UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

VICTOR EMANOEL ARMINI CALDAS

Adenina fosforibosiltransferase
de *Schistosoma mansoni*: proposta de
detalhamento do mecanismo catalítico por
dinâmica molecular

SÃO CARLOS

2011

VICTOR EMANOEL ARMINI CALDAS

Adenina fosforibosiltransferase de
Schistosoma mansoni: proposta de
detalhamento do mecanismo catalítico por
dinâmica molecular

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação do Instituto de Física de
São Carlos, da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr.
Otavio Henrique Thiemann

Versão Original

São Carlos – SP
Julho – 2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Caldas, Victor Emanuel Armini.

Adenina fosforibosiltransferase de *Schistosoma mansoni*: proposta de detalhamento do mecanismo catalítico por dinâmica molecular. / Victor Emanuel Armini Caldas; orientador Otavio Henrique Thiemann. -- São Carlos, 2011.

123p.

Dissertação (Mestrado em Ciência - Área de concentração: Física Aplicada – Opção Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2011

1. Adenina fosforibosiltransferase. 2. APRT. 3. *Schistosoma mansoni*. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Victor Emanuel Armini Caldas

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada -
Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 12.08.2011

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Otavio Henrique Thiemann

Instituição: IFSC/USP

Assinatura_____

Prof(a). Dr(a). Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva

Instituição: FCFRP/USP

Assinatura_____

Prof(a). Dr(a). Pablo Eduardo Rosi

Instituição: UBA/Argentina

Assinatura_____

Aos meus pais, que me ensinaram o
valor da educação, da perseverança e
mesmo com a distância e a saudade,
nunca deixaram de me apoiar e
acreditar.

Aos meus avós e ao meu irmão,

Amo vocês

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann, por aceitar um bixo em seu laboratório por tanto tempo, pela amizade, pelas discussões produtivas, ensinamentos, orientação e principalmente pela confiança e incentivo.

À FeRnanda C. Costa, por me entender nas dificuldades ao longo do mestrado, pela paciência e principalmente por tornar mais feliz cada dia da minha vida.

Ao Dr. Humberto D'Muniz Pereira, pelo convite para integrar o projeto Projeto Puri-Piridinoma de *Schistosoma mansoni*, pelo apoio, pelas discussões e ensinamentos.

Ao doutorando José Fernando Ruggiero Bachega (gordo), pela amizade, pelo entusiasmo, pelas discussões e pela colaboração excepcional a este trabalho.

Ao Matheus P. Postigo, pela amizade e apoio cinético nos experimentos.

Ao Daniel de A. M. M. Silvestre, pela amizade, pelas colaborações desenvolvidas ao longo desses anos e pela paciência em me ensinar um pouco de computação. Ainda, agradeço ao Prof. Dr. Raymundo S. Azevedo, do LIM-01, HC-FMUSP, por gentilmente nos ceder o servidor utilizado em nossas simulações - *Libre* (CNPq, grant 306684/2006-3)

Ao Dr. Fernando Alessandro, pela oportunidade, ensinamentos e principalmente pela amizade ao longo da minha iniciação científica.

Aos companheiros no grupo de pesquisa Daian, Ivan (IVAN!), Marcos Michel (MM), Marco Túlio, Mamé, Raphaela Makki (Rapha), Izaltina Jardim (Iza), Gustavo Mercaldi (Gu), Giselle, Simone M. Duarte, Alexandre Cassago (Alê), Livia Faim, Livia Manzine, Fernando Maluf, Rê, Malu, Fer Batista, Tavinho, Napo, Livia Salum, Vivi, Fran, Ana, Vanessa, Jaque, Amanda, Lari, Ju, César, pelas agradáveis conversas, científicas ou não.

Aos professores do Grupo de Cristalografia e do Grupo de Biofísica, do Instituto de Física de São Carlos, pelas idéias dadas ao longo do trabalho.

Às técnicas Susana, Andressa, Bel e a Maria pela ajuda e pronta disposição no auxílio com os experimentos.

Aos meus amigos da Biomol, em especial ao Gustavo M.A. de Lima (Udi), Ivan R. e Silva (IVAN!), Paula L. Amaral (Paulinha), Hilde H. Buzza, Geraldo R. Sartori (Kx), Luciano B. Censoni (Storvo), Atilio T. Júnior, Rodrigo Berté, Wagner R. Correr (Esperto), Ricardo Nascimento e B2. Só nós sabemos o que foram aqueles 4! anos.

Aos meus amigos de Vila Velha – ES, que sempre fazem a minha “volta” para casa ser ótima!

À todos os amigos do grupo de Cristalografia, sem exceção, por todas as conversas, discussões, ajudas e pelas contribuições a este trabalho.

À Universidade de São Paulo, em especial ao Instituto de Física de São Carlos e ao Grupo de Cristalografia de Proteínas.

Às funcionárias da biblioteca do Instituto de Física de São Paulo, pela dedicação e trabalho exemplar.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que mesmo não sendo citados, contribuíram de forma construtiva para este trabalho.

There is no use trying, said Alice; one can't believe impossible things. I dare say you haven't had much practice, said the Queen. When I was your age, I always did it for half an hour a day. Why, sometimes I've believed as many as six impossible things before breakfast.

Lewis Carroll

RESUMO

CALDAS, V.E.A. **Adenina fosforibosiltransferase de *Schistosoma mansoni*: proposta de detalhamento do mecanismo catalítico por dinâmica molecular** 2011. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

A Adenina Fosforibosiltransferase (APRT – E.C. 2.4.2.7) pertence à família de enzimas Fosforibosil Transferases (PRTase) do Tipo I, que catalisa a conversão reversível de Adenina e 5-fosfo- α -D-ribose-1-difosfato (PRPP) em difosfato e adenosina monofosfato, um importante precursor energético da célula. A APRT integra a via de salvação de purinas, única forma de suprir o balanço de purinas em *Schistosoma mansoni*. Este trabalho apresenta o isolamento, clonagem, expressão heteróloga e purificação da APRT de *S. mansoni* a fim de caracterizá-la quanto seus parâmetros físico-químicos. Não se obtendo cristais de proteína, foram elaborados modelos tridimensionais por homologia para estudos de dinâmica molecular e avaliação conformacional *via* tCONCOORD. A estrutura de APRT humana foi usada como controle nas simulações. Os dados computacionais e de biologia molecular foram comparados entre si para validação mútua e, verificou-se que a análise cuidadosa de dados computacionais é capaz de fornecer informações críticas sobre a APRT, auxiliando e guiando os estudos experimentais. Ainda, as simulações de dinâmica molecular foram capazes de evidenciar a abertura de *loops* do sítio ativo, explicitar a importância da análise de rotâmeros em modelos, permitindo, então, rearranjar da forma correta resíduos erroneamente modelados. Como complementação ao mecanismo catalítico previamente descrito na literatura, sugerimos a participação de uma molécula de água abstraindo o próton ligado ao N9 da adenina e, ainda, um mecanismo alternativo independente desta participação.

Palavras-chave: Adenina fosforibosiltransferase, APRT. *Schistosoma mansoni*.

ABSTRACT

CALDAS, V.E.A. **Adenine phosphoribosyltransferase from *Schistosoma mansoni*: insights of the catalytic mechanism via molecular dynamics.** 2011. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

The Adenine Phosphoribosyltransferase (APRT – E.C.2.4.2.7) belongs to the Phosphoribosyltransferase enzyme family (PRTase) of type I which catalyzes the reversible conversion of adenine and 5-phospho- α -D-ribose-1-diphosphate (PRPP) in diphosphate and adenosine monophosphate, an important source of this compound for the cell. APRT is involved in the purine salvage pathway, the only way that *Schistosoma mansoni* has to supply its purine demands. This work shows the isolation, cloning, heterologous expression and the purification of APRT from *S. mansoni* in order to establish its physical chemical and kinetics parameters. Since its crystallographic structure was not obtained, we built homology based models to perform molecular dynamics experiments and conformational evaluation *via* tCONCOORD. The human APRT structure was used as control in the simulation experiments. The computational and molecular biology data were compared for consistency and the meticulous analysis of the former allowed us to improve experimental conditions of APRT. The molecular dynamics experiments also showed the opening of the loops of the catalytic binding site and the importance of correct rotamers. At last, we were able to suggest a water molecule that catches the proton from N9 adenine and also a direct mechanism. Both views would improve the current view about APRT catalytic mechanism.

Keywords: Adenine phosphoribosyltransferase. APRT. *Schistosoma mansoni*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 a) Regiões endêmicas de esquistossomose no Brasil. As regiões hachuradas indicam prevalência moderada - entre 10% e 49%. b) Distribuição continental da esquistossomose. Nota-se o impacto que essa doença tem sobre o continente africano (AFR). Adaptado⁴.. 30
- Figura 2 Ciclo de Vida do *S. mansoni*. 1 – Os ovos são liberados na água junto com as fezes do paciente. 2 – Os ovos eclodem na água liberando a larva miracídeo. 3 – O miracídeo penetra no caramujo. 4 – Os miracídeos se transformam em esporocistos primário e, em seguida, esporocistos secundários, que originam as cercarias. 5 - As cercarias são liberadas ao meio e nadam em busca de um hospedeiro vertebrado. 6 – As cercarias penetram pela pele humana. 7 – A cercaria perde a cauda e origina um esquistossômulo. 8 – Parasitas vão para o sistema circulatório. 9 – Parasitas se instalam no sistema porta-hepático e tornam-se adultos. 10 – Ovos saem com as fezes do hospedeiro, reiniciando o ciclo. Fonte . Center of Disease Control and Prevention, 2008 31
- Figura 3 Imagens especulares dos componentes da mistura racêmica do PZQ. O carbono assimétrico está evidenciado em amarelo.33
- Figura 4 Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em *S. mansoni*. 1. Adenosina Kinase (AK), 2. Adenilato kinase (ADK), 3. Nucleosídeo difosfato kinase (NDPK), 4. Metiltioadenosina fosforilase (MTAP), 5. Adenina fosforibosiltransferase (APRT), 6. Adenina desaminase (ADA), 7. Purina nucleosídeo fosforilase (PNP), 8. Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT), 9. Adenilsuccinato sintetase (ADSS), 10. Adenilsuccinato liase (ADSL), 11. IMP-desidrogenase (IMPDH), 12. Guanosina monofosfato sintetase (GMPS), 13. Guanilato kinase (GUANK), 14. Nucleosídeo difosfato kinase (NDPK) ^{24; 25} modificados.37
- Figura 5 Alinhamento parcial da APRT de diversos organismos. A barra vermelha superior indica o domínio de ligação ao PRPP, conservado em nas PRTases. Losangos indica os resíduos variados, círculos os resíduos hidrofóbicos e os triângulos, os resíduos ácidos. A cor de fundo cinza indica os resíduos conservados. Adaptado.³¹39
- Figura 6 Reação catalisada pela APRT. Conversão de Adenina + PRPP resultado em AMP + PPI. A reação ocorre na presença do íon Magnésio e é reversível 40
- Figura 7 Modelo da APRT humana (1ZN8) – monômero – explicitando os motivos descritos. Em azul claro (H1-S1-S2) está o "Loop flexível", em azul escuro (S5-S6), o "hood", em laranja (S7 e parte da H5) o domínio de ligação do PRPP 41

Figura 8	Desenho esquemático do programa de PCR utilizado para a amplificação do cDNA da adenina fosforibosiltransferase.....	46
Figura 9	Diagrama esquemático do sistema de purificação TALON IMAC.a) Microesfera de Sepharose com o quelante do íon níquel, o tetradentato. B) Proteína alvo conjugada com a cauda de poli histidina. b) A eluição ocorre com a protonação do nitrogênio (pKa= 5.97) presente no grupo imidazol, gerando um íon amônio carregado positivamente que repele a resina liberando a proteína. Alternativamente, a repulsão pode ser causada com o aumento da concentração de imidazol, competindo pelo sitio na resina. c) - Interação entre elétrons do nitrogênio do grupamento imidazol com o íon metálico de cobalto. Adaptado de Talon® Metal Affinity Resins – User manual. Clontech,.....	53
Figura 10	Diagrama de uma cromatografia por gel-filtração. A) Cromatograma típico em que as linhas azuis indicam a proteína de interesse e a linha vermelha os compostos de baixa massa molecular. b) Esquema de interação das partículas com a resina. As partículas são porosas e a velocidade com que uma partícula passa pela resida depende da relação de seu tamanho com o poro.....	55
Figura 11	Comportamento da curva de correlação das intensidades em medidas de DLS. A linha pontilhada indica um caso de correlação ideal, a linha tracejada indica a correlação de partículas grandes e a linha sólida de partículas pequenas.	57
Figura 12	Modelagem comparativa pelo programa MODELLER. Primeiramente, restrições espaciais na distância Inter atômica e ângulos diedros são extraídos da estrutura do <i>template</i> . O alinhamento determina os resíduos equivalentes para aplicar as restrições. Finalmente, o modelo é gerado e algoritmos de otimização são usados para melhor satisfazer os critérios estruturais. Adaptado 49.....	62
Figura 13	Esboço do potencial de Lenard-Jones, utilizado pelos campos de força AMBER e OPLS.	66
Figura 14	Modelos de água. O modelo usado, TIP3P e modelos mais detalhados., TIP4P, TIP5P e TIP6P.....	67
Figura 15	Algoritmo do tCONCOORD. Adaptado de http://wwwuser.gwdg.de/~dseelig/tconcoord	70
Figura 16	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio com os resultados da amplificação da APRT.....	71
Figura 17	Gel de Agarose com o produto de PCR utilizando uma colônia bacteriana como fonte para o template. A coluna 1 indica o marcador. Colunas 3, 5, 6, 8, 10 e 11 indicam colônias corretamente clonadas.	72

Figura 18	Estrutura gênica da região em que o gene da APRT foi clonado em vetor pET28a(+)	73
Figura 19	Corrida de purificação por afinidade em resina de Níquel. A seta azul indica a proteína APRT sendo eluída	74
Figura 20	Purificação por afinidade adotando-se degraus de diferentes concentrações de Imidazol. A barra azul indica absorbância a 280nm, em unidades arbitrárias e a barra verde indica percentagem de tampão B (com 500mM de Imidazol) na amostra	75
Figura 21	Gel de 15% SDS-Page 1) Marcador de massa molécula; 2) Lisado bacteriano; 3) Lisado após interagir com a resina (“flowthrough”); 4) Estabilização do primeiro patamar; 5) Primeira lavagem com 10% de tampão com 500mM de Imidazol; 6) Lavagem com 20%; 7) lavagem com 50% e pico de eluição da proteína	76
Figura 22	Gel de 15% SDS-PAGE com a clivagem por trombina. 1) Marcador de massa molecular; 2) Proteína, clivagem 0h; 3) Proteína, clivagem 6h; 4) Proteína, clivagem 14h	76
Figura 23	Cromatograma da gel filtração em Superdex 75. No detalhe, gel de 15% SDS-PAGE contendo: 1) Marcado de massa molecular; 2) Fração 9; 3) Fração 10; 4) Fração 11	77
Figura 24	Gel de focalização isoeletrica. Tem-se os valores de pI de cada marcador (coluna M) com os respectivos marcadores e as bandas de APRT na coluna 1	79
Figura 25	Sobreposição das medidas de Z-médio - por DLS - e de elipcidade molar - por CD, a 220nm	80
Figura 26	Variação de absorbância durante o experimento de cinética da APRT, com medida direta de produção de AMP. A linha em preto indica a maior velocidade obtida e a em vermelho, a menor velocidade	82
Figura 27	Variação da velocidade de reação com a variação de um substrato - a) PRPP e b) adenina, frente ao excesso do substrato complementar à reação	82
Figura 28	Alinhamento da APRT com estruturas conhecidas. As colunas em vermelho indicam conservação de determinado resíduo. Em laranja, a sequência do subdomínio “hood”. Em azul claro o domínio de ligação do PRPP. Ainda, acc indica acessibilidade ao solvente de um resíduo e hyd a hidrofobicidade	85
Figura 29	Estrutura Secundária - APRT predição PSIPRED. Estão representadas as estruturas secundárias, sendo as hélices enumeradas com “H” e as fitas indicadas por B. Ainda, representam-se os motivos β -turn. Os pontos em vermelho indicam resíduos interagentes ao ligante	86

Figura 30	Sobreposição das estruturas cristalográficas evidenciando o alinhamento entre estruturas secundárias. A) Alinhamento entre as estruturas 1G2Q e 1ZN8. B) Alinhamento entre as estruturas 2DYO e 1ZN8. Não há correlação entre cor e pontuação para dado alinhamento.	86
Figura 31	Gráfico de valores de DOPE, em módulo. As estruturas com energias mais favoráveis serão aquelas com maior escore. Modelos considerando o molde 1G2Q, de <i>S. cerevisiae</i> . Esse valor de energia não possui significado físico direto, sendo uma forma de classificação das estruturas.	87
Figura 32	Diagrama de Ramachandran para os modelos gerados para a APRT, tendo como molde a estrutura humana 1ZN8. O modelo final utilizado foi otimizado quanto aos loops, restando apenas o resíduo Ser257 em região proibida. Acima de cada diagrama está o modelo ...	89
Figura 33	Comparação de parâmetros do modelo com o banco de dados de estruturas A linha central indica a média e as extremidades o intervalo de variação aceita. O ponto vermelho indica em que região encontra-se o modelo da APRT por homologia.	91
Figura 34	Modelo tridimensional da Adenina Fosforibosil Transferase de <i>S. mansonii</i> . Em destaque, a localização dos resíduos de cisteína.	92
Figura 35	Dados de espalhamento dinâmico de luz. A curva verde refere-se à hisAPRT e a curva vermelha à APRT. Nota-se o deslocamento do ponto de máximo na curva de intensidade relativa ao tamanho.	93
Figura 36	Representação física do raio hidrodinâmico observado nas medidas de DLS. a) APRT com cauda de histidina, hisAPRT; b) APRT com a cauda clivada, APRT.	94
Figura 37	Alinhamento entre a APRT de <i>S. mansonii</i> e os modelos humanos utilizados.	95
Figura 38	Gráfico do RMSD comparativo entre os modelos estudados. As regiões 1 e 3 são os <i>loops</i> aceptores de substrato para direcionamento ao sítio ativo e a região 2 compreende um <i>loop</i> que foi bloqueado cristalograficamente. Na legenda, hs indica o <i>Homo sapiens</i> ; DM: Dinâmica molecular, X: cristalografia, TC: tCONCOORD. AMP indica que esse modelo estava com AMP em seu sítio ativo.	96
Figura 39	Modelo em <i>cartoon</i> , comparando as flutuações da cadeia principal da estrutura cristalográfica (vermelho) e do modelo teórico obtido na simulação de dinâmica molecular.	96
Figura 40	a) Modelo em <i>cartoon</i> mostrando os contatos cristalinos, onde o loop 2 de uma unidade do cristal interage com os loops 1 e 3 de outra unidade, de forma a estabilizá-lo. b) Ampliação da região descrita.	97

Figura 41	Gráfico do RMSD comparativo entre os modelos estudados. As regiões 1 e 3 são os <i>loops</i> aceptores de substrato para direcionamento ao sítio ativo e a região 2 compreende um <i>loop</i> que foi bloqueado cristalograficamente. Na legenda, Sm indica o <i>Schistosoma mansoni</i> ; DM: Dinâmica molecular, TC: tCONCOORD. AMP indica que esse modelo estava com AMP em seu sítio ativo.....	97
Figura 42	Representação das conformações <i>cis</i> e <i>trans</i> para a trinca do grupo 1, para a estrutura de APRT de <i>G. lamblia</i> . Adaptado. ²⁹	98
Figura 43	Representação gráfica do rearranjo da Val129. Em cinza, o modelo de <i>S. mansoni</i> , na conformação desfavorável e em verde, a humana, com a conformação favorável.	99
Figura 44	Representação da correta orientação dos resíduos R25 e R67, com as ligações de hidrogênio evidenciadas em amarelo.	100
Figura 45	Esquema das interações feitas pela molécula de água, adenina e PRPP na dinâmica molecular baseada na estrutura 1ZN7.	101
Figura 46	Mecanismo proposto da APRT envolvendo a molécula de água. a) Molécula de água doa um próton para o oxigênio do PRPP. b) Hidrogênio da adenina é doado ao recém formado íon hidroxila e reestabelece a molécula de água. c) A adenina desprotonada, nucleofílico, ataca o carbono do PRPP; d) a ligação entre Adenina e PRPP é formada; e) Grupo pirofosfato é deslocado, dando origem ao AMP e P _i . Baseada em momentos da dinâmica molecular.	101
Figura 47	Esquema de interação presente no sítio ativo para a configuração 2. Nota-se a interação direta entre adenina e PRPP.	102
Figura 48	Mecanismo proposto para a APRT envolvendo ataque direto. a) Ocorre a interação direta entre a adenina e o PRPP. b) Ocorre a protonação do grupamento Pirofosfato, levando à formação de uma Base de Lewis. c) A base ataca o C1 da ribose d) O P _i é deslocado formando AMP. Baseado em instantes da dinâmica molecular	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estruturas conhecidas de APRTs retiradas do <i>Protein Data Bank</i> 41
Tabela 2	Reações das etapas de síntese de cDNA.45
Tabela 3	Sequência dos primers, suas enzimas e as sequências alvo. Em vermelho, destaca-se o sítio de clivagem e a barra (“/”) indica o ponto de clivagem. 46
Tabela 4	Componentes da Reação em cadeia da polimerase.47
Tabela 5	Reação de adenilação do DNA47
Tabela 6	Reação de ligação do inserto no vetor pGEM®-T Easy Vector. 48
Tabela 7	Reação de PCR de colônia..... 49
Tabela 8	Reação de digestão padrão 50
Tabela 9	Transformação em vetor de expressão pET28a. 51
Tabela 10	Compilação dos parâmetros físico-químicos teóricos da Adenina Fosforibosil Transferase com cauda de poli-histidinas(hisAPRT) e após clivagem (smAPRT) e comparação com proteínas já cristalizadas. A saber, 1G2Q - APRT de <i>S. cerevisiae</i> , 1ZN8 - <i>Homo sapiens</i> e 1L1Q – <i>Giardia lamblia</i>78
Tabela 11	Compilação de dados da cinética enzimática 83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMP – Adenina monofosfato

APRT – Adenina fosforibosiltrasnferase – *Adenine phosphoribosyltransferase*

DALY – Disability Adjusted Life Days

DLS – Dynamic Light Scatering – Espalhamento Din6amico de luz

DTT - Ditiotreitól

K_M – Constante de Michaelis-Menten

PPi – Difosfato

PRPP – 5-phospho- α -D-ribose-1-diphosphate

PRT – Phosphoribosyltrasnferase - fosforibosiltransferase

PCR – Polimerase Chain Reaction – Reaç3o em cadeia da polimerase

PDB – Protein Data Bank

PZQ –P raziquantel

XO – xantina oxidase

WHO – Wolrd Health Organization – Organizaç3o Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	Introdução	29
1.1	Esquistossomose	29
1.1.1	Caracterização	29
1.1.2	Prevenção, Tratamento e controle.....	31
1.1.3	O genoma do <i>Schistosoma mansoni</i>	35
1.2	Via de Salvação de Purinas – Metabolismo de Purinas em <i>Schistosoma mansoni</i>	35
1.3	Fosforibosiltransferases (PRT) e Adenina Fosforibosil Transferase (APRT) ..	38
1.3.1	Estruturas conhecidas.....	40
1.3.2	Cinética da APRT	42
1.4	Objetivos.....	43
1.4.1	Objetivos específicos	43
2	Materiais e Métodos.....	45
2.1	Materiais e Métodos – Etapa experimental.....	45
2.1.1	Obtenção da biblioteca de cDNA de <i>Schistosoma mansoni</i> adulto	45
2.1.2	Amplificação do cDNA da enzima Adenina Fosforibosil Transferase de <i>Schistosoma mansoni</i>	46
2.1.3	Adenilação do gene, ligação ao vetor pGEM-T Easy Vector® para propagação e sequenciamento do inserto	47
2.1.4	Transformação em células competentes.....	48
2.1.5	Digestão do pGEM-T Easy Vector com enzimas de restrição	50
2.1.6	Ligação em vetor de expressão pET28a(+) e transformação em bactéria competente <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	50
2.1.7	Expressão heteróloga da enzima Adenina Fosforibosil Transferase	51
2.1.8	Purificação da enzima APRT de <i>Schistosoma mansoni</i>	52
2.1.9	Ensaio de estabilidade e concentração da proteína	55
2.1.10	Focalização Isoelétrica	58
2.1.11	Ensaio de atividade enzimática	59
2.1.12	Ensaio de cristalização	60
2.2	Materiais e Métodos – Etapa computacional	61
2.2.1	Modelagem Molecular por Homologia	61
2.2.2	Dinâmica Molecular	63

3	Resultados e Discussão	71
3.1	Amplificação das isoformas do cDNA da enzima Adenina Fosforibosil Transferase de <i>Schistosoma mansoni</i>	71
3.2	Adenilação do gene, ligação ao vetor pGEM e transformação em bactérias competentes.	71
3.3	Clonagem da APRT no vetor de expressão pET28a	72
3.4	Expressão e Purificação da enzima APRT	73
3.5	Características Físico-Químicas da APRT	78
3.6	Ensaio de estabilidade frente à temperatura e concentração	80
3.7	Cinética enzimática	81
3.8	Ensaio de cristalização	83
3.9	Modelagem Molecular por homologia.....	84
3.9.1	Predição de Estrutura Secundária	85
3.9.2	Modelagem Molecular	87
3.9.3	Validação dos modelos gerados.....	88
3.9.4	.Predição de pontes Dissulfeto e Resíduos expostos de Cisteína.	91
3.10	Determinação do raio hidrodinâmico e dispersividade da amostra	92
3.11	Análises estruturais pela dinâmica molecular e tCONCOORD	94
3.11.1	Análise de variação conformacional	95
3.11.2	Análise conformacional do sítio ativo por Dinâmica Molecular	98
3.11.3	Análise do mecanismo de reação.....	100
4	Conclusão	105
5	Perspectivas	107
	Referências	109
	Apêndice A Tabela de evolução da Esquistossomose, baseado em dados da WHO.	119
	Apêndice B Interações do sítio ativo da APRT humana-1ZN8 e 1ZN7.....	120

1 Introdução

1.1 Esquistossomose

1.1.1 Caracterização

A esquistossomose – popularmente conhecida como Barriga D’água ou bilharzíase – é uma doença parasitária causada por um ou mais membros do gênero *Schistosoma*. Das espécies mais importantes, pode-se citar o *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. mekongi* e *S. intercalatum*. Dessas espécies, somente a primeira é endêmica no Brasil^{1; 2; 3; 4}.

O parasita possui um ciclo heteroxênico, cujo desenvolvimento é alternado entre um hospedeiro intermediário – um molusco – e o hospedeiro definitivo – mamífero. Ambos são essenciais para reprodução do parasita⁴.

Em humanos, a natureza da doença é essencialmente imunológica, tendo um aumento significativo de fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas IL1 e IL6, na fase aguda da doença, e apenas uma parte corresponde aos efeitos diretos do metabolismo do parasita sobre o tecido do hospedeiro. As lesões patológicas apresentadas resultam de reações alérgicas causadas pelo grande número de ovos produzidos diariamente pelo verme adulto, sendo que grande parte desses são retidos nos tecidos pelo hospedeiro, induzindo a produção de T helpers 2 (T_H2) e a outra parte, é expelida nas fezes e urina, que em contato com a água, eclodem e infectam o hospedeiro intermediário^{4; 5}.

A maioria das espécies de *Schistosoma* causam infecção intestinal no hospedeiro mamífero, uma vez que o verme adulto se aloja nas veias mesentéricas do intestino. Em um estágio avançado são observados casos graves de hepatomegalia, esplendomegalia, disfunções cognitivas, anemia e atraso no crescimento⁶.

Segundo o relatório da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization – WHO) – atualmente, calcula-se que 700 milhões de pessoas

atividades agrícolas, recreativas ou domésticas. Ainda, é estimado que 207 milhões de pessoas estejam infectadas, distribuídas em 74 países, sendo que somente 120 milhões são sintomáticas e 20 milhões com a forma severa da doença⁷. A maioria das pessoas contaminadas encontra-se em comunidades pobres, sem acesso à água tratada e saneamento básico.

O continente africano abriga mais de 85% dos casos mundiais de infecções humanas por *Schistosoma*. O Brasil por sua vez responde por mais de 6,5 milhões de infectados e por mais de 42 milhões de pessoas requerendo tratamento profilático⁴ ressaltando a importância deste parasito.

Sendo a esquistossomose endêmica de regiões tropicais e subtropicais, a distribuição dos focos depende essencialmente da presença do hospedeiro intermediário e das atividades humanas exercidas na região, levando à contaminação da água e por consequência das pessoas que a utilizam¹, uma vez que a contaminação está diretamente associada com as condições socioeconômicas da população, por sua transmissão ocorrer justamente pela utilização de água contaminada com a forma larval do parasita.

O hospedeiro intermediário é específico para cada espécie e região. No caso da América, o *Schistomoma mansoni* tem como hospedeiros os caramujos do gênero *Biomphalaria*. Especificamente, a esquistossomose mansônica é encontrada na maioria dos países da África Subsaariana, Egito, Líbia, Brasil, Suriname, Venezuela e algumas ilhas do Caribe. No Brasil, os focos estão concentrados na região Nordeste, nos estados de Minas Gerais e Pará (Figura 1)⁴

Figura 1 – a) Regiões endêmicas de esquistossomose no Brasil. As regiões hachuradas indicam prevalência moderada - entre 10% e 49%. b) Distribuição continental da esquistossomose. Nota-se o impacto que essa doença tem sobre o continente africano (AFR). Adaptado⁴

1.1.2 Prevenção, Tratamento e controle.

O *S. mansoni* possui um ciclo de vida heteroxêmico (Figura 2), alternando entre um hospedeiro intermediário, sendo no Brasil os caramujos do gênero *Biomphalaria*, e um hospedeiro definitivo, no caso, o homem, onde ocorre a fase sexuada da do ciclo de vida do parasita ⁸.

Figura 2 – Ciclo de Vida do *S. mansoni*. 1 – Os ovos são liberados na água junto com as fezes do paciente. 2 – Os ovos eclodem na água liberando a larva miracídeo. 3 – O miracídeo penetra no caramujo. 4 – Os miracídeos se transformam em esporocistos primário e, em seguida, esporocistos secundários, que originam as cercárias. 5 - As cercárias são liberadas ao meio e nadam em busca de um hospedeiro vertebrado. 6 – As cercárias penetram pela pele humana. 7 – A cercária perde a cauda e origina um esquistossômulo. 8 – Parasitas vão para o sistema circulatório. 9 – Parasitas se instalam no sistema porta-hepático e tornam-se adultos. 10 – Ovos saem com as fezes do hospedeiro, reiniciando o ciclo. Fonte . Center of Disease Control and Prevention.

Estima-se que o parasita possua um metabolismo bastante ativo, produzindo cerca de centenas a milhares de ovos por dia. Estudos indicam que esta fecundidade persista por anos e, portanto representa um exemplo de uma capacidade biosintética altamente especializada⁹

A prevenção da contaminação por *Schistosoma* e do estabelecimento da esquistossomose, como em outros parasitos humanos, consiste na interrupção do ciclo de vida do parasito (Figura 2). No caso de *Schistosoma* esta abordagem se baseia no fornecimento de água potável tratada, livre de cercarias e ovos para evitar novos casos na população. Quando possível, o controle dos caramujos pode ser considerado uma forma de diminuir ou erradicar o surgimento de novos casos de infecção na população de áreas endêmicas. Este quadro se baseia fundamentalmente em fornecer saneamento básico a população afetada^{4; 10}.

A profilaxia da enfermidade, uma vez estabelecida no paciente e adequadamente diagnosticado o quadro parasitêmico, consiste na administração de um único fármaco, o praziquantel (PQZ) e mesmo que de baixo custo – em torno de U\$1.00 por tratamento, esse está atualmente limitado pela disponibilidade do medicamento, logística de distribuição e controle de administração. É interessante salientar que o gasto total necessário para o tratamento de populações afetadas em muitos países africanos é superior ao gasto per-capita em programas de saúde pública e saneamento desses países⁷. Dentro desse contexto estima-se que, para atender profilaticamente à África Subsaariana seriam necessários U\$200 milhões/ano. O tratamento é puramente esquistossomicida, visando amenizar os sintomas da doença e evitar que esta se desenvolva para a forma severa¹¹.

A utilização exclusiva do PZQ no tratamento gera uma situação potencialmente perigosa, visto que o surgimento de formas resistentes já é amplamente reportada^{12; 13}. Esta situação mundial demanda o desenvolvimento de novos fármacos. Atualmente, por exemplo, é administrada uma mistura racêmica (1:1) das formas R e S de PZQ (Figura 3), porém, foi demonstrado por Meyer e colaboradores¹⁴ que o isômero (R)-Praziquantel é o responsável pela atividade esquistossomicida. A prioridade da produção do isômero ativo isolado com baixo custo encontra-se entre as metas da WHO³.

Figura 3 – Imagens especulares dos componentes da mistura racêmica do PZQ. O carbono assimétrico está evidenciado em amarelo.

O relatório recente da Organização Mundial de Saúde aponta que mais de 19 milhões de pessoas foram tratadas para a esquistossomose em 2009². Vê-se a necessidade de fornecer medicamentos adequados para os quase 180 milhões de enfermos restantes. Fica explícito a necessidade de se investigar novos fármacos tanto para potencializar a ação do PZQ quanto para o início de novas abordagens terapêuticas a fim de evitar o estabelecimento de formas resistentes ao PZQs¹⁵. Entretanto, nesse caso deve ser levado em conta que quando o foco da pesquisa é uma doença negligenciada, como é o caso da esquistossomose, o desenvolvimento de novos fármacos apresenta problemas estruturais graves que limitam os estudos. A capacidade de mover-se da pesquisa para o desenvolvimento e produção em larga-escala já está disponível em vários centros, porém estes não estão voltados para o escalonamento e padronização requeridos para manufatura e início de testes clínicos de fase I e II. Esse gargalo sistemático precisa ser revisto, modificado e receber investimentos o quanto antes para que a busca seja feita de forma eficiente¹⁵.

Outro fator a ser considerado é o elevado impacto econômico e social que a esquistossomose tem nas regiões endêmicas. No Brasil, o recente trabalho de Sarvel e colaboradores¹⁰ descrevem os resultados das medidas de controle da esquistossomose adotadas no estado de Minas Gerais nos últimos 25 anos. Tal estudo reforçou a importância das medidas de saneamento básico no controle da doença. Nesse período, o fármaco pós-infecção utilizado foi a oxamniquina, alternativa de segunda escolha ao PZQ, sendo administrado a mais de 13 milhões de pessoas e a relação entre a diminuição no número de casos e sua severidade com a melhora na qualidade de vida das pessoas infectadas é bastante evidente¹⁰, reforçando a eficácia de programas de tratamento.

Ainda como exemplo do impacto social da doença, um estudo feito nas Filipinas reporta que 45,4 dias de trabalho são perdidos por ano por pessoa contaminada. O *Global Burden Report - WHO*, de 2004 faz projeções dos cenários de diversas doenças, e ainda extrapola para um cenário otimista e um pessimista. Apêndice A. Nesta tabela, está correlacionado tanto o número total de vítimas fatais quanto à perda em DALYs (*Disability-Adjusted Life Years* - Anos de vida ajustados por incapacidade), permitindo uma noção global da evolução das principais causas de morte e a evolução de determinadas doenças.

À critério de comparação e descrição do cenário, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – SIDA, causada pelo HIV (Human Immunodeficiency Virus) continuará representando a principal doença infecciosa. Dentre as doenças tropicais, a esquistossomose se mantém como a segunda doença com maior impacto social. Mesmo notando um decréscimo nas taxas de mortalidade e de DALYs, fica explícito o problemas decorrentes da falta de uma política mais abrangente e eficiente de combate à esquistossomose. Comparando-se as projeções de 2015 e 2030 verifica-se os óbitos decorrentes de esquistossomose comparada com todas as doenças tropicais aumentam de 30.95% para 35.8% que correspondem a 1.39% e 2.18% respectivamente para a SIDA. A mesma comparação considerando DALYs revela que em 2105, 15,34% dos dos DALYs relativos à doenças tropicais serão causados por infecções por *Schistosoma* e essa percentagem aumenta para 16,38% em 2030¹.

Nota-se que os recursos atuais disponíveis bem como as projeções não serão suficientes para melhorar o panorama tanto de doenças tropicais quanto a esquistossomose especificamente. Mesmo com as previsões otimistas, a esquistossomose tende a aumentar seu impacto socioeconômico, principalmente em países africanos que, em 2030, serão responsáveis por mais de 90% das mortes causadas por *Schistosoma*. No continente americano o cenário se repete, mantendo-se as proporções. Porém, sabe-se que os valores estão subestimados pois os efeitos secundários das doenças, o que poderia aumentar ainda mais os valores não estão contabilizados nas atuais projeções. Alguns autores ainda defendem que DALYs não refletem a real severidade das doenças tropicais nem o decaimento na qualidade de vida, tornando o cenário ainda mais preocupante¹.

1.1.3 O genoma do *Schistosoma mansoni*

O *Schistosoma mansoni* foi teve seu genoma publicado e analisado primeiramente em 2009¹⁶. Ao todo, possui sete pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais (sendo fêmeas=ZW e machos=ZZ)¹⁶. O tamanho dos cromossomos varia de 18 a 73 mega pares de bases e podem ser classificados por tamanho, forma e “C branding”. Foram ainda identificados 11809 genes putativos e 13197 transcritos ¹⁶. Segundo o *Taxonomy Browser*, do *National Center of Biotechnology Information*, há, em Julho de 2011, 13263 genes e 27690 proteínas codificadas por esse genoma. Dessas, apenas 10 têm sua estrutura cristalográfica conhecida, divididas em 36 estruturas, com diferentes ligantes, depositadas no *Protein Data Bank*.

O projeto genoma do *S. mansoni* permite, então, uma abordagem de busca de novos fármacos baseada na existência de um alvo pré-determinado ¹⁷. Utilizando uma estratégia baseada em alvos e monitorando a emissão de NO em culturas de *S. mansoni*, tioredoxina glutationala redutase foi validada como alvo. Outros potenciais derivados dessa abordagem são quinases, fosfatases, neuropeptídios e canais iônicos.

Nesse contexto, a via de salvação de purinas também se apresenta como potencial alvo, visto que é a única rota de obtenção de bases nitrogenadas para o metabolismo do parasita, que tem uma alta demanda de um ativo metabolismo de nucleotídeos de purina, tanto como fonte de energia (ATP) como para o suprimento de bases de purina nas sínteses de DNA e RNA⁹.

1.2 Via de Salvação de Purinas – Metabolismo de Purinas em *Schistosoma mansoni*

Nucleotídeos de purina são requeridos em todos os organismos para síntese de DNA, RNA e outros metabólitos, como ATP. Em organismos vivos, existem duas formas de serem sintetizados: a via “de novo” e a via de salvação de purinas. A via “de novo” – utilizada preferencialmente em humanos – inicia com a condensação de guanina e α -D-5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) terminando em inosina

monofosfato após uma sequência de dez reações¹⁸. Por outro lado, a via de salvação de purinas - única forma de obtenção de nucleotídeos para vários parasitas, como *Toxoplasma. gondii*¹⁹, por exemplo - é caracterizada pela reutilização de metabólitos provenientes da degradação de RNA e DNA²⁰.

Senft e colaboradores (1972), em seu trabalho sobre metabolismo de purinas em *S. mansoni*, mostraram uma rápida incorporação de adenina em nucleotídeos e não conseguiram determinar a incorporação de ¹⁴C-glicina e ¹⁴C-glucose no anel purínico e, uma rápida formação de purinas com a incubação de ¹⁴C-adenina⁹. Esta evidência tanto sugere uma grande dependência de um suprimento externo de bases pré-formadas para a síntese de nucleotídeos, como a perda, ou mesmo ausência, da via “de novo” de síntese de purinas pelo parasita durante sua evolução.⁹ Essa ausência foi confirmada posteriormente por Dovey e colaboradores²¹.

Deste modo, o *S. mansoni*, ao contrário do seu hospedeiro humano, não possui a via biosintética de purinas “de novo” e depende da via de salvação para o suprimento de ATP e GTP, além de síntese de coenzimas e ácidos nucleicos¹⁸. Sendo assim, a dependência de purinas pré-formadas e a existência somente da via de salvação para conversão de bases e nucleosídeos em nucleotídeos é um indício de que essas vias poderiam ser afetadas por análogos de purinas, sugerindo-a como um alvo interessante para o desenvolvimento de fármacos para o combate da esquistossomose e outras doenças¹⁸. Coerente com esta hipótese são as observações de Senft e Crabtree²² e de Ross e Jaffe²³ de que vários análogos de purinas inibem enzimas da via de salvação e que um deles, 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 10⁻⁷M, além de que, a administração desses compostos afeta de forma mais intensa as vias do parasita do que as de mamíferos.²⁰

Ross e Jaffe²³ mostraram ainda que tubercidina pode ser usada como agente anti-esquistossomose em macacos, porém é bastante tóxico em humanos. Esse contexto remete a possível fragilidade no ciclo de vida parasitário caso ocorra a interrupção da via de salvação de purinas, devido à condição metabólica instável do parasita.

A via de salvação é mantida por um complexo conjunto de proteínas e tendo a adenosina, o principal precursor de purinas, como ponto de partida. Senft e

colaboradores²², compilaram em seu trabalho a via de salvação de purinas, tendo como foco a via em *S. mansoni* (Figura 4).

Figura 4 – Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em *S. mansoni*. 1. Adenosina Kinase (AK), 2. Adenilato kinase (ADK), 3. Nucleosídeo difosfato kinase (NDPK), 4. Metiltioadenosina fosforilase (MTAP), 5. Adenina fosforibosiltransferase (APRT), 6. Adenina desaminase (ADA), 7. Purina nucleosídeo fosforilase (PNP), 8. Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT), 9. Adenilsuccinato sintetase (ADSS), 10. Adenilsuccinato liase (ADSL), 11. IMP-desidrogenase (IMPDH), 12. Guanosina monofosfato sintetase (GMPS), 13. Guanilato kinase (GUANK), 14. Nucleosídeo difosfato kinase (NDPK) ^{24; 25} modificados.

Nota-se que o parasita dispõe de três formas de converter adenosina nos metabolitos de interesse, como ATP e GTP. A via direta, pela converção de Adenosina diretamente em AMP, pela ação da adenonisa kinase (E.C. 2.7.1.20); a via indireta, pela sequencia de reações Adenina-Inosina-Hipoxantina-IMP-AMP, sendo essa via consideravelmente mais ativa; e a via alternativa, em que a Adenosina é convertida

em Adenina e posteriormente em AMP, pela ação da Adenina Fosforibosiltransferase (E.C. 2.4.2.7) (Figura 4).

A APRT foi primeiramente identificada em *S. mansoni* por Crabtree e colaboradores²⁶, cuja presença foi demonstrada *in vivo*. Senft e colaboradores²⁷ demonstraram ainda que a APRT está presente em vermes adultos – assim como HGPRT e adenosina kinase. Em termos cinéticos, a APRT mostrou ser capaz de produzir AMP em uma velocidade dez vezes maior que a adenosina kinase. Ainda, o caminho alternativo, utilizando as enzimas Adenosina deaminase → Purina Nucleosídeo Fosforilase → HGPRT tem a última com etapa limitante, cuja velocidade de reação é menor que a da APRT reforçando a importância desta no fornecimento de AMP²⁷, sendo, então, é responsável por grande parte de sua síntese²⁸.

A caracterização das enzimas dessa via, tanto cinética quanto estrutural nos permitirá formular um modelo de estudo para a via completa e, posteriormente, o estudo racional de inibidores enzimáticos.

O presente trabalho tem como foco principal o estudo da enzima Adenina Fosforibosiltransferase (APRT), uma das enzimas responsáveis pela formação de AMP, convertendo adenina em AMP na via de salvação de purinas.. A APRT é uma dessas importantes proteínas, e foi reportada como potencial alvo para fármacos ²⁹.

1.3 Fosforibosiltransferases (PRT) e Adenina Fosforibosil Transferase (APRT)

As Fosforibosil Transferases (PRT) são uma família homóloga de proteínas catalíticas e proteínas regulatórias do mecanismo de síntese de nucleotídeos e da via de salvação de purinas³⁰. Nem todas as PRTs são enzimas além de que nem todas as proteínas com atividade PRT se incluem nessa família. Por exemplo, em algumas bactérias, proteínas da família das PRTs regulam a expressão de genes da síntese de purinas e pirimidinas³⁰.

As proteínas dessa família com atividade catalítica, as PRTases, englobam a maioria dos membros das PRT. A classificação de uma proteína como PRTase inclui a avaliação quanto ao enovelamento e por um motivo na estrutura primária, que

Figura 5 – Alinhamento parcial da APRT de diversos organismos. A barra vermelha superior indica o domínio de ligação ao PRPP, conservado em nas PRTases. Losangos indica os resíduos variados, círculos os resíduos hidrofóbicos e os triângulos, os resíduos ácidos. A cor de fundo cinza indica os resíduos conservados. Adaptado.³¹

As enzimas da família das Fosforibosil Transferases (PRTases) catalisam, em uma reação dependente de Mg^{++} , a substituição do grupo 1-pirofosfato do PRPP(5-fosfo- α -D-ribose-1-difosfato) por uma base de purina (adenina, guanina, hipoxantina ou xantina) para formar o nucleosídeo correspondente na forma ‘nucleosídeo-5-monofosfato’³¹. O PRPP é o metabólito central que conecta a síntese de nucleotídeos à via de salvação de purinas³⁰. As PRTases têm papel crucial na salvação de purinas em diferentes organismos, inclusive o *S. mansoni* ³².

As PRTases podem ser divididas em dois grandes grupos: PRTases tipo I, que tem um enovelamento do tipo α/β que forma o sítio de ligação ao PRPP e PRTases tipo II, que não apresentam o domínio de ligação ao PRPP e fazem parte do mecanismo de síntese e salvação de triptofano, histidina e nicotinamida, por exemplo.³⁰.

A Adenina Fosforibosil Transferase (APRT – E.C. 2.4.2.7), é uma PRTase tipo I que catalisa reversivelmente a reação entre Adenina e PRPP para a formação de AMP e PPi (Figura 6), o principal precursor de ATP da célula.

Figura 6 - Reação catalisada pela APRT. Conversão de Adenina + PRPP resultado em AMP + PPi. A reação ocorre na presença do íon Magnésio e é reversível

As funções primárias da APRT – ou APRTase - presente em mamíferos, bactérias, fungos e plantas são a de reciclagem de adenina e salvação de purinas ³³. Em humanos, sua função é de reciclar a adenina formada pela via de poliaminas. A deficiência de APRT resulta na oxidação inapropriada da adenina à 2,8-dihydroxyadenina, que é um metabólito insolúvel responsável pela Urotiliase e capaz de causar falência renal após anos de acumulo ³². Os sintomas são variáveis e reversíveis com a remoção da 2,8-diidroxiadenina. Os efeitos relativamente brandos em humanos tornam a APRT um potencial alvo para o desenvolvimento de fármacos inibidores da via para o tratamento de infecções parasitárias ao bloquear a via de salvação e a da síntese de poli aminas, uma vez que essa via é essencial para a vida do parasita²⁹.

1.3.1 Estruturas conhecidas

A APRT possui diversas estruturas cristalográficas resolvidas, como indicado na Tabela 1, sendo o Grupo de Cristalografia, do Instituto de Física de São Carlos – USP responsável por cinco dessas estruturas.

Como muitas famílias de proteínas, as PRTases foram identificadas devido à similaridade de sequência e, posteriormente, confirmada pela similaridade estrutural. Praticamente todas as PRTases possuem um motivo, indicado na figura 7, conservado de ligação ao PRPP (Figura 5). O motivo foi, ainda, confirmado como sendo o de ligação do PRPP³⁰.

Tabela 1 - Estruturas conhecidas de APRTs retiradas do *Protein Data Bank*

PDB	Ligante	Resolução(Å)	Organismo	Ano
1MZV	AMP + PO ₄	2.2	<i>Leishmania tarentolae</i>	2004
1ORE	AMP + CL	2.1	<i>Homo sapiens</i>	2004
1G2Q	APO	1.5	<i>Sacharomices cerevisiae</i>	2001
1QB7	ADE	1.5	<i>Leishmania donovani</i>	1999
1QB7	CIT + MG	1.5	<i>Leishmania donovani</i>	1999
1QB8	AMP + CIT	2	<i>Leishmania donovani</i>	1999
1QB8	MG	2	<i>Leishmania donovani</i>	1999
1QCC	CIT	1.98	<i>Leishmania donovani</i>	1999
1QCD	SO ₄	2.48	<i>Leishmania donovani</i>	1999
1ZN7	ADE + HSX + MG + SO ₄ + PRP	1.83	<i>Homo sapiens</i>	2008
1ZN8	AMP + CL	1.76	<i>Homo sapiens</i>	2008
1ZN9	AMP	2.05	<i>Homo sapiens</i>	2008
2DY0	MG	1.25	<i>E. coli</i> K12	2007

Figura 7 - Modelo da APRT humana (1ZN8) – monômero – explicitando os motivos descritos. Em azul claro (H1-S1-S2) está o "Loop flexível", em azul escuro (S5-S6), o "hood", em laranja (S7 e parte da H5) o domínio de ligação do PRPP

As PRTases ainda possuem um núcleo comum, formado por 5 fitas- β paralelas (S4-S3-S7-S8-S9) entre camadas de hélices- α (H2 e H3) em uma face e H5 e H6 em outra face e também um *loop* catalítico que acredita se fechar no sítio ativo durante a

catálise ³⁴. O PRPP liga-se associado a um metal bivalente, geralmente o Mg^{++} e, seu sítio de ligação pode ser dividido em três *loops*: 1) “PPi *loop*”, entre S7 e H5 ; 2) “*flexible loop*”, entre b2 e b3; 3) “PRPP I *loop*”, entre S3 e H3, como pode ser observado na Figura 7.

O *S. mansonii* possui uma sequência codificante para a APRT, a Smp_054360, com identidade sequencial de 39% em relação a humana, 40% em relação a de *E. coli* e 47% em relação a de *S. cerevisiae*.

Essas semelhanças foram o ponto de partida para a análise de similaridade, modelagem estrutural por homologia e parâmetros físico-químicos para o estudo da APRT.

1.3.2 Cinética da APRT

Baschor e colaboradores, em 2002 ³⁵ afirmavam que os estudos relativos à cinética da APRT são escassos comparados aos de outras PRTases.

O sítio ativo é estruturalmente conservado para as APRTs, reforçando a semelhança no mecanismo³⁶. Seguindo o mecanismo das PRTases Tipo I, têm-se mostrado que as APRTs ligam-se primeiramente ao PRPP seguido de adenina em um mecanismo Bi-Bi aleatório (“*random Bi-Bi mechanism*”). Porém, é ainda sugerido que a adenina pode se ligar ao sítio ativo na ausência PRPP, como visto na estrutura cristalográfica de *Leishmania donovani*³⁷. Porém, Si e colaboradores não eliminaram a hipótese de outros tipos de mecanismo²⁹.

Complementando-se, é sugerido que a APRT segue um mecanismo de ataque nucleofílico no C1, onde primeiramente é liberado o pirofosfato e depois o nucleotídeo. Nesse caso, os grupos que atacam e os que deixam o sítio são mantidos bem próximos de seus respectivos bolsões de ligação (“*binding pockets*”) e o C-1 do AMP transloca-se entre os nucleófilos. praticamente imóveis ²⁹

Caso seja descrito como um mecanismo de substituição nucleofílica do tipo I – SN1 – há formação de um intermediário carregado positivamente – carbocátion – e, caso seja um mecanismo de Substituição Nucleofílica tipo 2 – SN2 – a enzima promove um ataque nucleofílico simultâneo à formação do produto onde ocorre rapidamente a transferência do PRPP e a formação de um complexo ternário³⁵.

1.4 Objetivos

A complexidade tanto de forma quanto função de uma proteína a torna, por si só, um objeto interessante de estudo. Este trabalho procura aplicar técnicas computacionais e de biologia molecular para auxiliar no entendimento da Adenina Fosforibosil Transferase de *Schistosoma mansoni* e apresenta comparações com a APRT humana, cuja estrutura cristalográfica foi elucidada em nosso grupo.

A etapa de biologia molecular permite estudos em solução da proteína, com objetivo de obter informações detalhadas de sua estrutura e função.

A etapa computacional serve de guia para otimizações em bancada e ainda fornece informações gráficas sobre estrutura e mecanismos de reação.

Este trabalho dá continuidade aos estudos iniciados durante a iniciação científica do aluno Victor Emanuel Armini Caldas e integra a linha de pesquisa estabelecida no Grupo de Cristalografia de Proteínas – IFSC – USP para o mapeamento da via de salvação de purinas de *Schistosoma mansoni*, sob coordenação do Dr. Humberto D’Muniz Pereira.

1.4.1 Objetivos específicos

- 1 – Amplificação e clonagem do gene da APRT de *S. mansoni*;
- 2 – Expressão em *E. coli* e purificação da enzima recombinante;
- 3 - Análise de parâmetros físico-químicos da APRT;
- 4 - Teste de atividade enzimática;
- 5 - Ensaio de cristalização da APRT;
- 6 - Estudos computacionais acerca das características estruturais da APRT;
- 7 - Construção de um modelo por homologia;
- 8 – Dinâmica molecular e análise conformacional

2 Materiais e Métodos

Para a elaboração desta dissertação, foram realizados tanto experimentos *in vitro* (*e.g.* clonagem, expressão, purificação, entre outros) como *in silico*, envolvendo dinâmica molecular – e avaliação conformacional da proteína.

2.1 Materiais e Métodos – Etapa experimental

Neste capítulo estarão descritas as etapas experimentais, desde a obtenção do gene da Adenina Fosforibosil Transferase de *Schistosoma mansoni* até os ensaios de atividade enzimática e estabilidade térmica.

2.1.1 Obtenção da biblioteca de cDNA de *Schistosoma mansoni* adulto

Para a obtenção inicial dos genes de interesse foi preparada uma biblioteca de cDNA a partir do mRNA total de *Schistosoma mansoni* adulto utilizando-se o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System da Invitrogen (Tabela 2). O mRNA total foi fornecido pelo Prof. Ricardo DeMarco (IFSC - USP).

Incubou-se a reação 01, (Tabela 02) a 65°C por 5 minutos, depois se transferiu imediatamente para o gelo por 5 minutos. Centrifugou-se brevemente e então a prosseguiu-se com a Reação 02.

Tabela 2 - – Reações das etapas de síntese de cDNA.

Reação 01	Volume(µl)	Reação 02	Volume(µl)
RNAm total	16.0	2 X First- Strand Reaction mix	10
Mix Primer (µM de cada primer)	1.0	SuperScript III/RNase out Enzyme	2.0
		Reação 1	
Água Mili-Q,	Qsp. 20l	Água Mili-Q	Q.s.p.20

A amostra foi então incubada por 50min a 50°C e em seguida por 5min à 85°C para inativação das enzimas. Tendo sido a biblioteca preparada, pode-se agora isolar cada gene do *pool* de cDNA.

2.1.2 Amplificação do cDNA da enzima Adenina Fosforibosil Transferase de *Schistosoma mansoni*.

A partir dos dados do genoma do *Schistosoma mansoni* ¹⁶, tendo como base a sequência com código de acesso SMP_05436 – referente à APRT – foram desenhados os oligonucleotídeos inicializadores (*primers*) para as regiões 5' e 3', utilizando os programas BioEdit³⁸ e Generunner, para alinhamento dos fragmentos, para detecção e verificação de sítios de clivagem (Tabela 3) e cálculo das temperaturas de anelamento esperadas. O isolamento e amplificação do gene foram feitos por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), segundo reação descrita na Tabela 4 e ciclo esquematizado na visando a posterior clonagem em plasmídeos recombinantes pGEM-T e pET-28a e transformação em células competentes *E.coli* BL21 DE3.

Figura 8 – Desenho esquemático do programa de PCR utilizado para a amplificação do cDNA da adenina fosforibosiltransferase.

Tabela 3 – Sequência dos primers, suas enzimas e as sequências alvo. Em vermelho, destaca-se o sítio de clivagem e a barra ("/") indica o ponto de clivagem.

Gene	Oligonucleotídeo	Enzima
hisAPRT - Smp_054360	3'-TACAGT CAGCT /GTCAAATGTTGAAAAGTG-5'	SalI
	5'-ACTGTAT G /CTAGCATGTCTGATCGCGAG-3'	NheI

Tabela 4 – Componentes da Reação em cadeia da polimerase.

Reagentes	Volume (µl)
Tampão PCR 10X [20mM Tris-HCl(pH8,4), 50mM KCl]	2,0
dNTP (mistura A, T, C, G)[10mM]	1,0
Cloreto de magnésio [50mM]	0,5
Enzima Taq polimerase	0,2
Oligo Sense [10 µM]	2,5
Oligo Antisense [10 µM]	2,5
cDNA	1,0
Água mili-Q autoclavada	q.s.p. 50

O resultado da reação foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 2µL/100ml de Brometo de Etídio para visualização do DNA sob luz Ultravioleta (UV). A banda foi recortada e purificada com o kit *Promega Wizard SV Gel and PCR Clean Up*, seguindo recomendações do fabricante.

2.1.3 Adenilação do gene, ligação ao vetor pGEM-T Easy Vector® para propagação e sequenciamento do inserto

Para realizar a etapa de transformação o DNA amplificado por PCR, este necessita ser adenilado para posterior ligação ao vetor pGEM-T Easy Vector®. A adenilação é importante uma vez que o vetor possui pontas adesivas de timinas, sendo, portanto, complementar aos resíduos de adenina adicionados na extremidade do gene. As reações utilizadas estão indicadas nas tabela 5 e 6.

Tabela 5 – Reação de adenilação do DNA

Reação 03	Volume (µl)
Tampão [10x]	1.0
dATP [1mM]	0.5
MgCl ₂ [25mM]	1.0
Água	2.5
Total	10.0

A reação de adenilação (reação 03 – tabela 6 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**) foi incubada a 70°C por 30 minutos. Prosseguiu-se, então, com a reação 04 – tabela 4 *overnight*, a 4°C.

Tabela 6 – Reação de ligação do inserto no vetor pGEM®-T Easy Vector.

Reagentes	Volume(μl)
Tampão de ligação rápida T4 DNA ligase 10X	1,0
pGEM-T® (50ng)	1,0
Produto do PCR (inserto)	5,0
T4 ligase (3U)	3,0
Água milli-Q	q.s.p.10

A taxa molar de inserto usada em relação ao vetor foi de 3:1. As reações foram misturadas e incubadas 16 horas a 4°C.

2.1.4 Transformação em células competentes

As transformações foram feitas em células competentes de *E. coli* DH5α, seguindo o protocolo:

- 1 – Em tubos de 1,5 ml foram adicionados 10μl da reação de ligação e em seguida 50μl de células competentes;
- 2 – Agitou-se cuidadosamente o tubo e foi mantido por 30 minutos em gelo;
- 3 – Choque térmico a 42°C por 2 minutos;
- 4 – Retorno ao gelo por 5 min.
- 5 – Adicionou-se aos tubos 300μl de meio Luria-Bertani (LB) e incubou-se a 37°C por 2 horas com agitação de 150rpm.
- 6 – Centrifugou-se por 10 min a 1000 rpm;
- 7 – Ressuspendeu-se o *pellet* em 120 μl de meio LB
- 8 – Espalhou-se a suspensão de bactérias em placas contendo meio LB sólido com antibiótico de seleção (Ampicilina).

Após o crescimento das colônias em placa de Petri por 14 horas a 37° C, selecionaram-se colônias brancas ao acaso para verificação da presença do gene de

interesse nos plasmídeos contidos nessas bactérias por PCR de Colônia (Tabela 7). O resultado da reação foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 2µL/100ml de buffer de Brometo de Etídio para visualização do DNA sob luz Ultravioleta (UV).

Tabela 7 – Reação de PCR de colônia

Reação 04	Volume
Tampão [10x]	1.5µl
dNTP [10mM]	0.3µl
MgCl ₂ [25mM]	0.9µl
primer sense T73G (5pmol/µL)	2.0µl
primer reverse SP6 (5pmol/µL)	2.0µl
Água	5.1µl
DNA molde ^{**}	3.0µl
Enzima taq DNA pol. [50/µL]	0.2µl
Total	15µl

Identificada uma colônia positiva, é necessário verificar a correta inserção do gene. O plasmídeo foi extraído de 5ml de cultura crescida *overnight*, utilizando o Kit Miniprep Wizard SV Plus (Promega) e então foram sequenciados pelo método de terminação da cadeia de DNA por incorporação de didesoxinucleotídeos, com iniciadores fluorescentes e seguindo-se o protocolo do Kit “Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing with 7-deaza-dGTP” da Amersham/Pharmacia. O sequenciamento foi realizado pela técnica do Laboratório de Cristalografia Dra. Susana Sculaccio. A qualidade do sequenciamento obtido foi verificada com o pacote Phred/Phrap^{39; 40}, atribuindo um corte de 20 (phrap score) para sequências confiáveis (99% de chance de estar correta).

As amostras positivas foram congeladas em solução 50% Glicerol e cultura crescida em meio LB (1:1).

^{**} O DNA molde é composto de cultura de bactéria crescida *overnight* e água na proporção de 1:1, fervido por 5min e centrifugado a velocidade máxima por 3 min

2.1.5 Digestão do pGEM-T Easy Vector com enzimas de restrição

Os plasmídeos purificados foram digeridos com as enzimas NheI e SalI correspondentes para liberação do inserto e em seguida, o resultado foi verificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Quando observado o fragmento no tamanho correto, o gel era recortado e purificado usando o kit Eppendorf Perfect gel Cleanup. A reação de digestão é dada na tabela 8.

Tabela 8 – Reação de digestão padrão

Reação 06	Volume (µl)
DNA (cerca de 10ng)	X
Enzima 1 [10u/µl]	1.0
Enzima 2[10u/µl]	1.0
BSA [10000µg/ml]	1.0
Tampão [10X]	10.0
Água mili-Q	q.s.p 100

2.1.6 Ligação em vetor de expressão pET28a(+) e transformação em bactéria competente *E. coli* BL21(DE3)

De posse dos genes devidamente linearizados e disponíveis para inserção, estes foram clonados em um vetor de expressão, para então iniciar os estudos da APRT de *S. mansoni*.

O vetor pET28a foi digerido com as mesmas enzimas utilizadas no gene de interesse, formando assim extremidades coesivas, possibilitando a ligação entre o vetor e o gene de interesse na orientação e fase corretas orientação. Para a ligação no vetor pET28a(+) utilizou-se a seguinte reação (tabela 9), que foi incubada a 4°C em câmara fria *overnight*:

Tabela 9 – Transformação em vetor de expressão pET28a.

Reação 07	Volume(µl)
Tampão [10x]	1.0
Inserto gene [100 ng/µL]	2.0
Vetor pET 28a [57,4 ng/µL]	2.0
Enzima T4 DNA Ligase [400 U/µL NE Biolabs]	1.0
Água Mili-Q	q.s.p. 10

A amostra foi transformada como já descrito (Item 2.1.4).

Após incubação, caso verificado o crescimento, foi feito PCR de colônia para verificar a presença do inserto, de acordo com a reação da tabela 5. Para essa reação, entretanto, foram usados os *primers* específicos para o vetor pET28a, a saber T74G e T7 terminator. A amostra com resultado positivo foi sequenciada para confirmar a correta inserção do gene.

2.1.7 Expressão heteróloga da enzima Adenina Fosforibosil Transferase

Para expressão da enzima APRT foram adotados os seguintes procedimentos:

Um inóculo de meio LB da cultura de *E. coli* contendo o plasmídeo pET28a/APRT crescido “overnight” foi vertido na diluição de 1:100 em meio de cultura 2xYT (1,6% de bacto-triptona, 1% de Extrato de levedura e 0,5% de Cloreto de sódio, pH 7,0) suplementado com 30µg/ml de kanamicina.

O meio permaneceu sob agitação a 37° C a 150 rpm. A densidade óptica foi medida a 600nm em intervalos de uma hora e ao ser atingida a DO de 0,6 o indutor de expressão IPTG foi adicionado. A partir do momento da adição do indutor, a temperatura foi diminuída para 30° C e os tubos permaneceram por mais 4-5 horas sob agitação.

O produto da expressão foi então centrifugado por 20 min. a 8000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensionado com 50 mL de tampão de lise - tampão A - (50mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 300mM NaCl, 10mM imidazol, 5mM β-Mercaptoetanol e 1mM MgCl₂). As bactérias foram então lizadas em sonicador,

com 6 pulsos de 30 segundos (Sonic Dismembrator 550, Fisher Scientific) e intervalo de 30 seg. entre os pulsos (todo o procedimento foi realizado em gelo). A amostra foi novamente centrifugada por 20 min. a 9000 rpm. A fração solúvel foi utilizada nos ensaios de purificação da proteína

2.1.8 Purificação da enzima APRT de *Schistosoma mansoni*

A purificação da APRT foi realizada por afinidade seguida de cromatografia de exclusão molecular. Os detalhes de cada passo cromatográfico bem como protocolo utilizado serão discutidos a seguir.

2.1.8.1 Purificação por Afinidade

Nesse tipo de cromatografia há afinidade entre a substância a ser purificada e a resina. O que interage diretamente com a resina não é a proteína em si, mas a cauda de poli-histidinas que está fusionada ao N-terminal da proteína, que é adicionada pelo vetor de expressão utilizado (pET-28a(+)) – Invitrogen).

Resinas para purificação de proteínas com poli histidina são do tipo IMAC – Immobilized Metal Affinity Chromatography ⁴¹ e tem como princípio de funcionamento a interação reversível entre as cadeias laterais de aminoácidos e os íons imobilizados. Dependendo do metal imobilizado, diferentes cadeias laterais de aminoácidos podem ser o alvo da purificação. Os mais utilizados são a Histidina, o Triptofano e a Cisteína.

Figura 9 – Diagrama esquemático do sistema de purificação TALON IMAC. a) Microesfera de Sepharose com o quelante do íon níquel, o tetradentato. b) Proteína alvo conjugada com a cauda de poli histidina. c) A eluição ocorre com a protonação do nitrogênio (pKa= 5.97) presente no grupo imidazol, gerando um íon amônio carregado positivamente que repele a resina liberando a proteína. Alternativamente, a repulsão pode ser causada com o aumento da concentração de imidazol, competindo pelo sítio na resina. d) - Interação entre elétrons do nitrogênio do grupamento imidazol com o íon metálico de cobalto. Adaptado de Talon® Metal Affinity Resins – User manual. Clontech,

Cadeias de poli-histidina apresentam alta afinidade e seletividade com os metais de transição. (Níquel e Cobalto, por exemplo) e, em condições fisiológicas de pH, ligam-se à resina pela troca de elétrons entre o nitrogênio do grupo Imidazol com uma região de baixa densidade eletrônica no íon metálico⁴². A interação da cauda de poli-histidinas à resina é enfraquecida ao se passar um gradiente de solução com Imidazol em maiores concentrações – em geral até 500 mM. Desse modo, espera-se que somente as proteínas de interesse estejam ligadas à resina e, portando, a purificação seja feita em apenas uma etapa.

Com base nessa seletividade, a fração solúvel foi aplicada à coluna de Níquel HisTrap HP de 5ml (GE Healthcare) acoplada ao sistema de cromatografia líquida Äkta Purifier (GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi equilibrada com 2 volumes de coluna (VC) de tampão A, em temperatura ambiente, com fluxo de 5ml/min. O processo foi monitorado pela absorbância a 280nm. Após a injeção, a coluna é lavada com o tampão A até um patamar de absorbância ser atingido, indicando que as proteínas com interação inespecífica foram removidas.

Para estimar a concentração ideal de imidazol capaz de remover a APRT, ligada à resina, foi feito um gradiente contínuo de 0% a 100% com 25 VC, com tampão A + 500mM de Imidazol. Com isso, determina-se o ponto ideal como centro do pico de absorbância a 280nm durante a eluição.

Optou-se por remover o Imidazol do tampão imediatamente após à purificação. Utilizou-se tubos Centricon, centrifugando-se à 3000xg e completando o tubo com tampão A até reduzir a concentração de Imidazol a 1% da inicial.

Essa amostra foi quantificada pelo coeficiente de extinção molar a 280nm e sua respectiva absorbância. A amostra foi incubada por 16 horas com trombina (Amershan Biosciences) segundo recomendações do fabricante, a fim de remover a cauda de histidina fusionada. O eluato, o lavado, frações da eluição e as etapas de clivagem foram monitoradas em SDS-PAGE 15%.

2.1.8.2 Purificação por Exclusão Molecular

Cromatografia por Exclusão Molecular, também conhecida como gel-filtração ou peneira molecular é um eficiente método cromatográfico que utiliza a diferença de tamanho das moléculas como critério para separação.

A presente técnica é comumente utilizada na forma de FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography. É uma técnica em que a velocidade da fase móvel – no caso o solvente – é controlada por bombas e é mantido um fluxo constante. Tal procedimento aperfeiçoa a separação visto que diminui o efeito da difusão comparado com o procedimento feito somente por gravidade.

Fundamentalmente, resinas de diversos tamanhos de poro interagem de forma diferente com dada biomolécula. Quanto maior a molécula, menor a chance de ela passar entre um poro e, portanto, interage menos com a resina, eluindo antes (linha azul – Figura 10). Se a molécula é pequena, ela permeia os poros e dessa forma o caminho médio percorrido é maior, logo, sua eluição é retardada (vermelha).

Figura 10 - Diagrama de uma cromatografia por gel-filtração. A) Cromatograma típico em que as linhas azuis indicam a proteína de interesse e a linha vermelha os compostos de baixa massa molecular. b) Esquema de interação das partículas com a resina. As partículas são porosas e a velocidade com que uma partícula passa pela resina depende da relação de seu tamanho com o poro.

Utilizando sistema de cromatografia líquida Äkta Purifier, e uma coluna Superdex 75/30, que é ideal para as massas moleculares que queremos separar, configuramos o procedimento seguindo o manual do fabricante de cada parte do equipamento. Injetaram-se alíquotas de até 1.5 ml de proteína purificada, sem imidazol e clivada com trombina, com fluxo de 0.5 ml por minuto e coletaram-se as frações para posterior conferência em gel de SDS-PAGE 15%. Nesse processo, a proteína foi eluída da coluna em tampão PIPES 50mM, 150mM de NaCl, 1mM MgCl₂ e 1mM de DTT, pH 6.5.

2.1.9 Ensaios de estabilidade e concentração da proteína

Para qualquer tipo de ensaio é necessário, além de pureza, que a proteína esteja estável nas condições experimentais. Tais instabilidades podem ser desde auto clivagem até formação de agregados. Dessa forma, procurou-se obter uma condição de estabilidade tanto temporal quanto relativo à concentração de proteína na solução.

A realização desses ensaios envolve, ainda, a otimização dos tampões, variando pH (de 5.5 a 8.5), tipo de composto tamponante, concentração de sal(50 a 300mM de NaCl), inibidores de protease e ligantes ou cofatores (AMP, PRPP, Mg²⁺⁺).

As amostras foram concentradas em tubos Amicon Ultra® (Milipore) com corte de 30kDa por 4000xg até o início da formação de precipitados.

Foram testados diferentes tampões, variando pH de 5,5 até 9,0, diferentes concentrações de sal (NaCl de 75mM até 300mM) e aditivos, como glicerol, MgCl₂, AMP e Adenina.

A concentração foi verificada por absorbância a 280nm, utilizando o coeficiente de extinção molar teórico da APRT, calculado pelo PROTPARAM⁴³ em um NanoDrop® (Thermo Scientific).

A avaliação das condições foi realizada por ensaios de Espalhamento Dinâmico de Luz. Este possibilita verificar a monodispersividade da solução, fator importante para cristalização de proteínas, e sua estabilidade quanto à variação de temperatura⁴⁴.

2.1.9.1 Espalhamento Dinâmico de Luz – Dynamic Light Scattering – DLS

O espalhamento dinâmico de luz – *dynamics light scattering* ou *photon correlation spectroscopy* (PCS) – é uma técnica espectroscópica que mede o movimento Browniano baseada no espalhamento de luz de uma dada amostra, sendo não invasiva e não destrutiva. O princípio se baseia na incidência de luz monocromática (tipicamente vermelha, 633nm, ou infravermelho próximo, 830nm, para moléculas biológicas) em uma solução com partículas e monitoramento das flutuações de intensidade luminosa espalhada em função do tempo⁴⁵.

Partículas em solução movem-se ao acaso – Movimento Browniano – partículas menores dispersas em meio líquido movem-se mais rapidamente do que partículas grandes, como observado pela relação de Stokes-Einstein

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (1)$$

em que **a** é o raio da esfera, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura em Kelvin, η é a viscosidade do solvente.

Como as partículas estão em difusão, caso haja uma janela de leitura devidamente pequena – da ordem de nano ou micro segundos – a intensidade de luz espalhada sofrerá variações ao longo do tempo devido ao constante reordenamento

molecular. Quando menor as partículas, maiores serão essas diferenças. Portanto, existe uma relação entre a velocidade de flutuação de luz espalhada e o tamanho das partículas de interesse⁴⁵.

Se compararmos um padrão do espalhamento em um dado instante t com o sinal em um intervalo muito próximo ($t+\delta t$) será observado que eles serão muito parecidos – fortemente correlacionados – Se formos a um intervalo mais distante, digamos $t+2\delta t$, ainda haverá certa semelhança, porém inferior a primeira e, esse comportamento estende-se para os intervalos subsequentes. A correlação reduz-se com o tempo e, de forma mais acentuada para partículas pequenas. A função de auto correlação $G(t)$ é dada por

$$G(t) = \langle I(t_o) \rangle \times \langle I(t_o + \delta t) \rangle \quad (2)$$

No tempo t_0 , a intensidade do espalhamento $I(0)$ é máxima e a função de auto correlação tem seu valor máximo. Com o passar do tempo, a função $G(t)$ tende a zero. Normalmente, admite-se que essa função cai exponencialmente com o tempo (Figura 11Tabela 9)^{45; 46}.

Figura 11 – Comportamento da curva de correlação das intensidades em medidas de DLS. A linha pontilhada indica um caso de correlação ideal, a linha tracejada indica a correlação de partículas grandes e a linha sólida de partículas pequenas.

Para partículas esféricas e monodispersas, a função $G(t)$ é dada por

$$G(t) = Ae^{2\Gamma t} + B \quad (3)$$

onde A e B são constantes e Γ é a constante de decaimento da curva exponencial gerada pela função de auto correlação. Nesse caso

$$\Gamma = Dq^2 \quad (4)$$

onde q é o vetor de onda de luz espalhado dada por

$$q = (4\pi n/\lambda_0) \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (5)$$

onde n é o índice de refração do meio, λ_0 é o comprimento de onda da luz espalhada, θ é o ângulo de luz espalhada.

Os aparelhos de DLS disponíveis ajustam os dados obtidos à melhor curva e, com isso encontram o valor de Γ . Com esse valor, substitui-se na equação 4 encontrando-se D e, posteriormente na equação 1, encontrando finalmente o raio hidrodinâmico médio das partículas^{45; 46}.

Além das medidas-padrão de tamanho e dispersividade das amostras – fator importante para experimentos de cristalografia de proteína⁴⁴ – foi feito uma varredura variando a temperatura de 13° até 70° C – sempre após centrifugar a amostra por 15min a 16.000xg – a fim de se estudar a estabilidade da amostra frente a diferentes temperaturas tomando seu raio hidrodinâmico como parâmetro de interesse.

2.1.10 Focalização Isoelétrica

Como as proteínas são moléculas anfóteras, seu balanço de cargas depende do pH do meio em que estão inseridas. O ponto isoeletrico é um pH específico no qual o balanço de cargas é zero. Em meio com pH acima do pI, as proteínas têm carga líquida negativa e, abaixo do pI, carga positiva.

Neste experimento, um gradiente de pH é estabelecido ao longo de um gel de características anfólicas, que é capaz de doar (ácido) ou receber (base) prótons. A proteína, então, migra nesse campo até o ponto em que a carga seja zero, ou seja, o pH correspondente ao pI.

Este experimento foi realizado em um sistema “Phast System”, Pharmacia LKB Biotechnology com um gel “Phast Gel IF 3-9”, que é capaz de varrer as faixas de pH entre 3 e 9. A proteína foi aplicada a 1mg/ml e utilizadas as recomendações do fabricante para corrida e coloração do gel.

2.1.11 Ensaios de atividade enzimática

Os ensaios de atividade enzimática foram desenvolvidos segundo descrito na literatura³¹, em que a mudança na taxa de absorbância causado pelo consumo de Adenina e PRPP e produção de AMP e PPi é monitorada. Os experimentos foram realizados em um espectrofotômetro Cary 100 Bio (Varian®) em cubetas de quartzo de 0,5 ml. Usou-se como meio de reação o tampão Hepes 100mM suplementado com 10mM de MgCl₂. Como a reação direta envolve dois substratos, os experimentos foram feitos considerando um deles em excesso e a variação do outro substrato para coleta de dados cinéticos. A reação era disparada pela adição de proteína, na concentração final de 10nM. Apesar de o AMP e a Adenina possuírem o mesmo máximo de absorbância em seu espectro, duas formas de monitoramento foram reportadas. A reação pode ser acompanhada em 260nm, máximo de absorção para ambos compostos porém, com uma diferença de 1600M⁻¹ cm⁻¹ ^{31a} mais para o AMP ou, pode ser monitorado em 256nm, em que a diferença entre os espectros é máxima, sendo 2130 M⁻¹ cm⁻¹³⁵.

A medida direta é pouco sensível e tem baixa relação sinal-ruído. Para contornar esse problema, a foi empregada de uma reação acoplada em que é monitorada a presença de PPi ao ser consumido para a formação de DAHP que reage consumindo o 2β-NAD⁺ que tem absorbância máxima a 340nm.

A reação envolvida é a seguinte:

onde: PPi = Pirofosfato; F-6-P = D-Fructose-6-fosfato; PPI-PFK = Fructose-6-fosfato quinase, pirofosfato dependente; F-1,6-DP = D-Fructose-1,6-difosfato; Pi = Fosfato inorgânico; GAP = D-Gliceraldeído-3-fosfato; TPI = Triosefosfato isomerase; DHAP = Dihidroxiacetona fosfato; GDH = Glicerofosfato dehidrogenase; β-NADH = β-

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida); β -NAD⁺ = β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada) – (Pyrophosphate reaction – Sigma P7275)

Dessa forma, a cada 2 mols de 2β -NAD⁺ formado, 1 mol de PPi é consumido. A detecção mais sensível pela reação acoplada permite menores volumes de reação e experimentos em leitor de placas de 96 poços (Molecular Devices, Spectra Max Plus 384).

Para caracterização da afinidade frente ao PRPP, a concentração de adenina foi mantida em 0,4mM e, para caracterização da afinidade da Adenina, o PRPP foi mantido a 0,6mM.

Para a reação reversa, AMP + PPi, foi usado um teste acoplado com xantina oxidase. A xantina oxidase catalisa a conversão de adenina em 2,8-dihidroxi-adenina, que tem um coeficiente de extinção molar de $15.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 301nm. Esse valor torna o experimento cerca de 10x mais sensível do que uma medida direta³¹.

2.1.12 Ensaios de cristalização

A APRT purificada foi submetida a ensaios de cristalização nas formas APO, com ligante AMP e com ligante Adenina.

Os ensaios de cristalização utilizam de protocolos de busca convencionais multi-paramétricos em gotas sentadas utilizando o robô *Honeybee 931* da *Genomic Solutions Inc*, em câmaras termoestáveis a 18° C. O robô coloca automaticamente gotas de 1µl de solução de proteína com 1 µl de solução do poço. Para cada placa de 96 poços é possível realizar 288 experimentos simultâneos, visto a presença de múltiplos sítios para disposição das gotas. O *screening* completo realizado possui 1248 condições diferentes.

2.2 Materiais e Métodos – Etapa computacional

Neste capítulo, descreveremos as etapas de estudos computacionais realizados com a Adenina Fosforibosil Transferase de *S. mansoni*. Será abordado desde sua modelagem molecular por homologia– devido à indisponibilidade de um modelo cristalográfico –, até os estudos das interações e variações conformacionais do modelo. Como referência para o estudo, consideramos a estrutura de APRT humana cujo código PDB é 1ZN8.

Esta etapa do projeto foi feita em colaboração com o doutorando José Fernando R. Bachega, do Laboratório de Cristalografia, IFSC – USP.

2.2.1 Modelagem Molecular por Homologia

2.2.1.1 Descrição da Metodologia

A obtenção de um modelo cristalográfico de determinada proteína é um passo fundamental para o estudo da interação entre proteínas, elucidação de mecanismos de reação e desenvolvimento de inibidores enzimáticos baseados no alvo. Mesmo sendo uma etapa fundamental, a obtenção de cristais de proteína ainda é o gargalo da técnica. A análise das estatísticas encontradas no *Protein Structure Classification-CATH* – e no *Structural Classification of Proteins – SCOP*⁴⁷- revela que o número de diferentes dobramentos e motivos não cresce na mesma proporção que o número de estruturas depositadas. Ou seja, há uma redundância no enovelamento de proteínas e, essa informação permite que sejam elaborados modelos tridimensionais de uma proteína desconhecida baseada em sua similaridade com estruturas resolvidas cristalograficamente.

A técnica de modelagem molecular por homologia consiste em explorar essas similaridades sequenciais e assumir que pequenas mudanças na estrutura primária resultarão em pequenas variações na estrutura terciária⁴⁸.

O procedimento de modelagem molecular por homologia é composto das seguintes etapas fundamentais⁴⁹:

- 1 – Identificação das estruturas homólogas, sendo que quanto maior a identidade sequencial, melhor será conduzida a elaboração do modelo;
- 2 – Escolha de um ou mais moldes, baseado no alinhamento de sequências primárias e estrutura secundária. Nesse caso, podem ser usados servidores de predição de estrutura secundária, como o PSIPRED⁵⁰. Esse procedimento aumenta a precisão ao definir as regiões tridimensionais do modelo;
- 3 – Alinhamento e verificação da correta relação entre os aminoácidos e estruturas secundárias. Essa inspeção evita que uma dada região que, por exemplo, deveria formar uma hélice- α seja enovelada como outro motivo estrutural;
- 4 – Construção do modelo;
- 5 – Validação do modelo.

Para busca por modelos utilizou-se a ferramenta BLAST/BLASTP⁵¹ contra a base de dados do PDB. Os modelos foram separados e classificados quanto à sua percentagem de identidade sequencial. Um posterior alinhamento foi feito com as sequências escolhidas, utilizando o programa ClustalW e foi inspecionado a concordância do alinhamento com a estrutura secundária. O alinhamento em que essa concordância foi máxima foi o guia para a construção do modelo.

Tendo definido o alinhamento, prosseguiu-se com a geração do modelo pelo programa MODELLER⁵². O algoritmo do MODELLER busca satisfazer restrições espaciais baseadas no alinhamento fornecido utilizando a geometria das moléculas e métodos de otimização ⁵². Em modelos com menos de 40% de identidade, o alinhamento correto é uma etapa crítica para o sucesso da modelagem.

Figura 12 – Modelagem comparativa pelo programa MODELLER. Primeiramente, restrições espaciais na distância Inter atômica e ângulos diedros são extraídos da estrutura do *template*. O alinhamento determina os resíduos equivalentes para aplicar as restrições. Finalmente, o modelo é gerado e algoritmos de otimização são usados para melhor satisfazer os critérios estruturais. Adaptado ⁴⁹

Para cada alinhamento obtido, o MODELLER gerou 100 modelos tendo como parâmetros adicionais 300 ciclos de aplicação do VTMF (*variable target method function*). Os modelos foram gerados na forma dimérica, considerando moléculas de água e ligantes presentes nos *templates*. O VTMF aplica métodos de gradientes conjugados e *simulated annealing*. O método de gradiente conjugado satisfaz sequencialmente as restrições locais e aos poucos expande essas interações para outros resíduos. O *simulated annealing* é um método de busca em que a tentativa de resolver o problema é feita tentando adivinhar estruturas próximas que sejam candidatas a solução^{48; 53}.

A cada modelo é atribuído uma pontuação baseada em penalidades para posições não favoráveis. O modelo com melhor pontuação é escolhido.

2.2.1.2 Validação do Modelo

O arquivo de estrutura (.pdb) gerado para a melhor estrutura foi submetido ao SAVES – *Structural Analysis and VERification Server* – que executa diversos testes de qualidade e comparações com a proteína depositadas no PDB, como o PROCHECK⁵⁴, WHAT_CHECK⁵⁵, ERRAT⁵⁶, VERIFY3D⁵⁷ e PROVE. Ainda, o modelo foi submetido ao servidor do WHATIF⁵⁵ para retirada de impedimentos estéricos entre átomos. Essas ferramentas serão discutidas em mais detalhes posteriormente, ao ser feita a análise do modelo gerado.

2.2.2 Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular (DM) de proteínas é uma importante ferramenta computacional para entender as bases físicas da relação estrutura-função de biomoléculas. Fundamentada nas equações clássicas de movimento, a DM fornece informações sobre o comportamento dinâmico do sistema, de forma dependente do tempo e para cada átomo. A força que atua em cada partícula é derivada de um

potencial que depende do nível de detalhamento do sistema e das interações observadas^{58; 59}. O conjunto desses potenciais que agem sobre um sistema é chamado de “campo de força”. Um potencial $V(r)$, por exemplo, pode ser composto por termos que descrevem distâncias inter atômicas, comprimentos e ângulos de interação e termos para átomos não ligados (como interações de *van der Waals*⁵⁸).

A fim de descrever a posição e velocidade de cada partícula, geralmente em intervalos de fs (1fs = 1femto s = 10^{-15} s), a DM resolve numericamente a equação de movimento, que é representada de forma simplificada na equação 6⁵⁹:

$$\vec{F}_i(t) = m_i \vec{a}_i \quad (6)$$

$$\vec{F}_i(t) = -\frac{\partial V(r_i)}{\partial r} \quad (7)$$

onde $\mathbf{F}_i$ é a força que atua em uma dada partícula em um instante de tempo t e $\mathbf{a}_i$ é a aceleração do átomo i de massa m . Uma vez definido qual campo de força – conservativo – é possível calcular a derivada primeira da energia potencial em relação a esses átomos e descrever a força (equação 7). Para cada intervalo, as interações são calculadas novamente e é atribuída uma nova posição e velocidade para cada átomo (arquivo de trajetórias). Em DM as equações de energia potencial que descrevem o comportamento do sistema são conhecidos como “Campos de força”. Dentre os força mais utilizados, discutiremos acerca do AMBER⁶⁰ e do OPLS⁶¹, visto que serão utilizados nos experimentos.

Sendo a DM intrinsecamente uma simulação clássica, além de serem especificadas todas as coordenadas do sistema, deve-se realizar uma minimização de energia, ou otimização de geometria. Essa etapa diminui ou remove os contatos atômicos não favoráveis relaxando os ângulos torcionais, ligações químicas e interações de van der Waals. Ao final, o sistema está aplicando pequenas forças em cada átomo e, portanto, é o ponto de partida. Seguindo a mesma ideia da modelagem, a minimização pode usufruir de algoritmos de gradientes conjugados.

Após a etapa de minimização deve-se aumentar a temperatura do sistema até a temperatura de interesse. Para tal, cada átomo é colocado a uma determinada velocidade seguindo uma distribuição de Maxwell-Boltzmann (que descreve sistemas

clássicos de partículas). Cabe lembrar que as condições iniciais de um sistema de DM são bem diferentes das condições de equilíbrio térmico⁵⁹.

Resumidamente, o início de uma DM compreende duas etapas:

1 – Etapa de minimização. As propriedades do sistema não se mantêm constantes;

2 – Etapa de equilíbrio. As velocidades são impostas aos átomos e o sistema evolui até alcançar o equilíbrio termodinâmico. É a partir desse ponto que podem ser calculadas as propriedades do sistema.

A seguir, serão descritos brevemente algumas características dos campos de força utilizados.

2.2.2.1 Campo de Força AMBER e OPLS

O campo de força AMBER (*Assisted Model Building and Energy Refinement*) foi originalmente proposto por Weiner e colaboradores⁶⁰ e posteriormente por Cornell e colaboradores⁶² para o estudo de ácidos nucleicos e proteínas e moléculas com os grupos funcionais de interesse em química orgânica e bioquímica. O campo de força AMBER tem a seguinte forma⁶³:

$$V_{amber}(\{\vec{r}_N\}) = \sum_{\text{ligações}} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torções}} \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] \\ + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \left\{ 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \right\} \quad (8)$$

O primeiro termo é a soma das energias ao longo das ligações covalentes, representadas como um potencial harmônico. O segundo termo representa as energias dos ângulos relacionados às geometrias dos orbitais eletrônicos em uma ligação covalente. O terceiro termo representa as energias relativas à torção de um ângulo, por exemplo, uma dupla ligação tensionada. Deve-se notar que uma ligação simples tem mais liberdade conformacional. O último termo representa as energias não ligadas entre os pares eletrônicos. Este termo pode ser decomposto em um termo

de van der Waals e um termo eletrostático. Especificamente, foi utilizado o campo AMBER ff99SB, que permite uma melhor caracterização das estruturas secundárias visto uma melhor distribuição dos ângulos diedros para glicinas e alaninas, baseados em dados do PDB.⁶⁴

O campo de força OPLS (*Optimized Potential for Liquid Simulations*) possui similaridades com a descrição do campo de força do AMBER, descrito pela equação 9

$$\begin{aligned}
 V_{\text{opls}}(\{\vec{r}_N\}) = & \sum_{\text{ligações}} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \\
 & \sum_{\text{torções}} \left\{ \frac{V_1}{2} [1 + \cos(\varphi)] + \frac{V_2}{2} [1 - \cos(2\varphi)] + \frac{V_3}{2} [1 + \cos(3\varphi)] \right. \\
 & \left. + \frac{V_4}{2} [1 - \cos(4\varphi)] \right\} + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \left\{ 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right\} f_{ij} \quad (9)
 \end{aligned}$$

O OPLS expressa a energia potencial de um sistema de moléculas em um referencial clássico assumindo termos harmônicos para o estiramento de ligações (1º termo) e tensionamento de ângulos (2º termo)⁶³, assim como o AMBER. A diferença notável é a descrição das energias torcionais por uma série de Fourier e o termo para interações não ligadas é também aplicado para pares intermoleculares, porém com um fator de correção f_{ij} de 0.5.

Os parâmetros do OPLS foram elaborados de forma a otimizar a descrição simultânea de estrutura molecular, conformações energéticas, energias de interação intermolecular e propriedades de fluidos, como calor de vaporização, densidade e energias livres de solvatação.⁶³

Ambos os campos AMBER e OPLS utilizam um potencial de *Lenard-Jones* (LJ) mais cargas pontuais para átomos soltos ou distantes. O potencial de LJ com os termos de átomos não ligados. A figura 13 ilustra o potencial de Lenard-Jones.

Figura 13 – Esboço do potencial de Lenard-Jones, utilizado pelos campos de força AMBER e OPLS.

Outra semelhança é que ambos os campos ff99SB e OPLS (OPLS-AA) utilizados neste projeto tem como base o paradigma descritivo “*all atoms*”. Dessa forma, átomos de hidrogênio não polares são representados explicitamente. Ou seja grupos CH₃, por exemplo, tem seus 4 átomos considerados. Para efeito de comparação, o paradigma “*united atoms*” somente considera hidrogênios polares e, portanto, grupos como o CH₃ seriam tratados como um único pseudo-átomo.

Especificamente, utilizamos o campo OPLS-AA quando não explicitada a solvatação do sistema.

2.2.2.2 Preparação dos Modelos

Os modelos considerando a APRT humana (hsAPRT) e a APRT de *S. mansoni* (smAPRT) foram gerados no programa *tleap* presente no pacote Ambertools. Os parâmetros e topologias para a porção proteica do sistema foram associados ao campo de força AMBER99SB. Este campo de força é uma modificação do campo de força AMBER99, com melhoramento nos parâmetros dos diedros ϕ/ψ , de forma a reproduzir com maior fidelidade, propriedades de estruturas secundárias ⁶⁴. Um modelo de solvatação explícita do tipo TIP3P, foi utilizado para a porção do solvente ⁶⁵. Neste modelo, as moléculas de água são rígidas e descritas por três sítios de interação, correspondendo aos três átomos do conjunto. A cada átomo é associado uma carga pontual, e também uma potencial do tipo Lenard-Jones. Este modelo é amplamente utilizado em simulações do tipo dinâmica molecular por sua simplicidade e eficiência computacional.

Figura 14 – Modelos de água. O modelo usado, TIP3P e modelos mais detalhados., TIP4P, TIP5P e TIP6P.

A figura 14 ilustra os modelos mais usados. Os índices M e L indicam “dummy atoms”, que são átomos imaginários adicionados para melhorar a descrição de cargas naquela região. Os índices L indicam os pares de elétrons livre do oxigênio e o M é colocado ao longo da bissetriz do ângulo entre os hidrogênios.

Os ligantes foram parametrizados no programa antechamber, e aos tipos atômicos foram atribuídos parâmetros do campo de força GAFF (generalized AMBER force field) e as cargas parciais dos mesmos, foram determinadas pelo método semi empírico AM1-BCC. Estas cargas bem como os parâmetros do campo de força GAFF foram desenvolvidas para serem compatíveis com as outras versões de campos de força AMBER e, portanto o AMBER FF99SB. Íons tipo Na^+/Cl^- foram adicionados para garantir a neutralidade dos sistemas (função additions do programa tleap).

2.2.2.3 Simulações e ensembles

As simulações foram realizadas através programa NAMD ⁶⁶, utilizando-se o ensemble NPT, onde número de partículas, pressão e temperatura são mantidos constantes. O controle da temperatura é feito através do termostato de Langevin (ou dinâmica de Langevin) a uma temperatura de 310K. A dinâmica de Langevin é baseada na equação de movimento de Langevin, em que o sistema passa a ser dissipativo devido à adição de um termo de fricção proporcional à velocidade na equação de movimento. A energia é então ajustada e a temperatura mantida constante.

O soluto, proteína mais ligantes, foi montado em uma caixa de água com uma distancia mínima de 9.0 Å entre a proteína e as fronteiras da caixa. O sistema de “caixas” permite a simulação com condições de contorno periódicas. Dessa forma, se um átomo sair das fronteiras dessa caixa, por exemplo, haverá outra caixa adjacente capaz de receptá-lo tornando o sistema virtualmente infinito. Ainda, pode ser aplicado o PME (*Particle Mesh Ewald*), que é um método para cálculo de interações considerando a Lei de Coulomb para partículas e, concomitantemente, realiza uma transformada de Fourier para calcular a malha eletrônica (*mesh*) no espaço recíproco interpolados em uma rede. É com este artifício que interações de longo alcance e partículas não ligadas são incorporadas ao sistema. O raio de corte para interações de longa distancia (*cutoff*) utilizado foi de 10 Å.

Um relaxamento do solvente foi realizado durante 100ps para cada uma das simulações. O tempo total de cada simulação foi de 10 ns e as posições atômicas e energias foram salvas a cada 200 fs. O passo de integração utilizado foi de 1 fs.

2.2.2.4 Análise de trajetórias

As trajetórias foram visualizadas e analisadas no programa VMD, com o auxílio de ferramentas de análise do pacote GROMACS. O visualizador Pymol foi utilizado para geração de figuras.

2.2.2.5 CONCOORD e tCONCOORD

Os métodos de Dinâmica molecular são intrinsicamente dependentes de passos de cálculos. Cada imagem depende da sua anterior e é molde para a posterior. Ou seja, temos uma simulação conformacional dependente do tempo. Um dos problemas que afetam a DM é o fato de não ser possível, ou muito difícil, vencer barreiras de energia, condenando o sistema a um mínimo local e sacrificando a amostragem⁶⁷.

O método CONCOORD⁶⁸ – *Constraints to Coordinates* – e sua extensão tCONCOORD⁶⁷ são formas eficientes de se evitar o problema das barreiras de potencial ao gerar estruturas aleatórias que atende, porém, a certos comprimentos de ligações pré-determinados. O método está descrito na figura 15.

Em um primeiro momento, o programa *dist* mede e classifica todas as distâncias interatômicas, geralmente de uma estrutura minimizada. Para cada valor de distância é adicionado um termo de flutuação, para mais ou para menos, que reflete a força daquela interação. Ligações covalentes, por exemplo, tem baixos valores de tolerância ao passo que interações de van der Waals valores maiores. Na segunda etapa, o programa *disco* procura atender a essas limitações. O cálculo começa de uma estrutura randômica e as restrições são aplicadas para os átomos que

violam essas distâncias até todas as violações serem removidas. Se após certo número de tentativas não for possível eliminar as violações, a estrutura é descartada. Se for possível, a estrutura é salva⁶⁷.

A diferença entre os métodos CONCOORD e tCONCOORD é que o primeiro gera uma série de estruturas em torno daquela fornecida e o segundo tenta prever as transições entre elas, tornando as buscas exaustivas. Foi mostrado que, partindo de uma estrutura apo, o tCONCOORD foi capaz de gerar conformações muito próximas daquela do estado com ligante⁶⁹.

Os experimentos consideraram o campo de força OPLS-AA, gerando 400 variações para cada modelo.

Figura 15 - Algoritmo do tCONCOORD. Adaptado de <http://wwwuser.gwdg.de/~dseelig/tconcoord>

3 Resultados e Discussão

3.1 Amplificação das isoformas do cDNA da enzima Adenina Fosforibosil Transferase de *Schistosoma mansoni*.

A figura 16 mostra que a amplificação do gene codificante para a enzima Adenina Fosforibosil Transferase – coluna 1 – foi realizada com sucesso. O gene possui 561 bp e, como observado, encontra-se entre o marcador de 500 e 700 bp. A banda única que aparece foi recortada para purificação do DNA para as etapas posteriores de clonagem.

Figura 16 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio com os resultados da amplificação da APRT.

3.2 Adenilação do gene, ligação ao vetor pGEM e transformação em bactérias competentes.

O gene após ser adenilado, foi ligado ao vetor pGEM-T Easy Vector, como descrito anteriormente e as células de *E coli* DH5 α transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido para a obtenção de colônias após incubação a 37^o C. Diversas colônias foram obtidas, o que pode indicar que o gene foi corretamente inserido. Escolhemos, ao acaso, colônias bacterianas e submetemos a um PCR de colônia como descrito. Como pode ser observado na Figura 17, 6 colônias apresentaram o tamanho

esperado de banda referente ao PCR feito com *primers* flanqueando o gene clonado no vetor pGEM-T, indicando assim a presença de colônias contendo o gene de interesse.

Figura 17 - Gel de Agarose com o produto de PCR utilizando uma colônia bacteriana como fonte para o template. A coluna 1 indica o marcador. Colunas 3, 5, 6, 8, 10 e 11 indicam colônias corretamente clonadas.

A fim de averiguar a correta inserção do gene no plasmídeo, o produto de PCR de duas colônias positivas foi recortado, purificado e sequenciado. O sequenciamento com os oligonucleotídeos *sense* e *antissense* permitiu verificar a correta inserção do gene sem nenhuma mutação.

3.3 Clonagem da APRT no vetor de expressão pET28a

Após a digestão com as enzimas cujos sítios foram inseridos nos *primers* e estavam presentes no vetor, o gene e o vetor foram purificados do gel de agarose e quantificados para posterior ligação. Após a digestão o gene e o vetor foram purificados do gel de agarose e quantificados para posterior ligação. O produto da ligação foi utilizado na transformação de bactérias competentes *E. coli* BL21 (DE3), e plaqueadas em meio LB sólido. As colônias crescidas foram replicadas e utilizadas para PCR de colônia para confirmação da presença do inserto, que foi confirmado pela visualização em gel de agarose. A APRT clonada no vetor de expressão pET28a(+) apresenta construção mostrada na figura 18, que foi confirmada pelo sequenciamento.

Figura 18 - Estrutura gênica da região em que o gene da APRT foi clonado em vetor pET28a(+)

Como projetado inicialmente, o gene da APRT inseriu-se na mesma fase de leitura da região codificadora seguinte ao Operon Lac. Com isso, é expressa junto ao N-terminal uma porção extra de aminoácidos contendo um sítio de clivagem para trombina (linha demarcada “thrombin”) e uma região de 6x-Histidinas. Essa inserção é relevante para o processo de purificação e posterior remoção da cauda.

3.4 Expressão e Purificação da enzima APRT

Os ensaios de expressão da APRT foram todos realizados em cepas de *E.coli* BL21 (DE3). A cultura de células foi crescida em meio 2xYT até atingir a D.O. de 0.6, sempre a 37° C. Ao atingir a DO de 0.6, uma alíquota de cultura era retirada, centrifugada por 1min a velocidade máxima e uma pequena fração do precipitado era ressuspenso para verificação em SDS-PAGE 15%. Alíquotas foram retiradas a cada hora após indução com 0.1, 0.3, 0.5 e 1mM de IPTG. Verificou-se que, para critérios de expressão, 0.1mM ou 0.3mM não apresentavam diferenças significativas na expressão. Logo, optou-se por padronizar os ensaios a 0.1mM de IPTG. O tempo total de indução foi de 4 horas. A APRT foi expressa majoritariamente na fração solúvel. Outra variável testada foi a utilização de lisozima (1mg/ml) durante a lise das células. Tal medida não acrescentou benefícios significativos em relação de 10 pulsos de 30s de sonicação, com intervalos de 30s.

Tendo o lisado de células sido clarificado por centrifugação, este foi aplicado em uma resina de afinidade do tipo IMAC, cujo metal de transição associado é o Níquel. Verificou-se que, embora a APRT ligasse fortemente à resina, o processo foi melhorado ao optar pelo fluxo contínuo de 5ml/min em uma plataforma Äkta Purifier em vez do tradicional método por gravidade. A figura 19 mostra em azul a absorbância a 280nm e em verde o percentual de tampão A + 500 mM de imidazol. Primeiramente, vê-se a leitura em 280nm saturada, visto que todo o *pool* de proteínas lisadas está sendo detectado. Ao se passar somente o tampão A, as proteínas não ligadas são retiradas da resina até a obtenção de um patamar.

O gradiente linear aplicado garante que a interação proteína-resina seja enfraquecida aos poucos e que proteínas contaminantes que esteja interagindo sejam retiradas. Nota-se que o aumento de absorbância é gradativo, visto a presença de imidazol, porém, quando chega-se na concentração de eluição, há uma subida abrupta, indicando que a proteína-alvo está sendo eluída.

Ao ser totalmente eluída, a absorbância volta aos níveis relativos ao imidazol. As frações são coletadas para análise e a resina é lavada com tampão A para um novo ciclo de purificação.

Figura 19 – Corrida de purificação por afinidade em resina de Níquel. A seta azul indica a proteína APRT sendo eluída.

Ao se optar inicialmente por um aumento gradativo na concentração de imidazol, pode-se determinar a concentração ótima de eluição. Observou-se que a proteína se desligava da resina preferivelmente a 64,6% de tampão A contendo 500mM de Imidazol, o que corresponde à 325mM de Imidazol.

Tendo se estabelecido o ponto ótimo de eluição, a purificação foi otimizada adotando-se de degraus de concentração. Foi escolhida uma concentração de imidazol alta suficiente para retirar os contaminantes, mas não a APRT, e esta foi passada pela coluna até a absorbância a 280nm formar um patamar (Figura 20). O resultado foi verificado em gel SDS-PAGE 15%, figura 21.

Figura 20 – Purificação por afinidade adotando-se degraus de diferentes concentrações de Imidazol. A barra azul indica absorbância a 280nm, em unidades arbitrárias e a barra verde indica percentagem de tampão B (com 500mM de Imidazol) na amostra

Figura 21 – Gel de 15% SDS-Page 1) Marcador de massa molecular; 2) Lisado bacteriano; 3) Lisado após interagir com a resina (“flowthrough”); 4) Estabilização do primeiro patamar; 5) Primeira lavagem com 10% de tampão com 500mM de Imidazol; 6) Lavagem com 20%; 7) lavagem com 50% e pico de eluição da proteína.

Tendo sido purificada, o Imidazol foi retirado ao se trocar o tampão em tubos Centricon, a 4000x g. Após essa etapa, a amostra foi incubada a 18° C por 12-16 horas com trombina como descrito anteriormente. A Figura 22 mostra que após 14 horas de incubação da proteína com trombina a clivagem da cauda de histidinas foi efetiva, uma vez que a banda presente no gel na coluna 4 está mais baixa que na banda de proteína não clivada (coluna 2).

Figura 22 – Gel de 15% SDS-PAGE com a clivagem por trombina. 1) Marcador de massa molecular; 2) Proteína, clivagem 0h; 3) Proteína, clivagem 6h; 4) Proteína, clivagem 14h

O volume de proteína clivada foi concentrado a 1-2 ml – ou até a proteína apresentar sinais de precipitação. Centrifugou-se a amostra por 5 min a 10.000xg para remoção de particulados e foi aplicada na coluna Superdex 75 10/30 para a etapa final de purificação, removendo peptídeos clivados, possíveis proteínas contaminante e separando frações não clivadas de APRT.

Figura 23 – Cromatograma da gel filtração em Superdex 75. No detalhe, gel de 15% SDS-PAGE contendo: 1) Marcado de massa molecular; 2) Fração 9; 3) Fração 10; 4) Fração 11

Com a proteína pura, foi possível iniciar os estudos físico-químicos, estruturais e cinéticos.

A APRT tem um bom rendimento comparando-se com outras proteínas. Para cada 1L de meio de cultura induzido, foi possível obter até 25-35 mg de proteína pura. Entretanto, a estabilidade mostrou-se um problema grave. A busca por tampões e condições favoráveis foi extensa, variando o pH de 5.5 a 9.0 e não foi possível estabelecer um tampão que assegure a estabilidade da proteína em solução por longo prazo. O tampão final de 50mM de PIPES apresentou-se satisfatório, permitindo concentrações até 10mg/ml e estabilidade frente à precipitação em torno de 3-4 horas.

A gel filtração separa partículas por tamanho, foi feito, portanto, uma curva de calibração com proteínas conhecidas (a saber, BSA, 67kDa; β -lactoglobulina, 35kDa, Ribonuclease A, 13,7kDa, Aprotinina, 6,7kDa) cujo R^2 obtido foi de 0,937. A retenção da APRT ficou em 10,77ml quando em tampão PIPES e 10,61ml quando PIPES foi substituído por TEA, nas mesmas condições. Isso indica uma proteína de 40.62 kDa. Esse valor confirma um dímero em solução, que concorda com o esperado para uma PRTase do tipo I.

3.5 Características Físico-Químicas da APRT

Um passo importante antes de qualquer estudo envolvendo proteínas é a busca por objetos de estudo similares nos bancos de dados e uma predição dos parâmetros físico-químicos esperados, para um direcionamento racional dos experimentos. Temos que considerar a existência de duas construções a saber: 1) hisAPRT, que contém a proteína acrescida da cauda de 6x histidinas além do sítio de clivagem de trombina; 2) smAPRT, que representa a proteína acrescida de 6 resíduos (GSHMAS), resquícios da clivagem em pET28a(+). Pela ferramenta PROTPARAM ⁴³ foram levantados os parâmetros da tabela 10.

Tabela 10 - Compilação dos parâmetros físico-químicos teóricos da Adenina Fosforibosil Transferase com cauda de poli-histidinas(hisAPRT) e após clivagem (smAPRT) e comparação com proteínas já cristalizadas. A saber, 1G2Q - APRT de *S. cerevisiae*, 1ZN8 - *Homo sapiens* e 1L1Q – *Giardia lamblia*

	M.W(kDa)	pI	Abs	ϵ_{280} (M ⁻¹ cm ⁻¹)	GRAVY	Alifático	Instabilidade
hisAPRT	23,054	8,35	0.452	10430	0,084	103,97	37,47
smAPRT	21,172	7,82	0.493	10430	0,193	109,64	37,72
1ZN8	19,607	5,78	0,584	11460	0,104	107,83	39,29
1G2Q	20,596	5,03	0,434	8940	0.146	105,45	25,93
1L1Q	20,258	7,15	0,294	5960	0,070	105,32	32,47

As APRTs (E.C. 2.4.2.7) possuem 172 aminácios, em média, o que reflete a massa molecular aproximada. Das APRTs com modelo cristalográfico, apenas a 1L1Q (*G. lamblia*) apresenta pI próximo ao neutro ao passo que o restante apresenta pI mais ácido. É interessante notar que as smAPRT possui o maior pI até agora relatado na literatura, como visto na

Figura 24 - Gel de focalização isoeletrica. Tem-se os valores de pI de cada marcador (coluna M) com os respectivos marcadores e as bandas de APRT na coluna 1.

Mesmo não contendo triptofanos, que é o aminoácido com a maior contribuição para a absorbância a 280nm, a smAPRT apresenta 9 tirosinas, o que pode justificar o coeficiente de extinção molar baixo a 280nm porém, alta comparada as homólogas.

O índice de instabilidade é calculado tomando como base 7 proteínas instáveis e 32 estáveis e a ocorrência de certos dipeptídeos nas sequências primárias ⁷⁰, o que revela que a smAPRT representa, junto com a humana, uma das mais instáveis. Para ser considerada estável, a pontuação deve ser menor que 40. O índice alifático relaciona-se com o volume relativo ocupado por aminoácidos alifáticos (Ala(A), Val(V), Ile(I) e Leu(L)) e, acredita-se ser um fator benéfico para estabilidade térmica de proteínas globulares. No caso, a smAPRT seria termicamente a mais estável. O índice GRAVY(Grand Average of Hydropathy) é a relação entre a soma dos valores de hidrofobicidade atribuído a cada aminoácido sobre o número total de resíduos na cadeia ⁷¹. Interiores de proteínas tendem a ter maiores valores de GRAVY e, a smAPRT tem o maior valor entre as homólogas, indicando uma tendência hidrofóbica maior que média encontrada.

3.6 Ensaio de estabilidade frente à temperatura e concentração

A fim de avaliar as características da APRT em solução, foram feitos ensaios de espalhamento dinâmico de luz e dicroísmo circular. Esses ensaios visam avaliar a estabilidade frente à concentração e à temperatura. Para uma visão completa dos efeitos de agregação da APRT – o principal problema encontrado –, avaliamos o comportamento do raio hidrodinâmico em diferentes temperaturas e o enovelamento de α -hélices⁷².

Figura 25 - Sobreposição das medidas de Z-médio - por DLS - e de elipcidade molar -por CD, a 220nm.

O gráfico da figura 25 ilustra o comportamento da proteína em solução. As amostras foram verificadas tanto para hisAPRT quanto para smAPRT, em tampão A (etapa de afinidade) e em tampão PIPES (etapa de gel filtração) e o comportamento foi similar.

Pode-se verificar que há formação de um estado agregado a partir de 37° C e a abaixo de 16° C. Como o CD não é sensível a agregados, mas sim a estrutura secundária – no caso em questão, a leitura em 220nm monitora um dos mínimos relativos às hélices- α – vê-se que a proteína desnatura por volta de 55° C. Ou seja, a proteína agrega e posteriormente desnatura.

Com essa informação, reduziu-se a temperatura de indução de 37° C para 30° C e eliminaram-se todas as etapas que envolviam o uso de gelo (4° C). A redução na perda de proteína durante os experimentos foi notável, porém, a estabilidade da proteína em altas concentrações e a longo tempo ainda é um ponto crítico a ser resolvido.

3.7 Cinética enzimática

Verificou-se que tanto o ensaio direto quanto o acoplado foram satisfatórios para a caracterização enzimática da APRT. Entretanto o ensaio acoplado se mostrou mais sensível. A fim de garantir que a etapa acoplada não era a etapa limitante do processo, verificou-se a reação acoplada somente com PPi adicionado e, a esta não apresenta interferência aparente no processo.

Mesmo a medida direta de absorbâncias sendo possível, alguns cuidados foram tomados. A baixa relação sinal-ruído provida pelo sistema torna as medidas de absorbância ruidosas e, conseqüentemente, a regressão linear fica prejudicada – com baixos valores de r^2 - ou mesmo torna-se errada. A estratégia adotada foi a de aumentar a amostragem a fim de suavizar a curva e permitir uma melhor regressão. Dada a sensibilidade do aparelho, é possível tomar medidas a cada 0,1 segundo (figura 26). Portanto, para um minuto de reação temos 600 pontos para análise.

Cada curva resposta teve sua inclinação calculada e, o resultado foi usado para uma regressão não linear de melhor ajuste. Para a adenina, o PRPP foi mantido a 600 μM com variação da adenina entre 400 μM a 1,75 μM . Para o PRPP, a adenina foi mantida a 350 μM variando-se o PRPP de 600 μM a 6,25 μM . Os dados coletados estão representados na figura.

Figura 26 - Variação de absorbância durante o experimento de cinética da APRT, com medida direta de produção de AMP. A linha em preto indica a maior velocidade obtida e a em vermelho, a menor velocidade.

Figura 27 – Variação da velocidade de reação com a variação de um substrato - a) PRPP e b) adenina, frente ao excesso do substrato complementar à reação

Como o modelo cinético utilizado é o de Michaelis-Menten, o sistema segue a equação 10:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]} \quad (10)$$

onde v é a velocidade inicial de reação, $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima de reação, $[S]$ é a concentração do substrato e K_M é a constante de Michaelis-Menten. O Valor de K_M é uma medida relativa de afinidade da formação do complexo Enzima-Substrato, que

se caracteriza pela alta concentração deste quando comparado à concentração de enzima livre.

Portanto, temos a APRT ativa cineticamente e dois ensaios capazes de avaliar sua reação direta. Os valores estão resumidos na tabela 11

Tabela 11 - Compilação de dados da cinética enzimática

	Velocidade ($\mu\text{M/s}$)	$K_m(\mu\text{M})$	R^2
Adenina	6,55 $\pm$ 0,20	87,73 $\pm$ 8,19	0,9912
PRPP	7,54 $\pm$ 0,81	181,30 $\pm$ 49,49	0,9706

A mesma estratégia cinética foi avaliada para verificar a reação de AMP e PPi, utilizando a reação acoplada com xantina oxidase (XO). Nenhum sinal significativo de produção de adenina foi verificado. Ainda, duas amostras reacionais contendo 500mM de cada substrato foram incubadas por 20 minutos. À uma delas, foi adicionado 40nM de APRT (quatro vezes mais que o utilizado na reação direta) por 20 minutos. Ao final, foi adicionado excesso de XO (1U.I.) para cada reação. Não se observando nenhum sinal de detecção de adenina, a reação foi complementada com 500mM de adenina recém-preparada. Após essa adição, ambas as reações exibiram sinais de detecção de adenina, indicando que a XO estava ativa e portanto, sugere-se a ausência da etapa reversa da APRT de *S. mansoni*.

3.8 Ensaios de cristalização

A APRT foi testada frente aos kits *Crystal Screening e Salt RX* (Hampton Research), Classic Suite, PEGI e PEGII (Qiagen) de condições de cristalização nas concentrações de 5mg/ml e 7mg/ml de APRT na forma APO, com AMP e com Adenina. O panorama geral dos experimentos resultou em gotas contendo precipitado protéico que se forma rapidamente. Foram obtidos, ainda, pequenos cristais que não difrataram com sucesso e não foram reproduzíveis.

Acredita-se que uma das causas críticas da falha na cristalização seja a instabilidade da proteína em longo prazo, visto que, nesses experimentos, ainda não

se usou grandes quantidades de agentes redutores (DTT, por exemplo) e, os problemas da proteína a baixa temperatura ainda não haviam sido identificados.

3.9 Modelagem Molecular por homologia

A ideia da utilização de ferramentas computacionais para o estudo de proteínas visa obter o maior número de informações teóricas para serem correlacionados – quando possível – com os resultados experimentais.

A primeira etapa adotada foi a de correlacionar a Adenina Fosforibosil Transferase de *S. mansoni* com aquelas já conhecidas e cristalizadas. Alinhando-se a smAPRT com o banco de dados pFam ⁷³ percebe-se, um domínio altamente conservado do aminoácido 18 ao 118 da smAPRT. Esse domínio é composto por parte do subdomínio “hood” – fundo laranja, o subdomínio “core” – delimitado por linhas pretas na primeira linha do alinhamento – e o subdomínio “cap”. Com a ferramenta ESPript, pode-se evidenciar o alinhamento com as homólogas cristalizadas mais próximas, evidenciando a conservação de aminoácidos – vermelho - e a manutenção de aminoácidos de mesma característica - letras vermelhas delimitas por uma linha azul (Figura 28)

A smAPRT compartilha 47% de identidade com a APRT de *S. cerevisiae* (1G2Q e 1G2P), 40% com a de *E. coli* (2DYO), 40% com humana (1ZN8, 1ORE, 1ZN7 e 1ZN9) e 38% com a de *G. lamblia* (1L1Q). Nesse alinhamento, ainda, podem ser observados os aminoácidos destacados com ▲, indicando o domínio de ligação com PRPP altamente conservado.

Figura 28 – Alinhamento da APRT com estruturas conhecidas. As colunas em vermelho indicam conservação de determinado resíduo. Em laranja, a sequência do subdomínio “hood”. Em azul claro o domínio de ligação do PRPP. Ainda, acc indica acessibilidade ao solvente de um resíduo e hyd a hidrofobicidade.

3.9.1 Predição de Estrutura Secundária

O objetivo de se prever a estrutura secundária é o de se obter a primeira informação estrutural da proteína e identificar aonde os domínios conservados estão localizados. Para a identificação, utilizou-se o programa PSIPRED⁷⁴, que compara a sequência com as estruturas primárias e secundárias de diversas proteínas com estrutura tridimensional conhecidas e retorna o melhor um valor de probabilidade de que um dado aminoácido esteja em determinada estrutura secundária. É de se esperar que o resultado seja tendencioso para as proteínas com maior identidade. Entretanto, isso não é um problema visto que as APRTs com modelo cristalográfico possuem dobramento característico (Figuras 29 e 30).

Figura 29 – Estrutura Secundária - APRT predição PSIPRED. Estão representadas as estruturas secundárias, sendo as hélices enumeradas com “H” e as fitas indicadas por B. Ainda, representam-se os motivos β -turn. Os pontos em vermelho indicam resíduos interagentes ao ligante.

Figura 30 – Sobreposição das estruturas cristalográficas evidenciando o alinhamento entre estruturas secundárias. A) Alinhamento entre as estruturas 1G2Q e 1ZN8. B) Alinhamento entre as estruturas 2DY0 e 1ZN8. Não há correlação entre cor e pontuação para dado alinhamento.

A predição da estrutura secundária concorda com as APRTs discriminadas na Figura 28. Deve-se salientar que na porção N-terminal a porção MSDRE (aminoácidos de 1-5) não é estruturada. No caso da hisAPRT, essa porção tem 28 aminoácidos e, quando clivada, 12 aminoácidos. Essa porção não estruturada apresenta-se muito maior do que as encontradas em proteínas cristalizadas. Não há reportada nenhuma APRT cristalizada cuja construção tenha partido de uma cauda de histidina no N-terminal. Esses aminoácidos podem contribuir para o aumento da

mobilidade nas regiões de contato cristalino, logo, desfavorecendo a cristalizabilidade da proteína.

3.9.2 Modelagem Molecular

Tendo-se escolhidos os modelos com maior identidade, os alinhamentos foram feitos considerando informações de estrutura secundária e, preservaram-se as moléculas de água e ligantes – quando presentes. Os modelos foram gerados utilizando o programa MODELLER, versão 9.9⁵². Foram gerados 100 modelos, cada um com 300 passos de otimização. Ao fim da modelagem, os modelos foram hierarquizados quanto à pontuação de DOPE (Figura 31).

Temos, então, os quatro melhores modelos referentes aos moldes 1G2Q, 1ZN8, 1ZN7 e 2DYO como objetos de estudo. Mesmo a proteína homóloga humana não apresentando identidade alta, em relação às outras, é a única proteína cristalizada com os ligantes no sítio ativo. Como o dobramento da família de PRTases, e consequentemente da APRT, é conservado, considerou-se um bom molde para estudo.

Figura 31 – Gráfico de valores de DOPE, em módulo. As estruturas com energias mais favoráveis serão aquelas com maior escore. Modelos considerando o molde 1G2Q, de *S. cerevisiae*. Esse valor de energia não possui significado físico direto, sendo uma forma de classificação das estruturas.

3.9.3 Validação dos modelos gerados

Tendo sido selecionados os modelos iniciais para estudo, os arquivos foram submetidos ao *Structural Analysis and Verification Server* – SAVES – <http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/> – que executa diversas ferramentas como PROCHECK⁵⁴, WHAT_CHECK⁵⁵, VERIFY3D⁵⁷, ERRAT⁵⁶ e PROVE⁷⁵. Os modelos com piores índices foram descartados, resultando em um modelo para cada estrutura molde (*template*). Deve-se lembrar de que os modelos foram feitos considerando moléculas de água e ligantes, quando presentes.

Os procedimentos de validação aqui descritos foram feitos para todos os melhores modelos selecionados. Entretanto, somente aqueles gerados com base na APRT humana com ligantes (1ZN8), já que o procedimento de análise é semelhante.

A primeira etapa consistiu na análise do modelo pelo Procheck. O modelo gerado tem seus parâmetros comparados com o de estruturas depositadas em bancos de dados, como o *Protein Data Bank* (PDB). Quanto à posição dos resíduos analisados no diagrama de Ramachandran, dos 372 aminoácidos, sendo 186 para cada cadeia, 94,4%(306) dos resíduos se encontravam em regiões favoráveis, 3,1%(10) em regiões adicionais, 2,2%(7) em regiões generosamente favoráveis e 0,3%(1) em regiões desfavoráveis (Figura 32).

O resíduo de glicina possui apenas um hidrogênio como cadeia lateral e, dessa forma, não possui quiralidade. É representado por triângulos nos diagramas de Ramachandran gerados pelo PROCHECK. O modelo cristalográfico usado como molde (1ZN8) apresenta 10 resíduos em regiões desfavoráveis, sendo um deles em regiões proibidas. Visto que os resíduos do modelo gerado se encontravam em regiões de *loop*, foram utilizados algoritmos de otimização, via MODELLER e ao final, sete resíduos de regiões generosamente permitidas foram para regiões adicionais. Porém, o resíduo Ser257 não pôde ser removido de uma região proibida. Esse resíduo, como visto na Figura 28, possui em sua adjacência um resíduo de Ácido Glutâmico ao passo que na 1ZN8 esse resíduo é um Ácido Aspártico. A presença de um grupamento CH₂ pode justificar um impedimento estérico visto que estes resíduos estão em regiões de contato do dímero, porém, não causa perdas na avaliação do modelo. A região correspondente aos resíduos 243,245 e 247 no modelo de *S. masoni* apresenta-se sem alinhamento no respectivo molde, fato que explica a modelagem inicial de baixa

Posteriormente, o modelo foi submetido à avaliação de vizinhanças químicas empregando o programa, SAVES/WHAT_CHECK.^{55; 76}. De maneira geral, o modelo não apresentou problemas senão a ausência de informação da célula unitária e simetria – esperados para um modelo de homologia e contatos muito próximos entre átomos, possivelmente decorrentes das imposições espaciais feitas pelo algoritmo do MODELLER. Como etapa final, o modelo foi submetido à ferramenta de remoção de colisões do WHATIF, que gera pequenas torções na cadeia principal a fim de remover choques estéricos entre resíduos.

Com a análise pelo VERIFY3D⁵⁷, o modelo é avaliado quanto à possibilidade daquela sequência de aminoácidos gerarem o modelo predito. Cada resíduo, com sua estrutura tridimensional, é caracterizado pelo seu ambiente químico. (Esses ambientes, 18 no total, são baseados no tipo de estrutura secundária em que o resíduo está inserido, contatos polares e acessibilidade do resíduo) e, ainda, pode ser

calculada a probabilidade para cada resíduo ter a propriedade descrita, em um chamado perfil 3D-1D. A APRT modelada apresentou 95,71% dos resíduos com pontuação maior do que 0.2, o que indica que temos um bom modelo. Para a estrutura 1ZN8, 100% dos resíduos estão com pontuação maior que 0.2.

Na comparação com modelos cristalográficos refinadas a 2.0 Å podemos avaliar os parâmetros de cadeia principal (Figura 33). Nesses gráficos, as regiões em roxo representam àquelas que estão na média das estruturas resolvidas por cristalografia. A linha central é o ajuste mínimo quadrático ao passo que a largura da banda corresponde ao desvio padrão. Temos: a) representação da qualidade do diagrama de Ramachandran, que é referente à percentagem de resíduos em regiões favoráveis; b) Planaridade das ligações peptídicas ω , quanto menor o desvio padrão, mais próximo é esse ângulo de 180°, sendo assim, uma ligação peptídica ideal; c) Medida de interações não favoráveis entre aminoácidos que representa quantificação de impedimentos estéricos entre resíduos. A estrutura 1ZN8 apresenta o mesmo padrão; d) Distorções no ângulo ζ , que é um ângulo imaginário entre os átomos de C α , N, C e C β de um dado resíduo. A distorção observada está no limite inferior do gráfico, indicando baixas distorções; e) Energias de ligação de hidrogênio, mostrando que as interações assumiram uma conformação estável e, portanto, favorável; e) Fator-G (*G-factor*) é uma medida de normalidade da estrutura, dados parâmetros estereoquímicos. Baixos valores de G indicam que aquela é uma conformação com baixa probabilidade de ocorrência. Um resíduo em uma região proibida do Diagrama de Ramachandran terá um fator G muito baixo e/ou negativo. Dessa forma, concluímos que o modelo gerado é de boa qualidade para estudos com a Adenina Fosforibosil Transferase de *S. mansonii*.

A avaliação dos modelos foi feita comparando-se com os dados já existentes nos bancos de dados, como o *Protein Data Bank* (PDB). Foram plotados os dados dos ângulos diedros ϕ e ψ relacionados aos resíduos de aminoácidos de proteínas.

Figura 33 – Comparação de parâmetros do modelo com o banco de dados de estruturas A linha central indica a média e as extremidades o intervalo de variação aceita. O ponto vermelho indica em que região encontra-se o modelo da APRT por homologia.

3.9.4 .Predição de pontes Dissulfeto e Resíduos expostos de Cisteína.

A existência de pontes dissulfeto em proteínas pode auxiliar a estabilidade dessas, visto a forte ligação. Os sistemas de expressão heterólogos em procariotos, no caso *E. coli*, não são capazes de formar pontes dissulfeto nas proteínas expressas.

Sabendo que cada cadeia da APRT possui quatro cisteínas, foi feita uma predição de pontes dissulfeto entre esses resíduos usando o servidor DISULFIND⁷⁷. Todas as cisteínas foram preditas no estado não ligado, com confiabilidade alta. Ao localizar tais resíduos no modelo, entretanto, notamos que seis estão em regiões expostas ao solvente. Como a formação de pontes dissulfeto leva a proteína à formação de agregados, a utilização de agentes redutores, tais como β -Mercaptoetanol e Ditioneitol (DTT) é fundamental para o trabalho com a APRT.

Observou-se que as amostras com DTT resistiam por mais tempo. Então, após a purificação da proteína, as soluções foram mantidas com 6-8mM de DTT.

Figura 34 – Modelo tridimensional da Adenina Fosforibosil Transferase de *S. mansoni*. Em destaque, a localização dos resíduos de cisteína.

3.10 Determinação do raio hidrodinâmico e dispersividade da amostra

O experimento de espalhamento dinâmico de luz fornece informações sobre o raio hidrodinâmico das partículas em solução e a dispersividade desse raio. Tal dado é importante ao se avaliar estado de oligomerização de proteínas, formação de particulados solúveis e aumento do raio devido à interação com ligantes.

A fim de avaliar o comportamento da APRT, foram medidos os raios hidrodinâmicos tanto da APRT clivada quando da construção com cauda de histidinas (hisAPRT). As medidas foram feitas em triplicata, no aparelho ZetaSizer (Malvern Instruments), sendo cada uma a acumulação de 13 leituras, a 20° C. Os

parâmetros de intensidade e contagem de fótons são otimizados automaticamente antes de cada leitura (Figura 35)

Figura 35 – Dados de espalhamento dinâmico de luz. A curva verde refere-se à hisAPRT e a curva vermelha à APRT. Nota-se o deslocamento do ponto de máximo na curva de intensidade relativa ao tamanho.

Determinou-se, como raio hidrodinâmico por DLS para a APRT $38,47 \pm 17,45$ e para a hisAPRT $41,70 \pm 10,70$. Apesar de o resultado ter bons parâmetros para cálculo (Figura 35), o erro associado à medida é grande visto que pode ocorrer interação entre as moléculas, flutuações de temperatura na medida e aproximações no índice de refração do meio. Ambas as amostras foram consideradas polidispersas, o que remete à variação entre as espécies em solução. A amostra de hisAPRT foi menos polidispersa, com um índice de 25% contra 44% da APRT. Tal fato pode ser decorrente da clivagem parcial da cauda de histidina em algumas cadeias, formando uma população que, mesmo com propriedades muito próximas, é heterogênea.

Observa-se que o raio hidrodinâmico da hisAPRT apresenta-se maior. O fato era esperado visto que a cauda não está estruturada e pode causar um maior arrasto da molécula em solução.

O raio hidrodinâmico foi calculado teoricamente, em uma série de *scripts* para o Pymol.

Figura 36 – Representação física do raio hidrodinâmico observado nas medidas de DLS. a) APRT com cauda de histidina, hisAPRT; b) APRT com a cauda clivada, APRT.

Os raios teóricos calculados foram de 42,14 Å para a hisAPRT e de 39,26 Å para a APRT clivada. Esses resultados reforçam a qualidade do modelo. As diferenças podem ainda ser explicadas pela expansão no volume que a estrutura pode sofrer em solução, devido às flutuações térmicas, regiões móveis nas cadeias, hidratação e relaxação do empacotamento cristalino.

3.11 Análises estruturais pela dinâmica molecular e tCONCOORD

Duas configurações do complexo enzima/ligante foram utilizadas para as simulações de dinâmica molecular no *conjunto* NPT. Realizamos os estudos empregando a APRT humana na forma ligada ao AMP – 1ZN8 – e a forma ligada a Adenina e PRPP – 1ZN7. Modelos tridimensionais por homologia foram gerados e validados tomando como base essas estruturas como *molde*.

O principal objetivo dessas simulações é de avaliar as diferenças estruturais da proteína em solução e do modelo cristalográfico.

A primeira das etapas de uma dinâmica molecular é verificar se a simulação houve a convergência do sistema para um estado de equilíbrio. Nesse estado, os valores para RMSD (*Root-mean square-deviation*) convergem para um determinado intervalo, indicando que o sistema não apresenta impedimentos estéricos e que a proteína está estável durante o experimento.

O tempo total das simulações foi de 10 ns.

3.11.1 Análise de variação conformacional

Uma análise prévia dos modelos cristalográficos da hsAPRT (1ZN8 e 1ZN7) permite avaliar, pelos fatores de temperatura, as regiões de maior mobilidade na estrutura cristalográfica e então correlacionar com elementos de estrutura secundária (Figura 37)

Figura 37 - Alinhamento entre a APRT de *S. mansoni* e os modelos humanos utilizados.

Dentre elas, destacam-se a porção N-terminal, e os *loops* situados entre os resíduos 13 e 29, compreendendo duas fitas β antiparalelas e um *turn*, e entre os resíduos 90 e 110, compreendendo o mesmo tipo de estrutura. Estes loops (loops 1 e 3 – Figura 38) estão associados a função de captação e direcionamento dos substratos em direção aos sítios de ligação.

Figura 38 - Gráfico do RMSD comparativo entre os modelos estudados. As regiões 1 e 3 são os *loops* aceptores de substrato para direcionamento ao sítio ativo e a região 2 compreende um *loop* que foi bloqueado cristalograficamente. Na legenda, hs indica o *Homo sapiens*; DM: Dinâmica molecular, X: cristalografia, TC: tCONCOORD. AMP indica que esse modelo estava com AMP em seu sítio ativo.

O resultado da dinâmica para o modelo hsAPRT contendo AMP, mostra uma estrutura de equilíbrio coerente com o modelo cristalográfico (Figura 38).

Figura 39 - Modelo em *cartoon*, comparando as flutuações da cadeia principal da estrutura cristalográfica (vermelho) e do modelo teórico obtido na simulação de dinâmica molecular.

Além da identificação das regiões móveis, 3 regiões se destacam pelo significativo aumento de mobilidade. Duas delas são as regiões 1 e 3 (Figura 38 – destaques em azul), que correspondem aos *loops* aceptores. A região compreendida entre os resíduos 50 e 60 aumenta drasticamente sua mobilidade e compreende um *loop-turn* entre a hélice-3 e a fita-3 (Figura 37).

Duas informações emergem desse dado. Primeiramente que a região 2 da figura 38 é uma região de inserção de aminoácidos da estrutura de *S. mansoni* em relação à humana, dificultando a modelagem aumentando a mobilidade da cadeia devido à falta de estrutura. Segundo que essa é uma região de contato cristalino entre as regiões 1 e 3 e a região 2, ou seja, o contato cristalino limita a mobilidade dessas regiões dos *loops* respectivos a essas regiões. Dessa forma, em uma estrutura cristalográfica há uma tendência a uma mobilidade muito menor que a real.

Figura 40 – a) Modelo em cartoon mostrando os contatos cristalinos, onde o loop 2 de uma unidade do cristal interage com os loops 1 e 3 de outra unidade, de forma a estabilizá-lo. b) Ampliação da região descrita.

Nas duas configurações simuladas, a da enzima contendo AMP, e a enzima contendo ADE mais PRPP, as estrutura rapidamente convergiram para uma ligeira abertura dos loops 1 e 3, conformação que mostrou-se estável em uma escala de 10ns.

O gráfico de RMSD para os modelos de *S. mansoni* apresentam uma distribuição parecida, com as regiões mais móveis concordando com a humana (Figura 41).

Figura 41 - Gráfico do RMSD comparativo entre os modelos estudados. As regiões 1 e 3 são os *loops* aceptores de substrato para direcionamento ao sítio ativo e a região 2 compreende um *loop* que foi bloqueado cristalograficamente. Na legenda, Sm indica o *Schistosoma mansoni*; DM: Dinâmica molecular, TC: tCONCOORD. AMP indica que esse modelo estava com AMP em seu sítio ativo.

3.11.2 Análise conformacional do sítio ativo por Dinâmica Molecular

Durante a validação dos modelos estruturais da APRT de *S. mansoni* baseados na estrutura de APRT humana 1ZN7 e 1ZN8 foram verificados alguns dos contatos importantes na interação do ligante no sítio catalítico. Dessas interações, duas se revelaram interessantes para o estudo, a saber:

1 – Grupo 1 – Os resíduos 65-67 da APRT humana (DSR), na APRT de *S. mansoni* correspondem a ESR.

2 – Grupo 2 – O resíduo L129 da APRT humana corresponde a V.na APRT de *S. mansoni*

O grupo 1 é reportado como uma conformação *cis* importante para a ligação do PRPP ao sítio ativo⁷⁸. Mesmo sendo possível encontrar ambas as formas *cis* e *trans* em estruturas cristalográficas, não é reportada a conformação *trans* quando o PRPP está ligado ao sítio (Figura 42)

Figura 42 – Representação das conformações *cis* e *trans* para a trinca do grupo 1, para a estrutura de APRT de *G. lamblia*. Adaptado.²⁹.

O grupo 2 apresenta uma mutação de Leu (humano) para Val (*S. mansoni*). Além das diferenças estruturais (um grupamento CH₂ a mais da valina na cadeia lateral), observou-se um posicionamento diferente, que mostrou-se desfavorável à ligação da adenina (Figura 43). É reportado que a Ala131, adjacente, é um dos resíduos responsáveis pela afinidade e reconhecimento da adenina^{34; 35}. Este resíduo é conservado em todas as APRTs estudadas.

Durante as simulações de dinâmica molecular, observou-se que o Grupo 1 se reordena instantaneamente, da ordem de femto segundos, e o grupo 2, inicialmente

favorece a saída da adenina porém, após simulações da ordem de décimos de ns, o sua conformação é corrigida e a adenina retorna à conformação original no sítio (figura 43).

Figura 43 – Representação gráfica do rearranjo da Val129. Em cinza, o modelo de *S. mansoni*, na conformação desfavorável e em verde, a humana, com a conformação favorável.

Mesmo com a reorganização dos rotâmeros, a Arg67, conservada em todas as APRTs conhecidas, não assumiu uma posição favorável e, o que atentou para importantes características do sítio catalítico. No sítio de ligação, a adenina é estabilizada por duas interações polares. A primeira com o hidrogênio da cadeia principal do resíduo R25, e a segunda com grupo carregado na cadeia lateral do resíduo R67 (Figura 44). O valor médio da energia de interação entre a adenina e proteína calculado através da simulação por dinâmica molecular foi de -26,5 kcal/mol. Utilizando-se o mesmo procedimento, a contribuição energética calculada, para os resíduos R25 e R67 é de -6,7 e 10,6 kcal/mol respectivamente. Ou seja, o resíduo R67 é responsável por mais de 1/3 da energia total de interação entre a proteína e a base de adenina.

Esta interação também favorece a orientação da molécula de adenina, de modo que o ataque nucleofílico do mesmo à molécula de PRPP seja facilitado. Este fato reforça a razão pela qual este resíduo é altamente conservado nesta posição. Quando as simulações foram realizadas com a Arg67 em seu rotâmero incorreto a energia total calculada é inferior, com a diferença correspondente à ausência da ligação de hidrogênio no sítio.

Figura 44 – Representação da correta orientação dos resíduos R25 e R67, com as ligações de hidrogênio evidenciadas em amarelo.

3.11.3 Análise do mecanismo de reação

A dinâmica molecular, por ser uma abordagem intrinsecamente clássica, não permite que fenômenos envolvendo transferência de carga sejam observados, logo, reações não podem ser explicitamente observadas. Entretanto os experimentos de dinâmica molecular foram capazes de nos fornecer importantes indícios para a determinação de mecanismos de reação.

Durante a simulação do sistema hsAPRT contendo adenina + PRPP, foram observadas duas configurações predominantes que sugerem interações favoráveis, para transferências de cargas e, portanto, possíveis caminhos de reação.

Na configuração 1 (Figura 45), uma molécula de água, faz uma ponte entre a molécula de PRPP, doando uma ligação de hidrogênio, e adenina, recebendo uma ligação de hidrogênio, pelas ligações, $O_{PRPP}^4 - H_{H_2O}^1$ e $O_{H_2O}^2 - H_{adenina}^5$ de acordo com a Figura 43.

Figura 45 - Esquema das interações feitas pela molécula de água, adenina e PRPP na dinâmica molecular baseada na estrutura 1ZN7.

Nesta configuração, a ligação $O_{PRPP}^4 - H_{H_2O}^1$ é curta o suficiente para que a molécula de água atue como um ácido, transferindo um próton para o grupo fosfato da molécula de PRPP, gerando uma espécie OH^- . Esta, por sua vez, está na orientação favorável com o receptor (base) do próton $H_{adenina}^5$, regenerando a molécula de água e transformando a adenina em nucleófilo (base). Por fim, a adenina ataca o carbono C_{PRPP}^1 da molécula de PRPP, deslocando o grupo pirofosfato (PPi) e gerando uma molécula de adenosina monofosfato (AMP). O mecanismo é detalhado na figura 46.

Figura 46 - Mecanismo proposto da APRT envolvendo a molécula de água. a) Molécula de água doa um próton para o oxigênio do PRPP. b) Hidrogênio da adenina é doado ao recém formado íon hidroxila e reestabelece a molécula de água. c) A adenina desprotonada, nucleofílica, ataca o carbono do PRPP; d) a ligação entre Adenina e PRPP é formada; e) Grupo pirofosfato é deslocado, dando origem ao AMP e PPi. Baseada em momentos da dinâmica molecular.

Na configuração 2, o H_{ade65} , faz uma interação direta com o O_{prpp40} , de forma que o grupo fosfato é protonado diretamente. A adenina se transforma em uma espécie básica (nucleófilo), que ataca o carbono C_{prpp25} , completando a reação e tendo como produtos AMP e PPI.

Figura 47 – Esquema de interação presente no sítio ativo para a configuração 2. Nota-se a interação direta entre adenina e PRPP.

Quando o grupo fosfato é protonado, sabe-se o carbono C_{prpp25} torna-se um ácido de Lewis mais forte, devido ao aumento de carga positiva neste átomo, complementando a teoria do mecanismo da configuração 2. Na figura 48, temos esse mecanismo detalhado.

Figura 48 – Mecanismo proposto para a APRT envolvendo ataque direto. a) Ocorre a interação direta entre a adenina e o PRPP. b) Ocorre a protonação do grupamento Pirofosfato, levando à formação de uma Base de Lewis. c) A base ataca o C1 da ribose d) O PPI é deslocado formando AMP. Baseado em instantes da dinâmica molecular

O ataque nucleofílico que acontece do N9 da adenina com o C1 da ribose já foi proposto anteriormente. Silva e colaboradores ainda afirmam que nenhum candidato óbvio capaz de provocar a abstração havia sido identificado³⁴.

Com os dados de dinâmica molecular pode-se verificar que, caso haja esse agente desprotonador, sugere-se que este seja uma molécula de água. Foi observado durante as simulações que esta molécula permanece na conformação mostrada na figura 45 por vários ns. Caso ela saia do sítio, outra molécula a substitui na escala de fs.

4 Conclusão

A Adenina fosforibosiltransferase de *S. mansoni* teve seu cDNA isolado e clonado, sendo a respectiva proteína expressa e purificada, permitindo a realização de experimentos de cristalização, que estão em andamento, e medidas de cinética enzimática. Os modelos gerados por homologia concordaram com raio hidrodinâmico obtidos por DLS. Ainda, a APRT mostra-se mais estável em temperatura ambiente, como foi comprovado pelos experimentos de DLS, sendo observada agregação abaixo de 16° C. Ainda, o modelo explicitou a necessidade de altas de agentes redutores devido às cisteínas expostas.

A proteína encontra-se cineticamente ativa e teve seus valores de K_M levantados, permitindo a comparação com outras APRTs já estudadas, sendo esse valor comparável e coerente com a literatura..

As simulações e dinâmica molecular permitiram observar e comparar o modelo com a estrutura cristalográfica, explicitando movimentos de cadeias não visualizados mediante análise da estrutura cristalográfica previamente descrita.

É interessante perceber que mesmo os modelos por homologia atendendo a diversos critérios de qualidade utilizados rotineiramente, pequenas imperfeições não foram detectadas. O estudo do modelo por dinâmica molecular mostrou-se uma etapa crítica para a correta simulação dos mecanismos catalíticos e correção da estrutura por homologia.

Mesmo assim, simulações da ordem de décimos de nano segundo foram capazes de corrigir rotâmeros erroneamente modelados. Fica explícito que a inspeção visual criteriosa é fundamental para a validação de um modelo por homologia.

Pode se observar dois distintos caminhos da reação direta, da conversão de adenina e PRPP em AMP e PPi e sugeriu-se ainda a possibilidade de uma molécula de água atuar abstraindo um próton da adenina, o que amplia o conhecimento do mecanismo enzimático da APRT.

5 Perspectivas

1 – Cristalizar e resolver a estrutura para a APRT de *S. mansoni*, aplicando as informações obtidas com os modelos por homologia e dinâmica molecular para então aprofundar os estudos relativos ao seu mecanismo enzimático.

2 – Realizar um maior número de simulações para observação dos fenômenos abordados com maior espaço amostral.

3 – Utilizar métodos de mecânica quântica para analisar os problemas que a dinâmica molecular não é capaz de resolver, como avaliação detalhada dos mecanismos reacionais.

REFERÊNCIAS

- 1 WORLD HEALTH ORGANISATION. **The Global burden Disease. Projections of mortality and burden of disease, 2004-2030**, 2004. Disponível em: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/index.html. Acessado em: 21 jul. 2011.
- 2 _____. Weekly epidemiological record: WHO: 73-80 p. 2011.
- 3 _____. WHO, Programmes and projects, Schistosomiasis Strategy. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>. Acessado em: 21 jul. 2011
- 4 _____. Working to overcome the global impact of neglected diseases. Geneva: WHO 2009.
- 5 PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499-511, July 2002.
- 6 VAN DER WERF, M.J.; DE VLAS, S.J., BROOKER, S.; LOOMAN, C.W.N.; NAGELKERKE, N.J.D.; HABBEMA, J.D.F.; ENGELS, D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Tropica**, v. 86, n. 2-3, p. 125-139, May 2003.
- 7 CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p. 41-51, Oct. 2000.
- 8 PESSOA, S. M.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. 10. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977.
- 9 SENFT, A.W.; MIECH, R.P.; BROWN, P.R.; SENFT, D.G. Purine metabolism in *Schistosoma mansoni*. International. **Journal of Parasitology**, v. 2, n. 2, p. 249-260, 1972.

10 SARVEL, A.K.; OLIVEIRA, A.A.; SILVA, A.R.; LIMA, A.C.L.; KATZ, N. Evaluation of a 25-Year-Program for the Control of Schistosomiasis Mansoni in an Endemic Area in Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, May 2011.

11 CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Neglected Tropical Diseases 4 Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 239-247, Jan. 2010.

12 DOENHOFF, M.J.; KUSEL, J.R.; COLES, G.C.; CIOLI, D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 465-469, Sepy-Oct 2002.

13 FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis - resistance to praziquantel and oxamniquine induced in schistosoma-mansoni in mice is drug-specific. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 1, p. 83-88, July 1994.

14 MEYER, T.; SEKLJIC, H.; FUCHS, S.; BOTHE, H.; SCHOLLMMEYER, D.; MICULKA, C. New Incentive to Switch to (R)-Praziquantel in Schistosomiasis Treatment. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 1, Jan. 2009.

15 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on the scientific working group meeting on Schistosomiasis. WHO. Genebra, SW, 2005. p.123.

16 BERRIMAN, M.; HAAS, B.J.; LOVERDE, P.T.; WILSON, R.A.; DILLON, G.P.; CERQUEIRA, G.C.; MASHIYAMA, S.T.; AL-LAZIKANI, B.; ANDRADE, L.F.; ASHTON, P.D.; ASLETT, M.A.; BARTHOLOMEU, D.C.; BLANDIN, G.; CAFFREY, C.R.; COGHLAN, A.; COULSON, R.; DAY TA, DELCHER A, DEMARCO R, DJIKENG A, EYRE T, GAMBLE JA, GHEDIN E, GU *ET AL*. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352-358, 2009.

17 SAYED, A.A.; SIMEONOV, A.; THOMAS, C.J.; INGLESE, J.; AUSTIN, C.P.; WILLIAMS, D.L. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nature Medicine**, v. 14, n. 4, p. 407-412, Apr. 2008.

18 SENFT, A. W.; CRABTREE, G. W. Purine metabolism in the schistosomes - potential targets for chemotherapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 20, n. 3, p. 341-356, 1983.

19 SCHWARTZMAN, J. D. PFEFFERKORN, E. R. Toxoplasma-gondii - purine synthesis and salvage in mutant host-cells and parasites. **Experimental Parasitology**, v. 53, n. 1, p. 77-86, 1982

20 ELKOUNI, M. H.; CHA, S. Metabolism of adenosine-analogs by schistosoma-mansoni and the effect of nucleoside transport inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 7, p. 1099-1106, Apr. 1987.

21 DOVEY, H. F. MCKERROW, J. H. WANG, C. C. Purine salvage in schistosoma-mansoni schistosomules. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 11, n.; p. 157-167, Apr. 1984.

22 SENFT, A. W. CRABTREE, G. W. Pathways of nucleotide-metabolism in schistosoma-mansoni .7. Inhibition of adenine and guanine nucleotide synthesis by purine analogs in intact worms. **Biochemical Pharmacology**, v. 26, n. 20, p. 1847-1855, 1977.

23 ROSS, A. F.; JAFFE, J. J. Effects of tubercidin and its ribonucleotides on various metabolic pathways in schistosoma-mansoni. **Biochemical Pharmacology**, v. 21, n. 22, p. 3059-&, 1972.

24 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. **Biochemichal Pharmacology**, v. 26, n. 20, p. 1847-55, Oct. 1977.

25 VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of biochemistry**. New York: Wiley, 1999. xxiii, 931 p. ISBN 047158650.

26 CRABTREE, G.W.; AGARWAL, K.C.; AGARWAL, R.P.; BROWN, P.R.; SCHOLAR, E.M.; SENFT, D.; SENFT, A.W.; PARKS, R.E. pathways of purine metabolism in schistosoma-mansoni. **Pharmacologist**, v. 13, n. 2, p. 311-&, 1971.

27 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 .3. Identification of enzymes in cell-free extracts. **Biochemical Pharmacology**, v. 22, n. 4, p. 449-458, 1973.

28 STEGMAN, R.J.; DRNRY, S.E.; BROWN, P.R.; PARKS, R.E.. Pathways of nucleotide metabolism in schistosoma-mansoni .4. Incorporation of adenosine analogs in-vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 22, n. 4, p. 459-468, 1973.

29 SHI, W.X.; TANAKA, K.S.E.; CROTHER, T.R.; TAYLOR, M.W.; ALMO, S.C.; SCHRAMM, V.L. Closed site complexes of adenine phosphoribosyltransferase from Giardia lamblia reveal a mechanism of ribosyl migration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39981-39988, 2002.

30 SINHA, S. C.; SMITH, J. L. The PRT protein family. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 6, p. 733-739, 2001.

31 SARVER, A. E.; WANG, C. C. The adenine phosphoribosyltransferase from Giardia lamblia has a unique reaction mechanism and unusual substrate binding properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39973-39980, 2002.

32 BERENS, R.L.; KRUG, E.C.; MARR, J.J.; MULLER, M. Purine and pyrimidine metabolism. **Biochemistry and molecular biology of parasites**. p. 89-117, 1995.

33 MYERS, R. W.; ABELES, R. H. Conversion of 5-s-ethyl-5-thio-d-ribose to ethionine in klebsiella-pneumoniae - basis for the selective toxicity of 5-s-ethyl-5-thio-d-ribose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 18, p. 10547-10551, 1989.

34 SILVA, C.; SILVA, M.; IULEK, J.; THIEMANN, O.H. Structural complexes of human adenine phosphoribosyltransferase reveal novel features of the APRT catalytic mechanism. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v. 25, n. 6, p. 589-597, 2008..

35 BASHOR, C.; DENU, J.M.; BRENNAN, R.G.; ULLMAN, B. Kinetic mechanism of adenine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*. **Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 4020-4031, 2002. ISSN 0006-2960.

36 SHI, W.X.; TANAKA, K.S.E.; CROTHER, T.R.; TAYLOR, M.W.; ALMO, S.C.; SCHRAMM, V.L. Structural analysis of adenine phosphoribosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v. 40, n. 36, p. 10800-10809, 2001.

37 PHILLIPS, C.L.; ULLMAN, B.; BRENNAN, R.G.; HILL, C.P.. Crystal structures of adenine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*. **Embo Journal**, v. 18, n. 13, p. 3533-3545, 1999. ISSN 0261-4189.

38 TIPPMANN, H. F. Analysis for free: Comparing programs for sequence analysis. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, n. 1, p. 82-87, Mar 2004. ISSN 1467-5463.

39 EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P.. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998. ISSN 1054-9803.

40 EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998. ISSN 1054-9803.

41 PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G.; Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, n. 5536, p. 598-599, 1975.

42 GE Healthcare Affinity Chromatography: Principles and Methods: 159 p. 2007.

43 WILKINS, M. R.; GASTEIGER, E.; BAIROCH, A.; SANCHEZ, J. C.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **2-D Proteome Analysis Protocols**, v. 112, p. 531-552, 1999.

44 DIERKS, K.; MEYER, A.; EINSPAHR, H.; BETZEL, C.. Dynamic light scattering in protein crystallization droplets: Adaptations for analysis and optimization of crystallization processes. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 5, p. 1628-1634, May 2008.

45 BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic Light Scattering: With applications to chemistry, biology and physics**. Dove Publications, 2004. ISBN 978-0486411552.

46 MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. **Zetasizer uV: User manual**. Worcerstershire: Malver Instruments Ltd., 2008.

47 ANDREEVA, A.; HOWORTH, D.; CHANDONIA, J.-M.; BRENNER, S. E.; HUBBARD, T. J. P.; CHOTHIA, C.; MURZIN, A. G. Data growth and its impact on the SCOP database: new developments. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. D419-D425, Jan 2008. ISSN 0305-1048.

48 SANCHEZ, R.; SALI, A. Comparative protein structure modeling as an optimization problem. **Theochem-Journal of Molecular Structure**, v. 398, p. 489-496, June 1997.

49 _____. Comparative protein structure modeling - Introduction and practical examples with modeller. **Protein Structure Prediction: methods and protocols**, v. 143, p. 97-129, 2000.

50 MCGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**, v. 16, n. 4, p. 404-405, Apr. 2000.

51 ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990..

52 SALI, A.; BLUNDELL, T. L. COMPARATIVE PROTEIN MODELING BY SATISFACTION OF SPATIAL RESTRAINTS. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993.

53 SANCHEZ, R.; SALI, A. Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3. **Proteins-Structure Function and Genetics**, p. 50-58, 1997

54 LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK - A PROGRAM TO CHECK THE STEREOCHEMICAL QUALITY OF PROTEIN STRUCTURES. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 283-291, Apr. 1993.

55 VRIEND, G. WHAT IF - A molecular modeling and drug design program. **Journal of Molecular Graphics**, v. 8, n. 1, p. 52-&, 1990.

56 COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures - patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, v. 2, n. 9, p. 1511-1519, Sep. 1993.

57 BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known 3-dimensional structure. **Science**, v. 253, n. 5016, p. 164-170, July 1991.

58 VANGUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer-simulation of molecular-dynamics - methodology, applications, and perspectives in chemistry. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 29, n. 9, p. 992-1023, Sep. 1990.

59 NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. **Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos**. Eclética Química. 33 2008.

60 WEINER, S. J.; KOLLMAN, P. A.; CASE, D. A.; SINGH, U. C.; GHIO, C.; ALAGONA, G.; PROFETA, S.; WEINER, P.; a new force-field for molecular mechanical simulation of nucleic-acids and proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 3, p. 765-784, 1984

61 JORGENSEN, W. L.; TIRADORIVES, J. The opls potential functions for proteins - energy minimizations for crystals of cyclic-peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 6, p. 1657-1666, Mar. 1988.

62 CORNELL, W. D.; CIEPLAK, P.; BAYLY, C. I.; GOULD, I. R.; MERZ, K. M.; FERGUSON, D. M.; SPELLMEYER, D. C.; FOX, T.; CALDWELL, J. W.; KOLLMAN, P. A.; a 2nd generation force-field for the simulation of proteins, nucleic-acids, and organic-molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 19, p. 5179-5197, May 1995.

63 JORGENSEN, W. L.; CALDWELL, J. W.; ROSS, W. S.; PEARLMAN, D. A.; CASE, D. A.; DEBOLT, S.; CHEATHAM, T. E.; FERGUSON, D.; SEIBEL, G. A program for simulation of biological and organic molecules. **Encyclopedia of Computational Chemistry**: John Wiley and Sons: 3450 p. 1998.

64 HORNAK, V.; ABEL, R.; OKUR, A.; STROCKBINE, B.; ROITBERG, A.; SIMMERLING, C. Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, v. 65, n. 3, p. 712-725, Nov. 2006.

65 MAHONEY, M. W.; JORGENSEN, W. L. A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions. **Journal of Chemical Physics**, v. 112, n. 20, p. 8910-8922, May 22 2000.

66 KALE, L.; SKEEL, R.; BHANDARKAR, M.; BRUNNER, R.; GURSOY, A.; KRAWETZ, N.; PHILLIPS, J.; SHINOZAKI, A.; VARADARAJAN, K.; SCHULTEN, K. NAMD2: Greater scalability for parallel molecular dynamics. **Journal of Computational Physics**, v. 151, n. 1, p. 283-312, May 1999. ISSN 0021-9991.

67 SEELIGER, D.; HAAS, J.; DE GROOT, B. L. Geometry-based sampling of conformational transitions in proteins. **Structure**, v. 15, n. 11, p. 1482-1492, Nov. 2007.

68 DEGROOT, B. L.; VANAALTEN, D. M. F.; SCHEEK, R. M.; AMADEI, A.; VRIEND, G.; BERENDSEN, H. J. C. Prediction of protein conformational freedom from distance constraints. **Proteins-Structure Function and Genetics**, v. 29, n. 2, p. 240-251, Oct. 1997.

69 SEELIGER, D.; DE GROOT, B. L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, n. 5, p. 417-422, May 2010

70 GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V. B.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition - a novel-approach for predicting invivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Engineering**, v. 4, n. 2, p. 155-161, Dec. 1990..

71 KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, n. 1, p. 105-132, 1982

72 RANJBAR, B.; GILL, P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, n. 2, p. 101-120, Aug. 2009.

73 FINN, R. D.; MISTRY, J.; TATE, J.; COGGILL, P.; HEGER, A.; POLLINGTON, J. E.; GAVIN, O. L.; GUNASEKARAN, P.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E. L. L.; EDDY, S. R.; BATEMAN, A. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. D211-D222, 2010.

74 BRYSON, K.; MCGUFFIN, L. J.; MARSDEN, R. L.; WARD, J. J.; SODHI, J. S.; JONES, D. T. Protein structure prediction servers at university college london. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. W36-W38, 2005..

75 PONTIUS, J.; RICHELLE, J.; WODAK, S. J. Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 264, n. 1, p. 121-136, Nov. 1996.

76 HEKKELMAN, M. L.; BEEK, T.; PETTIFER, S. R.; THORNE, D.; ATTWOOD, T. K.; VRIEND, G. WIWS: a protein structure bioinformatics Web service collection. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. W719-W723, 2010. ISSN 0305-1048..

77 CERONI, A.; PASSERINI, A.; VULLO, A.; FRASCONI, P. DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. W177-W181, July 2006.

78 SILVA, M.; SILVA, C.; IULEK, J.; THIEMANN, O. H. Three-dimensional structure of human adenine phosphoribosyltransferase and its relation to DHA-urolithias. **Biochemistry**, v. 43, n. 24, p. 7663-7671, 2004.

Apêndice A – Tabela de evolução da Esquistossomose, baseado em dados da WHO.

Habitantes (Milhares)									
	2030		2015		2008				
	Otimista	Base	Pessimista	Otimista	Base	Pessimista			
Total Mundo	63,263,308	67,790,423	73,691,198	57,429,507	60,855,734	63,741,207	57,810,683	58,766,061	59,509,867
Total -rica	8,070,059	8,439,651	8,913,429	6,676,917	6,822,330	7,004,559	6,307,356	6,334,527	6,363,624
Doenças Infeciosas - Mundo	2,941,649	4,216,113	5,537,486	5,235,143	7,043,628	7,761,935	7,869,437	8,426,720	8,634,829
Doenças Infeciosas - América	212,289	239,101	267,573	261,622	292,235	304,060	300,226	307,180	309,337
SIDA/HIV Mundo	814,723	1,231,238	1,558,841	1,113,246	2,281,770	2,393,912	1,915,897	2,242,597	2,262,268
SIDA/HIV - América	81,101	99,901	118,087	83,389	1,464,796	3	1,915,897	75,210	75,771
Doenças Tropicais - Mundo	57,910	75,041	104,842	91,403	102,655	117,896	123,574	127,258	132,061
Doenças Tropicais - América	7,048	7,411	7,843	9,109	9,357	9,661	11,030	11,070	11,121
Esquistossomose - Mundo	21,400	26,893	36,405	28,718	31,777	35,723	35,680	36,509	37,751
Esquistossomose - América	283	320	375	499	521	558	683	686	693
DALYs									
	2030		2015		2008				
	Otimista	Base	Pessimista	Otimista	Base	Pessimista			
Total Mundo	1,265,434,160	1,362,315,839	1,515,395,664	1,334,053,637	1,414,752,387	1,494,243,618	1,435,908,851	1,460,140,289	1,484,139,555
Total -América	146,476,644	154,052,938	163,718,057	142,699,642	146,096,890	150,111,635	141,696,225	142,396,030	143,212,383
Doenças Infeciosas - Mundo	84,210,765	120,674,068	162,704,674	165,963,982	212,217,104	236,637,527	247,736,892	262,939,655	270,318,475
Doenças Infeciosas - América	4,037,020	4,937,946	5,933,650	6,501,960	7,297,625	7,768,466	8,258,354	8,448,815	8,556,116
SIDA/HIV Mundo	23,212,781	34,138,709	42,295,116	37,082,641	62,601,187	66,061,110	56,947,964	64,661,516	65,494,310
SIDA/HIV - América	1,855,411	2,371,485	2,893,300	2,456,583	2,965,571	3,146,334	2,413,070	2,519,405	2,568,271
Doenças Tropicais - Mundo	3,754,758	5,048,240	7,302,262	6,807,214	7,741,210	8,999,975	9,600,535	9,920,186	10,305,337
Doenças Tropicais - América	164,531	194,122	231,089	297,722	316,554	336,850	415,424	418,943	422,320
Esquistossomose - Mundo	642,592	827,322	1,179,145	1,061,405	1,187,535	1,359,982	1,422,639	1,456,725	1,513,755
Esquistossomose - América	9,795	11,740	14,558	22,272	23,617	25,609	34,271	34,528	34,882

Apêndice B – Interações do sítio ativo da APRT humana-1ZN8 e 1ZN7

Legenda correspondente às informações do Apêndice B

Ligações ocorrentes no sítio da APRT humana com adenina (1zn7)

Ligações ocorrentes no sítio da APRT humana com PRPP (1zn7)