNP. Este loop envolve a subunidade de um lado e diferentes regiões de outro monômero (Figura 4.29).

FIGURA 4.29. Estrutura do trímero da SmPNP (forma apo) em modelo de fitas. As fitas betas estão coloridas em azul, as α-hélices em vermelho e os loops em cinza. o maior loop (resíduos 144-169) da SmPNP o qual realiza grande parte dos contatos entre as subunidades do trímero está colorido em verde.

Utilizando um critério de distância de 4,5Å para os resíduos em contato com outra subunidade foram encontrados 53 resíduos participando da interface na subunidade A, 46 resíduos na subunidade B e 51 resíduos na subunidade C. Este número de resíduos indica que a 17,8% dos resíduos da estrutura estão envolvidos na formação do trímero. Uma característica peculiar encontrada nos resíduos que participam da interface entre as subunidades é a presença de um grupamento de metioninas situados no centro da estrutura do trímero (Figura 4.30), neste

grupamento participam as metioninas M210 e M214 de cada subunidade (a título de comparação na PNP bovina estes resíduos são leucina).

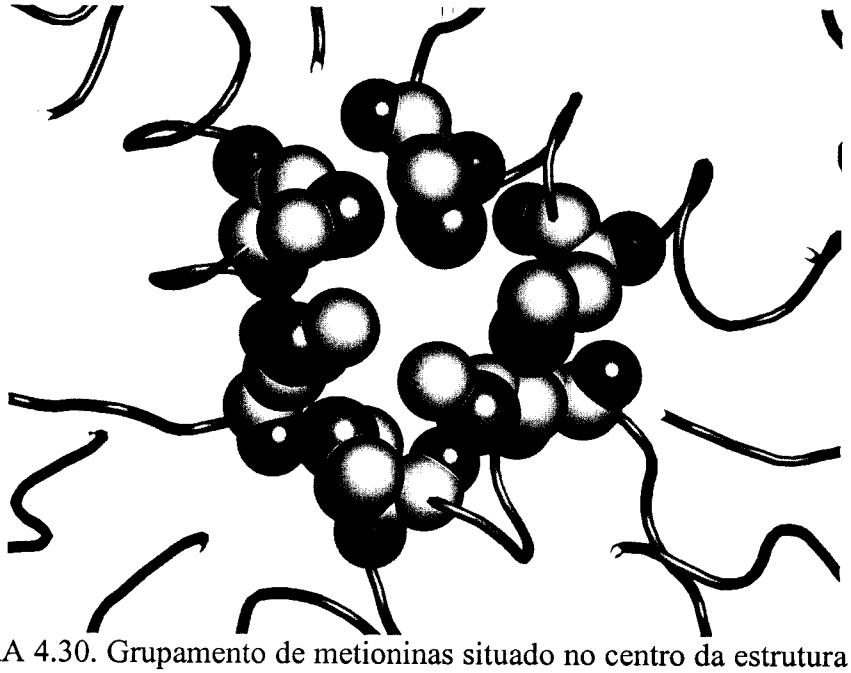


FIGURA 4.30. Grupamento de metioninas situado no centro da estrutura da SmPNP. Na formação deste grupamento participam as metioninas 210 e 214 de cada subunidade. O eixo de ordem três passa pelo centro da Figura.

4.7.2 O sítio ativo da SmPNP

O sítio ativo da SmPNP (como outras PNPs) pode ser dividido em três subsítios: o sítio de ligação a base, a ribose e ao fosfato. A seguir será realizada a descrição de cada sítio em comparação com as estruturas das PNPs humana, bovina e de *Cellulomonas*.

4.7.2.1 O sítio de ligação a base

O sítio de ligação a base da SmPNP é composto dos resíduos A119, G120, Y202, E203, V219, G220, M221, N245, I246 e S247 (A117, G118, F200, E201,

V217, G218, M219, N243, K244 e V245 nas PNPs humana e bovina). Quando comparadas as PNPs humana e bovina podem ser observadas três diferenças, as substituições F200Y202, K244I246 E V245S247, estes aminoácidos possuem densidade eletrônica bem definido em todas as estruturas da SmPNP refinadas, como por exemplo na estrutura da SmPNP em complexo com NDSB195 (Figura 4.31).

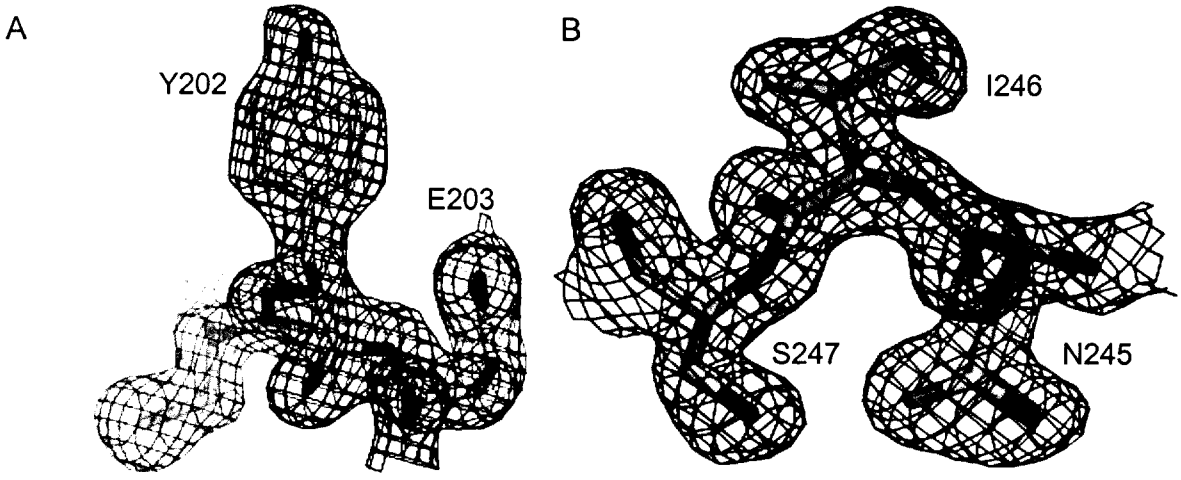


FIGURA 4.31. Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ para os resíduos Y202 (A) e I246 e S247 (B) da SmPNP em complexo com NDSB. Estes resíduos participam do sítio de ligação a base e são mutados quando comparados as huPNP e boPNP. O resíduo S247 somente é encontrado na SmPNP quando comparado a PNPs de outras 14 espécies.

Nas PNPs humana e bovina o resíduo F200 realiza uma interação hidrofóbica com a base. As PNPs de *Cellulomonas* (Tebbe *et al.*, 1999) e de *Mycobacterium tuberculosis* (Shi *et al.*, 2001), possuem, como na SmPNP, a substituição F200Y202 (F200Y188 em *M. tuberculosis* e F200Y203 em *Cellulomonas*). Na estrutura da PNP de *M. tuberculosis* em complexo com immucilina-H (ImmH) o anel fenólico do resíduo Y188 é orientado perpendicular ao plano da base do ImmH e forma uma ponte de hidrogênio com o grupo 5'-hidroxil do ImmH. Na PNP de *Cellulomonas* o resíduo Y203 realiza uma interação de stacking com o composto 8-iodoguanina

presente no sítio ativo. Na SmPNP em complexo com AT2169 o resíduo Y202 está deslocado com relação a perpendicular do plano do anel do composto AT2164 (Figura 4.32), e a distância entre os átomos do anel do resíduo Y202 e o composto AT2169 e de aproximadamente 3,9Å.

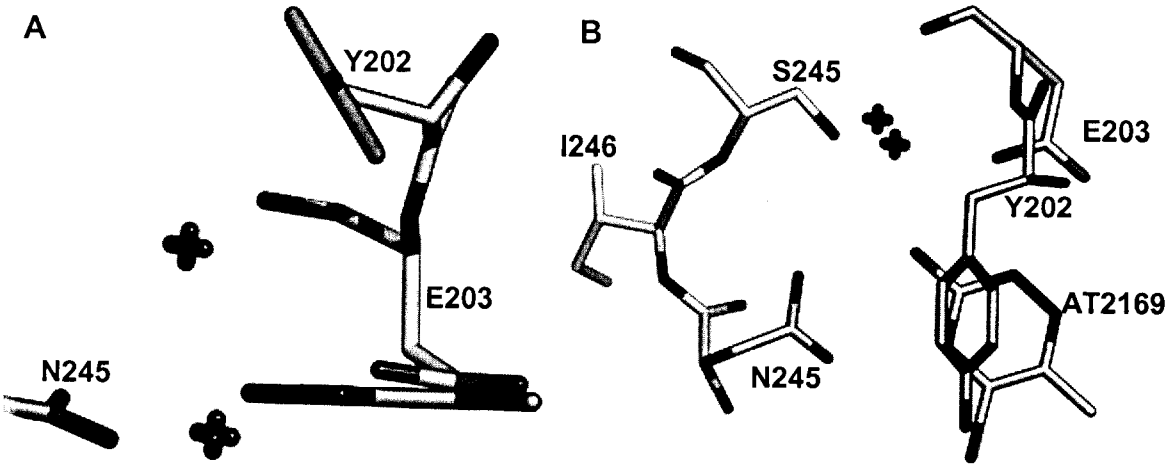


FIGURA 4.32. Posicionamento do resíduo Y202 com relação ao composto AT2169. A- O grupo fenil de Y202 esta a 34^0 com relação a um plano perpendicular ao plano do anel do composto AT2169. B- Vista a 90^0 com relação a AT2169, o grupo fenil de Y202 encontra-se deslocado com relação ao centro do composto AT2169.

Muito tem sido discutido com relação a participação ou não do resíduo K244 (I246 em SmPNP) no sítio ativo da PNP humana e bovina. Na PNP humana (huPNP) a 2,75Å de resolução em complexo com guanina (Narayana *et al.*, 1997) a cadeia lateral de K244 esta situada dentro do sítio ativo. Porem na huPNP na forma apo também a 2.75Å de resolução (Narayana *et al.*, 1997), a cadeia lateral de K244 aponta para fora do sítio ativo. Na estrutura da huPNP resolvida a 2,3Å de resolução (Azevedo Jr *et al.*, 2003) o N_ζ da K244 forma uma ponte de hidrogênio com os grupos carbonila dos resíduos F124 e N121, o que indica segundo Azevedo Jr *et al.*, (2003), que a cadeia lateral de K244 esta firmemente travada nesta orientação (para fora do sítio ativo). Em nenhuma estrutura da PNP bovina o resíduo K244 encontra-se com sua cadeia lateral direcionada para o sítio ativo indicando que este resíduo

não participa de nenhuma interação com a base no sítio ativo da PNP bovina. Azevedo Jr. *et al.*, (2003), sugerem que a participação de K244 na catálise ou ligação com a base tem de ser revista, pois não há nenhum tipo de interação entre K244 e a base na estrutura deles. Erion *et al.*, (1997a), em estudos de mutagênese sítio dirigida da huPNP relataram que a mutante K244A exibe uma cinética enzimática similar ao tipo selvagem, indicando mais uma vez que este resíduo não participa da catálise.

A SmPNP como visto na Figura 4.31 B, possui a substituição K244I246 quando comparado com huPNP e boPNP. Na estrutura da SmPNP o resíduo I246 aponta para fora do sítio ativo e não é de se esperar nenhuma participação na catálise ou ligação do substrato. A PNP de *Cellulomonas* possui a substituição K244L247, e a cadeia lateral do resíduo L247 também aponta para fora do sítio ativo indicando mais uma vez que não há participação deste resíduo com a catálise ou ligação do substrato. Estes fatos (substituições na posição e posicionamento da cadeia lateral) indicam a não participação deste resíduo bem como do resíduo K244 nas huPNP e boPNP na ligação ou na cinética destas PNPs.

A diferença mais marcante quando comparado ao sítio de ligação a base da huPNP e boPNP é a presença da substituição V245S247 na SmPNP. Segundo Bzowska *et al.* (2000) o resíduo V245 participa na boPNP do sítio de ligação a base realizando uma interação hidrofóbica. Comparando-se esta posição no alinhamento da SmPNP com outras 13 seqüências de PNPs, é observado que entre estas seqüências somente a SmPNP possui uma serina nesta posição. A cadeia lateral da S247 aponta diretamente para o sítio de ligação a base (Figura 4.33), interagindo com o resíduo E203 via uma molécula de água. A orientação da cadeia lateral da S247 para o sítio ativo foi observada durante o refinamento da primeira estrutura da SmPNP (2,75Å de resolução), entretanto não foi observada nenhuma interação via

uma molécula de água com o E203, provavelmente devido a resolução com que foi obtida a estrutura. Em todas as outras estruturas obtidas é visualizada esta interação. A importância das substituições na atividade da SmPNP, bem como a comparação entre as estruturas da SmPNP, e outras PNPs serão realizadas em outro tópico.

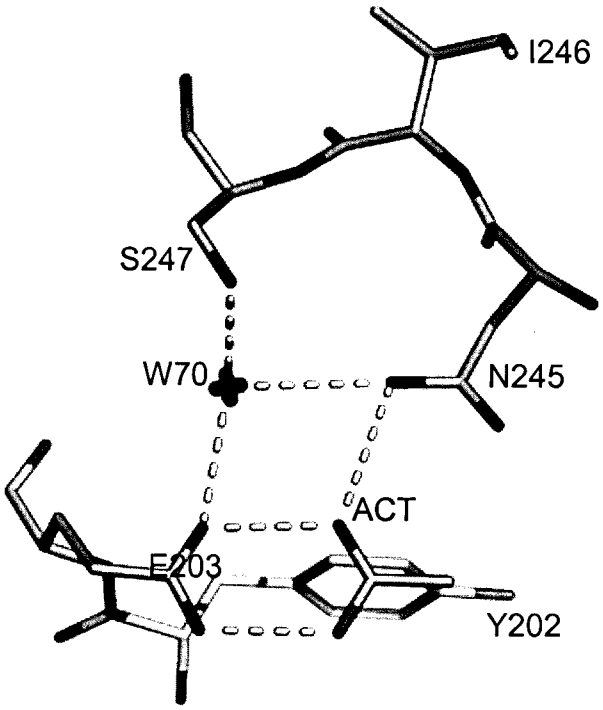


FIGURA 4.33. Parte do sítio de ligação a base da SmPNP em complexo com acetato (SmPNP a 1,75Å). A cadeia lateral do resíduo S247 aponta diretamente para o interior do sítio. Pode-se visualizar a interação entre S247 e E203 por pontes de hidrogênio via uma molécula de água. A molécula de água W70 é ancorada por três pontes de hidrogênio. A presença de S247 é uma característica única da SmPNP quando comparada a PNPs de outras espécies.

Com relação ao resíduo E203, foi observado que na SmPNP, diferentemente das PNPs bovina e humana, este resíduo realiza duas pontes de hidrogênio, as quais podem "segurar" firmemente este resíduo nesta posição. O átomo $O_{\varepsilon 2}$ do E203 forma uma ponte de hidrogênio com o $N_{\delta 1}$ do resíduo N197, que por ser L195 na boPNP é impossível realizar esta interação. Na boPNP o átomo $O_{\varepsilon 2}$ do resíduo E201 realiza

uma ponte de hidrogênio com a molécula de água W312 (na estrutura 1b8n). A substituição L195N197 permite a SmPNP a realize uma ponte de hidrogênio similar mas sem a participação de uma molécula de água. A segunda ponte é realizada pelo átomo $O_{\varepsilon 1}$ do E203 com uma molécula de água (W50 na SmPNP na forma apo) (FIGURA 4.34).

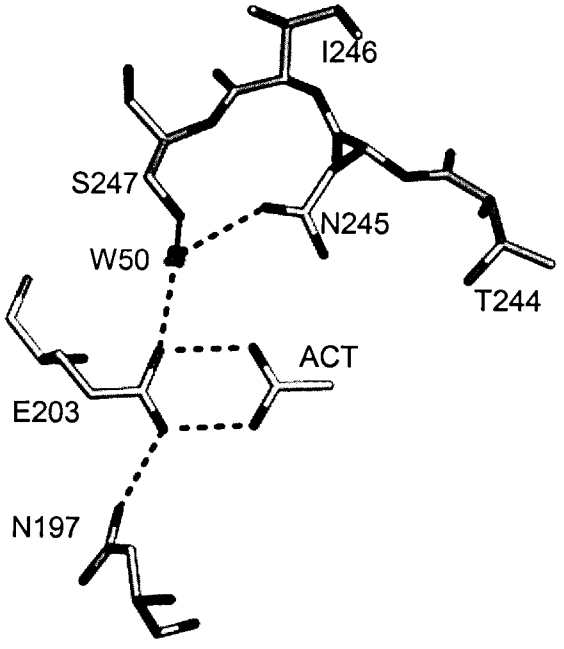


FIGURA 4.34. Pontes de hidrogênio no sítio ativo da SmPNP. O resíduo E203 interage com o resíduo N197 e com a água W50 via pontes de hidrogênio. Na boPNP o resíduo correspondente a N197 é L195, e o resíduo E201 realiza uma ponte de hidrogênio com uma água situada aproximadamente na mesma posição do átomo N_{δ} do resíduo N197 na SmPNP.

4.7.2.2 O sítio de ligação a ribose

Na SmPNP o sítio de ligação a ribose compreende os resíduos F161 (de outra subunidade), Y202, V219,G220, M221, H259 e E261 (F159, F200, V217, G218, M219, H257 e E259 na PNPs humana e bovina). Com exceção de Y202 que também

participa do sítio de ligação a base, este sítio é totalmente conservado. O sítio de ligação a ribose é a parte mais hidrofóbica do sítio ativo.

Na PNP bovina os oxigênios da ribose O(2') e O(3') são ligados por pontes de hidrogênio ao nitrogênio da cadeia principal do resíduo M219 e a hidroxila do resíduo Y88 respectivamente. O O(5') realiza uma ponte de hidrogênio com o nitrogênio δ1 da H257. Em adição, as hidroxilas 2'- e 3'-hidroxil interage com dois oxigenios do sulfato e o 2'-hidroxil ainda com uma molécula de água. Outras interações envolvendo a ribose são hidrofóbicas e são mantidas pelos resíduos H86, Y88, Y200 e F159 (Bzowska *et al.*, 2000).

Como não possuímos uma estrutura da SmPNP em complexo com um nucleosídeo ou ribose-1-fosfato, não temos detalhes estruturais da ligação da pentose com seu sítio. Entretanto, foram realizados simulações de "docking" utilizando o programa GOLD com nucleosídeos e inibidores das PNPs, os quais são utilizados na descrição das interações da ribose com seu sítio, a qual será realizada no tópico relativo aos experimentos de docking (item 4.15).

4.7.2.3 O sítio de ligação ao fosfato

Ao contrário do sítio de ligação a ribose onde não possuímos uma estrutura em complexo com um nucleosídeo ou ribose-1-fosfato, para o sítio de ligação ao fosfato dois complexos foram utilizados para a descrição deste sítio: as estruturas da SmPNP em complexo com NDSB195 e da SmPNP em complexo com fosfato.

O sítio de ligação ao fosfato é positivamente carregado e na SmPNP como nas PNPs humana e bovina, consiste de uma arginina R86, uma histidina H88, duas serinas S35 e S222, uma contribuição da cadeia principal de uma alanina A118 N

(R84, H86, S33, S220 e A116 na hu e boPNP), e uma molécula de água W119 na SmPNP (W312 na boPNP) a qual possui sua posição conservada na SmPNP quando comparada na boPNP em complexo com fosfato (4PNP). Além da molécula de água W119, a SmPNP possui ainda quatro moléculas de água que realizam pontes de hidrogênio com o fosfato são elas: W279, a qual também interage com o resíduo Y90, W344, W394 e W519 (Figura 4.35).

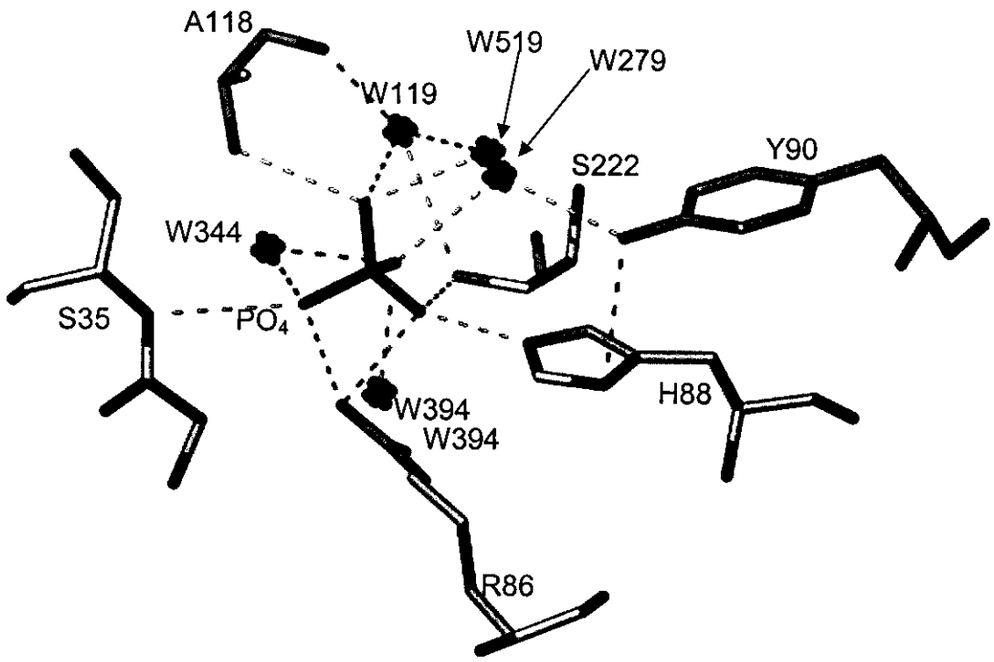


FIGURA 4.35. Sítio de ligação ao fosfato da SmPNP em complexo com fosfato (subunidade A). Uma extensa rede de pontes de hidrogênio com participação de 5 moléculas de água é observada na interação do fosfato. O resíduo Y90 participa da interação com o fosfato via a molécula de água W279. Ao todo o fosfato realiza 12 pontes de hidrogênio com seu sítio de ligação.

Quando sobrepomos os monômeros da SmPNP em complexo com fosfato, observa-se que o loop 34-38 que está envolvido na ligação ao fosfato possui uma conformação diferente na subunidade B em comparação com as subunidades A e C, e além disto a orientação do fosfato na subunidade B também é diferente (Figura

4.36). Segundo Bzowska *et al.*, (2000), este loop passa por uma mudança conformacional na PNP bovina associada à ligação do fosfato. Na ausência de fosfato, esta região adota uma única conformação, mas com uma alta concentração de fosfato este loop é bem ordenado e formam contatos com o ânion, com uma baixa concentração de fosfato este loop adota uma conformação intermediária. Mao *et al.*, (1998) postulou que este efeito pode ser explicado pela comunicação entre subunidades associada a ligação do fosfato, em linha com alguns dados de cinética e de ligação para o fosfato, apontando a possibilidade de uma cooperatividade negativa ou não igualdade dos sítios ativos.

Na PNP de *Cellulomonas* é observada apenas uma pequena diferença estrutural no resíduo R103 (R84 na boPNP e R86 na SmPNP), entretanto estas diferenças podem ser em razão do empacotamento cristalino (Tebbe *et al.*, 1999).

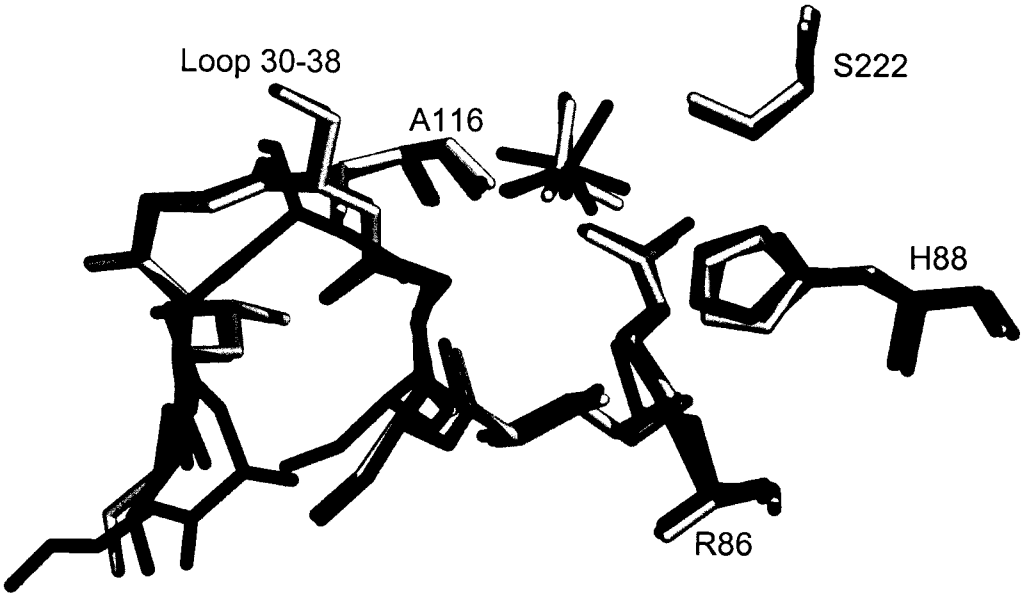


FIGURA 4.36. Sobreposição das subunidades A (vermelho), B (azul) e C (amarelo) para o sítio de ligação ao fosfato. Pode-se observar que nas subunidades A e C a posição do fosfato é basicamente a mesma, enquanto que na subunidade B ocorre um desvio quando comparada as outras subunidades. O loop 34-38 possui a mesma conformação nas subunidades A e C, enquanto na subunidade B este loop adota outra conformação.

A conformação do loop 34-38 nas subunidades da SmPNP indica que há uma diferença nos sítios de ligação ao fosfato da SmPNP, apesar da igualdade da seqüência de aminoácidos nos monômeros. Este fato também é observado na SmPNP em complexo com NDSB195, onde as subunidades B e C possuem a mesma conformação do loop 34-38 enquanto que a subunidade A possui uma conformação diferente. Além disto na SmPNP na forma apo o loop 34-38 possui uma conformação diferente na subunidade B em comparação com as subunidades A e C (como SmPNP em complexo com fosfato), e por fim na SmPNP em complexo com AT2169 este mesmo loop possui a mesma conformação em todas as subunidades. Este último fato pode ser um indicativo que a ligação de um composto no sítio de ligação a base pode levar a uma reorientação deste loop, e por conseguinte no sítio de ligação ao fosfato.

Além do fato do posicionamento do fosfato ser diferente na subunidade B da SmPNP em complexo com fosfato, o fator de temperatura para o fosfato da subunidade B é maior (~55Å^2) que na subunidade A (~38Å^2) e na subunidade C (~45Å^2), sugerindo que na subunidade B este sítio talvez não esteja completamente ocupado. Este fato também foi observado na PNP de *Cellulomonas* (Tebbe *at al.*, 1999), onde os autores sugeriram a existência de uma cooperatividade negativa e uma não identidade nos sítios ativos, sendo esta última também encontrada na SmPNP. Portanto estes dados dão apoio a hipótese que ocorre algum tipo de cooperatividade entre as subunidades, a qual poderá ser comprovada no futuro através de experimentos de cinética enzimática.

4.7.2.3.1 Comparação entre os sítios de ligação do fosfato da SmPNP e as PNPs bovina e humana

Apesar de existir uma total conservação dos resíduo envolvidos no sítio de ligação ao fosfato entre a SmPNP e as PNPs humana e bovina, foram encontradas algumas diferenças estruturais. Na Figura 4.37 é visualizada a sobreposição do sítio de ligação ao fosfato da SmPNP em complexo com fosfato e a estrutura da PNP bovina também em complexo com fosfato. A posição do fosfato é ligeiramente diferente nas duas estruturas. O loop envolvendo os resíduos 34-36 (32-34 na PNP bovina) possui uma conformação diferente nas duas estruturas, ambas as quais possibilitam a interação entre o S33 (SmPNP) ou S35(boPNP) com o fosfato. A cadeia lateral dos resíduos R86 (R84) apresenta dois rotâmeros diferentes nas duas estruturas, enquanto que o resíduo H88 (H86) está um pouco deslocado na PNP bovina em comparação com a SmPNP, entretanto mantém as mesmas interações entre a proteína e o fosfato em ambas as estruturas.

Interessantemente a SmPNP possui uma molécula de água em uma posição aproximada do átomo $N_{\varepsilon 2}$ da cadeia lateral do resíduo H64 (na boPNP), a uma distância de 0,61Å, e realiza uma ponte de hidrogênio com o fosfato. O resíduo correspondente ao H64 na SmPNP é H66, e pertence a um loop que interage com o fosfato como descrito para a PNP bovina (Mao *et al.*, 1998), segundo os mesmos autores o loop 59-69 é muito flexível é só está complemente ordenado na presença do fosfato. Na SmPNP este loop só é visível em uma subunidade realizando de contatos cristalinos, e portanto nas estruturas determinadas não participa da ligação ao fosfato, devido ao empacotamento cristalino.

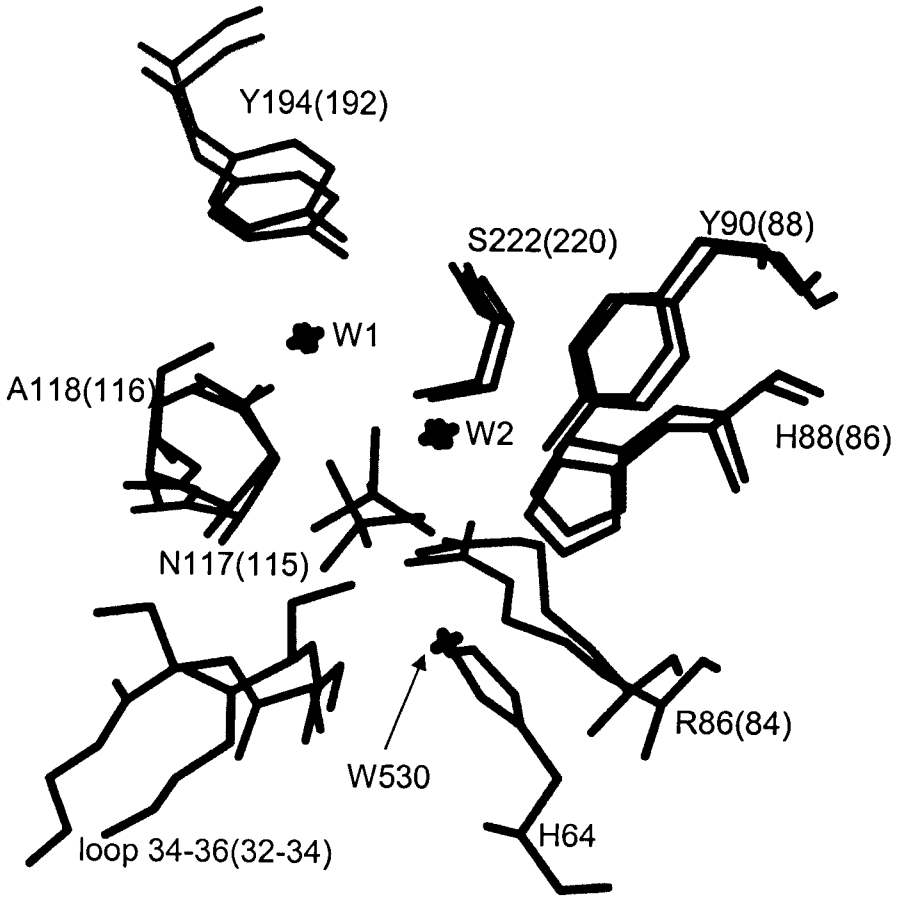


FIGURA 4.37. Sobreposição dos sítios de ligação ao fosfato da SmPNP (azul) e da boPNP (vermelho) (3pnp). As moléculas de água conservadas nas duas estruturas estão em W1: W116(301) e W102(302). Na figura e na legenda o primeiro número corresponde ao resíduo na SmPNP e o número entre parênteses ao correspondente na boPNP.

Uma grande diferença encontrada foi a total ausência de moléculas de água no sítio de ligação ao fosfato na estrutura da huPNP (1m73). Nas PNPs de *Cellulomonas* (1c3x) e de *Mycobacterium tuberculosis* (1g2o), e da boPNP (3pnp) quando sobrepostas a SmPNP apresentam uma molécula de água conservada no sítio de ligação ao fosfato (W1 na Figura 4.37 somente para a SmPNP e boPNP). Esta molécula de água medeia duas pontes de hidrogênio com o fosfato, uma com a hidroxila do resíduo Y194 (SmPNP) (Y192 na boPNP; Y180 em *M. tuberculosis* e Y195 em *Cellulomonas*) e a segunda com o oxigênio da cadeia principal da A118 (SmPNP) (A116 na boPNP; A120 em *M. tuberculosis* e G135 em *Cellulomonas*). A

conservação de uma molécula de água na PNPs de espécies tão diversas aponta para uma grande importância desta molécula de água na ligação entre o fosfato e a PNP.

Na Figura 4.38 é observada a sobreposição entre os sítios de ligação ao fosfato na SmPNP(em complexo com fosfato) e a PNP humana (em complexo com sulfato). Em geral a diferenças encontradas são muito semelhantes as descritas para a comparação da SmPNP com a boPNP.

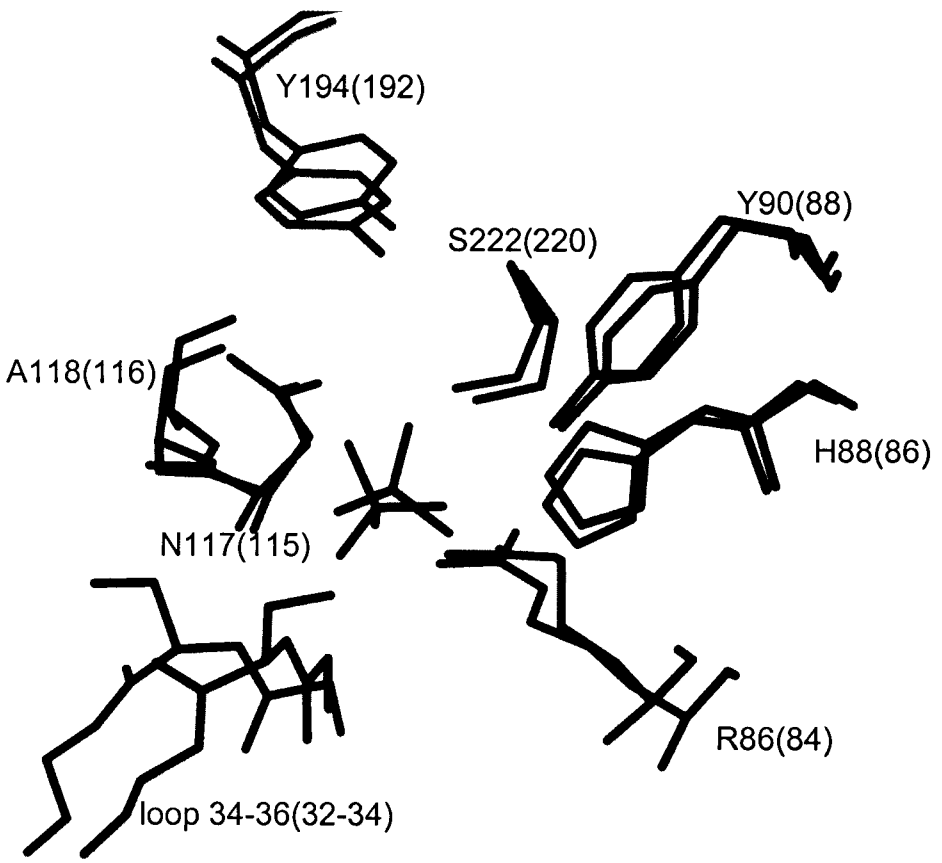


FIGURA 4.38. Sobreposição do sítio de ligação do fosfato da SmPNP (azul) e de huPNP (vermelho). Na Figura o primeiro número corresponde ao resíduo na SmPNP e segundo número ao correspondente na huPNP. Diferentemente da estrutura da boPNP, a huPNP, não possui nenhuma água no sítio de ligação com o fosfato.

Outra diferença encontrada quando comparadas as estruturas da huPNP e a boPNP foi a diferente orientação para o loop 59-69 o qual se liga ao fosfato via H64 na boPNP. Na huPNP este loop não permite a interação entre H64 e o fosfato.

Em geral mesmo com uma conservação total nos resíduos do sítio de ligação ao fosfato foram encontradas diferenças neste sítio para a SmPNP quando comparadas as PNPs humana e bovina.

Como conclusão geral temos que o sítio de ligação do fosfato é bastante variável em conformação apesar da total conservação da seqüência. Parece ser uma função complexa que varia de espécie para espécie e em função da presença ou não de ligantes. A importância de contatos cristalinos e eventual cooperatividade não estão ainda totalmente esclarecidos.

4.7.2.3.2 Comparação entre os sítios de ligação a base da SmPNP e as PNPs bovina e humana

Sobrepondo-se o sítio de ligação a base da SmPNP (forma apo a 1,9Å) contra a huPNP (1m73) podem ser observadas várias diferenças, como as substituições anteriormente descritas (Figuras 4.39 e 4.40), e diferentes rotâmeros para resíduos do sítio ativo bem como o posicionamento de moléculas de água no sítio de ligação a base.

Na Figura 4.39, é visualizado parte do sítio de ligação a base das SmPNP (azul) e da huPNP (vermelho). A cadeia principal dos resíduos 244-247 da SmPNP (242-245 na huPNP) encontra-se deslocada em relação a huPNP, principalmente com relação ao resíduo N246 (N244) (1,30Å para os Cα correspondentes).

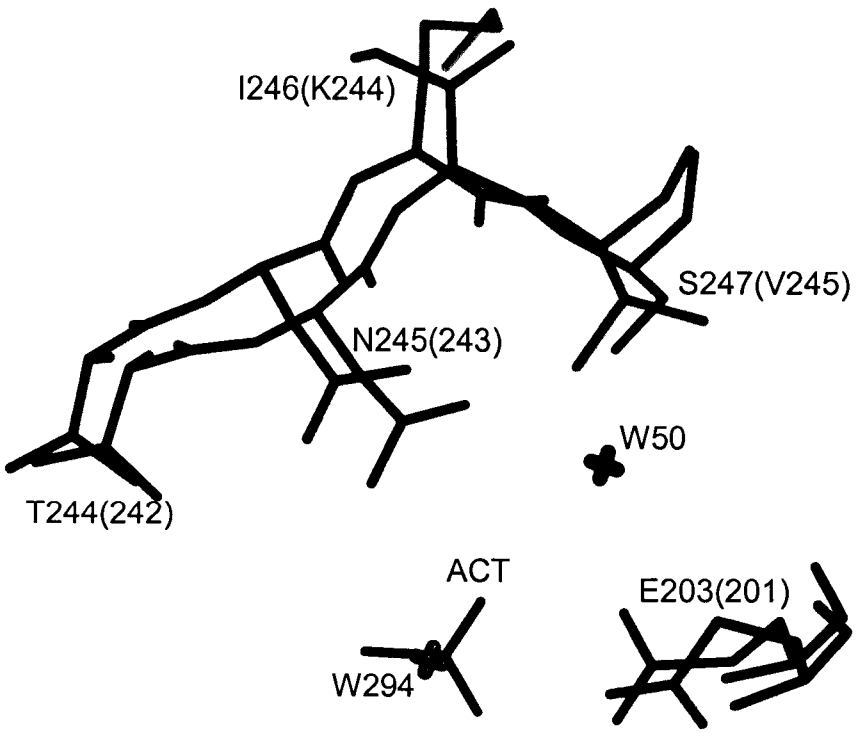


FIGURA 4.39. Sobreposição de parte do sítio de ligação a base da SmPNP (azul) e da huPNP (vermelho). As principais diferenças entre estes dois sítios são: as substituições I246K244 e S247V245; o deslocamento da cadeia principal dos resíduos 244-247 (242-245); os diferentes rotâmeros para o resíduo E203 (E201); o posicionamento das moléculas de água W50 (SmPNP) e W294 (huPNP), além da presença do acetato na SmPNP. Na Figura o primeiro número corresponde a numeração na SmPNP e o número entre parênteses a huPNP.

O resíduo E203 (201) possui rotâmeros diferentes: na SmPNP o E203 aponta em direção ao centro do sítio de ligação a base, enquanto que na huPNP o resíduo E201 aponta para fora do sítio ativo, diferentemente das PNPs bovina, de *Cellulomonas* e de *Mycobacterium tuberculosis*. No caso da SmPNP a presença do acetato poderia justificar esta diferença, porem parece improvável pois este ligante não esta presente nas outras estruturas. As cadeias laterais dos resíduos K244 e I246 apontam para fora do sítio de ligação a base como descrito anteriormente, mais uma vez suguerindo a não participação destes resíduos na ligação à base ou na catálise. A molécula de água W294 na huPNP ocupa a mesma posição do átomo de carbono central da molécula de acetato. Esta água segundo Azevedo Jr *et al.*, (2003), realiza uma ponte de hidrogênio com o átomo $O_{\varepsilon 2}$ do resíduo E201 (sendo a distância desta

ponte de hidrogênio longa, 3,44Å). A molécula de água W50 (da SmPNP) faz três pontes de hidrogênio com os resíduos E203, N245 e S247, mas não foi descrito no caso da huPNP, talvez devido a resolução em que a estrutura foi refinada.

Na Figura 4.40, pode-se observar parte do sítio de ligação a base, especialmente os resíduos Y202 (F200) e H259 (257) que não foram descritos na Figura 4.39. O resíduo Y202 da SmPNP possui uma orientação diferente do anel comparado ao resíduo F200 da huPNP. O resíduo H259 possui uma orientação completamente diferente quando comparado ao resíduo H257 da huPNP. Azevedo Jr *et al.*, (2003) relata que o resíduo H257 da estrutura da huPNP na forma apo (1m73) quando comparada a huPNP em complexo com guanina (1ulb) foi deslocado por uma distância considerável, pois o os resíduos 241-260 atuam como uma porta que se abre durante a ligação do substrato. No caso da SmPNP este loop (250-261) não possui densidade em uma subunidade, que é um indicio de flexibilidade, a qual seria coerente com a hipótese de movimento necessário para a entrada do substrato. Entretanto seria muito útil a obtenção da SmPNP em complexo com um nucleosídeo para verificar a movimentação deste loop em comparação com a estrutura sem ligantes.

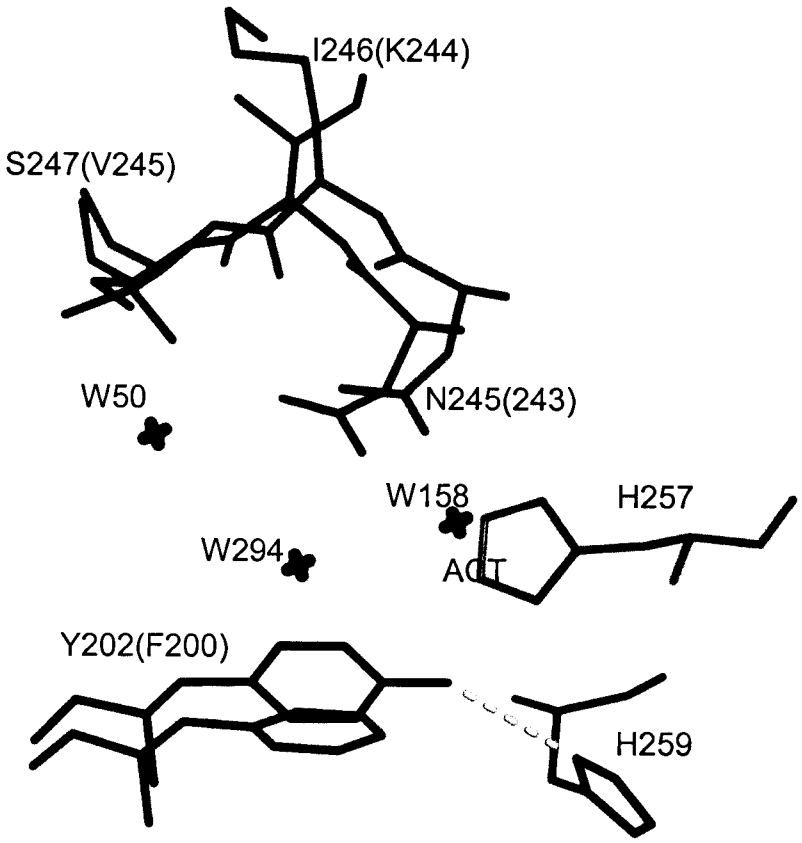


FIGURA 4.40. Sobreposição de parte do sítio de ligação a base da SmPNP (azul) e da huPNP (vermelho). Podem ser observadas as diferentes conformações para os resíduos Y202(F200) e especialmente para o resíduo H259(257). O resíduo Y202 realiza uma ponte de hidrogênio com H259.

Sobrepondo-se o sítio de ligação a base da SmPNP com a PNP bovina em complexo com hipoxantina (1a9r) (Figuras 4.41 e 4.42), pode ser observado que a SmPNP se assemelha mais a boPNP que a estrutura da huPNP, principalmente quando comparamos os resíduo E203(201) e H259(257). Na estrutura da SmPNP como na boPNP o resíduo E203(201) aponta para o centro do sítio ativo, mesmo quando a boPNP não possui ligantes no sítio de ligação a base.

O resíduo E203(201) em ambas as estruturas realiza uma ponte de hidrogênio com uma molécula de água (W50 na SmPNP e W401 na boPNP), sendo as distâncias 2,81Å e 2,86Å respectivamente. A molécula de água W401 (boPNP) ainda realiza uma ponte de hidrogênio com o átomo O6 da hipoxantina. Por sua vez a W50 (SmPNP) realiza mais duas pontes de hidrogênio, com os resíduos S247 e N245. A

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

substituição V245S247 permite que a molécula de água W50 se desloque na direção da cadeia lateral do resíduo S247 formando uma ponte de hidrogênio com este resíduo como também com N245. Na boPNP o resíduo V245 por sua característica hidrofóbica impede uma maior aproximação da molécula de água W401 e por conseguinte impede a formação da ponte de hidrogênio com o resíduo N243.

O resíduo N245 da SmPNP como na huPNP se encontra deslocado em relação ao resíduo N243 (1,03Å), mas interessantemente os resíduos K244 e I246 possuem quase uma sobreposição exata para os átomos $C\alpha$ e $C\beta$.

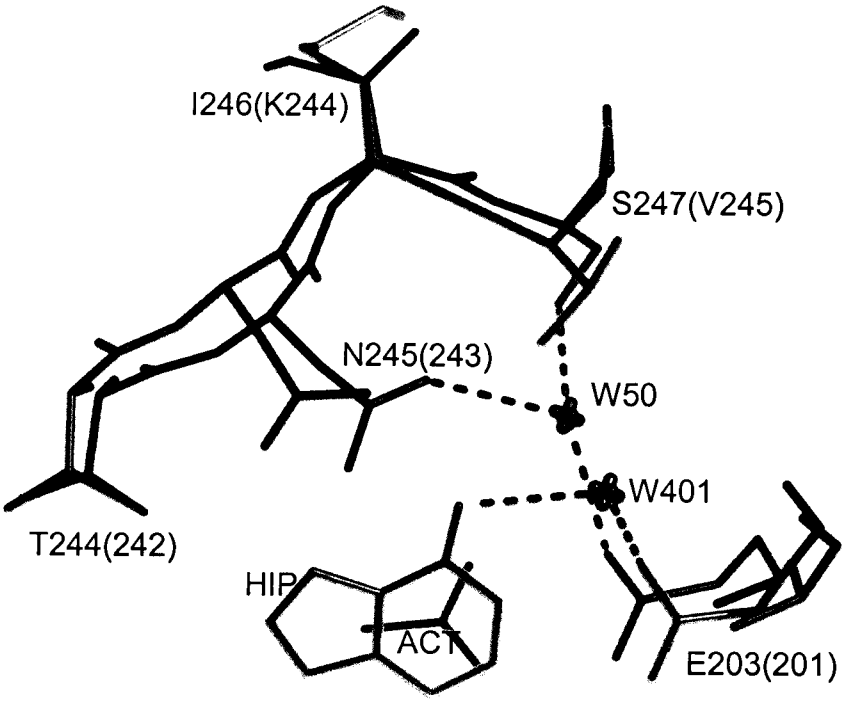


FIGURA 4.41. Sobreposição de parte do sítio de ligação a base da SmPNP (azul) e da boPNP em complexo com hipoxantina (vermelho). Em ambas as estruturas o resíduo E203(201) aponta para o centro do sítio ativo, e realiza pontes de hidrogênio com as moléculas de água W50 (SmPNP) e W401 (boPNP).

Na Figura 4.42 é observado parte do sítio de ligação a base especialmente os resíduos Y203(F200) e H259(257), quando comparado a Figura 4.40 observa-se mais uma vez a semelhança entre a SmPNP e a boPNP. Os resíduos Y203(F200) e H259(257) possuem essencialmente a mesma conformação, somente ocorre um

deslocamento entre os dois pares de resíduos (0,76Å para os Cα dos resíduos Y203 e F200 e 0,67Å para os Cα dos resíduos H259 e H257).

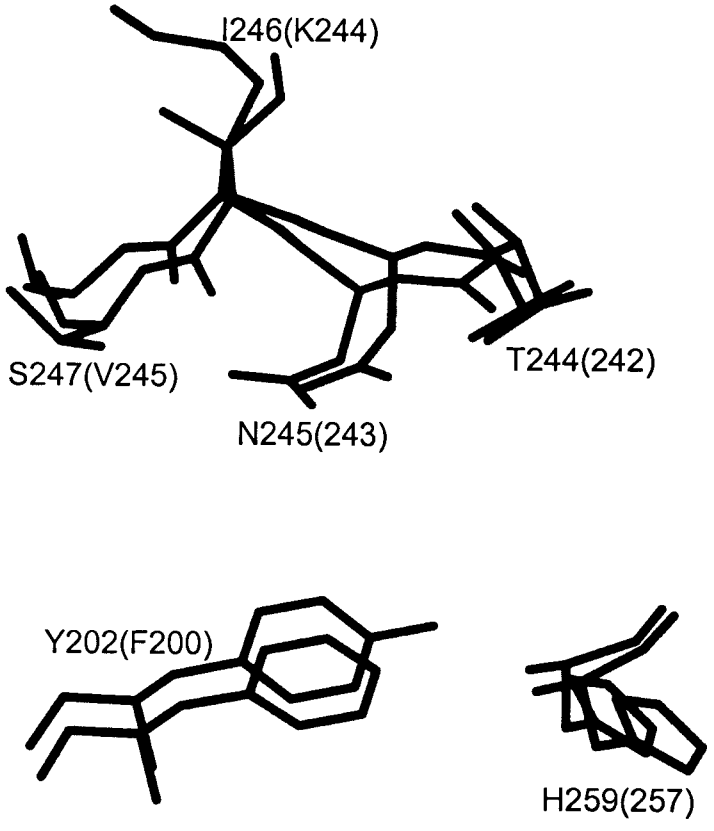


FIGURA 4.42. Sobreposição de parte do sítio de ligação a base da SmPNP (azul) e da boPNP (vermelho). As conformações dos resíduos Y202(F200) e H259(257) são bastante semelhantes.

4.8. Comparação entre as estruturas das SmPNPs

Foi realizada a sobreposição dos trímeros da SmPNP para o cálculo do desvio médio quadrático entre as estruturas. A estrutura da SmPNP em complexo com NDSB195 apresentou o maior desvio quando comparada a outras estruturas da SmPNP. A estrutura da SmPNP na forma apo apresentou o menor desvio médio quadrático (0,24Å) quando comparada com a estrutura da SmPNP em complexo com fosfato. O máximo do desvio entre duas estruturas da SmPNP foi de 0,55Å e o

mínimo de 0,24Å (Tabela 4.11). A estrutura da SmPNP em complexo com NDSB195 possui o maior desvio quando comparada as outras estruturas possivelmente devido a ligação do NDSB195 no sítio ativo.

TABELA 4.11. Desvio médio quadrático (em angstrons) para os Cα dos trímeros da SmPNP. NDSB corresponde a SmPNP em complexo com NDSB195; Apo 1,9Å a SmPNP na forma apo; Apo 2,75Å a SmPNP refinada a 2,75Å; PO_4 a SmPNP em complexo com fosfato e AT2169 a SmPNP em complexo com AT2169.

ESTRUTURA	Apo 1,9Å	Apo 2,75Å	PO_4	AT2169
NDSB	0,52Å	0,53Å	0,51Å	0,55Å
Apo 1,9Å		0,42Å	0,24Å	0,38Å
Apo 2,75 Å			0,37Å	0,41Å
PO_4				0,35Å
AT2169				

Comparando-se as estruturas da SmPNP em complexo com NDSB com a PNP na forma apo a 1.9 Å de resolução, especialmente a região do sítio ativo, foram observadas que as maiores diferenças encontradas estão relacionadas com a posição dos resíduos envolvidos nos sítios de ligação a ribose e ao fosfato. Com relação ao sítio de ligação a ribose a maior diferença entre as duas estruturas é a posição da cadeia lateral do resíduo M221, o qual realiza interação hidrofóbica com o NDSB195, como pode-se observar na Figura 4.43. Outras pequenas diferenças podem ser notadas no sítio de ligação a base, como diferentes conformações para os resíduos Y203 e N245. Na Figura 4.43 ainda pode ser observada a conservação no sítio ativo da SmPNP de 5 moléculas de água, em todas as estruturas resolvidas.

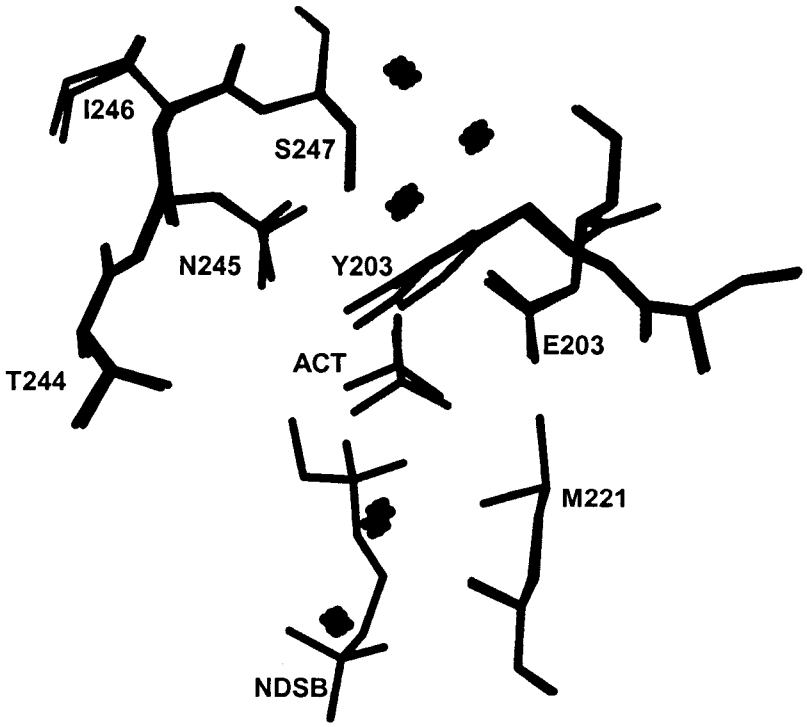


FIGURA 4.43. Sobreposição de parte do sítio ativo da SmPNP em complexo com NDSB195 (azul) e a SmPNP na forma apo a 1,9 Å de resolução (vermelho). Pode-se observar a diferença na cadeia lateral do resíduo M211 nas duas estruturas. Quando ligado ao NDSB195 e na ausência de um ligante no sítio de ligação a ribose. Podem ainda serem observadas as diferenças nas cadeias laterais dos resíduos N245 e Y203 nas duas estruturas.

Foram calculados os desvios médios quadráticos entre os monômeros de uma mesma estrutura os resultados podem ser vistos na Tabela 4.12.

TABELA 4.12. Valores para a sobreposição dos monômeros em cada estrutura da SmPNP.

Subunidade sobreposta	A - B	A - C	B - C
NDSB	0,45Å	0,55Å	0,32Å
Apo 1,9Å	0,46Å	0,37Å	0,50Å
Apo 2,75 Å	0,22Å	0,35Å	0,30Å
PO_4	0,45Å	0,35Å	0,48Å
AT2169	0,32Å	0,42Å	0,43Å

A SmPNP na forma apo a 2,75Å, obteve os menores valores para o desvio médio quadrático entre as subunidades quando comparado a outras estruturas da SmPNP. Estes valores menores para o desvio médio quadrático entre os monômeros certamente são resultado da utilização de restrições de simetria não cristalográficas durante o refinamento.

Mesmos com as diferenças observadas para os trímeros e os monômeros as estruturas são muito similares, provavelmente em função da grande área de contato entre as subunidade, as quais não se arranjam de maneira diferente em função da presença de ligantes. Desta forma as diferenças não são globais (reorientação das subunidades), mas locais envolvendo pequenas movimentos de cadeia principal e algumas cadeias laterais.

Outra diferença observada entre as estruturas da SmPNP no sítio de ligação a ribose é o deslocamento do resíduo H259 (Figura 4.44), (o qual na PNP bovina realiza uma ponte de hidrogênio com a ribose). Quando o sítio de ligação a ribose é ocupado pelo NDSB195, o deslocamento do Cα do resíduo H259 é de 1,63Å quando comparado a estrutura sem este ligante. O deslocamento da cadeia lateral deste mesmo resíduo é de 1,90Å. Na PNP bovina o máximo movimento no sítio ativo é relacionado com o resíduo H257 (H259 na SmPNP), o qual movimenta de 2 a 6Å, permitindo a formação de uma ponte de hidrôgenio com o O(5') da pentose (Mao *et al.*, 1998). Na Figura 4.44 pode-se observar este deslocamento do resíduo H259 na SmPNP em complexo com NDSB195 e na SmPNP na forma apo. Este resíduo pertence ao loop que serve de porta para a entrada do substrato no sítio ativo e freqüentemente é encontrado desordenado.

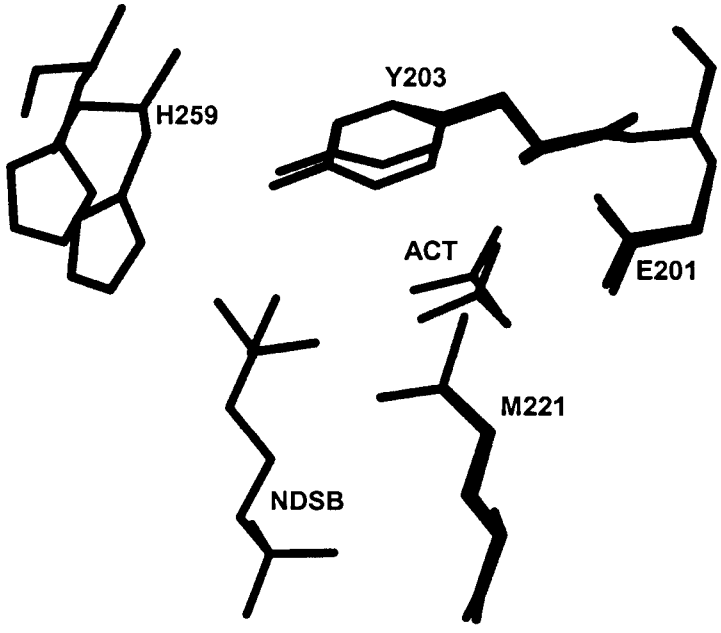


FIGURA 4.44. Sobreposição do sítio ativo da SmPNP em complexo com NDSB195 (azul) e a forma apo a 1,9Å de resolução (vermelho). Nesta figura pode ser observado o deslocamento do resíduo H259 na SmPNP em complexo com NDSB195 e sem este ligante. Este deslocamento ocorre a fim de ser possível acomodar o NDSB195.

Comparando-se o sítio de ligação a base da estrutura da SmPNP em complexo com AT2169 com as outras estruturas das SmPNPs, observa-se que houve um deslocamento da cadeia principal dos resíduos 244-247. Em termos quantitativos o deslocamento foi de 0,87Å para o Cα do resíduo T244, 1,1Å para o Cα do resíduo N245, e 0,47Å para o Cα do resíduo I246 e 0,32Å para o Cα do resíduo S247. A cadeia lateral do resíduo N245 deslocou-se ,16Å comparando-se os Cγ do resíduo N245, enquanto que a cadeia lateral do resíduo S247 manteve sua posição praticamente inalterada, assim como a molécula de água ancorada por este resíduo em todas as estruturas comparadas (Figura 4.45).

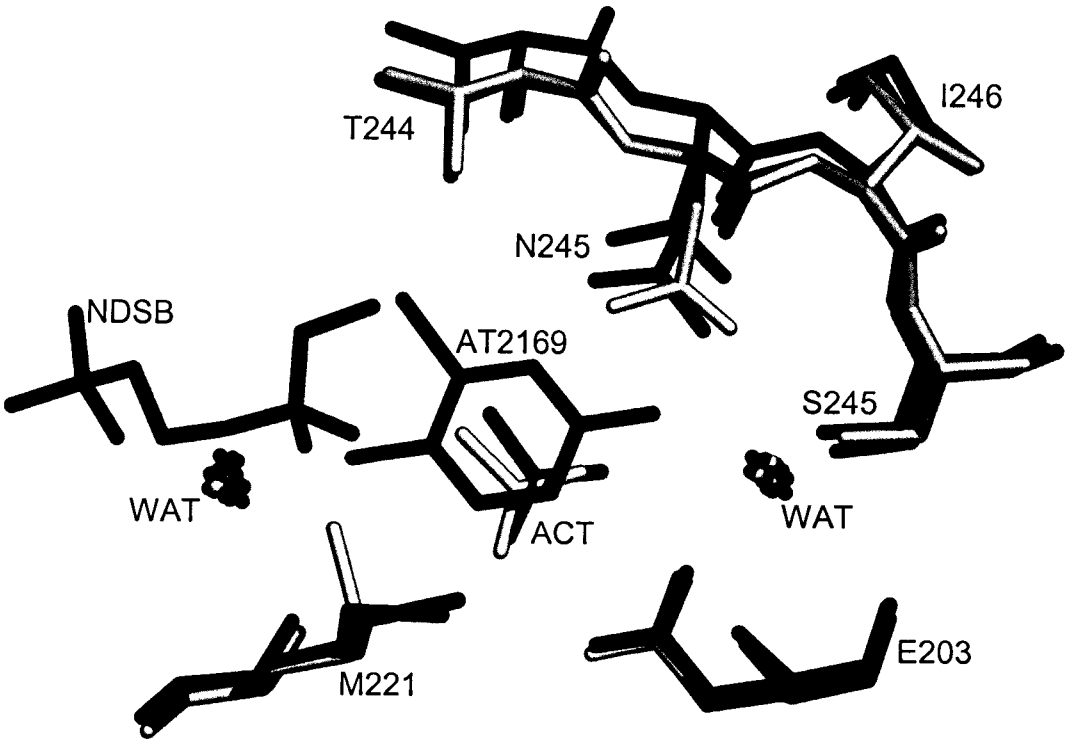


FIGURA 4.45. Sobreposição de parte do sítio ativo das estruturas da SmPNP em complexo com AT2169 (Azul), em complexo com NDSB195 (vermelho), e na forma apo (amarelo). Pode-se observar o deslocamento dos resíduos 244-246, possibilitando a ligação do composto AT2169. O maior deslocamento ocorre para o resíduo N245 e o menor para o S247. São visualizados dois conjuntos de moléculas de água conservadas em todas as estruturas. Não é observada a sobreposição da SmPNP em complexo com fosfato pois esta estrutura é muito semelhante à forma apo.

Interessantemente a posição do resíduo E203 manteve-se inalterada nas estruturas comparadas, este fato mais uma vez é um indicativo que devido a formação da ponte de hidrogênio com o resíduo N197 a posição da cadeia lateral de E203 é "travada" nesta conformação.

Comparando a estrutura da SmPNP em complexo com NDSB195 com a SmPNP em complexo com fosfato (Figura 4.46), foi possível observar na subunidade A um deslocamento do grupo sulfato do NDSB com relação ao fosfato. Também ocorre uma pequena modificação da posição das cadeias laterais dos resíduos R86, H88 e Y90.

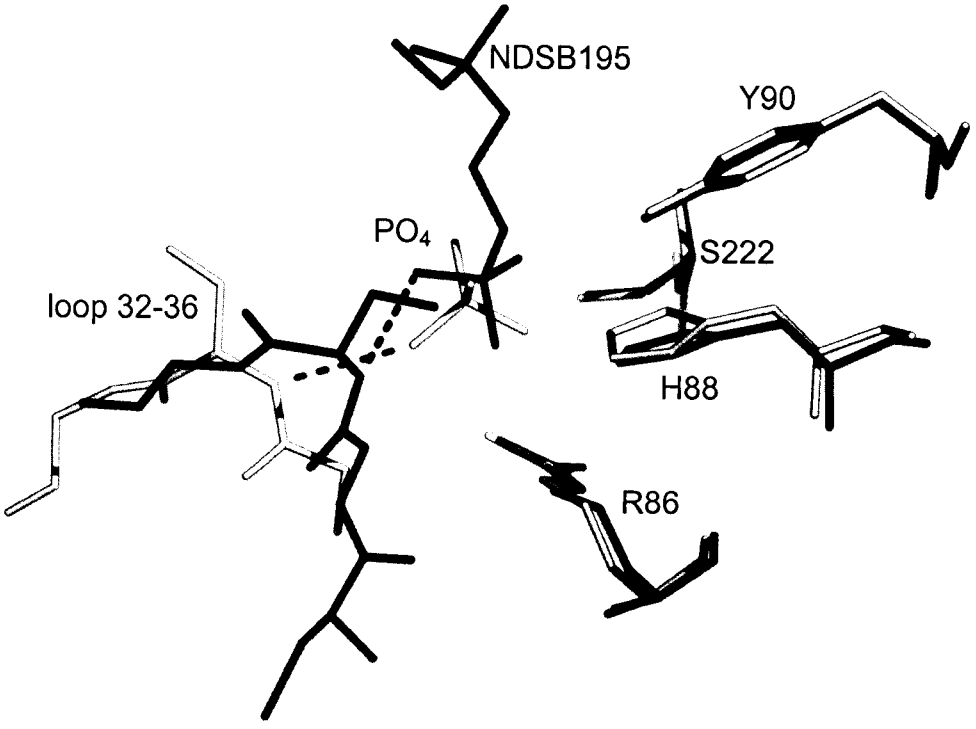


FIGURA 4.46. Sítio de ligação ao fosfato nas estruturas da SmPNP em complexo com NDSB195 (vermelho) e em complexo com fosfato (amarelo). O loop de ligação ao fosfato (resíduos 34-36) apresenta duas conformações diferentes nestas estruturas da SmPNP. Entretanto ainda ocorre a ponte de hidrogênio entre o S35 N e o grupo sulfato (do NDSB) ou com o fosfato.

O loop dos resíduos 34-36 encontra-se em duas conformações diferentes nas duas estruturas (Figura 4.46); na estrutura em complexo com NDSB195 ocorre uma ponte de hidrogênio entre o S35 N com o O3 do NDSB195, enquanto que na estrutura da SmPNP em complexo com fosfato mesmo possuindo um conformação diferente, realiza uma ponte de hidrogênio semelhante entre o átomo S35 N e o O2 do fosfato. Este fato indica que as duas conformações do loop 34-36 permitem uma interação satisfatória com o ligante (NDSB195 e PO_4). Nas subunidades B e C o loop 32-36 apresentam conformações semelhantes nas duas estruturas. Esta plasticidade conformacional permite que mesmo com conformações diferentes sejam mantidas as mesmas interações com o ligante.

Este fato vem contradizer Bzowska *et al.* (2000), que relata conformações deste loop como sendo dependente da ligação do fosfato, na SmPNP este loop assume duas conformações distintas na presença de NDSB195 e de fosfato, e mesmo nas estruturas sem ligantes no sítio de ligação ao fosfato, possui conformações diferentes para este loop (com exceção da estrutura em complexo com AT2169). Indicando que a determinação conformacional desta região provavelmente são o resultado da flexibilidade inerente e não uma conseqüência de um rearranjo em função da ligação do PO_4.

4.9. Comparação entras as estruturas da SmPNP e as PNP humana, bovina, de *Cellulomonas* e de *Mycobacterium tuberculosis*

Foram sobrepostas as estruturas da SmPNP contra a PNP humana (1m73), bovina (4pnp), de *Cellulomonas* (1c3x) e de *Mycobacterium tuberculosis* (1g2o), para o calculo do desvio médio quadrático entre as estruturas (Tabela 4.13). O valores mínimos e máximos para o desvio entre as estruturas são de 1,03Å e 1,46Å respectivamente, um valor relativamente baixo para a porcentagem de identidade entre as estruturas (49% para as PNPs humana e bovina e 34% para as PNPs de *Cellulomonas* e de *Mycobacterium tuberculosis*). Demostrando quão bem conservados são os trímeros das PNPs. Possivelmente devido a grande área de contato entre as subunidades.

TABELA 4.13. Valores para o desvio médio quadrático para as estruturas da SmPNP e da huPNP (1m73), boPNP (4pnp), de *Cellulomonas* (1c3x) e de *Mycobacterium tuberculosis* (1g2o).

	SmPNP NDSB 195	SmPNP Apo 1.9Å	SmPNP PO_4	SmPNP Apo 2.75Å	SmPNP AT2169
boPNP (4pnp)	1,24 Å	1,12Å	1,07Å	1,10Å	1,12Å
huPNP (1m73)	1,03 Å	1,13Å	1,08Å	1,26Å	1,14Å
Cellulomonas (1c3x)	1,34Å	1,33Å	1,27Å	1,40Å	1,32Å
M. Tuberculosis (1g2o)	1,30Å	1,35Å	1,32Å	1,29Å	1,46Å

A parte central da estrutura da PNP de baixa massa molecular é classificada segundo Hutchinson & Thornton (1996) como um barril misto de nove fitas, onde este barril é estruturalmente a parte mais conservada em todas as PNPs comparadas. Algumas diferenças podem ser encontradas nos elementos de estrutura secundárias quando comparamos a estrutura da SmPNP com a PNP humana e bovina, por exemplo a pequena fita antiparalela formando pelos resíduos 62-63 e 66-67 na SmPNP que não são encontradas nas PNP humana e bovina e a mudança de uma hélice de 3_{10} (resíduos 36-41 nas huPNP e bovPNP) para uma α-hélice (resíduos 38-42 na SmPNP), e a transformação de uma volta beta tipo IV na PNP bovina (resíduos 183-186) par uma hélice 3_{10} na SmPNP (resíduos 186-188).

4.10 Comparação entre as superfícies de potencial eletrostático da SmPNP e das PNPs bovina e humana

Enquanto que nas PNPs humana e bovina a distribuição dos resíduos carregados é bastante conservada, na SmPNP esta distribuição é bastante alterada.

Este fato pode ser observado no alinhamento entre a SmPNP e a PNP bovina (Figura 4.47). A SmPNP possui um maior número de resíduos carregados positivamente na superfície quando comparado a PNP bovina ou humana. Esta diferença de cargas é logicamente refletida no ponto isoelétrico (pI) destas proteínas: A SmPNP possui um pI de aproximadamente 6,85, a PNP bovina possui um pI em torno de 5,4 (Agarwal *et al.*, 1975). Este mesmo autor relata que a PNP humana é composta de uma mistura de variantes com uma faixa de pI de 5,85 a 6,25.

```
                  10        20        30        40        50        60
Smpnp     MHLSVTANILNVKKVAHHIQKLTSIVPLIGIICGSGLGKLALGVKDKITIPYTKIPNFPQ
BovPNP    MANGYT--YLLYQLTAKWLLSHTLQKPQVAVICGSGLGGLVNKLTQAQTFLYSLIPNFPL
Consrvd   *    *   *     *      *   *    ******* *        *  *  *****

                  70        80        90       100       110       120
Smpnp     TSVVGHSGNLIFGTLSGKKVVVMQGKFHMYLGYSNLTVALPIKVMLLLGVLILMVSNAAG
BovPNP    STVPGHAGKLVFGILNGKACVMMQGKFHMYLGYPFWKVTFPVKVFLLLGVLTLVVTNAAG
Consrvd     * ** * * ** * **  * ***********    *  * **  ****  * * ****

                 130       140       150       160       170       180
Smpnp     GLNKSLKLGLFVILKHIYLPGLGLNNILVGPNQLAFGTKFPALSNAYLLLLLAVQVA
BovPNP    GLNPNFKVGLIMLIRHINLPGFSGLNPLKGPNLKFGVKFPAMSLAYLLMLQLAHSTW
Consrvd   ***     **     *** ***    * * *** * ** **** * ***** *  *

                 190       200       210       220       230       240
Smpnp     KNGFGNLVHQGVYVMNGGPCYLTPALCTMLLNMGCLVVGMSTIPLVVIALHCGIQVFAV
BovPNP    KQMGLQKELQLGTYVMLGGPNFLTVALCKLLKNLGALAVGMSTVPLVIVALHCGLKVFGF
Consrvd     *       * *** ***  ** ***  * * * * ***** ***  *****  **

                 250       260       270       280       290
Smpnp     SLVTNISVLDVLSLLKPNHLLVLATGAQKALLMQSWFLKIIEKLPKD----
BovPNP    SLITNKVIMDTLSQGKANHLLVLLAGKQAAQKLLQFVSLLMASIPVSGHTG
Consrvd   ** **    * **  * ******  * * *
```

FIGURA 4.47- Alinhamento da seqüências das PNPs de *S. mansoni* e bovina. Neste alinhamento é visualizada a distribuição dos resíduos carregados. Os resíduos positivos são coloridos em azul e os negativos em vermelho. O sítio ativo está sublinhado e em amarelo tem-se os as duas diferenças do sítio ativo da SmPNP com relação a boPNP.

Utilizando-se o programa GRASP (Nicholls *et al.*, 1991), foram calculadas as superfícies de potencial eletrostático para a SmPNP, para a boPNP e para a huPNP, para um estudo das cargas nas superfície da proteína (Figuras 4.48, 4.49 e 4.50) A

SmPNP possui uma superfície muito mais básica quando comparadas a PNP humana ou bovina.

Não apenas ocorre uma mudança de cargas mas também ocorre uma diferença na distribuição das mesmas. Na SmPNP (Figura 4.48) as regiões mais carregadas positivamente (azul) são situadas próximas aos vértices da estrutura, enquanto que na boPNP (Figura 4.49) estão localizadas mais nas regiões centrais. Na huPNP (Figura 4.50) a distribuição é mais complexa.

A distribuição das cargas na proximidade do sítio de ligação ao fosfato merece um comentário. Na boPNP e huPNP esta região é carregada negativamente com exceção do ponto de ligação do fosfato, que é logicamente carregado positivamente, enquanto que a SmPNP possui esta região basicamente neutra (com exceção do ponto de ligação do fosfato, carregada positivamente). Este fato nos leva a especular que a ligação do fosfato se daria mais rapidamente na SmPNP, já que o fosfato não teria de "lutar" contra uma grande concentração de cargas negativas, o que poderia levar a uma maior eficiência catalítica, pois o passo limitante da reação fosforolítica da PNP é a clivagem da ligação glicosídica, e é sugerido que o fosfato ajuda a clivagem a clivagem provavelmente através da estabilização do TS e também agindo como nucleófilo na reação (Erion *et al.*, 1997), portanto uma maior velocidade na ligação do fosfato ajudaria a reação a ocorrer mais rapidamente.

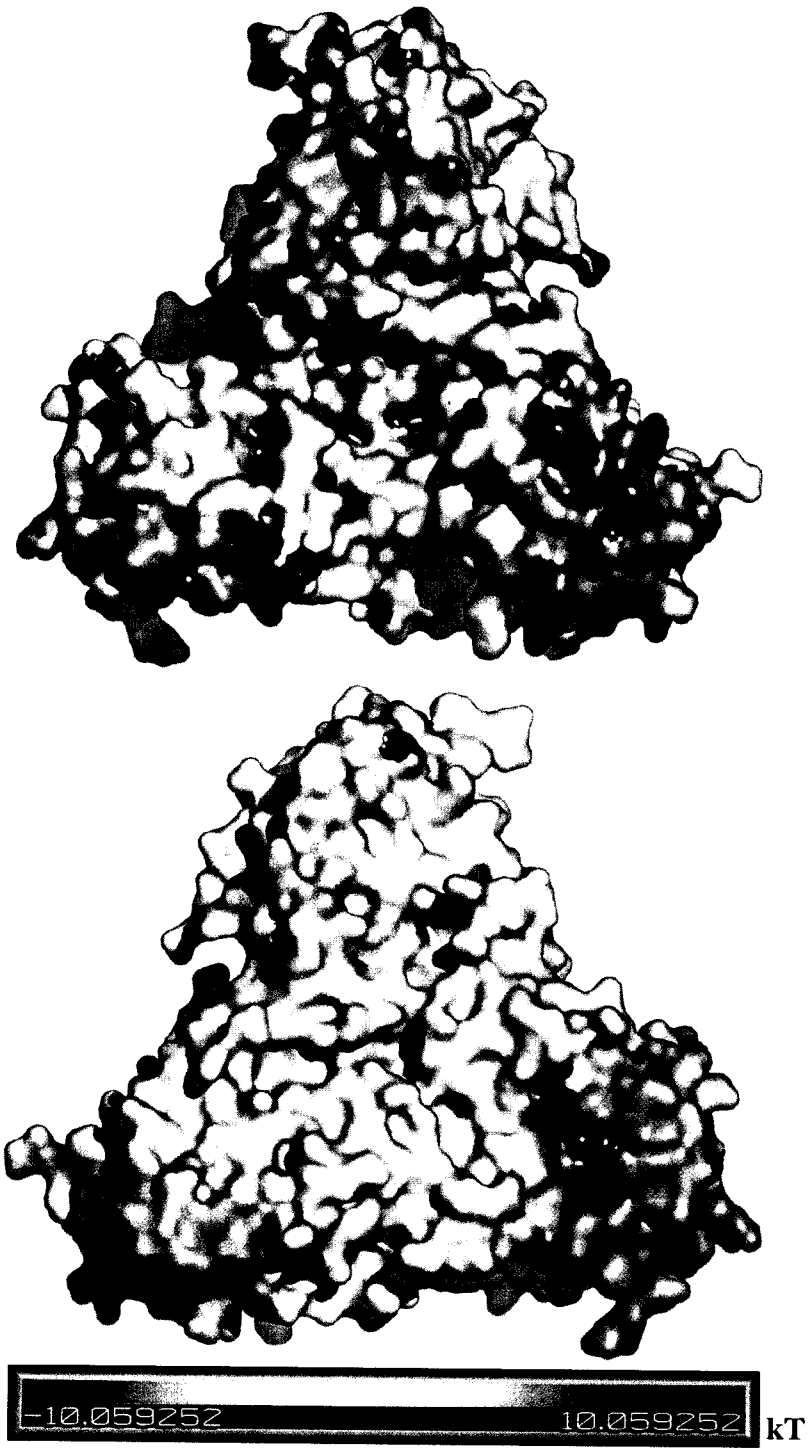


FIGURA 4.48. Superfície de potencial eletrostático para as duas faces da SmPNP (olhando ao longo do eixo de ordem três), calculado com o programa GRASP. Na sua maioria as cargas na superfície da SmPNP são positivas, diferentemente das huPNP e boPNP.

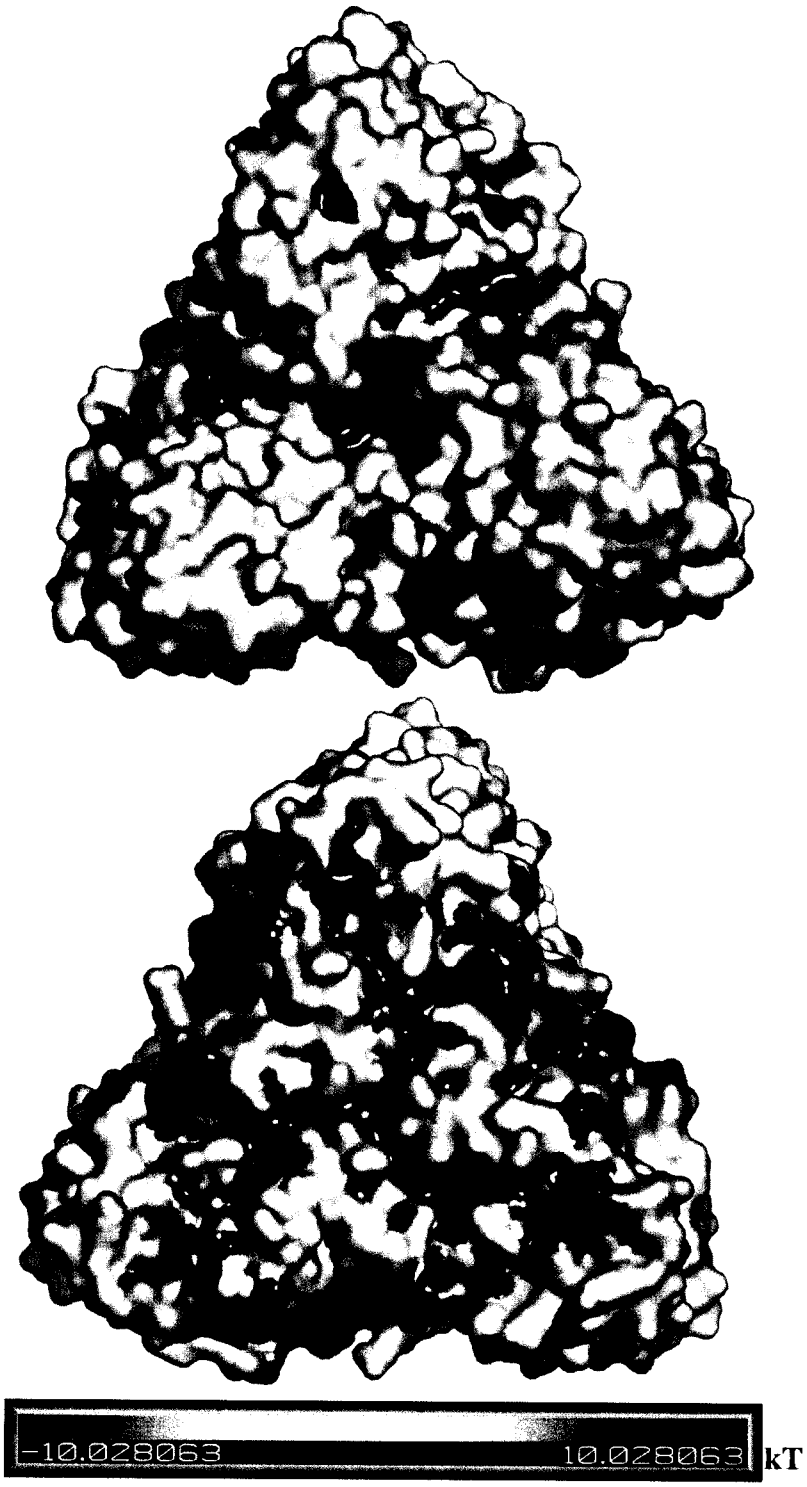


FIGURA 4.49. Superfície de potencial eletrostático para as duas faces da boPNP (olhando ao longo do eixo de ordem três), calculado com o programa GRASP. Na sua maioria as cargas na superfície da boPNP são negativas, e semelhante a huPNP.

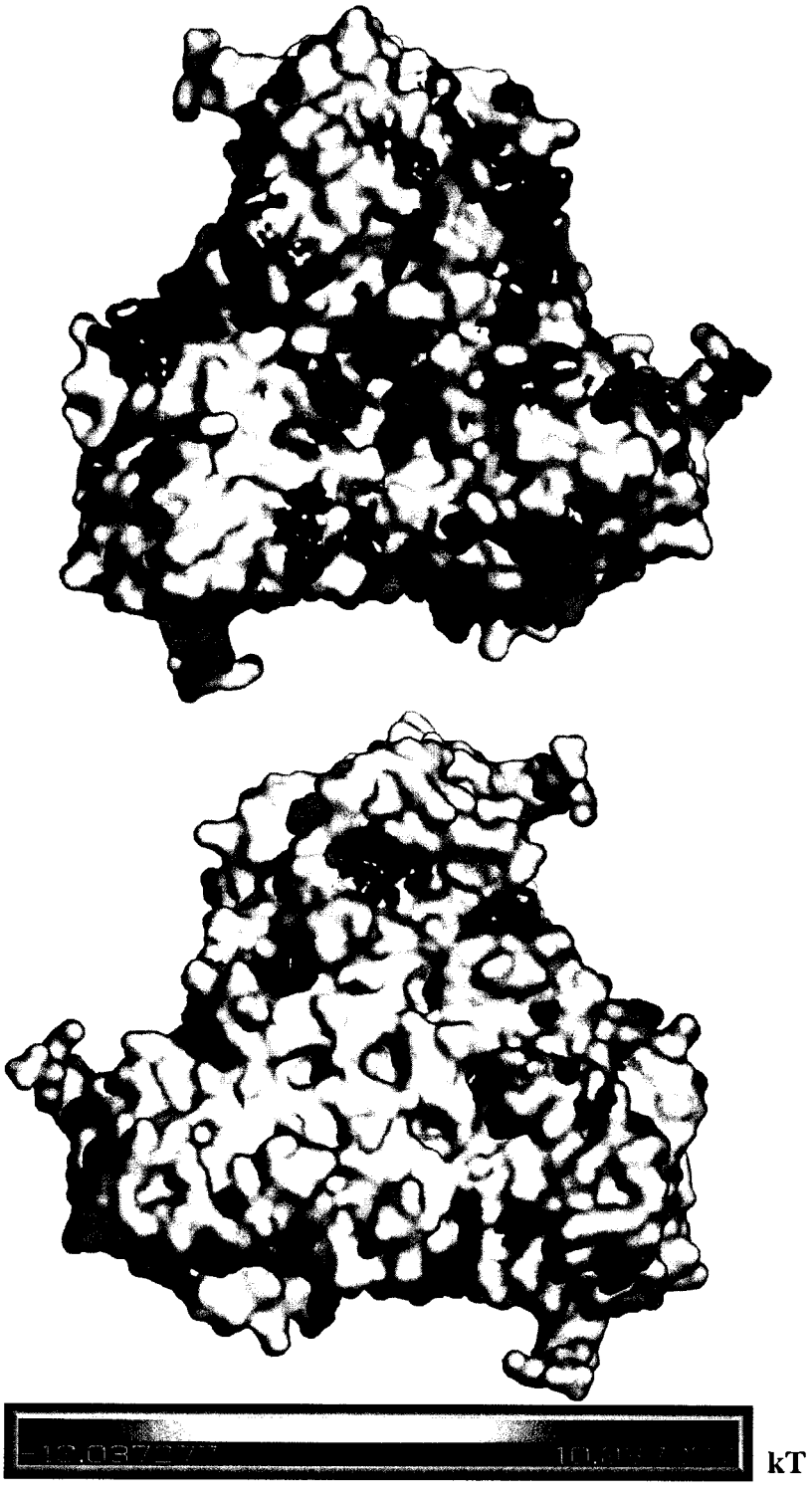


FIGURA 4.50. Superfície de potencial eletrostático para as duas faces da huPNP (olhando ao longo do eixo de ordem três), calculado com o programa GRASP. Na sua maioria as cargas na superfície da huPNP.

4.11. Cinética para a fosforólise de inosina para a SmPNP

Foi realizada a determinação das constantes catalíticas para a fosforólise de inosina pela SmPNP. Os valores obtidos foram de 3μM para o K_M e de 222 s^{-1} para o k_{cat}. O gráfico da cinética da SmPNP é visualizado na Figura 4.51.

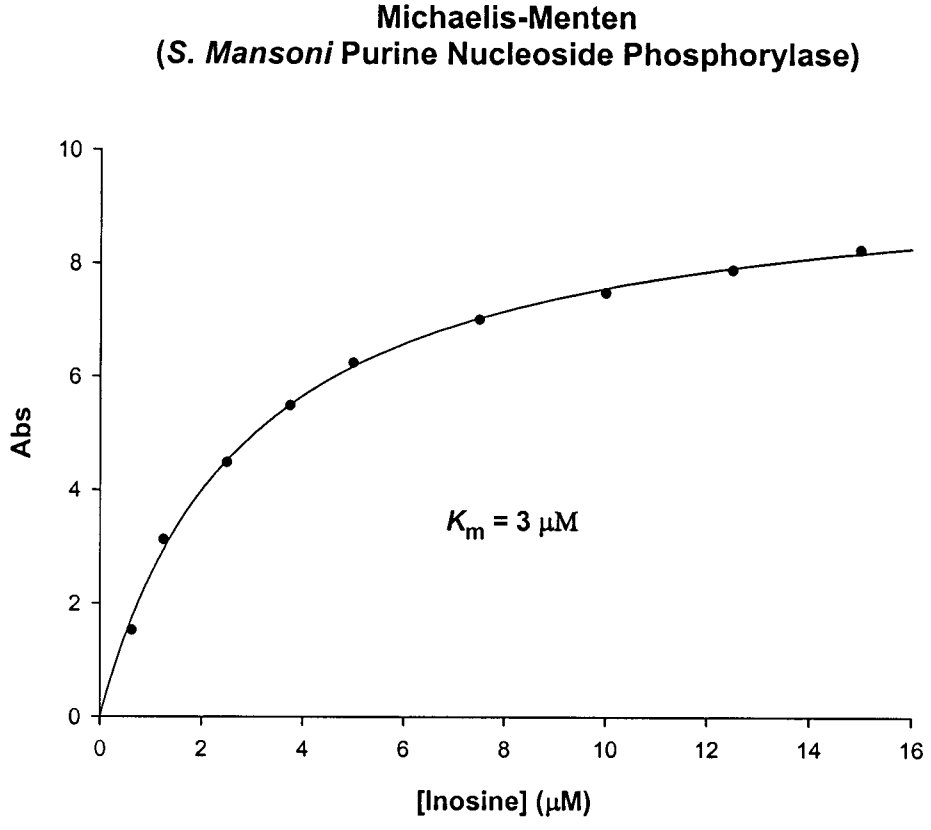


FIGURA 4.51. Gráfico de Michaelis-Meten para fosforólise de inosina pela SmPNP, a absorbância esta expressa em mU.

Quando compara-se os valores das constantes catalíticas para a SmPNP com dados da literatura para as PNPs humana (Stoeckler et al., 1997) e bovina (Bzowska et al., 1990) (Tabela 4.14), observa-se que a SmPNP possui um K_M 11 vezes menor que a bovPNP e 15 vezes menor que a huPNP. O valor do K_M para a SmPNP é o menor para uma PNP de baixo peso molecular já descrito. A SmPNP possui um k_{cat}

17 vezes maior que a boPNP e 3,8 vezes maior que a huPNP (Tabela 4.14), o que leva a maior eficiência catalítica (em média aproximadamente duas ordens de grandeza maior) quando comparada a huPNP e boPNP.

TABELA 4.14. Comparação dos valores das constantes catalíticas para SmPNP, boPNP e huPNP.

Enzima	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	kcat/K_M
SmPNP	3	222	$74x10^6$
boPNP	34	13	$0,38x10^6$
huPNP	45	57	$1,26x10^6$

Estes fatos levantam uma questão: qual seria a base estrutural para esta maior afinidade pela inosina encontrada para a SmPNP? Acreditamos que a resposta desta questão passa unicamente pelo sítio de ligação a base pois os outros dois subsítios são completamente conservados. Infelizmente não possuímos o complexo SmPNP-inosina, o qual nos auxiliaria no entendimento desta maior afinidade. ,

4.12. Ensaios de atividade com a SmPNP

4.12.1. Ensaios de atividade da SmPNP com os compostos oriundos do Virtual Screening contra a bovPNP

A partir do VS para compostos que se ligassem a boPNP, 19 compostos foram selecionados para ensaios de atividade para a SmPNP. Destes apenas seis se

mostraram capazes de inibir a SmPNP sob as condições do ensaio descrito no Materiais e Métodos (Tabela 4.15).

TABELA 4.15. Compostos selecionados e porcentagem inibição para a SmPNP.

Composto	% de inibição
AT2169	98,32
AT2172	96,19
AT2183	76,8
AT2167	28,83
AT2175	10,81
AT601	8,75

Todos estes compostos foram utilizados em experimentos de soaking, vários conjuntos de dados foram coletados nos ESRF e no SRS, e foi obtido um complexo entre a SmPNP e o composto AT2169.

4.12.2. Ensaios de atividade da SmPNP com os compostos oriundos do VS contra a SmPNP

22 compostos foram selecionados a partir do VS para a SmPNP. Os compostos foram ensaiados contra a SmPNP para verificar sua capacidade de inibir a enzima, sob as condições do ensaio descrito no Materiais e Métodos. Na Tabela 4.16 estão apresentados melhores os resultados deste ensaios de inibição expressos em porcentagem de inibição da enzima SmPNP.

TABELA 4.16. Resultado para os melhores ensaios de atividade da SmPNP usando os compostos selecionados no VS para a SmPNP.

Número AT	% de inibição
AT2328	100
AT2324	79,57
AT986	70,96
AT2326	70,66
AT2333	55,35

Cinco compostos se mostraram ativos contra a SmPNP e foram utilizados nos experimentos de soaking, com cristais da SmPNP, vários conjuntos de dados foram coletados e infelizemente nenhum complexo foi obtido até o momento. Nenhum destes compostos são análogos de purina ou base de purina, alguns destes compostos são anéis simples, outros são de estrutura aberta, possuindo um boa diversidade química.

A utilização de virtual screening é uma ferramenta poderosa na obtenção de novos ligantes, no caso da PNP, todos os compostos que mostraram ativos contra a enzima nunca foram descritos anteriormente com inibidores das PNPs. Alem disto, a utilização de soaking e de cristalografia de proteínas em larga escala permitiram a obtenção do primeiro complexo entre a SmPNP e o AT2169. Esperamos que num futuro próximo consigamos obter outros complexos entre a SmPNP e os compostos escolhidos por VS e por ensaios de atividade.

Com a experiência adquirida durante o estágio na Astex, pudemos idealizar e montar um "cluster" Linux para a realização de virtual screening no Grupo de Cristalografia. Este cluster está permitindo a realização da técnica de virtual screening (utilizando o programa GOLD), para diversos alvos protéicos, com excelentes resultados, faltando ainda a comprovação da atividade dos compostos selecionados por ensaios de atividade com as proteínas alvo.

4.12.3. Determinação do IC50 para os compostos formicina B, 6-mercaptoguanosina e tubercidina.

Foram determinados os IC50 para os compostos Formicina B, 6-mercaptoguanosina e tubercidina. Estes compostos foram ensaiados devido ao fato de Senft & Crabtree., (1983), terem descritos estes compostos como capazes de inibir a SmPNP, e especialmente a tubercidina, a qual já foi utilizada experimentalmente como um droga contra a esquistosomose . Os valores de IC50 para estes compostos são: 47μM para a formicina-B, 95μM para 6-mercaptoguanosina e 131μM para tubercidina.

Nenhum destes compostos possui um ótima inibição da SmPNP, a tubercidina apresentou o pior IC50, provavelmente pelo fato da tubercidina ser uma análogo de adenosina, a qual não é um bom ligante para as PNPs de baixa massa molecular como a SmPNP. Foi tentado a obtenção de um complexo entre a SmPNP e estes compostos, e em nenhum experimento foi obtido um complexo, o que pode ser reflexo da baixa capacidade inibitória destes compostos.

Com relação ao IC50 para os compostos selecionados por VS temos no momento apenas o valor de IC50 para o composto AT2328 o qual a 100μM inibiu completamente a SmPNP como descrito anteriormente. O valor de IC50 para o composto AT2328 é de 5μM, apesar deste composto de não ser um análogo de purina, possui uma ótima inibição da SmPNP, com um IC50 na ordem de grandeza do K_M obtido para a inosina. Este resultado demonstra a capacidade do VS em encontrar inibidores para a SmPNP, com um valor de inibição melhor de que para inibidores da SmPNP já descritoss. Este foi o primeiro valor de IC50 determinada para um dos compostos obtidos na ASTEX Technology, alem do fato destes

compostos nunca terem sido descritos como inibidores das PNPs. Devido ao contrato de confidencialidade com a ASTEX não podemos descrever as estruturas destes inibidores. Os valores de IC50 para os outros compostos oriundos do VS estão sendo realizados e serão finalizados em breve.

4.13. Simulações de docking com a SmPNP utilizando o programa GOLD

Para contornar em parte a ausência de um complexo entre a SmPNP e um nucleosídeo ou base de purina, foi realizada uma série de experimentos de docking com o programa GOLD, utilizando as estruturas da SmPNP em complexo com NDSB195 (subunidade C), na forma apo a 1,9Å (subunidade A) e com o complexo com AT2169 (subunidade B) (Todos os ligantes foram retirados para a realização do VS). Foram utilizados neste docking os seguintes compostos: inosina, hipoxantina, formicina B, guanosina, guanina, immucilinas H e G. Os valore do goldscore para estes compostos estão nas Tabela 4.17 abaixo.

TABELA 4.17. Valores do goldscore para substratos e inibidores da SmPNP

Composto	SmPNP NDSB195	Apo 1,9Å	SMPNP AT2169
Inosina	74,99	81,40	70,38
Hipoxantina	32,99	34,33	30,57
Guanosina	84,14	89,65	75,03
Guanina	40,49	34,03	36,91
Formicina B	75,08	81,24	69,07
Immucilina H	78,08	83,30	75,75
Immucilina G	85,05	91,24	76,45

Os menores valores do goldscore e geral para a estrutura da SmPNP em complexo com AT2169 pode ser reflexo da ausência nesta estrutura do resíduo H259, o qual interage com o O5' da ribose. De maneira geral o programa GOLD previu com grande precisão o posicionamento dos nucleosídeos e seus análogos no sítio ativo da SmPNP, quando comparado as estruturas dos complexos equivalentes da boPNP.

O resultado do docking da SmPNP (apo a 1,9Å) com inosina é visualizado na Figura 4.52, não foi observado nenhuma interação da molécula de água W50 com a inosina, e por isto a mesma bem como o resíduo S247 não são visualizados nesta Figura.

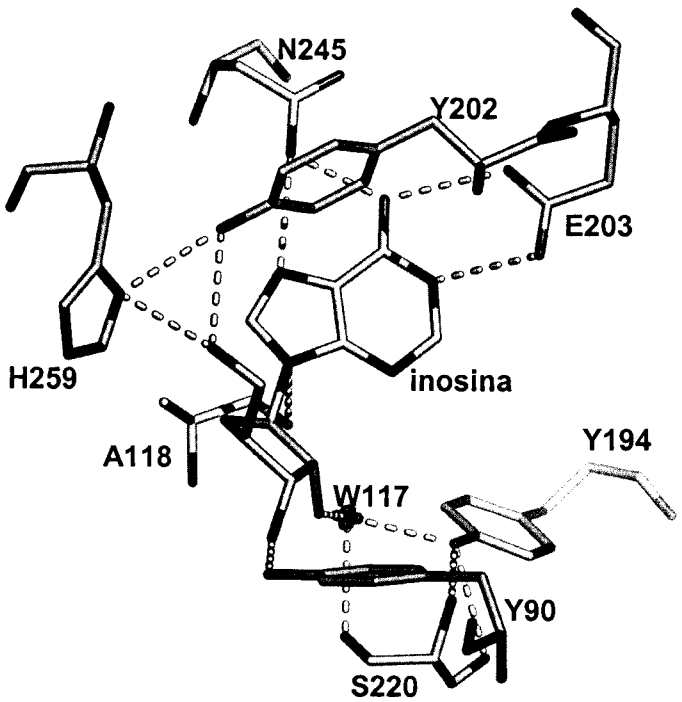


FIGURA 4.52. Complexo entre a SmPNP e inosina, obtido através do programa GOLD.

Como no docking com outros nucleosídeos e seus análogos, é possível visualizar a ponte de hidrogênio entre o OH do resíduo Y202 da SmPNP e o O5' da ribose, como também a ponte de hidrogênio entre os átomos Y202 OH e o átomo $N_{\delta 1}$ do resíduo H259. Diferentemente da boPNP em complexo com inosina (1a9s) é visualizada neste complexo uma ponte de hidrogênio entre os átomos A118 O e INO N9 (3,05Å na SmPNP; 3,39Å na boPNP). O complexo hipotético SmPNP inosina realiza ao todo 9 pontes de hidrogênio, três a mais que o complexo boPNP inosina (1a9s), o que pode explicar o menor K_M para inosina da SmPNP. A molécula de água W117 interage diretamente com a ribose, e é ancorada pelos resíduos A118, S220 e Y194. Quando comparada a outras estruturas de PNPs, como descrito anteriormente, a posição desta molécula de água é conservada, apontando a grande importância desta água e de sua interação com a ribose. Esta molécula de água também interage com o fosfato o que pode auxiliar no correto posicionamento dos substratos no sítio ativo da SmPNP.

Na Figura 4.53 pode-se visualizar a comparação entre o modo de ligação da inosina na SmPNP (azul) com o complexo boPNP-inosina (1a9s) (vermelho). Basicamente a orientação da inosina é mantida nas duas estruturas, sendo que há um pequeno deslocamento no posicionamento da base.

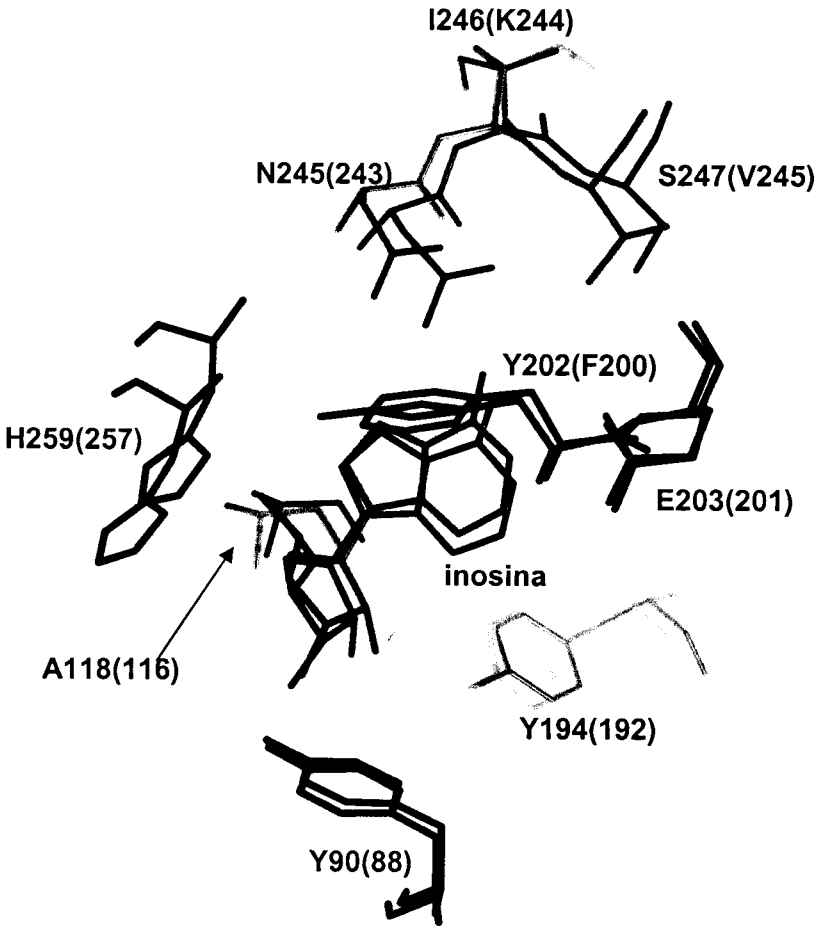


FIGURA 4.53. Comparação do modo de ligação da inosina na SmPNP(azul) (docking) e na boPNP (vermelho) (cristalográfico). A inosina liga-se de modo similar nas duas estruturas, o que valida este experimento de docking.

O complexo hipotético entre a hipoxantina e a SmPNP é visualizado na Figura 4.54, onde pode-se novamente observar a ponte de hidrogênio ente os átomos A118 O e INO N9 (2,73Å na SmPNP; 3,63Å na boPNP). Na Figura 4.54 também é observado que a molécula de água W50 bem como o resíduo S247 não participam da interação com a base de hipoxantina.

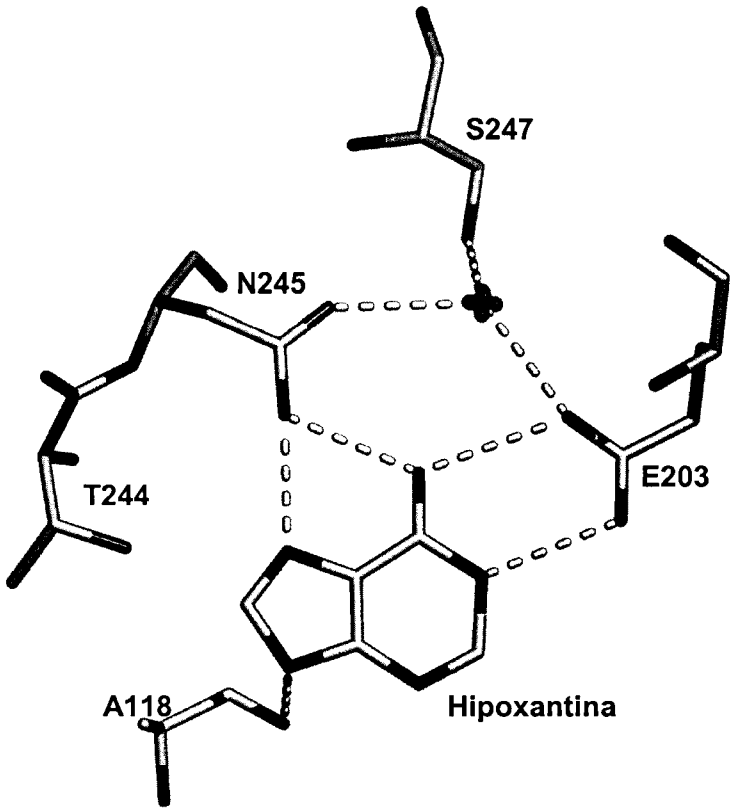


FIGURA 4.54. Complexo entre a SmPNP e a base de hipoxantina, obtido através do programa GOLD.

Na figura 4.55 observa-se a comparação entre o modo de ligação da hipoxanina na SmPNP (azul) e na boPNP (vermelho) (1a9q). Em comparação ao complexo da boPNP a hipoxantina da SmPNP está deslocada, este deslocamento deve-se ao posicionamento mais interno no sítio ativo do resíduo N245, entretanto as mesmas interação com os resíduos E203/201 e N245/243 são mantidas nas duas estruturas.

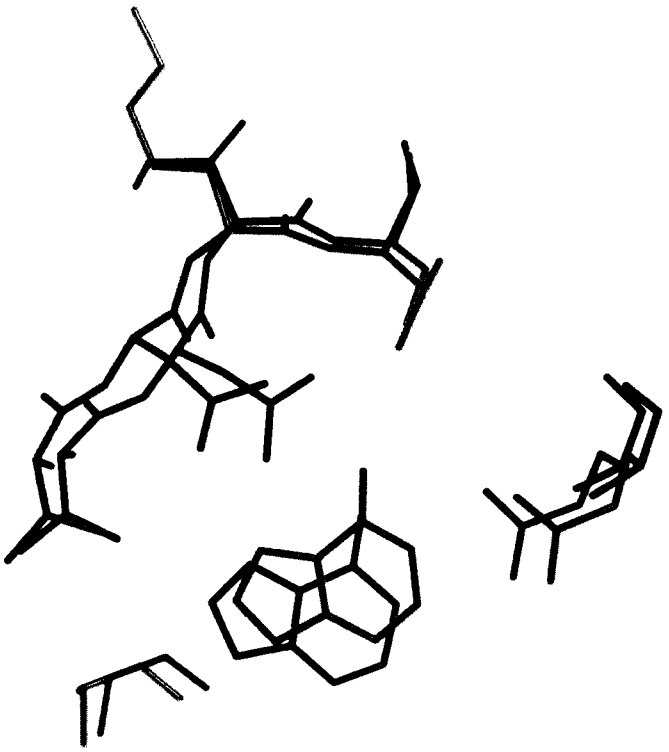


FIGURA 4.55. Comparação do modo de ligação da hipoxantina na SmPNP (azul) e na boPNP (vermelho) (1a9q), quando comparada ao complexo da boPNP, a hipoxantina na smPNP encontra-se deslocada, entretanto são mantidas as mesmas interações nas duas estruturas.

A guanosina obteve um dos maiores goldscore, isto é devido a presença do grupo amina na posição 3, a qual permite a realização de mais uma ponte de hidrogênio com o aminoácido E203 (Figura 4.56). As interações de ponte de hidrogênio são muito semelhantes quando comparadas às do complexo SmPNP inosina, com exceção das pontes de hidrogênio formadas pelo resíduo E203 e a guanosina. O E203 não mais interage com o O6 da base como no caso da inosina e sim com duas pontes de hidrogênio com o átomo N1 e uma com o N2, como visualizado na Figura 4.56

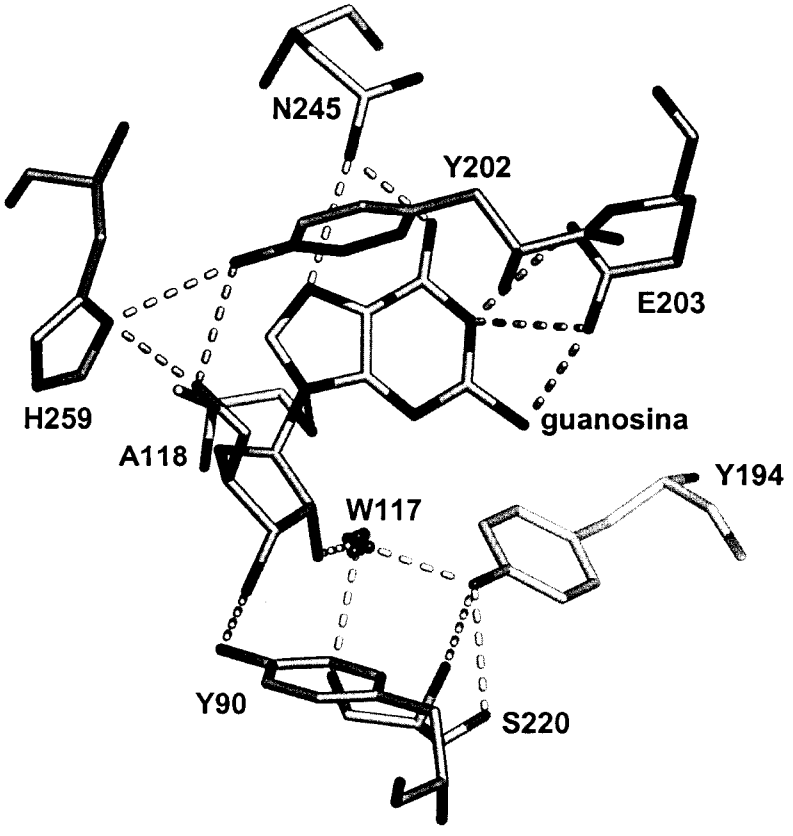


FIGURA 4.56. Complexo entre a SmPNP e guanosina, obtido através do programa GOLD.

O modo de interação entre a SmPNP e os análogos de transição immucilina-H e immucilina-G é similar a interação entre a SmPNP e a inosina e guanosina, compo tambem aos complexos cristalogáficos entre estes compostos e a boPNP (estruturas 1b8n e 1b8o). Na Figura 4.57, são visualizados o modo de interação entre a immucilina-G e a SmPNP (A) e entre a SmPNP e a immucilina-H (B).

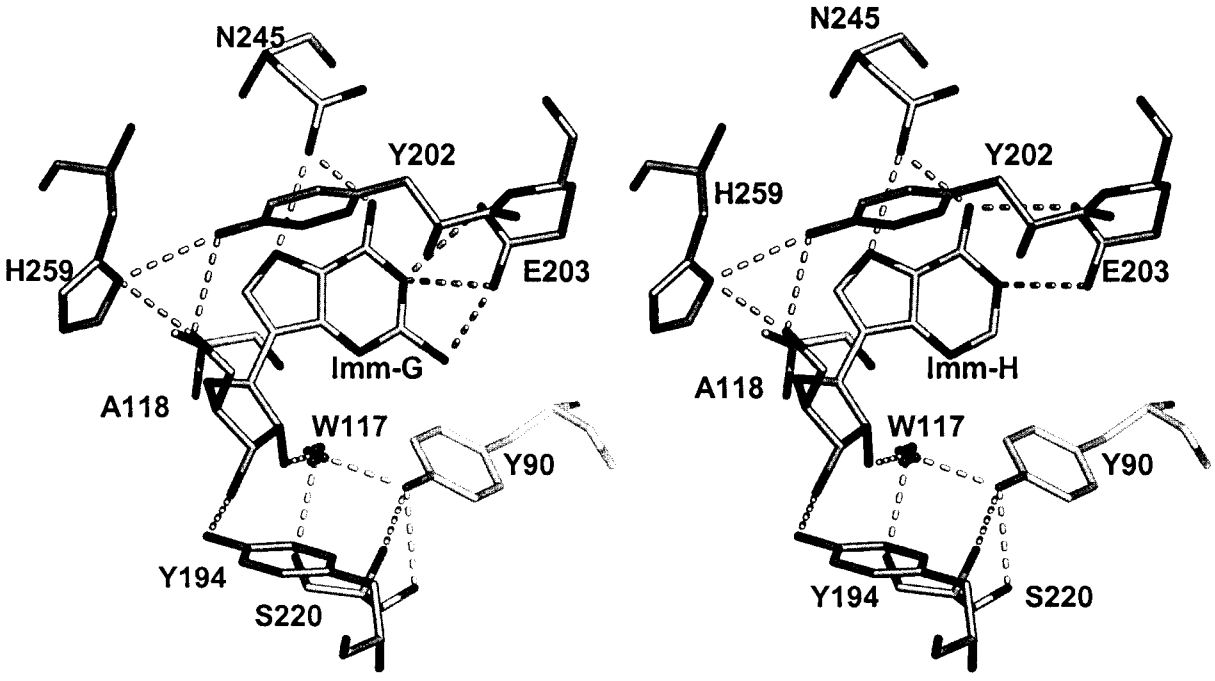


FIGURA 4.57. Complexo entre a SmPNP e immucinlina-G (A) e immucilina-H (B). O modo de ligação destes composto e bastante similar, entretanto a imm-g como realiza mais uma ponte de hidrogênio com o E203.

Os resultados gerados pelo programa GOLD ajudaram a contornar a ausência da SmPNP em complexo com uma base e/ou nucleosídeo de purina. Como as descrições das interações nos sítios de ligação a base e ao fosfato da SmPNP puderam ser descritas devido a presença de um ligante nestes sítios, as interações no sítio de ligação a ribose não foram descritas, devido a ausência de um ligante neste sítio.

O sítio de ligação a ribose como anteriormente descrito é praticamente conservado em termos da seqüência (com exceção da substituição F200Y202). A ribose é ancorada por pontes de hidrogênio realizadas entre os átomos Y90 OH - O3' , W117 - O2' (a molécula de água W117é ancorada pelos resíduos A118, Y194 e S222), o átomo O5' realiza duas pontes de hidrogênio com os átomos Y202 OH e H259 $N_{\delta 1}$. A substituição F200Y202 permite a realização de uma ponte de hidrogênio com o ribose e pode ser um dos principais responsáveis pelo menor K_M

para inosina quando comparada a boPNP ou a huPNP. Entretanto a confirmação desta interação necessita aguardar a obtenção de um complexo entre a SmPNP e nucleosídeo/analogo de purina.

A utilização do GOLD para a realização dos experimentos de docking se mostrou (no caso da SmPNP) muito confiável, com a predição do modo de ligação dos compostos testados de maneira muito similar as estruturas cristalográficas entre a boPNP e os mesmos compostos, alem disto, a utilização de estruturas e subunidades diferentes da SmPNP em três experimentos docking levaram ao mesmo resultado, validando a utilização desta ferramenta, além disto estes estudos foram importantes para validar a abordagem de docking utilizada pelo programa GOLD, o qual foi empregado na descoberta de novos ligantes.

5. CONCLUSÕES

Foram apresentados nesta tese todos os procedimentos experimentais de produção e purificação da enzima SmPNP recombinante, bem como as condições experimentais de cristalização da SmPNP. De posse dos cristais foi obtido a primeira estrutura da SmPNP a 2,75 Å de resolução no LNLS, a qual foi resolvida empregando o método da substituição molecular (MR) utilizando a boPNP trimérica como modelo de busca. A utilização do aditivo NDSB195 levou a um grande aumento no tamanho dos cristais da SmPNP, e foi obtida a estrutura do complexo SmPNP - NDSB195 a 1,75Å de resolução no ESRF. A estrutura foi resolvida por MR utilizando a estrutura da SmPNP a 2,75Å como modelo de busca. Utilizando esta estrutura foi realizado um virtual screening para a descoberta de compostos que se ligassem a SmPNP. Dos compostos selecionados foi obtida a estrutura do complexo SmPNP - AT2169 a 1,9 no SRS. Também foram obtidas a estrutura da SmPNP na forma apo a 1,9Å no SRS e em complexo com fosfato a 2,0Å utilizando uma fonte de raios X de ânodo rotatório.

De posse destas estruturas foi possível realizar uma comparação das diferenças entre a SmPNP e as PNPs bovina, humana, de *Cellulomonas* e de *Micobacterium tuberculosis*, especialmente discutindo as diferenças encontradas no sítio ativo quando comparada a PNP bovina ou humana, alem de algumas

características únicas encontrada na estrutura da SmPNP, como o grupamento de metioninas no centro da estrutura.

Foram determinadas as constantes catalíticas para a SmPNP, a qual possui um K_M de cerca de 3μM para a fosforólise de inosina e um valor de 222 s^{-1} para o k_{cat}. Quando comparada com dados da literatura para as PNPs humana e bovina a SmPNP possui um menor K_M e um maior k_{cat}, possuindo também uma maior eficiência catalítica.

A abordagem de descoberta de ligantes baseado em estrutura, por métodos de virtual screening, mostrou-se no caso da SmPNP valida e promissora, com a obtenção de ligantes inéditos e ativos. Esta estratégia foi coroada com a obtenção de um complexo entre a SmPNP e um ligante oriundo do VS. A técnica de docking utilizada se mostrou bastante robusta, encontrando a mesma orientação para análogos, bases e nucleosídeos de purinas nas diferentes estruturas e subunidades utilizadas.

A utilização da SmPNP como um alvo para o desenvolvimento de uma droga contra a esquistossomose ainda necessita ser validada. Foi demostrado que a inibição da PNP de malária causa a morte do parasita (*in vitro)*. Apesar das vias de salvação de purina serem diferentes nos dois organismos, o estudo com a PNP de malária incentiva a continuidade deste projeto, sendo o passo mais importante a validação da SmPNP como um bom alvo quimioterápico.

A descoberta de ligantes baseado em estrutura e em VS apresentada nesta tese, pode ser aplicada com igual sucesso a outros sistemas, bem como a utilização da técnica de soaking para a obtenção de complexos como os compostos selecionados pelo virtual screening.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLA, E.; KUHN, P.; EARNEST, T.; STEVENS, R. C. Automation of X-ray crystallography. **Nature Structure Biology**. Structural Genomic Supplement, p.973-977. Nov 2000.

ADAMS, M.D.; SOARES, M.D.; KERLAVAGE, A.R.; FIELDS, G. & VENTER, J.C. Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. **Nature Genetics**, v.4, n.4, p.373-380, 1993.

ADAMS, P. D. & GROSSE-HUNSTLEVE, R. W. Recent developments in software for the automation of crystallography macromolecular structure determination. **Current Opinion in Structure Biology**, v.10, p. 564-568, 2000.

AGARWAL, K.C.; AGARWAL, R.P.; STOECKLER, J.D. & PARKS; R.E. Purine nucleoside phosphorylase microheterogeneity and comparison of kinetic behavior of the enzyme from several tissues and species. **Biochemistry**, v.14, n.1, p.79-84, 1975.

AZEVEDO JR, W.F.;CANDURI, F.; SANTOS, D.M.; SILVA, R.G.; OLIVEIRA, J.S.; CRAVALHO, L.P.S.; BASSO, L.S.; MENDES. M.A.; PALMA, M.S. & SANTOS, D.S. Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase at 2.3Å resolution. **Biochem. Biophy. Res. Com**. v.308, p.545-552, 2003.

BRUNGER, A.T.; ADAMS, P.D.; CLORE, G.M.; DELANO, W.L.; GROS, P.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.W.; JIANG, J.-S.; KUSZEWSKI, J.; NILGES, N.; PANNU, N.S.; READ, R.J.; RICE, L.M.; SIMONSON, T. & WARREN G.L. Crystallography and NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination. **Acta Crystallographica. D**. v.54, p.905-921 (1998).

BZOWSKA, A.; KULIKOWSKA, E. & SHUGAR, D. Properties of purine nucleoside phosphorylase (PNP) of mammalian and bacterial origin. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v.45C, p.59-70, 1990.

BZOWSKA, A.; KULIKOWSKA, E. & SHUGAR, D. Purine nucleoside phosphorylases: properities, functions, and clinical aspects. **Pharm. Ther**. v.88, p.349-425, 2000.

BZOWSKA, A.; LUIC, M.; SCHRÖDER, W.; SHUGAR, D.; SAENGER, W. & KOELLNER, G. Calf spleen purine nucleoside phosphorylase: purification, sequence and crystal structure of its complex with na N(7)-acycloguanosine inhibitor. **FEBS Letters**, v.367, p.214-218, 1995.

CACCIAPUOTI, G.; PORCELLI, M.; BERTOLDO, C.; DE ROSA, M. & ZAPPIA, V. Purification and characterization of extremely thermophilic thermostable 5'-methylthio-adenosine phosphorylase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.24762-24769, 1994.

COLLABORATIVE COMPUTER PROJECT NUMBER 4 CCP4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica. D**. v. 50, p.760-763, 1994.

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

DIAS-NETO, E.; CORREA, R.G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; BRIONES, M.R.; NAGAI, M.A.; DA SILVA, W JR.; ZAGO, M.A.; BORDIN, S.; COSTA, F.F.; GOLDMAN, G.H.; CARVALHO, A.F.; MATSUKUMA, A.; BAIA, G.S.; SIMPSON, D.H.; BRUNSTEIN, A.; DE OLIVEIRA, P.S.; BUCHER, P.; JONGENEEL, C.V.; O'HARE, M.J.; SOARES, F.; BRENTANI, R.R.; REIS, L.F.; DE SOUZA, S.J. & SIMPSON, A.J. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.97, p.3491-3496, 2000.

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

DOVEY, H.F.; McKERROW, J.H. & WANG, C.C. Purine salvage in *Schistosoma mansoni* schistosomules. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.11, p.157-167, 1984.

EALICK, S.E.; RULE, S.A.; CARTER, D.C.; GREENHOUGH, T.J.; BABU, Y.S.; COOK, W.J.; HABASH, J.; HELLIWELL, J.R.; STOECKLER, J.D.; PARKS, R.E.; CHEN, S.F. & BUGG, C.E. Three dimensional structure of human erythrocytic purine nucleoside phosphorylase at 3.2 Å resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v.265, n.3, p.1812-1820, 1990.

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

EL KOUNI, M.H.; DIOP, D. & CHA, S. Combination therapy of schistosomiasis by tubercidin and nitrobenzylthioinosine 5'-monophosphate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v.80, p.6667-6670, 1983.

EL KOUNI, M.H.; MESSIER, N.J. & CHA, S. Treatment of schistosomiasis by purine nucleoside analogues in combination with nucleoside transport inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, v.36.n.22, p.3815-3821, 1987.

ERION, M.D.; TAKABAYASHI, K.; SMITH, H.B.; KESSI, J.; WAGNER, S.; HONGER, S.; SHAMES, S.L. & EALICK, S.E. Purine nucleoside phosphorylase. 1. Stucture-Function studies. **Biochemistry**, v.36, p.11725-11734, 1997a.

ERION, M.D.; STOECKLER, J.D.; GUIDA, W.C.;WALTER, R.L & EALICK, S.E. Purine nucleoside phosphorylase. 2. Catalytic Mechanism. **Biochemistry**, v.36, p.11735-11748, 1997b.

FEDOROV; A.A; , KICSKA; G.A; FEDOROV; E.V.; STROKOPYTOV, B.V.; TYLER; P.C.; FURNEAUX; R.H.; SCHRAMM; V.L. & ALMO; S.C. (1999). Calf spleen purine nucleoside phosphorylase complexed with immucillin. http://www.rcsb.org/pdb/pdbexplore.cgi?pid625936888311&pdbId=3PNP. (9/09/1999)

FRANCO, G.R.; ADAMS, M.D.; SOARES, M.B.; SIMPSON, A.J.; VENTER, J.C. & PENA, S.D. Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by the EST strategy using a directional cDNA library. **Gene**, v.152, p.141-147, 1995.

GIBLETT, E.R.; AMMANN, A.J.; WARA, D.W.; SANDMAN, R. & DIAMOND, L.K. Nucleoside phosphorylase deficiency in a child with severe defective T-cell immunity and normal B-cell immunity. Lancet. v.1, p.1010-1013, 1975.

GILL, S.C. & VON HIPPEL, P. H. Calculation of protein extinction coeffcients from amino acid sequence data. **Analytical Biochemistry**, v.182, p.319-326, 1989.

GILPIN, R.W. & SADOFF, H. Physical and catalytic properties of purine nucleoside phosphorylase from cells and spores of *Bacillus cereus*. **The Journal of Biological Chemistry,** v.246, p.1475-1480, 1971.

GLYKOS, N. M. & KOKKINIDIS, M. A stochastic approach to molecular replacement. **Acta Crystallogr D**, v.56, p.169-174, 1999.

HAMAMOTO, T.; NOGUCHI, T. & MIDORIKAWA, Y. Cloning and expression of purine nucleoside phosphorylase II gene from *Bacilus stearothermophilus* TH 6-2 and characterization of its gene product. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.61, p.276-280, 1997b.

EESC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

HAMAMOTO, T.; OKUYAMA, K.; NOGUCHI, T.& MIDORIKAWA, Y. Cloning and expression of purine nucleoside phosphorylase I gene from *Bacilus stearothermophilus* TH 6-2. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.61, p.272-275, 1997a.

HENDRICKSON, W. A. Synchrotron crystallography. **TIBS**, v.25, p.637-643, 2000.

HOLTON, T.; IOERGER, T. C.; CHRISTOPHER, J. A.; SACCHETTINI, J. C. Determining protein structure from electron-density maps using pattern matching. **Acta Crystallogr D**, v.56, p.722-734, 2000.

HORI, N.; WATANABE, M.; YAMAZAKI, Y. & MIKAMI, Y. Purification and characterization of a second thermostable purine nucleoside phosphorylase in *Bacilus stearothermophilus* JTS 859. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, p.3219-3224, 1989.

HUTCHINSON, E.G. & THORNTON, J.M. PROMOTIF: a program to identify and analyze motifs in proteins. Protein Science, v.5, p.212-220, 1996.

JENSEN, K.F. & NYGAARD, P. Purine nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* – Purification and some properties. **European Journal of Biochemistry**, v.51, p.253-265, 1975.

JENSEN, K.J. Two purine nucleoside phosphorylase in *Bacilus subtilis*. Purification and some properties of the adenosine-specific phosphorylase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.525, p.346-356. 1978.

JOHNSTON, D.A. et al. Opening the can of worms: molecular analysis of *Schistosoma* population. **Parasitology Today**, v.9, p.286-291, 1993.

JONES, T.A.; BERGDOLL, M & M. KJELDGAARD, M. O: A macromolecular modeling environment. Crystallographic and Modeling Methods in Molecular Design. Eds.: C. Bugg & S. Ealick. Springer-Verlag Press. p.189-195, 1990.

JONES, G; WILLETT, P; GLEN, R.C; LEACH, A.R. & TAYLOR R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **J. Mol. Biol**, v.267, 727-748, 1997.

KALCKAR, H.M. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. I- Determinatiom of Hydroxypurine compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, v.167, p.429-443, 1947.

KISSINGER, C.R,; GEHLHAAR, D.K.; FOGEL, D.B. Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. **Acta Crystallogr D**, v.55, p.484-491, 1999.

KLEYWEGT, G.J. & JONES, T.A. Homo crystallographicus--quo vadis? Structure, v.10, p.465-472, 2002.

KLEYWEGT, G.J. & JONES, T.A. Databases in protein crystallography. **Acta Crystallogr D**, v.54, p.1119-1131, 1998.

KOELLNER, G.; LUIC, M.; SHUGAR, D.; SAENGER, W. & BZOWSKA, A. Crystal structure of calf spleen purine nucleoside phosphorylase in a complex with hypoxanthine at 2.15 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.265, p.202-216, 1997.

KOELLNER, G.; LUIC, M.; SHUGAR, W.; SAENGER, W. & BZOWSKA, A. Crystal structure of the ternary complex of E. coli purine nucleoside phosphorylase with Formicin B, a structural analogue of the substrate inosine, and phosphate (sulfate) at 2.1 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.280, p.153-166, 1998.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structuralprotein during the assembly of the head of bacteriophaget T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LASKOWSKI, R.A., MACARTHUR, M.W. & THORNTON, J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallographic**, v.26, p.283-291, 1993.

LÜTHY; R.; BOWIE; J.U. & EISENBERG; D. Assessment of protein models whit three-dimensional profiles. **Nature**, v.356, p.83-85, 1992.

MAO, C.; COOK, W.J.; ZHOU, M.; FEDEROV, A.A.; ALMO, S.C. & EALICK, S.E. Calf speen purine nucleoside phosphorylase complexed with substrates and substrates analogues. **Biochemistry**, v.37, p.7135-7146, 1998.

MAO, C.; COOK, W.J.; ZHOU, M.; KOSZALKA, G.W.; KRENISTKY, T.A. & EALICK, S.E. The crystal structure of *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase: a comparison with the human enzyme reveals a conserved topology. **Structure**, v.5, n.10, p.1373-1383, 1997.

McPHERSON; A., **Crystallizations of Biological Macromolecules**. 1ª.ed. New York. Cold Spring Harbor Press, 1998. 586p.

MIECH, R.P.; SENFT, A.W.& SENFT, D.G. Pathways of nucleotide metabolism in Schistosoma mansoni. VI Adenosine Phosphorylase. **Biochemical Pharmacology**, v.24, p.407-411, 1975.

MUCHMORE, S. W.; OLSON, J.; JONES, R.; PAN, J.; BLUM, M.; GREER, J.; MERRICK, S. M.; MAGDALINHOS, P.; NIENABER, V. N. Automated crystal mounting and data collection for protein crystallography. **Structure**, v.8, p.R243-R246, 2000.

NARAYANA, S.V.L.; BUGG, C.E. & EALICK, S.E. Refined structure of purine nucleoside phosphorylase at 2,75 Å Resolution. **Acta Crystallographica**, v.D53, p.131-142, 1997.

NAVAZA, J., SALUDJIAN, P. AMoRe: An automated molecular replacement program package. **Methods in Enzymology:** Macromolecular crystallography, Part A. v.276, p.581-594, 1997.

NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 8.ed. São Paulo, Atheneu, 1991. p.212-223.

NICHOLLS, A.; SHARP, K.A. & HONIG, B. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. **Proteins**. v.11, p.281-296, 1991.

NIENABER, V. N.; RICHARDSON, P. L.; KLIGHOFER, K.; BOUSKA, J. J.; GIRANDA, V. L.; GREER, J. Discovering novel ligants for macromoleculles using X-ray crystallographic sreening. **Nature Biotechnology**, v.18, p.1105-1108, 2000.

OLDFIELD, TJ. "X-LIGAND: An application for the automated addition of flexible ligands into electron density." **Acta Crystallogr D**. v.57, p.696-705, 2001.

OTWINOWSKI, Z. Oscillation data reduction program. In Proceeding of the CCP4 Study Weekend: Data collection and processing 29-30 January 1993. Sawyer, L.; Isaacs, N. & Bailey, S. eds. p.56-62. SERC Daresbury Laboratory, England. 1993.

PEREIRA, H.M.; CLEASBY, A.; PENA, S.D.J.; FRANCO, G.R & GARRATT, R.C. Cloning, expression and preliminary crystallographic studies of the potential drug target purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni*. **Acta Crystallogr D**, v.59, p.1096-1099, 2003.

PARKS, R.E. & ARGAWAL, R.P. **The enzymes.** 3.ed. New York, Academic Press, 1972, v.7, Cap.16, p.483-514.

PERRAKIS, A.; MORRIS, R. & LAMZIN VS. Automated protein model building combined with iterative structure refinement. **Nat Struct Biol**. v.6, p.458-463, 1999.

PERRAKIS, A.; SIXMA, T. K.; WILSON, K. S.; LAMZIN, V. S. wARP: improvement and extension of crystallographic phases by weighted averaging of multiple-refined dummy atomic models. **Acta Crystallogr D**, v.53, p.448-455, 1997.

PESSOA, S.M. & MARTINS, A.V. **Parasitologia médica.** 10.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. p.399-421.

PUGMIRE; M.J.; C.MAO; C. & EALICK S.E. (1999). The high resolution crystal structure of bovine spleen purine nucleoside posphorylase in complex forms with phosphate and 9-deazainosine. http://www.rcsb.org/pdb/pdbexplore.cgi?pid625936888311&pdbId=1B8O (9/09/1999)

REY, L. **Parasitologia**. 2.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p.342-410.

ROBERTSON, B.C. & HOFFEE, P.A. Purification and properites of purine nucleoside phosphorylase form *Salmonella typhymurium*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.248, p.2040-2043, 1973.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning:** a laboratory manual. 2.ed. New York, Cold Spring Harbor Press, 1989. p.1.82-1.84.

SENFT, A.W. & CRABTREE, G.W. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni* – VII – Inhibition of adenine and guanine nucleotide synthesis by purine analogs in intact worms. **Biochemical Pharmacology**, v.26, p.1847-1855, 1977.

SENFT, A.W. & CRABTREE, G.W. Purine metabolism in the schistosomoses: potential targets for chemotherapy. **Pharmacological Therapy**, v.20, n.3, p.341-356, 1983.

SENFT, A.W.; CRABTREE, G.W.; AGARWAL, K.C.; SCHOLAR, E.M.; AGARWAL, R.P. & PARKS, R.E. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni* – III – Identification of enzymes in cell-free extracts. **Biochemical Pharmacology**, v.22, p.449-458, 1973b.

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

SENFT, A.W.; SENFT, D.G. & MIECH, R.P. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni* – II – Disposition of adenosine by whole worms. **Biochemical Phamarcology**, v.22, p.437-447, 1973a.

SHERIFF, S.; KLEI, H. E.; DAVIS, M. E. Implementation of a six-dimensional search using AmoRe translation function for difficult molecular-replacement problems. **J. Appl. Crystallogr**, v.32, p.98-101, 1999.

SHI, W.; BASSO, L.A..; SANTOS, D.S.; TYLER, P.C.; FURNEAUX, R.H., BLANCHARD, J.S.; ALMO, S.C. & SCHRAMM, V.L. Structure of purine nucleoside phosphorylase from Mycobacterium tuberculosis in complexes with immucilin-H and its pieces. **Biochemistry**. v.40, 8204-8215. 2001.

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

STEGMAN, R.J.; SENFT, A.W.; BROWN, P.R. & PARKS, R.E. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni* – IV – Incorporation of adenosine analogs in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v.22, p.459-468, 1973.

STOECKLER, J. D. **Developments in Cancer Chemotherapy.** Boca Ranton, CRC Press, 1984. p.35-60.

STOECKLER, J.D.; AGARWAL, R.P.; AGARWAL, K.C.; SCHMIT, K. & PARKS JR., R.E. Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes: physico-chemical properties of crystaline enzyme. **Biochemistry**, v.17, p.278-283, 1978a.

STOECKLER, J.D.; POIROT, A.F.; SMITH, R.M.; PARKS JR, R.E.; EALICK, S.E.; TAKABAYASHI, K. & ERION, M.D. Purine nucleoside phosphorylase. 3. Reversal of purine base specificty by site direct mutagenesis. **Biochemistry**, v.36, p.11749-11756, 1997.

TEBBE, J.; BZOWSKA, A.; WIELGUS-KUTROWSKA, B.; SCHRODER, W., KAZIMIERCZUK, Z.; SHUGAR, D.; SAENGER, W. & KOELLNER, G. Crystal structure of the purine nucleoside phosphorylase (PNP) from *Cellulomonas* sp. and its implication for the mechanism of trimeric PNPs. **Journal of Molecular Biology**. v.294, p.1239-1255, 1999.

VAGIN, A. & TEPLYAKOV, A. *MOLREP*: an Automated Program for Molecular Replacement. **J. Appl. Cryst**. v.30, p. 1022-1025, 1997.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E.A.; GUIMARAES, P.E.; OJOPI, E.P.; PAQUOLA, A.C.; PIAZZA, J.P.; NISHIYAMA, M.Y JR.; KITAJIMA, J.P.; ADAMSON, R.E.; ASHTON, P.D.; BONALDO, M.F.; COULSON, P.S.; DILLON, G.P.; FARIAS, L.P.; GREGORIO, S.P.; HO, P.L.; LEITE, R.A.; MALAQUIAS, L.C.; MARQUES, R.C.; MIYASATO, P.A.; NASCIMENTO, A.L.; OHLWEILER, F.P.; REIS, E.M.; RIBEIRO, M.A.; SA, R.G.; STUKART, G.C., SOARES, M.B.; GARGIONI, C.; KAWANO, T.; RODRIGUES, V.; MADEIRA, A.M.; WILSON, R.A.; MENCK, C.F.; SETUBAL, J.C.; LEITE, L.C. & DIAS-NETO, E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite Schistosoma mansoni. **Nature Genetics**. v.35, p.148-157, 2003.

VOET, D. & VOET, J.G. **Biochemistry**. 2.ed. New York, John Wiley, 1995. 1223 p.

VRIED, G. & SANDER, C. Quality control of protein models: directional atomic contact analysis. **Journal of Applied Crystallographic**, v.26, p.47-60, 1993.

VUILLARD, L., BAALBAKI, B., LEHMANN, M., NØRAGER, S., LEGRAND, P., ROTH, M. Protein crystallography with non-detergent sulfobetaines. **J. Crystal Growth**, v.168, p.150-154, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the WHO Informal Consultation on Schistosomiasis Control. World Health Organization, Geneva, WHO/CDS/CPC/SIP/99.2. 1999

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tropical Diseases – Progress in Research, 1989-1990. Geneva, World Health Organization, 1991. p.41-47 (Programme Report, 10).

ZIMMERMAN, T.P.; ROSS, N.B. & MIECH, R.P. Adenine as substrate for purine nucleoside phosphorylase. **Canadian Journal of Biochemistry**, v.49, p.1050-1054, 1971.

APÊNDICE A
Artigo Publicado

Acta Crystallographica Section D
Biological Crystallography
ISSN 0907-4449

Cloning, expression and preliminary crystallographic studies of the potential drug target purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni*

Humberto M. Pereira,[a]* Anne Cleasby,[b] Sérgio D. J. Pena,[c] Glória R. Franco[c] and Richard C. Garratt[a]

[a]Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brazil, [b]Astex Technology, Cambridge, England, and [c]Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biologicas, UFMG, Brazil

Correspondence e-mail: hmuniz@if.sc.usp.br

Received 28 January 2003
Accepted 7 April 2003

The parasite *Schistosoma mansoni*, unlike its mammalian hosts, lacks the *de novo* pathway for purine biosynthesis and depends on salvage pathways for its purine requirements. The gene encoding one enzyme of this pathway, purine nucleoside phosphorylase from *S. mansoni* (SmPNP) was identified, fully sequenced and cloned into the bacterial expression vector pMAL c2G to produce a protein in fusion with maltose-binding protein. The recombinant fusion protein was expressed at high levels and was purified in a single step by amylose resin affinity chromatography. After factor Xa cleavage, SmPNP was purified using a cation-exchange column and crystallized by hanging-drop vapour diffusion using polyethylene glycol 1500 as precipitant in the presence of 20% glycerol in acetate buffer. The use of the non-detergent sulfobetaine 195 (NDSB 195) as an additive had a marked effect on the size of the resulting crystals. Two data sets were obtained, one from a crystal grown in the absence of NDSB 195 and one from a crystal grown in its presence. The crystals are isomorphous and belong to the space group $P2_12_12_1$. It is intended to use the structures in the discovery and development of specific inhibitors of SmPNP.

1. Introduction

Schistosomiasis is a major public health problem in the developing world. It is endemic in 76 countries and territories and amongst the parasitic diseases ranks second after malaria in terms of social and economic impact and public health importance (Shuhua *et al.*, 2002). The World Health Organization estimates that in 1999, 652 million people were at risk from the disease, with 193 million actually infected (World Health Organization, 1999). The disease is caused by a trematode parasite (blood fluke) or schistosome, of which the principal species is *Schistosoma mansoni*.

The *Schistosoma* Genome Project was created in 1992 to encourage research in strategic areas, especially those that will lead to the discovery and development of new drugs and vaccines. The main objectives were (i) the discovery and characterization of new genes from *S. mansoni* and *S. japonicum*, (ii) the development of a low-resolution physical map, (iii) the sequencing and analysis of the mitochondrial genome, (iv) the development of new resources to be used and distributed and (v) the construction and maintenance of a WWW site, the ShistoDB (Franco *et al.*, 2000).

As part of this project (Franco *et al.*, 1995), we have identified and isolated the gene coding for the enzyme purine nucleoside phosphorylase from an adult worm cDNA library, which we named SmPNP (*S. mansoni* PNP). Purine nucleoside phosphorylase (PNP; EC 2.4.2.1) catalyzes the reversible phosphorolysis of purine nucleosides to generate the corresponding purine base and ribose 1-phosphate and has previously been described as participating in the purine-salvage pathway in *S. mansoni* (Senft & Crabtree, 1977).

It has been demonstrated that schistosomes (Senft & Crabtree, 1983) and their larvae shistosomules (Dovey *et al.*, 1984), unlike their mammalian hosts, do not have the capacity to synthesize purine nucleosides *de novo* and depend exclusively upon the salvage pathway for their purine requirements, suggesting that the pathway's component enzymes may represent potential drug targets for novel chemotherapy. Indeed, the purine-salvage pathway has been successfully exploited as a drug target against several other parasites in the past by the use of purine and purine nucleoside analogues (Nelson *et al.*, 1979; Carlson & Chang, 1981) and may therefore also be useful in the development of novel compounds for the combat of schistosomiasis.

More recently, interest in the salvage pathway has been rekindled and it has been suggested that selective inhibitors of PNP from parasites could prevent the spread of parasitic infections (Bzowska *et al.*, 2000). For example, Immucillin-H, a transition-state analogue of PNP, is a potent inhibitor of the enzyme from *Plasmodium falciparum*, thus preventing the utilization of inosine and deoxyinosine as a

© 2003 International Union of Crystallography
Printed in Denmark – all rights reserved

source of hypoxanthine. This indicates that PNP may be a viable target for antimalarial therapy (Kicska *et al.*, 2002).

A further reason for investing in a PNP-based drug-design strategy is the fact that it has been intensively studied as a target for other diseases. For example, potent inhibitors of PNPs may also be useful as immunosuppressive agents as well as in the treatment of gout and in the enhancement of the therapeutic effects of drugs that are purine nucleosides and are therefore cleaved by PNP prior to reaching their target (Koellner *et al.*, 1997). It is to be expected that the crystallographic structure of SmPNP will help in the search for and/or development of compounds that inhibit *S. mansoni* PNP specifically and that could be useful in the treatment of schistosomiasis in the future.

2. Material and methods

2.1. Cloning, expression and purification of SmPNP

SmPNP cDNA was identified and partially sequenced as part of the *S. mansoni* Genome Project (Franco *et al.*, 1995). Both strands of the gene were subsequently sequenced using the Automated Fluorescent DNA Sequencer (Amersham Biosciences), making use of a restriction-enzyme digestion and subcloning strategy for full coverage of the cDNA. The 973 bp SmPNP cDNA was amplified by PCR using two oligonucleotides: Smpnp1, 5′-CTG**GGATCC***ATCGAGGGAAGG*ATGCATGAGTCAGTAACT-3′, including a cleavage site for factor Xa protease (in italics) inserted before the ATG initiation codon, as well as a *Bam*HI restriction site (in bold), and Smpnp2, 5′-CTG**CTGCAG**TAGACAGAAAACTTTATAAG-3′, including a *Pst*I restriction site (in bold). The amplified SmPNP cDNA was inserted into the pMAL c2G vector (New England Biolabs) fused to that of the maltose-binding protein (MBP) and the fusion plasmid was used in the transformation of DH5α. Expression of the corresponding fusion protein was performed in 1 l 2×YT medium in the presence of 100 μg ml^{-1} ampicillin and 2% glucose, inoculated with an overnight culture. The cells were incubated at 310 K to an OD_{600} of about 0.6 and induced with 300 μ*M* of isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 2.5 h. The culture was harvested by centrifugation and sonicated in an ice bath. After centrifugation, the crude extract was applied to an amylose affinity column and the fusion protein was eluted with 10 m*M* maltose. The fusion protein was cleaved with factor Xa (1 U per 200 μg of fusion protein) for 4 d at 277 K. The cleavage product was dialyzed against 20 m*M* MES pH 6.0 and the SmPNP was then purified by cation-exchange chromatography on a Poros 20SP (4.6 × 100 mm) or a Mono-S column (Amersham Biosciences) using a linear gradient of 0–1 *M* NaCl. All stages of SmPNP production were visualized by SDS–PAGE. Fractions containing the purified enzyme were pooled, dialyzed against 10 m*M* β-mercaptoethanol and concentrated to about 12 mg ml^{-1} by ultrafiltration (Centriprep YM-10).

2.2. Enzyme assay

The inosine phosphorolysis activity of SmPNP was assayed by the coupled xanthine oxidase method of Kalckar (1947). This method consists of measurement of the hypoxanthine released during phosphorolysis of inosine or deoxyinosine indirectly by monitoring the uric acid produced by xanthine oxidase on its oxidation. The standard reaction mixture (final volume 1 ml) contained 50 m*M* potassium phosphate buffer pH 7.4, 5–250 μ*M* inosine and 0.02 units of xanthine oxidase. The reaction was started by addition of 350 ng of SmPNP to the reaction mixture and the OD_{293} was immediately monitored with a UV–Vis spectrophotometer. The kinetic parameters (K_M and k_{cat}) were derived from non-linear least-squares fits of the Michaelis–Menten equation using the experimental data.

2.3. Crystallization

SmPNP crystallization was performed by the hanging-drop vapour-diffusion method at 277 K. The initial crystallization condition obtained was solution 43 from Crystal Screen Cryo (Hampton Research), which consists of 24% PEG 1500 and 20% glycerol. Refinement of this condition was performed by varying the pH by including different buffers (32 m*M* Tris–HCl pH 8.0, 7.5 and 7.0, 32 m*M* cacodylic acid pH 6.0 and 32 m*M* sodium acetate pH 5.6, 5.3, 5.0 and 4.0). SmPNP crystals only appeared in sodium acetate buffer pH 5.0 and therefore a second optimization was performed using a finer pH grid with 32 m*M* sodium acetate buffer pH 4.8–5.5 in pH increments of 0.1. The final optimized condition was 24% PEG 1500, 20% glycerol pH 4.9–5.0. The hanging drop (4 μl) contained 2 μl of SmPNP solution at 10–12 mg ml and 2 μl of well solution and was equilibrated against 500 μl of well solution. Improvements in the crystal size were obtained using the non-detergent sulfobetaine 195 (NDSB 195; Vuillard *et al.*, 1996) as an additive and an SmPNP concentration reduced to 9 mg ml^{-1}. In this case, it was necessary to increase the PEG 1500 concentration to 28–30% and NDSB195 was included in the SmPNP solution at a final concentration of 600 m*M*. The same drop size was used as described above.

2.4. X-ray data collection and processing

SmPNP crystals were always grown in the presence of the cryoprotectant glycerol and two separate data sets were collected. The first originated from a small crystal grown in the absence of NDSB 195. This crystal was mounted in a nylon-fibre loop and flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were measured at 100 K using synchrotron radiation on beamline CPr at the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brazil) and copper-like radiation (λ = 1.544). Diffraction data were collected to 2.75 Å resolution using 1° φ increments over a total rotation of 95°. The data were indexed, integrated and scaled using the *HKL* program package (Otwinowski & Minor, 1997). A second data set from a crystal grown in the presence of NDSB 195 was collected on beamline ID 14.1 of the ESRF using λ = 0.993 at 100 K. Diffraction data were collected to 1.75 Å resolution using 0.5° φ increments over a total rotation of 90°. The data were indexed and integrated using the program *MOSFLM* (Leslie, 1992) and scaled using the program *SCALA* from the *CCP*4 suite (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

2.5. Molecular replacement

The first molecular replacement of SmPNP was performed using the program *AMoRe* (Navaza, 1994) using the data collected to 2.75 Å resolution. The crystal structure of trimeric bovine PNP (PDB code 4pnp) was used as the search model using all data in the resolution range 15–3.5 Å and an integration radius of 45.59 Å. For the data collected to 1.75 Å resolution, molecular replacement was performed using the program *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 1997; Vaguine *et al.*, 1999) as implemented in the *CCP*4 program package (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). The partially refined SmPNP trimer was used as the search model in this case using all data in the resolution range 45.0–3.0 Å and an integration radius of 27.0 Å.

```
Smpnp    MHESVTANIENVKKVAHHIQKLTSIVPEIGIICGSGLGKLADGVKDKITIPYTKIPNFPQ 60
HuPNP    MENGYT--YEDYKNTAEWLLSHTKHRPQVAIICGSGLGGLTDKLTQAQIFDYSEIPNFPR 58
BovPNP   MANGYT--YEDYQDTAKWLLSHTEQRPQVAVICGSGLGGLVNKLTQAQTFDYSEIPNFPE 58
         *    *   *     *       *   *    ******* *            *  *****

Smpnp    TSVVGHSGNLIFGTLSGRKVVVMQGRFHMYEGYSNDTVALPIRVMKLLGVKILMVSNAAG 120
HuPNP    STVPGHAGRLVFGFLNGRACVMMQGRFHMYEGYPLWKVTFPVRVFHLLGVDTLVVTNAAG 118
BovPNP   STVPGHAGRLVFGILNGRACVMMQGRFHMYEGYPFWKVTFPVRVFRLLGVETLVVTNAAG 118
           * ** * * ** * **  * ***********    *  * **  ****  * * ****

Smpnp    GLNRSLKLGDFVILKDHIYLPGLGLNNILVGPNQEAFGTRFPALSNAYDRDLRKLAVQVA 180
HuPNP    GLNPKFEVGDIMLIRDHINLPGFSGQNPLRGPNDERFGDRFPAMSDAYDRTMRQRALSTW 178
BovPNP   GLNPNFEVGDIMLIRDHINLPGFSGENPLRGPNEERFGVRFPAMSDAYDRDMRQKAHSTW 178
         ***     **      *** ***    * * *** * ** **** * ****  *  *

Smpnp    EKNGFGNLVHQGVYVMNGGPCYETPAECTMLLNMGCDVVGMSTIPEVVIARHCGIQVFAV 240
HuPNP    KQMGEQRELQEGTYVMVAGPSFETVAECRVLQKLGADAVGMSTVPEVIVARHCGLRVFGF 238
BovPNP   KQMGEQRELQEGTYVMLGGPNFETVAECRLLRNLGADAVGMSTVPEVIVARHCGLRVFGF 238
            *        * ***  **  ** ***  *   * * ***** ***  *****  **

Smpnp    SLVTNISVLDVESDLKPNHEEVLATGAQRAELMQSWFEKIIEKLPKD---- 287
HuPNP    SLITNKVIMDYESLEKANHEEVLAAGKQAAQKLEQFVSILMASIPLPDKAS 285
BovPNP   SLITNKVIMDTESQGKANHEEVLEAGKQAAQKLEQFVSLLMASIPVSGHTG 285
         ** **    * **  * ******  * * *
```

Figure 1
Sequence alignment of SmPNP, human and bovine PNPs. The conserved residues are marked with asterisks. The residues of the active site are underlined and the two mutations in the active site are highlighted.

3. Results and discussion

3.1. Sequence comparison, purification and activity assay

The open reading frame corresponding to the SmPNP gene is 864 bp in length, coding for a 287-residue protein with a calculated molecular mass of 31 162.2 Da. This compares with 31 166.6 Da as determined for the purified enzyme by electrospray mass spectrometry. The difference is probably within the experimental error of the mass spectrometry or owing to uncertainty in the protonation states of ionizable residues. A BLAST search showed that SmPNP is most similar to the mammalian PNPs and an alignment of the parasite enzyme with human and bovine homologues (Williams *et al.*, 1984; Bzowska *et al.*, 1995) is shown in Fig. 1. In both cases, SmPNP presents 49% sequence identity. These data clearly classify SmPNP as a member of the low-molecular-mass PNPs, which are homotrimers with an M_r of between 80 and 100 kDa that are specific for the catalysis of 6-oxopurines and their nucleosides (Bzowska *et al.*, 2000).

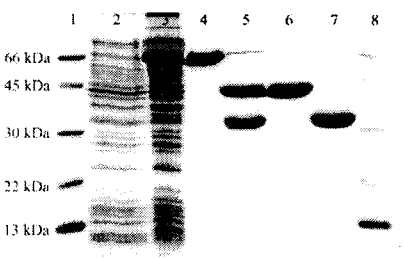


Figure 2
Analysis of the purification of SmPNP by 15% SDS–PAGE after Coomassie blue staining. Lanes 1 and 8 are markers containing serum bovine albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (22.4 kDa), cytochrome *c* (13.4 kDa). Lane 2, crude bacterial lysates prior to IPTG induction; lane 3, crude bacterial lysates after 0.3 m*M* IPTG induction for 2.5 h; lane 4, purified fusion protein (MBP-SmPNP) after amylose affinity column chromatography; lane 5, the result of cleavage of the fusion protein with factor Xa; lane 6, MBP eluted in the void volume on Poros 20SP column chromatography; lane 7, purified SmPNP after elution from the Poros 20SP with an NaCl gradient.

The N- and C-termini show low sequence identity when compared with the human and bovine homologues. Furthermore, despite conservation of the phosphate and ribose-1-phosphate binding subsites (underlined residues in Fig. 1), two mutations are observed in the base-binding subsite of the active site. Phe200 and Lys244 in the human and bovine enzymes are replaced by Tyr202 and Ile246 in SmPNP, respectively. These differences suggest the real possibility of designing nucleoside-based inhibitors which are sufficiently selective to be useful anti-parasitic agents. They represent the principal stimulus behind investing further effort in structural studies.

The primer Smpnp1 inserted a factor Xa cleavage site between MBP and SmPNP. The use of factor Xa protease has the advantage of producing a protein product with no additional residues at the N-terminus. This may be critical in cases where the N-terminus is expected to be buried or close to an interface between subunits, as is the case for trimeric PNPs. Indeed, previous attempts to crystallize an SmPNP product which included ten extra N-terminal residues derived from the vector were systematically unsuccessful.

Each purification step was monitored by SDS–PAGE (Fig. 2). Typically, 80 mg of recombinant fusion protein were obtained from 1 l of cell culture. After cleavage of 30 mg of this fusion protein using factor Xa, approximately 8 mg of SmPNP were obtained. The gel shows the remarkable efficiency of the cleavage (lane 5) both in terms of yield and a total lack of side products resulting from non-specific proteolysis.

Kinetic studies showed that the recombinant SmPNP is active against inosine, with a K_M of 7 μM and a k_{cat} of 1.78 s^{-1}. These values are roughly comparable with those published for the human enzyme (45 μM and 57 s^{-1}; Stoeckler *et al.*, 1997), but show a slightly greater apparent substrate affinity compensated by a reduced turnover rate. The significance, if any, of these differences for parasite metabolism has yet to be evaluated and their structural basis must await full refinement of SmPNP to high resolution.

3.2. Crystallization, preliminary X-ray analysis and molecular replacement

Crystals obtained in the absence of the additive NDSB 195 grew to 0.15 mm in the largest dimension and were obtained using 32 m*M* sodium acetate buffer pH 4.9–5.0, 24% PEG 1500 and 20% glycerol. These crystals took approximately three weeks to reach their full size. On the other hand, much larger crystals (up to 0.6 mm in the largest dimension) were obtained after only 3 d in the presence of 600 m*M* NDSB 195. These crystals were obtained under essentially identical conditions to those described above but in the presence of a slightly increased precipitant concentration, 28–30% PEG 1500 (Fig. 3).

Data sets were collected from crystals grown under both conditions. The use of NDSB 195 in the crystallization clearly resulted in several improvements to the crystals obtained: (i) they grew more rapidly, attaining their full size after a maximum of 3 d compared with three weeks in the absence of the additive, (ii) the final size obtained was at least four times greater in all dimensions and (iii) the resolution of the crystals improved from 2.75 to 1.75 Å. Although in the latter case it is difficult to make direct comparisons between the two data sets as different radiation sources and wavelengths were used, we presume that the increased size of the crystals and the improvement in resolution are both manifestations of a greater internal order. The

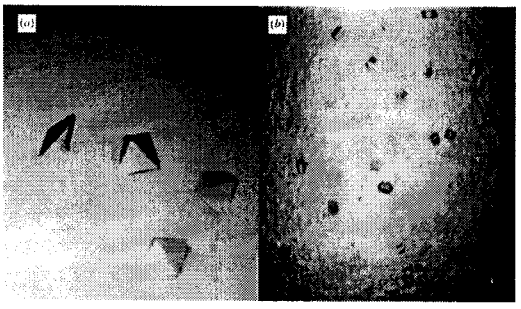


Figure 3
Crystals of SmPNP grown in (*a*) the presence and (*b*) the absence of NDSB 195.

Table 1
X-ray data-collection and processing statistics.

Values in parentheses correspond to the highest resolution shell.

Crystal form	Without NDSB 195	With NDSB 195
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Unit-cell parameters (Å)		
a	47.30	48.75
b	119.19	122.06
c	130.94	129.76
Resolution range (Å)	20.0–2.75 (2.81–2.75)	45.0–1.75 (1.83–1.75)
V_M (trimer per AU) ($Å^3\,Da^{-1}$)	1.97	2.06
Solvent content (%)	37.24	39.96
Unique reflections	19240 (1244)	78422 (11027)
R_{merge} (%)	8.0 (27.9)	8.1 (29.8)
Completeness	96.5 (95.0)	99.3 (97.1)
Average $I/\sigma(I)$	8.6 (3.1)	4.7 (2.5)

crystals are isomorphous and belong to space group $P2_12_12_1$. Analysis of crystals grown in the absence of the additive suggests a trimer in the asymmetric unit (V_M = 1.97 $Å^3\,Da^{-1}$), corresponding to a solvent content of 37.24%. Alterations in the unit-cell parameters between the two crystal forms vary from 3.1% in *a* to 1.0% in *c*, corresponding to a total unit-cell volume increase of 4.5% for the crystals grown in the presence of NDSB 195 (Table 1).

Non-detergent sulfobetaine solubilizers/stabilizers such as NDSB 195 are believed to act principally by increasing the solubility and stability of the protein and consequently leading to a reduction in non-specific aggregation (Vuillard *et al.*, 1996). As a result, this favours the formation of appropriate crystal contacts, leading to improved crystal growth. This increased solubility probably explains why a slightly greater precipitant concentration was necessary for crystallization in the presence of the additive (from 24% to 28–30%). The sulfobetaine itself, however, may not be visible in the final electron-density map. In the present case, an explanation for the its effects in improving crystal-growth rate, size and quality must await full structure refinement.

In the case of the crystals grown in the absence of NDSB 195, a unique molecular-replacement solution was obtained with a correlation coefficient of 33% and an *R* factor of 45%. Despite the relatively poor molecular-replacement solution, electron-density maps were calculated using the program *CNS* (Brünger *et al.*, 1998) and these, together with the resulting crystal packing, demonstrated the solution to be correct. A partially refined SmPNP structure resulting from this solution was used as the search model for the crystals obtained in the presence of the additive and yielded a correlation coefficient of 70.7% and an *R* factor of 34.7%. The solution corresponds to a small essentially rigid-body displacement of the trimer with respect to the first crystal form. Direct rigid-body refinement from the partially refined structure without molecular replacement yielded effectively the same solution.

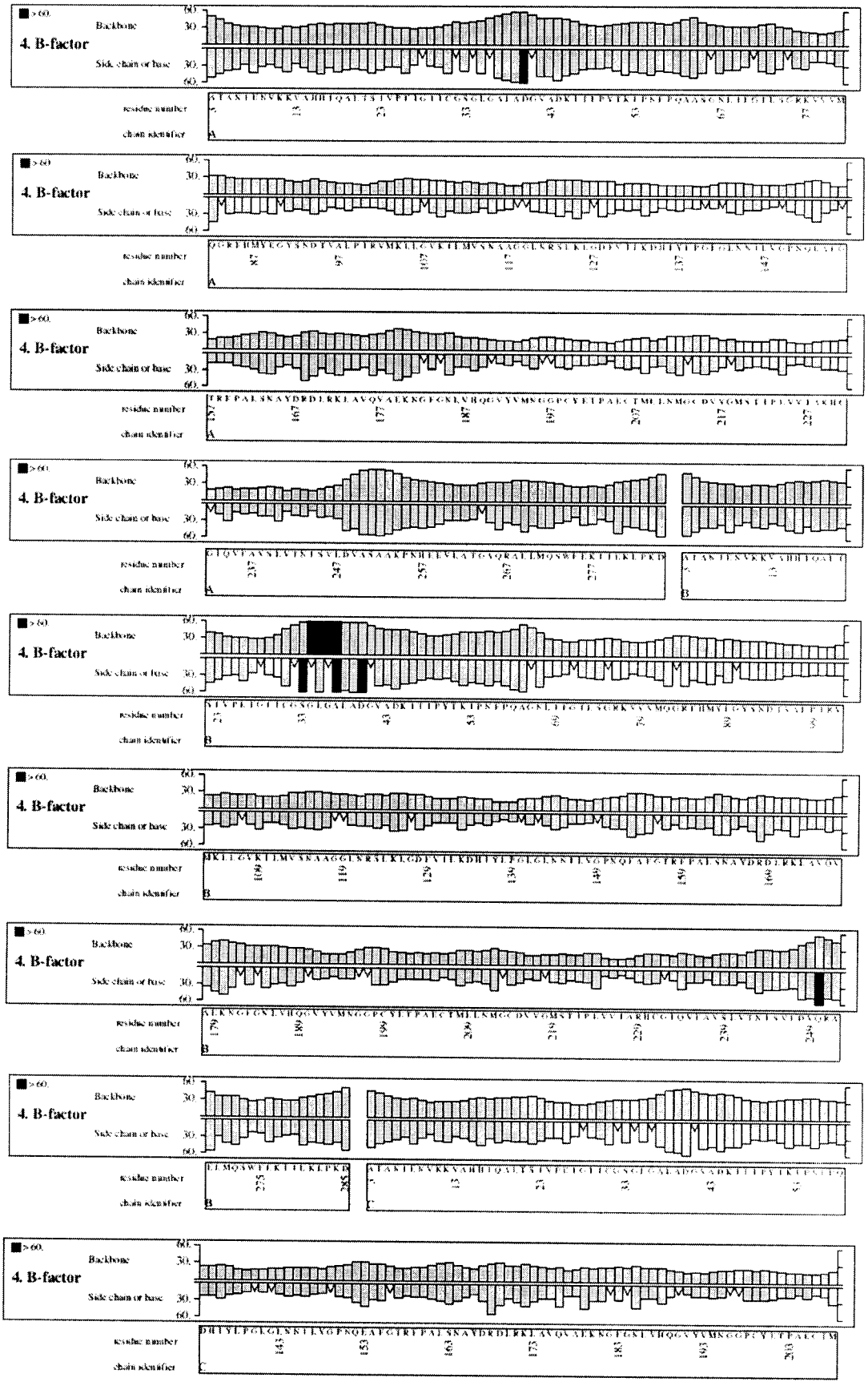
The molecular-replacement solutions obtained showed the non-crystallographic molecular threefold axis of the trimer to lie approximately parallel to the *a* axis. This was confirmed by calculation of the self-rotation function using the program *GLRF*, which revealed one peak on the section corresponding to $\kappa = 120°$. This peak lies in the plane defined by the crystallographic *a* and *b* axes at an angle of 18° with respect to *a*. These results pave the way for the full structure determination of the first parasite PNP, opening up new perspectives for an alternative drug-design strategy based on inhibition of the purine-salvage pathway. The fully refined structure will be used for the development of specific SmPNP inhibitors with a view to obtaining alternative treatments for schistosomiasis.

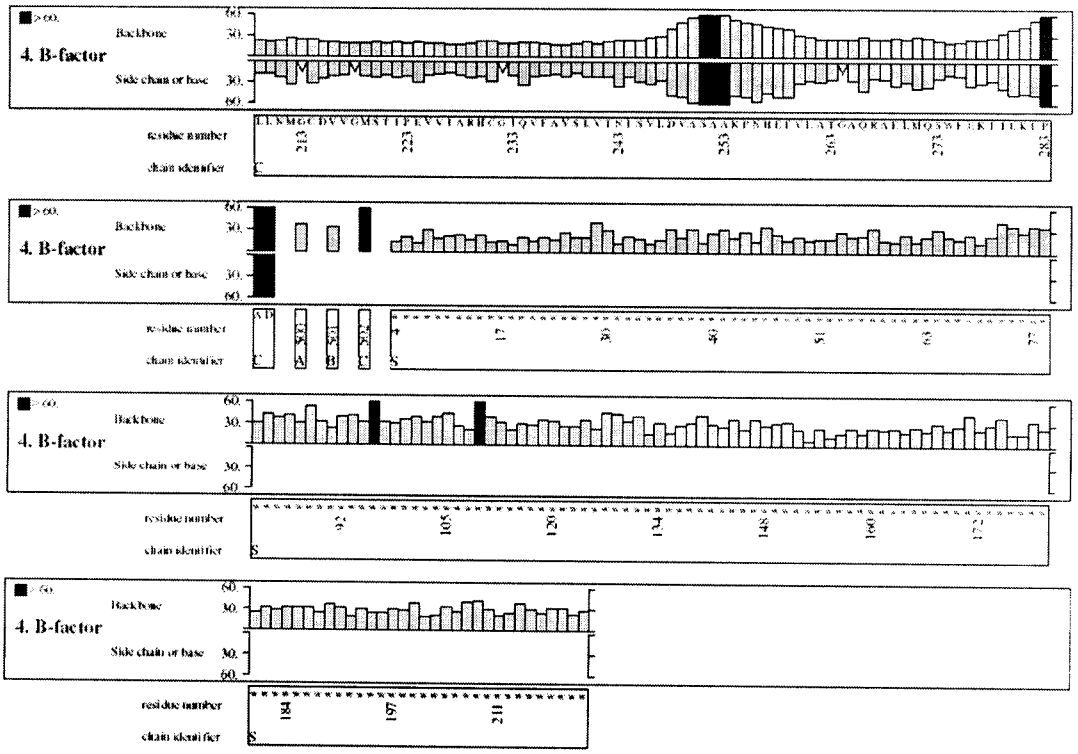
We are grateful to FAPESP and PRONEX (FINEP, CNPq) for financial support and to Astex Technology for providing experimental facilities during the six-month visit of HMP. We also thank José Brandão Neto for excellent technical assistance in the use of the CPr beamline at the LNLS as well as Kátia Barroso for carrying out automated DNA sequencing and Analina F. Valadão for initial directions and assistance on cloning and expression procedures.

References

Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). *Acta Cryst.* **D54**, 905–921.
Bzowska, A., Kulikowska, E. & Shugar, D. (2000). *Phamacol. Ther.* **88**, 349–425.
Bzowska, A., Luic, M., Schroder, W., Shugar, D., Saenger, W. & Koellner, G. (1995). *FEBS Lett.* **367**, 214–218.
Carlson, D. A. & Chang, K. P. (1981). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 1377–1383.
Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.
Dovey, H. F., McKerrow, J. H. & Wang, C. C. (1984). *Mol. Biochem. Parasitol.* **11**, 157–167.
Franco, G. R., Adams, M. D., Soares, M. B., Simpson, A. J., Venter, J. C. & Pena, S. D. (1995). *Gene*, **152**, 141–147.
Franco, G. R., Valadão, A. F., Azevedo, V. & Rabelo, E. M. L. (2000). *Int. J. Parasitol.* **30**, 453–463.
Kalckar, H. M. (1947). *J. Biol. Chem.* **167**, 429–443.
Kicska, G. A., Tyler, P. C., Evans, G. B., Furneaux, R. H., Schramm, V. L. & Kim, K. (2002). *J. Mol. Biol.* **277**, 3226–3231.
Koellner, G., Luic, M., Shugar, D., Saenger, W. & Bzowska, A. (1997). *J. Mol. Biol.* **265**, 202–216.
Leslie, A. G. W. (1992). *Jnt CCP4/ESF-EAMCB Newsl. Protein Crystallogr.* **26**.
Navaza, J. (1994). *Acta Cryst.* **A50**, 157–163.
Nelson, D. J., LaFon, S. W., Tuttle, J. V., Miller, W. H., Miller, R. L., Krenisky, T. A., Elion, G. B., Berens, R. L. & Marr, J. J. (1979). *J. Biol. Chem.* **254**, 11544–11549.
Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
Senft, A. W. & Crabtree, G. W. (1977). *Biochem. Pharmacol.* **26**, 1847–1855.
Senft, A. W. & Crabtree, G. W. (1983). *Pharmacol. Ther.* **20**, 341–356.
Shuhua, X., Tanner, M., N'Goran, E. K., Utzinger, J., Chollet, J., Bergquist, R., Minggang, C. & Jiang, Z. (2002). *Acta Trop.* **82**, 175–181.
Stoeckler, J. D., Poirot, A. F., Smith, R. M., Parks, E. Jr, Ealick, S. E., Takabayashi, K. & Erion, M. D. (1997). *Biochemistry*, **26**, 11749–11756.
Vagin, A. A. & Teplyakov, A. J. (1997). *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022–1025.
Vaguine, A. A., Richelle, J. & Wodak, S. J. (1999). *Acta Cryst.* **D55**, 191–205.
Vuillard, L., Baalbaki, B., Lehmann, M., Nørager, S., Legrand, P. & Roth, M. (1996). *J. Cryst. Growth*, **168**, 150–154.
Williams, S. R., Goddard, J. M. & Martin, D. W. Jr (1984). *Nucleic Acids Res.* **12**, 5779–5787.
World Health Organization. (1999). *Report of the WHO Informal Consultation on Schistosomiasis Control*, WHO/CDS/CPC/SIP/99.2. Geneva: World Health Organization.

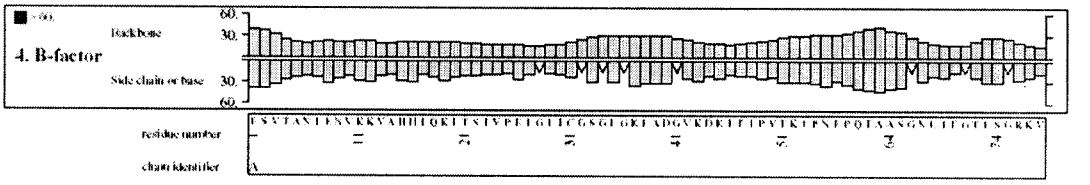
APÊNDICE B
Fator de Temperatura para a estrutura 2,75

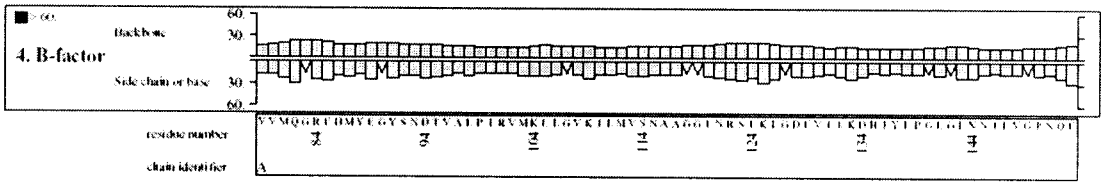

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier

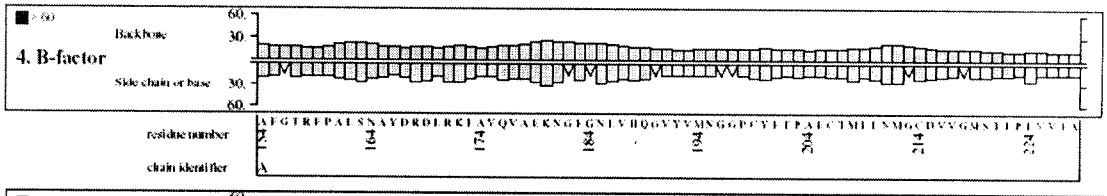

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier
4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier
4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier
4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier

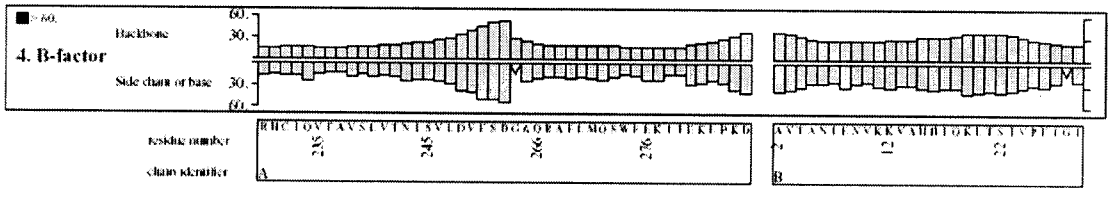
APÊNDICE C
Fator de Temperatura para a estrutura NSDB

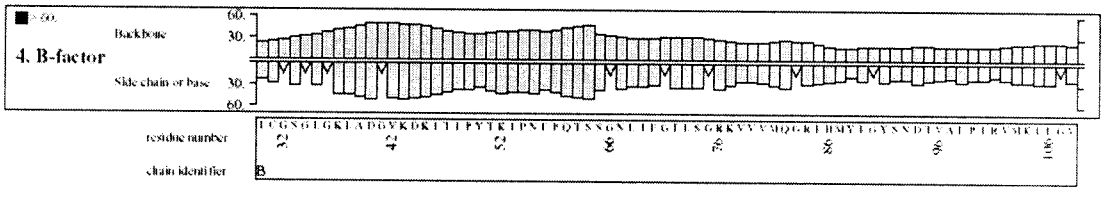
IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

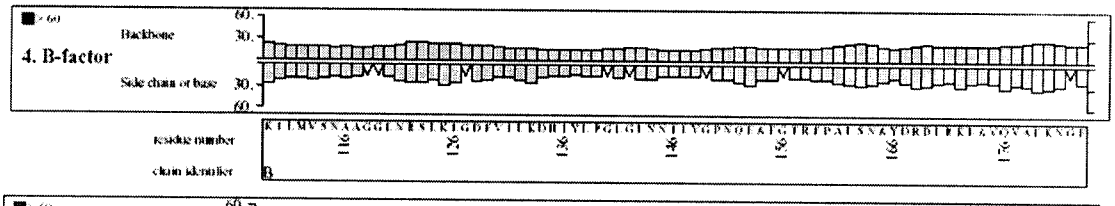

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier

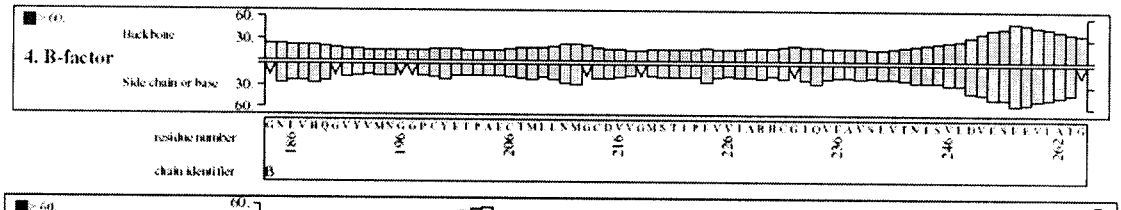

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier

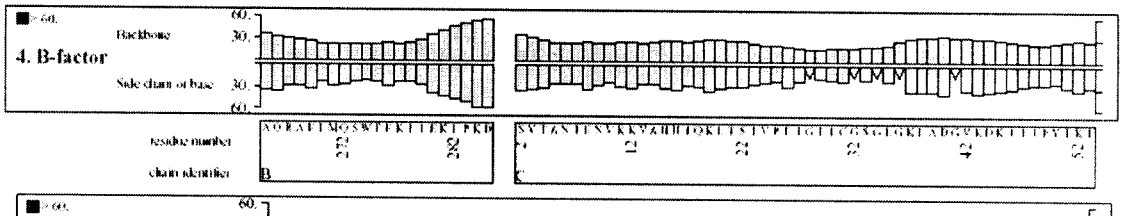

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier

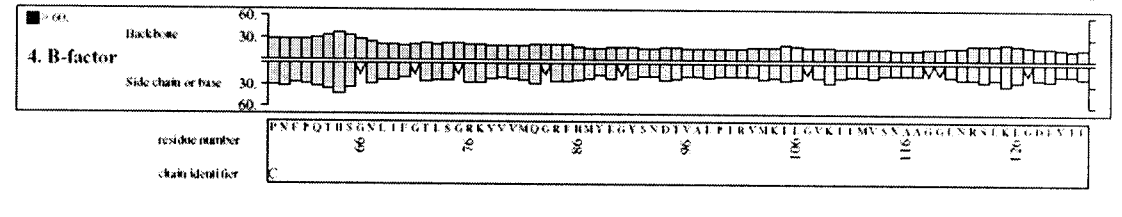

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier

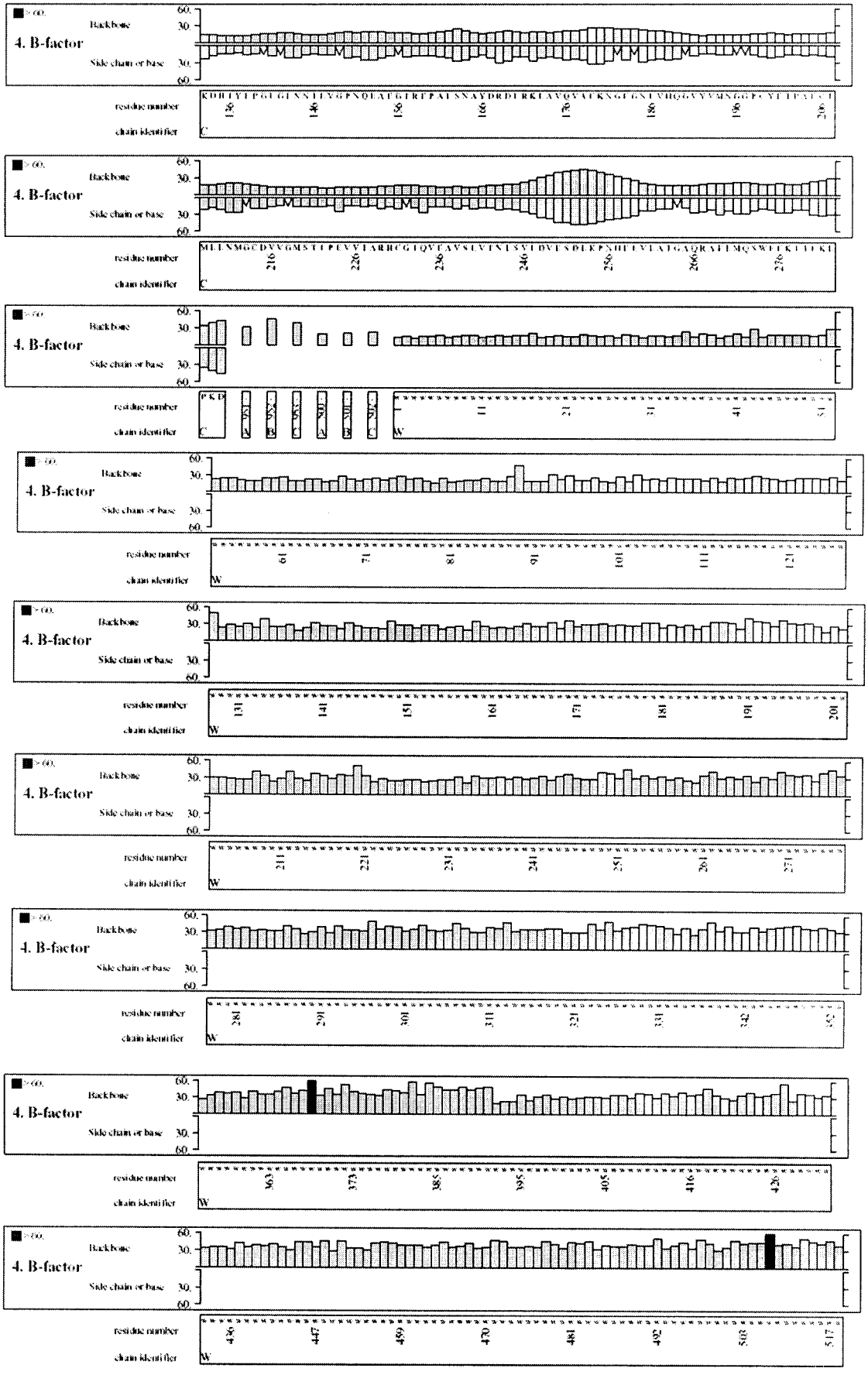

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier

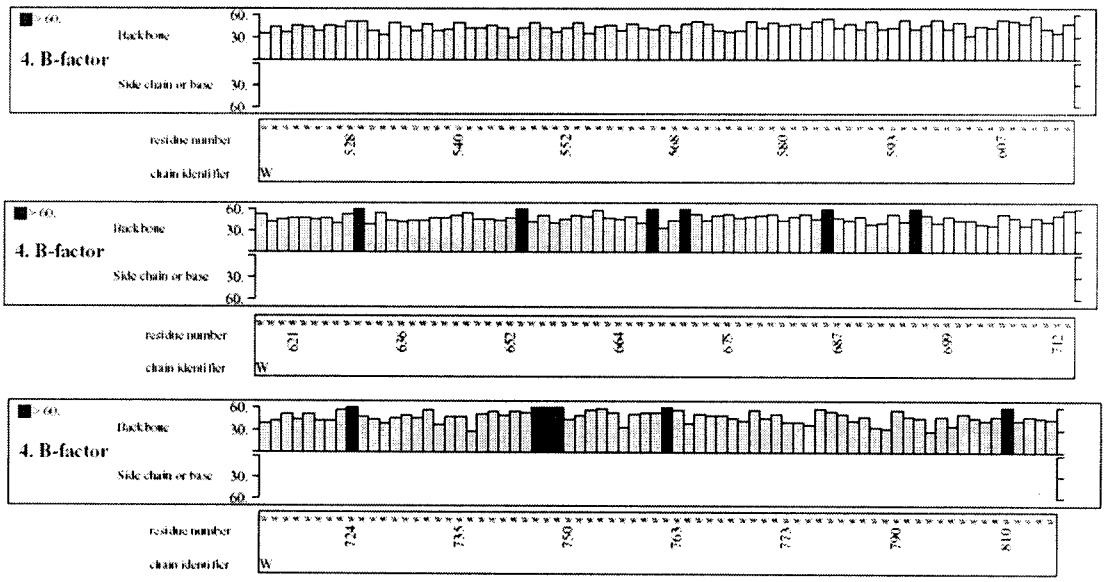

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier


4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier

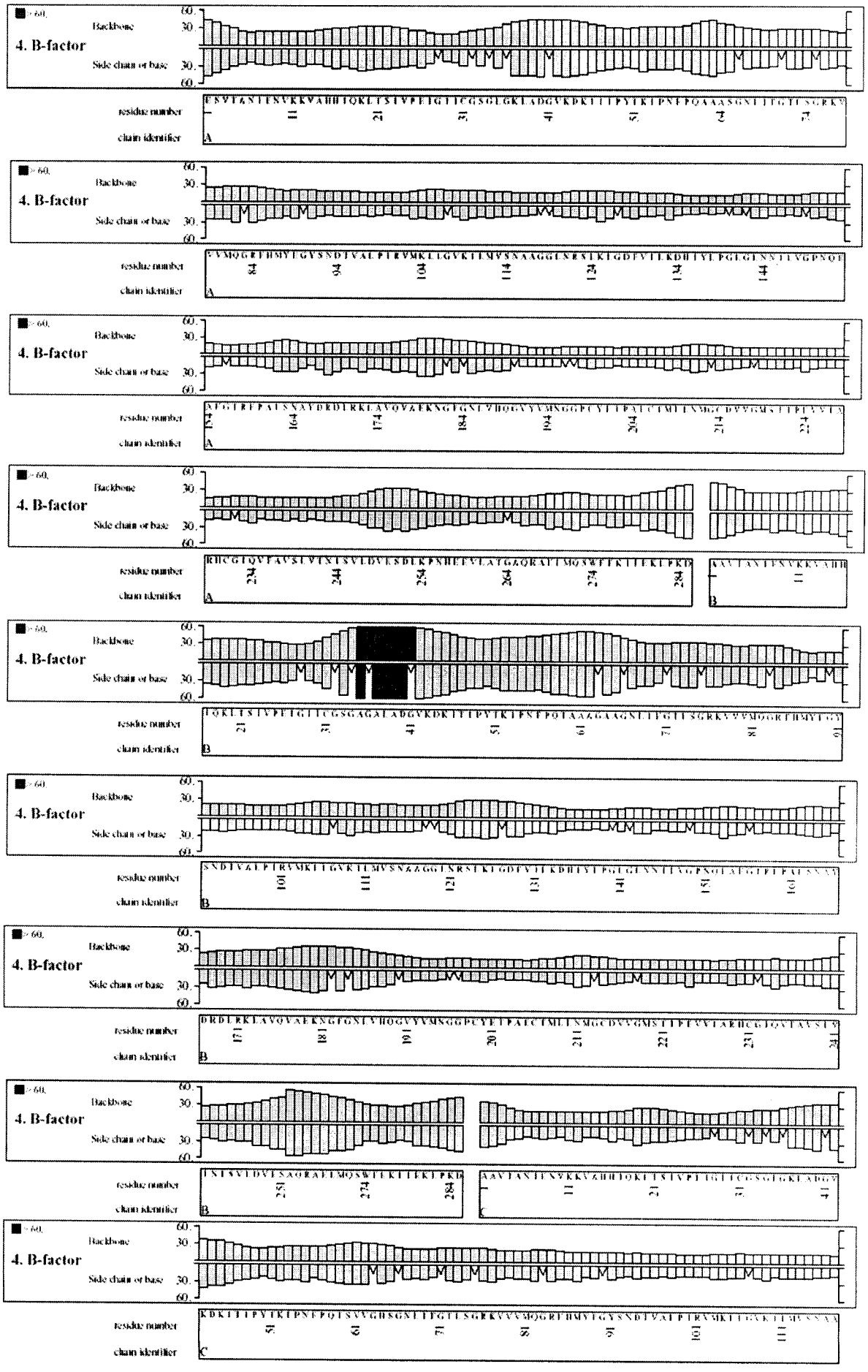

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier

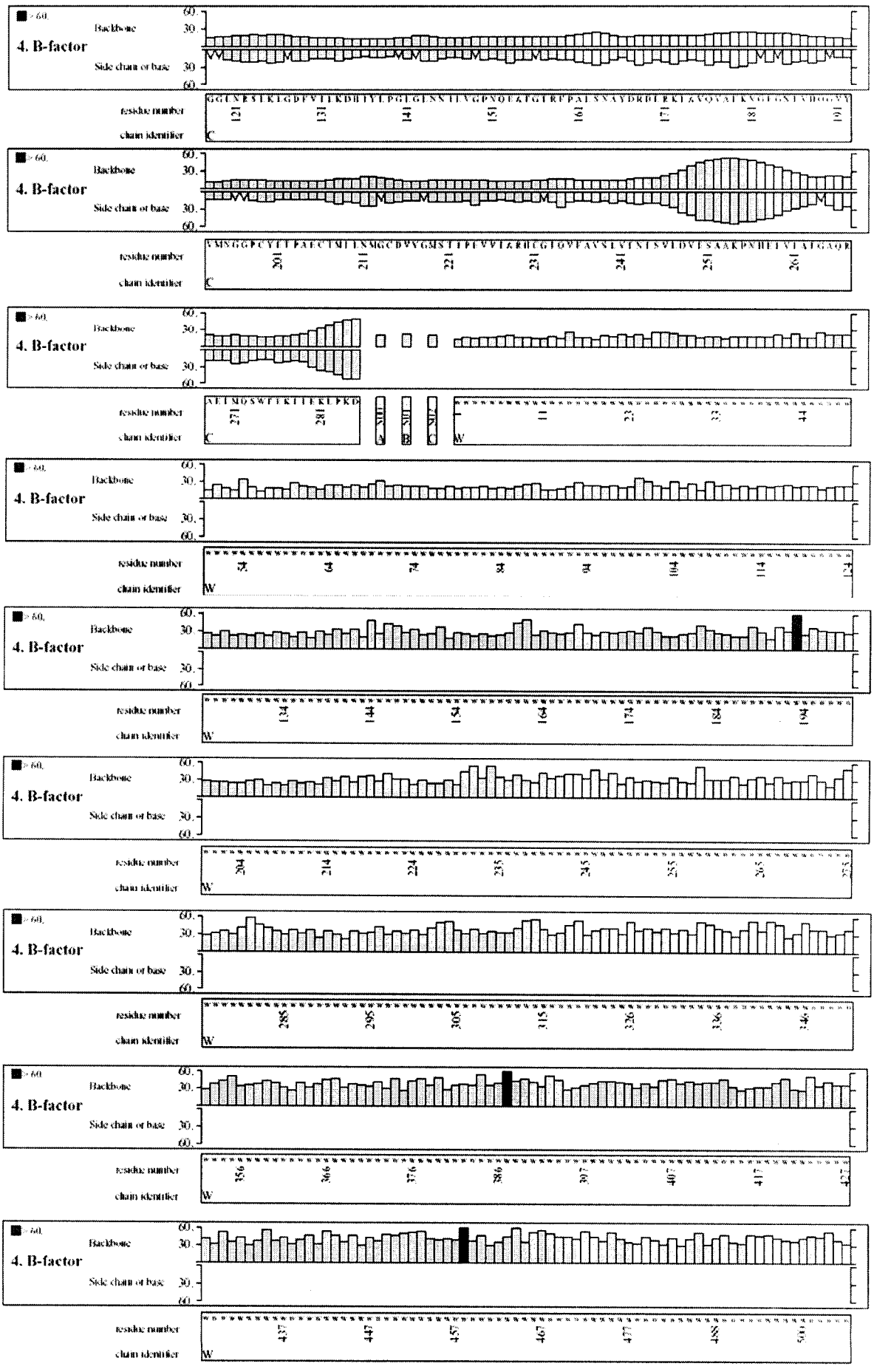

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier

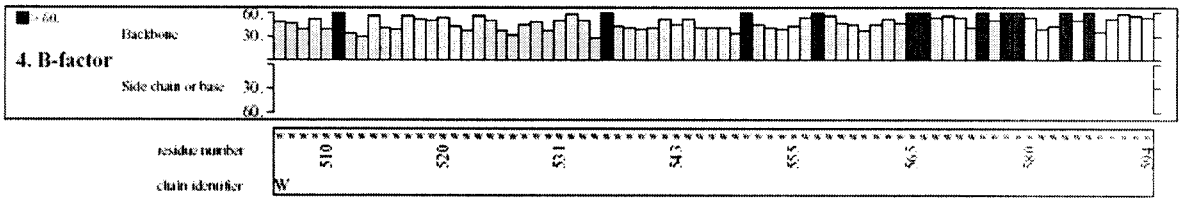

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier

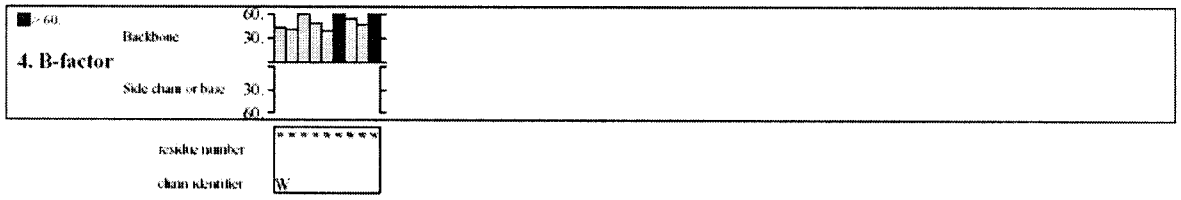

> 60.
Backbone
4. B-factor
Side chain or base
60.
30.
residue number
chain identifier
W
528
540
552
565
581
593
607
621
638
652
664
675
687
699
712
724
735
750
763
773
790
810

APÊNDICE D
Fator de Temperatura para a estrutura apo 1,9

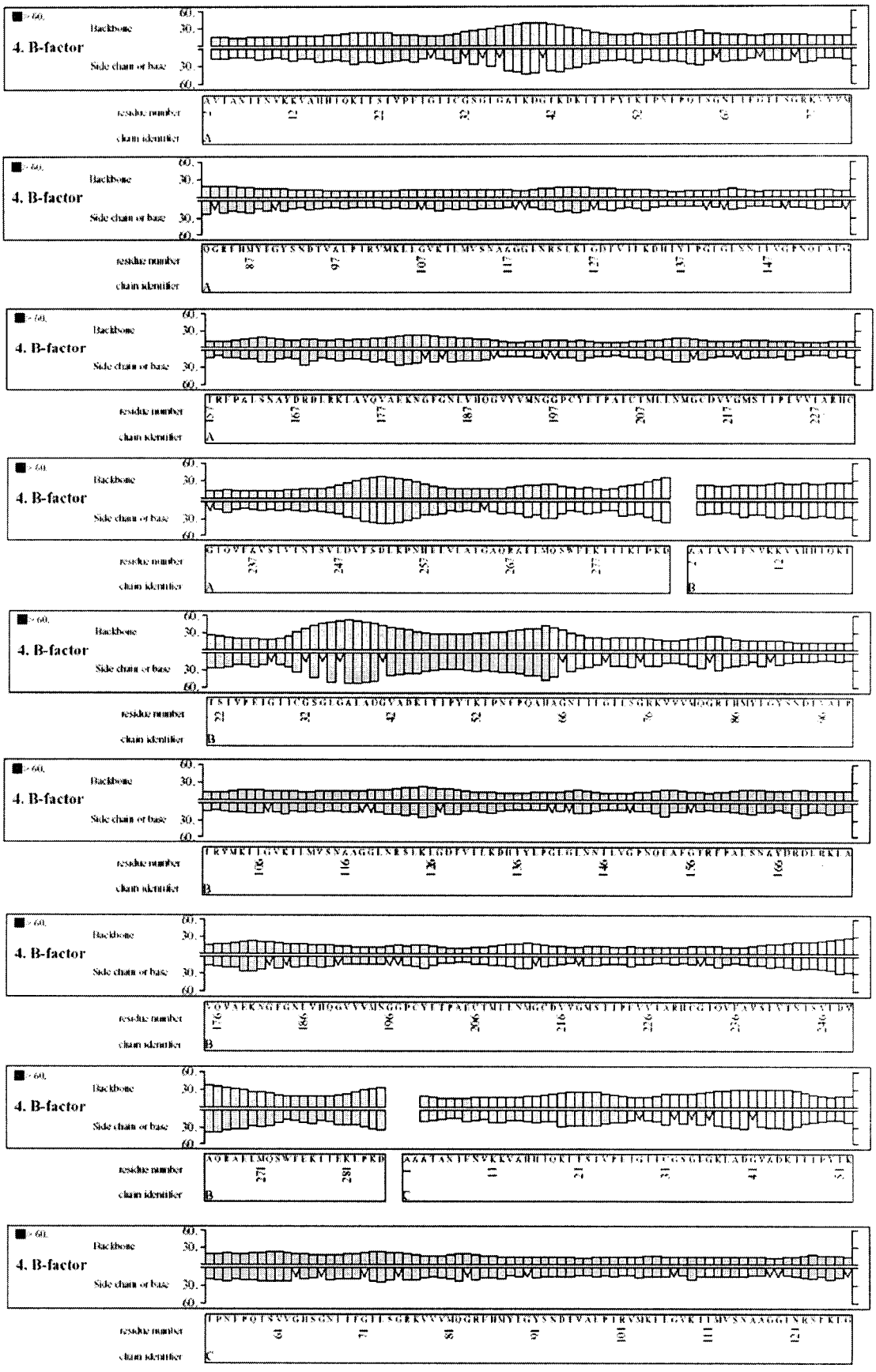

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier

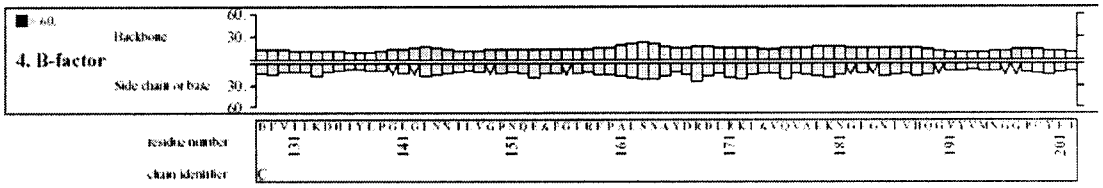

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier

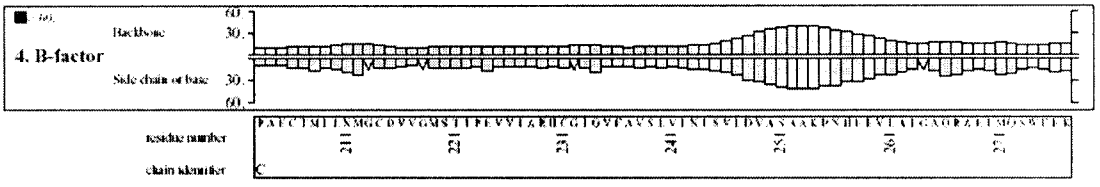

> 60.
Backbone
4. B-factor
Side chain or base
60.
30.
30.
60.
residue number
510
520
531
543
555
565
586
594
chain identifier
W

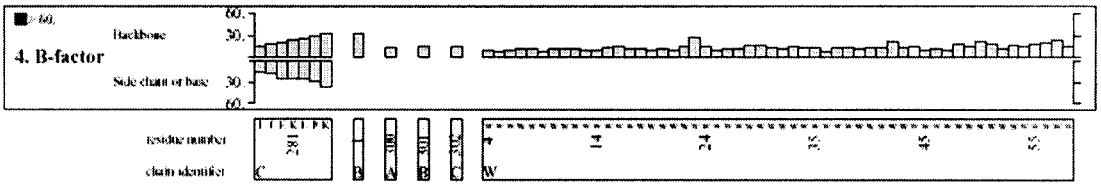

> 60.
Backbone
4. B-factor
Side chain or base
60.
30.
30.
60.
residue number
chain identifier
W

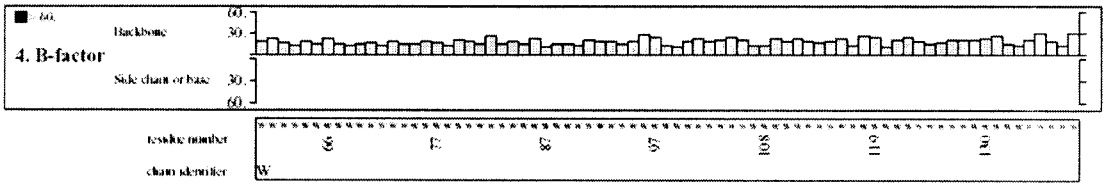
APÊNDICE E
Fator de Temperatura para a estrutura AT2169

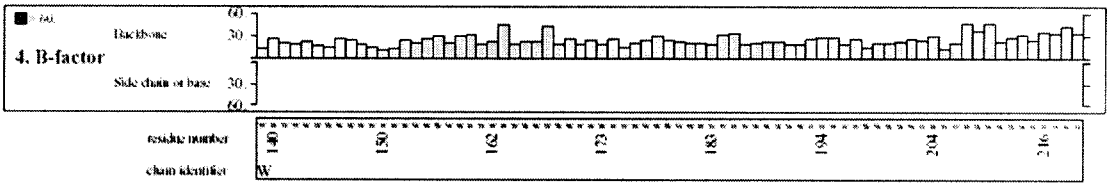

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier

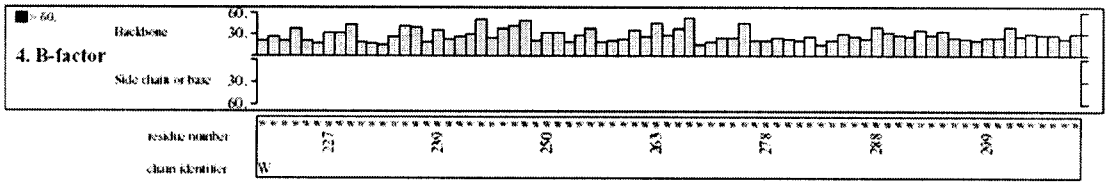

> 60.
Backbone
4. B-factor
Side chain or base
60.
30.
residue number
131
141
151
161
171
181
191
201
chain identifier
C

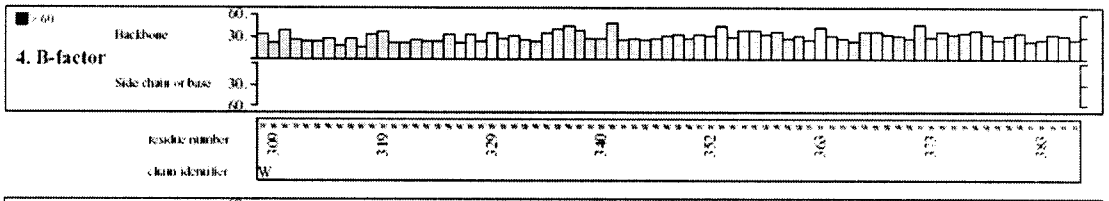

> 60.
Backbone
4. B-factor
Side chain or base
60.
30.
residue number
211
221
231
241
251
261
271
chain identifier
C

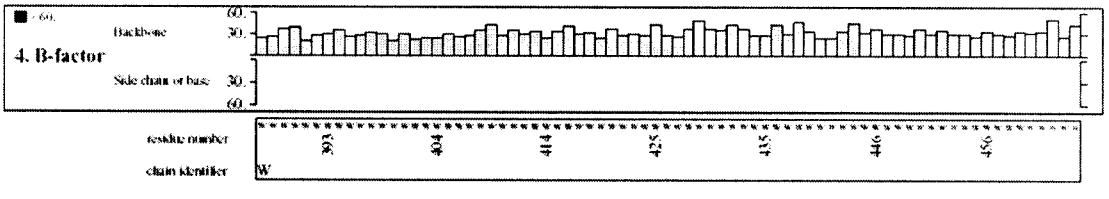

> 60.
Backbone
4. B-factor
Side chain or base
60.
30.
residue number
281
4
14
24
35
45
55
chain identifier
C
W

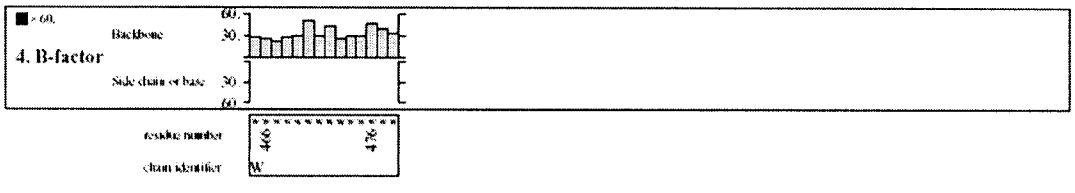

> 60.
Backbone
4. B-factor
Side chain or base
60.
30.
residue number
66
87
97
108
119
130
chain identifier
W


> 60.
Backbone
4. B-factor
Side chain or base
60.
30.
residue number
140
150
162
173
183
194
204
216
chain identifier
W

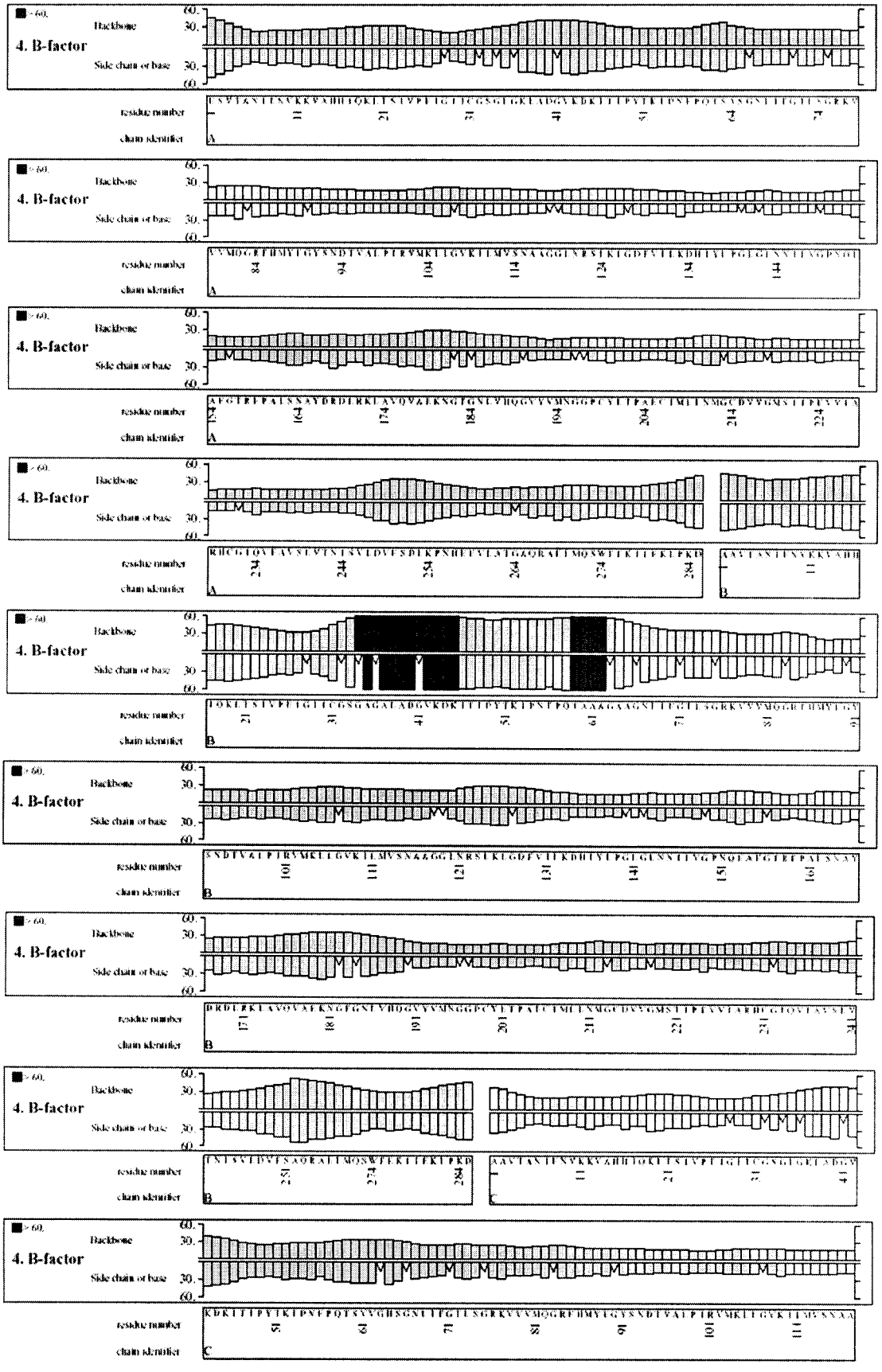

> 60.
Backbone
4. B-factor
Side chain or base
60.
30.
residue number
227
239
250
263
278
288
299
chain identifier
W

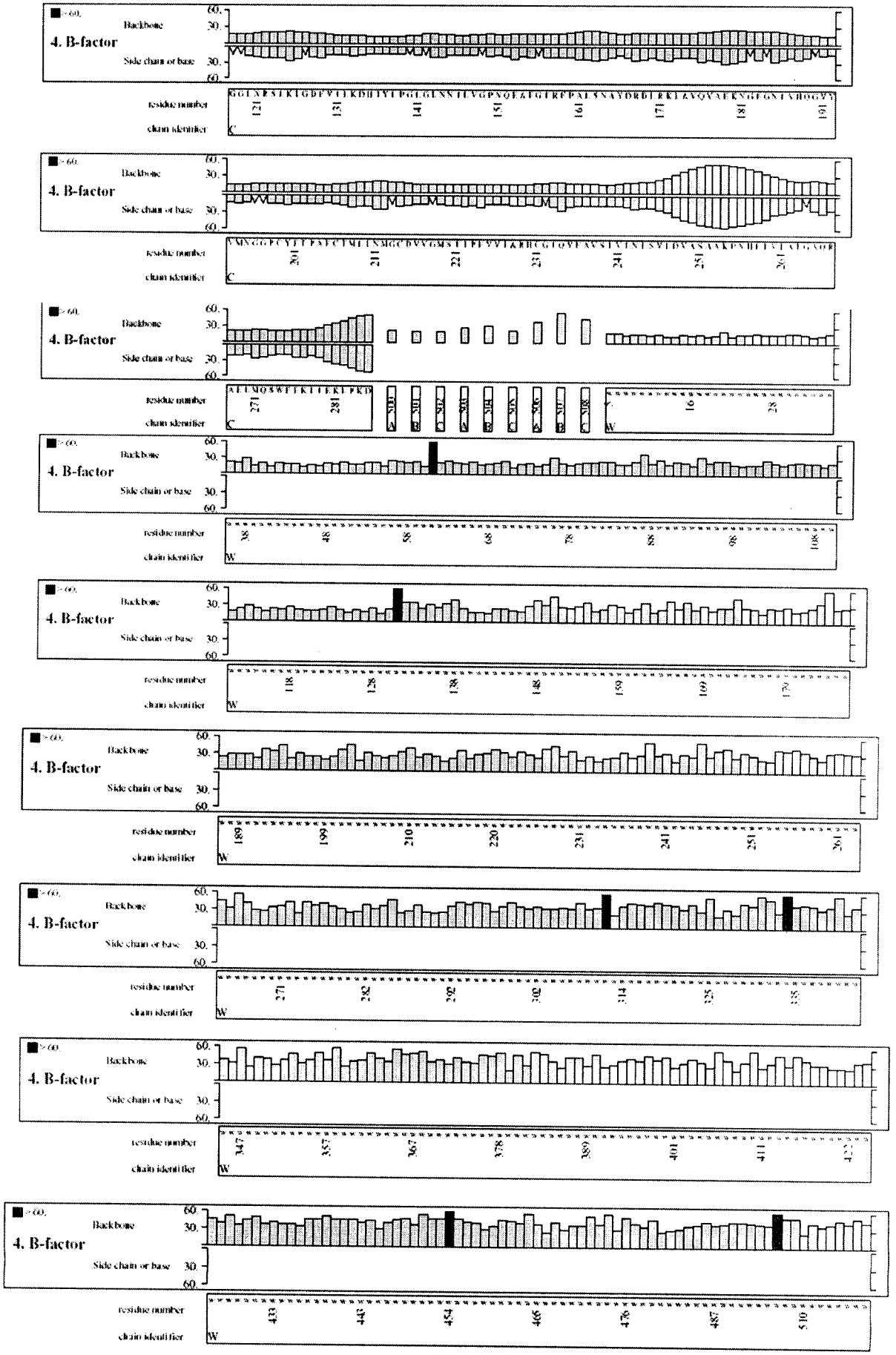

> 60.
Backbone
4. B-factor
Side chain or base
60.
30.
residue number
309
319
329
340
352
363
373
383
chain identifier
W

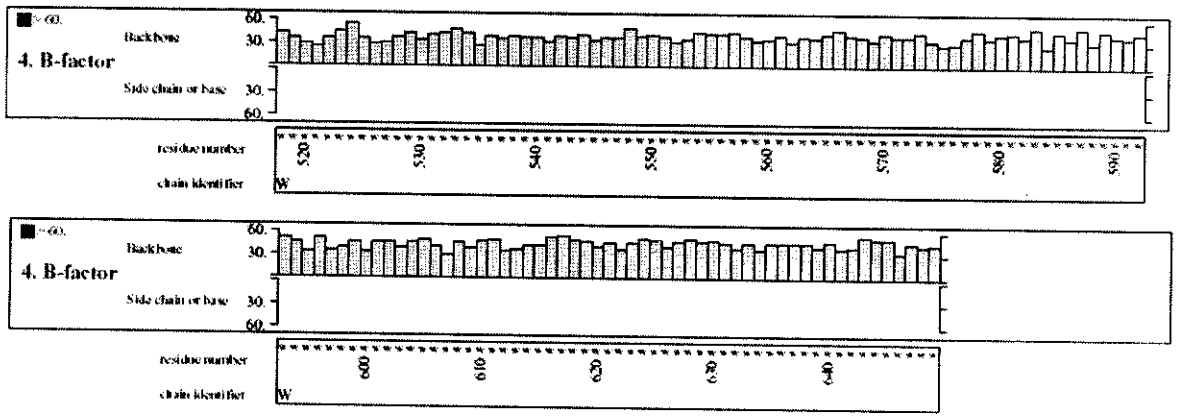

> 60.
Backbone
4. B-factor
Side chain or base
60.
30.
residue number
393
404
414
425
435
446
456
chain identifier
W


> 60.
Backbone
4. B-factor
Side chain or base
60.
30.
residue number
466
476
chain identifier
W

APÊNDICE F
Fator de Temperatura para a estrutura PO_4


4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier


4. B-factor
Backbone
Side chain or base
residue number
chain identifier


4. B-factor
Backbone
Side chain or base
60.
30.
residue number
chain identifier
W
520
530
540
550
560
570
580
590

4. B-factor
Backbone
Side chain or base
60.
30.
residue number
chain identifier
W
600
610
620
630
640