UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

**Estrutura Cristalográfica da enzima hipoxantina-
guanina fosforribosiltransferase (HGPRT) de
Leishmania tarentolae complexada com GMP**

PAULO SÉRGIO MONZANI

Tese apresentada à área de Física
Aplicada, Sub-área Física
Biomolecular da Universidade de
São Paulo, como parte dos
requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Tit. Glaucius
Oliva

São Carlos
2003

Monzani, Paulo Sérgio

“Estrutura cristalográfica da enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT) de *Leishmania tarentolae* complexada com GMP”

Paulo Sérgio Monzani – São Carlos, 2003

Tese (Doutorado) – Área de Física Aplicada opção Física Biomolecular da Universidade de São Paulo, 2003 - Páginas: 162

Orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva

1. Hipoxantina-guanina; 2. Estrutura cristalográfica; 3. Enzima.

I. Título

**MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE
DOUTORADO DE PAULO SERGIO MONZANI, APRESENTADA
AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO, EM 20-03-2003.**

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Glaucius Oliva (Presidente) - IFSC-USP

Prof. Dr. Francisco Javier Medrano Martin - LNLS

Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni - UNESP

Prof. Dr. Eduardo Ernesto Castellano - IFSC-USP

Prof. Dr. Richard Charles Garratt - IFSC-USP

*Dedico a meus pais José e Inês
Às minhas irmãs, Aparecida, Vera, Sueli, Genice e Amália
À minha amada esposa Giovana
E aos meus queridos filhos Enzo, Lucca e Guido*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Glaucius Oliva pela oportunidade oferecida para execução dessa tese, pela orientação e pelas inúmeras festas de confraternização. Suas conquistas nos inspiram vontade de crescer e sermos objetivos.

Ao Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann pela orientação, disponibilidade, companheirismo e amizade. Sua conduta é invejável a todo homem com dignidade.

Aos professores que muito contribuíram para minha formação, em especial Dr. Richard Charles Garrat, Dra. Ana Paula Ulian de Araújo, Dr. Flávio Henrique Silva e Dr. Gilberto Moraes.

Aos amigos do Laboratório de Cristalografia pela convivência amigável durante todo o período de doutoramento. Em especial ao grande companheiro Humberto d'Muniz Pereira pela ajuda significativa para a execução desta tese, desde a coleta dos dados de difração até o refinamento e ao prezado Stefano Trapani pela ajuda no final do refinamento e pelos inúmeros auxílios durante a execução da tese, além de todos os outros que sempre auxiliaram com boa vontade, André, Marcelo Castilho, Paulo Henrique, João Renato, Arthur e Marcio.

Aos técnicos do laboratório que sempre auxiliaram no dia a dia, Bianca, Suzana, Bete, Dulce e Eli, por tudo e pela grande amizade formada.

Aos secretários do grupo de cristalografia, Jaciara e Maria Helena e Fernando, que sempre me ajudaram quando precisei, principalmente em épocas de prestação de contas.

Ao Gustavo e Ricardo que sempre resolveram os problemas relacionados ao computador e principalmente pela ajuda na impressão fora de hora desse exemplar.

Aos técnicos Gê e Augusto pelos deliciosos churrascos no departamento.

Ao guarda noturno misterioso que me trazia café para terminar a Tese.

À professora Beth Moraes e minha esposa Giovana pela supervisão do texto e serviços de secretariado feitos com muito carinho.

Aos bons e velhos amigos por tudo que passamos juntos.

À FAPESP- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro.

Sumário

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
I – Introdução.....	1
I.1 – Leishmanioses.....	1
I.2 – HGPRT como alvo para desenho de drogas.....	5
I.3 – A síntese de purinonucleotídeos.....	11
I.4 – A enzima HGPRT.....	15
I.4.1 – Especificidade da enzima HGPRT aos substratos purinos.....	18
I.4.2 – Mecanismo cinético da reação da HGPRT.....	21
I.4.3 – Mecanismo de reação da HGPRT.....	23
I.4.4 – Mecanismo enzimático da HGPRT.....	26
I.5 - Justificativa.....	31
I.6 – Objetivos.....	32
II – Clonagem, Expressão e Purificação da Enzima HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	33
II.1 – Clonagem do gene <i>hgprt</i> de <i>Leishmania tarentolae</i>	33
II.2 – Expressão da proteína HGPRT recombinante.....	37
II.3 – Purificação da proteína recombinante HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i> ...	39
III – Caracterização da enzima HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	43
III.1 – Parâmetros cinéticos da enzima HGPRT.....	43
III.1.1 – Introdução teórica.....	43
III.1.2 – Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max}	45
III.2 - Determinação da massa molecular da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i> ..	52
III.3 – O ponto isoelétrico da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	56
III.4 – Ensaio de atividade da HGPRT na presença de inibidores comerciais	57
IV – Cristalização da enzima HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	60
IV.1 – Introdução teórica.....	60
IV.2 – Ensaio de cristalização da apoenzima HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	62
IV.2.1 – Ensaio inicial de cristalização para a forma apoenzima.....	62
IV.2.2 – Refinamento da condição inicial do fatorial sulfato de amônio.....	65

IV.2.3 – Refinamento da condição inicial do fatorial PEG 6000.....	65
IV.3 – Ensaio de co-cristalização da enzima HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i> com o produto de reação GMP.....	68
IV.3.1 – Ensaio de co-cristalização utilizando as condições provenientes do refinamento de PEG 6000.....	68
IV.3.2 – Ensaio de co-cristalização com o uso de aditivos.....	69
IV.3.3 – Ensaio de co-cristalização com o uso do fatorial “Sreen cryo”.....	70
IV.3.4 – Refinamento dos ensaios de co-cristalização com o uso do fatorial “Sreen cryo”.....	70
IV.4 – Testes de co-cristalização com inibidores comerciais.....	73
V – Coleta e processamento dos dados de difração de raios-X.....	75
V.1 – Introdução teórica.....	75
V.1.1 – O uso de raios-X.....	75
V.1.2 – A geração de raios-X.....	76
V.1.3 – A interação dos raios-X com a matéria.....	77
V.1.4 – Detectores de raios-X.....	78
V.1.5 – A técnica de difração de raios-X.....	79
V.2 – Coleta dos dados de difração de raios-X vinda do cristal da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	82
V.3 – Processamento dos dados de difração de raios-X vindo do cristal da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	85
VI - Resolução e refinamento da estrutura cristalográfica da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	90
VI.1. – Introdução teórica.....	91
VI.2. - O método de substituição molecular.....	92
VI.3 - Resolução da estrutura da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	93
VI.4– Refinamento da estrutura da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	95
VI.5 – Avaliação da qualidade do modelo refinado.....	99
VII – Análise da estrutura tridimensional da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	110
VII.1 – O enovelamento e topologia da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	110
VII.2 – A interface dimérica da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	115

VII.3 – O sítio ativo da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	121
VII.3.1 – O <i>loop</i> I.....	122
VII.3.2 – O <i>loop</i> II.....	124
VII.3.3 – O <i>loop</i> III.....	126
VII.3.4 – O <i>loop</i> IV.....	128
VII.3.5 – O <i>loop</i> III’.....	130
VII.3.6 – O co-fator magnésio.....	132
VII.3.7 – O GMP no sítio ativo.....	132
VIII – Conclusões e perspectivas futuras.....	142
VIII.1 – Conclusões.....	142
VIII.2 – Perspectivas Futuras.....	146
X – Referências Bibliográficas.....	148

Lista de Figuras

Figura 1- Esquema da <i>via de recuperação</i> de purino-nucleotídeos da ordem Kinetoplastida.....	13
Figura 2 – Esquema da reação enzimática catalisada pela enzima HGPRT, onde R representa o radical diferente para as bases hipoxantina (Hx) e guanina (Gua).....	16
Figura 3 – Representação estrutural das duas classes de PRTases.....	17
Figura 4 – A sobreposição dos sítios ativos dos complexos da HGPRT _{GMP} (azul) e HGPRT _{XMP-PPi-Mg} (verde) de <i>T. gondii</i> e a HGPRT _{GMP} (laranja).....	21
Figura 5 – Esquema do mecanismo cinético proposto para HGPRT humana, incluindo passos funcionalmente significantes.....	23
Figura 6 – Interações do <i>loop</i> flexível (<i>loop</i> II) fechado e as ligações com o ligante no sítio ativo.....	25
Figura 7 – Movimentos envolvidos na catálise.....	28
Figura 8 – Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos representativas da HGPRT.....	33
Figura 9 – Gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) pré e pós-purificação da enzima HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	38
Figura 10 – Gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) da primeira passagem na coluna POROS 20HQ.....	41
Figura 11 – Gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) da segunda passagem na coluna POROS 20HQ.....	41
Figura 12 – Gráfico de Lineweaver-Burk para guanina e hipoxantina, sendo fixado o PRPP em 1 mM.....	46
Figura 13 – Gráfico de Lineweaver-Burk para PRPP, sendo fixado a guanina em 40 µM e a hipoxantina em 100 µM.....	47
Figura 14 – Cromatografia por exclusão de tamanho na coluna superose 12. De 1 a 5- marcadores de massa molecular.....	53
Figura 15 – Linearização pela escala logarítmica – log das massas moleculares em função do volume de retenção.....	54
Figura 16 - Gel de determinação do pI.....	56

Figura 17 – Fotos de cristais usando sulfato de amônio como agente precipitante.....	64
Figura 18 – Fotos de cristais utilizando PEG 6000 como agente precipitante...	65
Figura 19 – Cristais obtidos na substituição de PEG 6000 por PEG 4000.....	68
Figura 20 - Fotos de cristais provenientes das condições crioprotetoras.....	71
Figura 21 – Imagem de difração de raios-X do cristal da HGPRT de <i>L. tarentolae</i> , coletada no LNLS, com resolução de 2,3Å.....	83
Figura 22 - Mapa de Fourier-diferença $2mF_o - DF_c$ com o nível de contorno 1σ , da região do sítio ativo.....	98
Figura 23 – Duplas conformações observadas para os resíduos Glu31 e Lys162 da cadeia A e o resíduo Asp56 da cadeia B.....	98
Figura 24 – Dupla conformação do ligante GMP, sendo C3'-endo e C2'-endo.....	99
Figura 25 – Hélice- α na região do <i>loop</i> flexível.....	100
Figura 26 - Cadeias laterais e cadeia principal dos resíduos 106, 107 e 108.....	100
Figura 27 – Dois bolsões encontrados na interface do dímero com três moléculas de água no interior deles.....	101
Figura 28 – Gráfico do fator R_{real} para os resíduos das cadeias A e B.....	102
Figura 29 – Gráfico de Ramachandran para os ângulos ϕ e ψ dos resíduos do modelo.....	103
Figura 30 – Gráfico do fator G (ϕ/ψ) para os resíduos das cadeias.....	103
Figura 31 – Gráficos dos desvios das posições das carbonilas, dos resíduos da cadeia principal nas duas cadeias A e B.....	104
Figura 32 – Gráfico dos desvios em angstroms da cadeia lateral em relação ao rotâmero mais próximo.....	104
Figura 33 – Gráfico da qualidade do empacotamento dos resíduos no modelo.	105
Figura 34 – Representação das estruturas secundárias do monômero A da enzima HGPRT.....	111
Figura 35 - Figura mostrando o segundo motivo $\beta/\alpha/\beta$ da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	112
Figura 36 - Figura mostrando o <i>loop</i> IV da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	114

Figura 37 – Figura da topologia dos dois monômeros da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	115
Figura 38- Representação da estrutura dimérica da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i> por elementos de estrutura secundária, com GMP nos sítios ativos.....	116
Figura 39 – Pontes salinas na interface dimérica da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	117
Figura 40 – Comparação das posições da Lys do <i>loop</i> I e da Arg do <i>loop</i> IV, na interface dimérica e no sítio ativo.....	119
Figura 41 – Comparação das estruturas de <i>Leishmania tarentolae</i> com a humana.....	120
Figura 42 – Representação do <i>loop</i> I. O <i>loop</i> está bem definido no mapa de Fourier-diferença $2mF_o - DF_c$	122
Figura 43 – Representação do <i>loop</i> III. O <i>loop</i> está bem definido no mapa de Fourier-diferença $2mF_o - DF_c$	126
Figura 44 – Representação das pontes de hidrogênio formada entre o <i>loop</i> III e o grupo 5'-fosfato do GMP.....	127
Figura 45 - Representação do <i>loop</i> IV.....	128
Figura 46 – Representação das pontes de hidrogênio formada entre o <i>loop</i> IV e os átomos de oxigênio e nitrogênio da base guanina do GMP.....	129
Figura 47 – Representação do <i>loop</i> III'.....	131
Figura 48 – Representação do produto de reação GMP no sítio ativo da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	132
Figura 49- Alinhamento das seqüências de aminoácidos da enzima HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Tritrichomonas foetus</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Plasmodium falciparum</i> e <i>Homo sapiens</i>	134
Figura 50 – Sobreposição dos carbonos $C\alpha$ das estruturas de HGPRT.....	137
Figura 51 – Superposição das estruturas da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i> (vermelho) com a de <i>Trypanosoma cruzi</i> (verde).....	138

Figura 52 – Comparação das interações entre o GMP e os resíduos do sítio ativo da HGPRT humana e de <i>Leishmania tarentolae</i>	140
---	-----

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Lista de K_m da HGPRT para os diferentes substratos dos diferentes organismos.....	48
Tabela 2 – Tabela comparando os valores de k_{cat} para guanina e hipoxantina e as razões K_{cat}/K_m para estes mesmo substratos.....	51
Tabela 3 – Tabela contendo os testes de IC_{50} de 11 inibidores comerciais análogos à purina e pirimidina, exceto cefotaxima que é um antibiótico cefalosporina de terceira geração.....	58
Tabela 4 – Lista das extinções sistemáticas fornecidas pelo programa SCALEPACK.....	87
Tabela 5 – Resultado do método de Matthews, utilizado para encontrar o número de monômeros por unidade assimétrica e a porcentagem de solvente.....	88
Tabela 6 – Tabela das estatísticas dos processamentos dos dados de difração de raios-X.....	83
Tabela 7 – Saída do AMoRe para os diferentes grupos espaciais com as respectivas correlações e fatores R, bem como as diferentes soluções.....	94
Tabela 8 – Tabela das estatísticas globais da estrutura cristalográfica da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i> , refinada a 2,1 Å de resolução.....	109
Tabela 9 – Comparação dos d.q.m. dos carbonos $C\alpha$ da HGPRT de <i>Leishmania tarentolae</i> entre as cadeias A e B, e com a HGPRT de outros organismos, sendo superposta apenas uma cadeia e as duas cadeias.....	136
Tabela 10 – Comparação entre os resíduos da HGPRT de humano e de <i>L. tarentolae</i> e as pontes de hidrogênio formadas entre os átomos da base com os átomos da proteína e dos átomos do grupo fosfato com os átomos da proteína.....	139

Resumo

O presente trabalho teve como objetivos a clonagem, expressão e purificação da proteína HGPRT de *Leishmania tarentolae*, para a caracterização e cristalização dessa enzima, a fim do seu estudo estrutural e funcional.

O gene da HGPRT foi amplificado a partir de uma biblioteca genômica de *Leishmania tarentolae*, da cepa UC Lambda ZAP Express *Bam*HI-*Sal*3A I. Esse gene foi clonado no vetor de expressão **pET29a(+)** e usado na transformação da bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3). Esse sistema de expressão apresentou uma superexpressão da proteína recombinante, que foi purificada em cromatografia de troca iônica, com o uso da coluna de troca aniônica POROS 20HQ.

A proteína purificada foi utilizada para sua caracterização, como a determinação das constantes cinéticas (K_m , V_{max} e k_{cat}) para os diferentes substratos. A proteína foi encontrada como dímero em solução e com o pI de aproximadamente 8,2. Além disso, essa proteína foi utilizada nos ensaios de cristalização pelo método de difusão de vapor em gota suspensa.

Os cristais obtidos foram utilizados nos testes de difração de raios-X, sendo coletado um conjunto de dados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Os dados de difração de raios-X foram processados com o uso do pacote de programa HKL. A resolução da estrutura cristalográfica foi obtida pelo método de substituição molecular através do programa AMoRe. Para o refinamento da estrutura foram utilizados os programas de refinamento automático CNS e REFMAC, e a manipulação na estação gráfica foi realizada através do programa O. A estrutura da HGPRT foi resolvida a 2,1 Å de resolução com os fatores de concordância R_{work} e R_{free} finais de 17,34 e 21,53%, respectivamente.

ABSTRACT

The aims of this work were the cloning, expression and purification of the protein HGPRT from *Leishmania tarentolae*, for the characterization and crystallization of the enzyme for its structural and functional study.

The full-length *hgprt* gene was isolated from a *Leishmania tarentolae* UC strain Lambda ZAP Express *Bam*HI - *Sal*3A I genomic library. This gene was cloned in the expression vector **pET29a+**, and used in the transformation of the bacteria *Escherichia coli* BL21(DE3). This expression system presented a super-expression of the recombinant protein, which was purified by ionic change chromatography, utilizing the anionic change column POROS 20HQ.

The purified protein was utilized for its characterization, including its kinetics constants (K_m , V_{max} and k_{cat}) for different substrates. The protein was found to be a dimer in solution with pI close to 8.2. Besides, this protein was used in the crystallization assays by the steam diffusion in suspended drop technique.

The obtained crystals were utilized in the X-ray diffraction studies. The data collection was performed in the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. The X-ray diffraction data were processed utilizing the package program HKL. The crystallographic structure resolution was obtained by the molecular replacement method from the AMoRe program. For the structure refinement, the automatic refinement programs CNS and REFMAC were used, and the graphic manipulation was made through the O program. The structure of the HGPRT was resolved with 2.1 Å of resolution and final agreement factors R_{work} and R_{free} of 17.34% and 21.53% respectively.

Capítulo 1

I – Introdução

Neste capítulo é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a enzima HGPRT onde são descritas suas propriedades como: a catálise da reação, a família das PRTases, a especificidade pelo produto, o tipo de reação, mecanismo cinético e mecanismo enzimático. O produto nucleotídico da reação pode ser obtido pela *via de síntese de novo* ou pela *via de recuperação*, no entanto, os protozoários parasitas só podem obtê-lo por meio da segunda via. Isso tem levado vários autores a considerarem as enzimas pertencentes à *via de recuperação*, como alvos para o desenvolvimento racional de drogas. Por outro lado, o nocaute de três dos quatro genes correspondentes às enzimas dessa via não foram letais ao protozoário causador de leishmaniose. Aproveitando a introdução sobre o assunto, serão abordados a justificativa e os objetivos deste trabalho.

I.1 – Leishmanioses

As leishmanioses formam um grupo de zoonoses causadas por protozoários de diversas espécies pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, da família *Trypanosomatidae* e ao gênero *Leishmania*. Este gênero se caracteriza por apresentar duas formas durante seu ciclo de vida. A forma amastigota é levemente achatada, de contorno ovóide e aflagelada, ocorrendo quando o parasito é intracelular de

hospedeiro vertebrado. A promastigota é alongada com aspecto fusiforme ou piriforme, com a extremidade anterior mais arredondada e a posterior mais fina, e flagelado. Esta forma ocorre quando o protozoário se desenvolve no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados, os insetos flebotomíneos, bem como em meio de cultura. Ultimamente tem surgido uma tendência de separar algumas espécies próprias de répteis, do gênero *Leishmania*, formando um novo gênero *Sauroleishmania*. Assim a *Leishmania tarentolae* passaria a *Sauroleishmania tarentolae*.

Em vista das leishmanioses apresentarem características clínicas e epidemiológicas diversas em cada área geográfica, foram reunidas em quatro grupos: a leishmaniose cutânea, a leishmaniose cutânea difusiva, a leishmaniose cutâneo-mucosa ou mucocutânea e a leishmaniose visceral ou calazar.

A leishmaniose cutânea é caracterizada pela produção de lesões infiltrativas da pele, com tendência à cura espontânea em poucos meses, porém, em alguns casos, quando nas orelhas, o processo segue geralmente um curso crônico, que pode durar um ano, dois ou mais. Várias espécies são os agentes causadores dessa moléstia. A *Leishmania mexicana* se encontra no México, na Guatemala e em Besile. A *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *Leishmania aethiopica*, responsáveis pela leishmaniose cutânea do velho mundo, são encontradas no Mediterrâneo, na Ásia e na África. A *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis* e *Leishmania venezuelensis* são encontradas na América do Sul.

A leishmaniose cutânea difusiva pode ser causada pela *Leishmania mexicana*, *Leishmania pifanoi* e *Leishmania amazonensis*, nas Américas e *Leishmania*

aethiopica na África. É caracterizada por lesões múltiplas. Em alguns casos, como o da *Leishmania pifanoi*, o parasita apresenta um tropismo dérmico com marcada tendência de disseminação das lesões.

A leishmaniose cutâneo-mucosa, também conhecida como úlcera de Bauru, espúndia e ferida brava, caracteriza-se por produzir lesões cutâneas de vários tipos, e freqüentemente, por lesões secundárias na região nasal ou na região bucofaringeana. É causada pela *Leishmania braziliensis*.

A leishmaniose visceral ou calazar é caracterizada por produzir febre irregular, esplenomegalia e hepatomegalia (aumento de volume do baço e do fígado), anemia e caquexia. É causada pela *Leishmania donovani* e pela *Leishmania infantum*, esta não distinta de *Leishmania chagasi*. A leishmaniose visceral é encontrada nas Américas, na Ásia, na África e na Europa.

Estima-se que 2 milhões de novos casos ocorrem anualmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo, estando mais de 12 milhões de indivíduos contaminados e 350 milhões sob risco de infecção [http://www.hhmi.ucla.edu/parasite_course/index2.php] (março de 2003). Esses alarmantes números retratam um alto índice de mortalidade e morbidade das leishmanioses. Em humanos, a doença tem manifestação crônica, de apresentação cutânea ou visceral. As formas cutâneas do Novo Mundo se caracterizam por desenvolver lesões metastáticas mutilantes nas várias mucosas. As formas viscerais, distribuídas em ambos os hemisférios, se caracterizam por infecções do sistema retículo-endotelial.

As formas de tratamento têm se baseado no uso de antimônios pentavalentes como o antimoniato de N-methyl glucamina (Glucantine) e o estibogluconato de

sódio (Pentostam) [Mardsen e Arruda, 1987 e Alencar e Neves, 1987]. A duração da terapia e a resposta clínica variam de região a região e da interação patógeno-hospedeiro. Na prática, é comum a aplicação de altas doses por prolongados períodos. Isso se deve, em parte, à rápida eliminação desses compostos da corrente sangüínea. Em casos de recidiva e nas infecções por *L. aethiopica* ou leishmanioses viscerais, indica-se o emprego da anfotericina B (Fungizon) [Geary et al, 1989]. A anfotericina B sempre apresenta efeitos colaterais indesejados e até graves, portanto necessitando ser ministrada em hospitais, uma dificuldade adicional no tratamento, em se considerando as condições de saúde pública prevalentes nas regiões endêmicas. Essa terapia tem se mostrado pouco eficiente em diversos casos. Em pacientes com parasitas resistentes ao Glucantine e ao Fungizol não se identificam alternativas eficazes. Tende-se a repetir o tratamento, com doses nos limites da tolerância ou a utilizar-se o isotionato de pentamidina como uma última alternativa [Mardsen e Arruda, 1987 e Alencar e Neves, 1987]. Aliadas à baixa eficácia de tratamento, também são observadas diversas reações de toxicidade que vão desde náusea, vômitos, mialgia e nos casos mais graves, ao choque, alterações eletrocardiográficas, hipersensibilidade e trombose venosa. Essas características indesejáveis associadas ao aparecimento de formas resistentes de *Leishmania* [Geary et al, 1989], têm exacerbado a necessidade do desenvolvimento de drogas antileishmanióticas mais eficazes e menos tóxicas ao paciente. A toxicidade é particularmente severa no tratamento de crianças e idosos ou indivíduos portadores de infecções oportunistas secundárias.

Um aspecto da *via de recuperação* de *Leishmania* e *Trypanosoma* constitui a base para a susceptibilidade desses gêneros a vários análogos pirazolopirimidina

[Marr e Berens, 1983]. Esses compostos são eficientemente metabolizados a nucleotídeos, sendo que as células de mamíferos são incapazes dessas transformações metabólicas. Uma vez metabolizados a nucleotídeos, são eficientemente incorporados na transcrição de RNA e levam a uma rápida degradação dos mesmos, acompanhado da inibição de síntese protéica [Marr e Berens, 1983]. O alopurinol (4-hidroxipirazolo[3,4]pirimidina, HPP) é uma droga não tóxica para seres humanos e é amplamente usada no tratamento de hiperuricemia e gota [Palella e Fox, 1989]. Essa droga tem demonstrado eficiência significativa em pacientes com leishmaniose cutânea [Martinez e Marr, 1992] e doença de chagas [Gallerano et al, 1990].

A *Leishmania tarentolae* tem sido utilizada como modelo de *Leishmania* para uma variedade de estudos moleculares, bioquímicos e evolutivos. Uma das vantagens em trabalhar-se com a *Leishmania tarentolae* é a ausência do risco de contágio, pois esse organismo, infecta, especificamente répteis. A fácil cultura da célula e de análise genética facilita o seu uso em experimentos de mutação sítio dirigida do gene *hprt*, como para complementação funcional e de testes com substratos inibitórios para o desenho racional de drogas. Como para os outros tripanosomatídeos, a *Leishmania tarentolae* é auxotrófica para os nucleotídeos de purina [Trager, 1957].

I.2 – HGPRT como alvo para desenho de drogas

A abordagem moderna para o desenvolvimento de drogas [Kubinyi, 1998] explora enzimas específicas ao metabolismo do parasito. Essas enzimas podem ser empregadas como alvo no desenvolvimento de inibidores da cadeia metabólica, sem com isso afetar o hospedeiro. Para tanto, torna-se indispensável à determinação da

estrutura tridimensional da enzima, a caracterização do mecanismo de catálise e a identificação do sítio catalítico, bem como de domínios reguladores presentes na mesma [Kubinyi, 1998]. Para esse estudo é requerido o desenvolvimento de proteínas mutantes resistentes a inibidores ou com características cinéticas alteradas, a fim de permitirem elucidar o mecanismo de catálise.

O estudo estrutural por técnica de difração por raios-X de monocristais de proteínas, acompanhado do estudo cinético das proteínas selvagens e mutantes, tem sido a abordagem empregada com o objetivo de desenvolver racionalmente novas drogas no combate a doenças infecciosas [Greer et al, 1994].

O estudo da enzima HGPRT apresenta-se relevante, uma vez que essa proteína apresenta direta influência em termos sociais. O grande número de mutações encontrados no gene humano, que codificam a enzima HGPRT, comprometem a atividade normal da enzima. Em casos menos severos, causam a uma deficiência parcial da atividade, conduzindo a um aumentado fluxo metabólico pela *via de síntese de novo* [Eads et al, 1994]. Isto resulta em hiperuricemia, nefrolitoses e artrites de gota [Kelley et al, 1969]. As mutações, como deleção total ou parcial do gene, mudança de fase de leitura ou simples substituição de base, podem causar uma severa deficiência da atividade da enzima HGPRT e conseqüente deficiência na *via de recuperação* de purina. Essas mutações resultam na Síndrome de Lesch-Nyhan [Seegmiller et al, 1967], uma doença hereditária caracterizada por hiper-uricemia, senilidade, retardamento mental e auto-mutilação compulsiva [Stout e Caskey, 1989]. Além disso, a enzima HGPRT desempenha um importante papel no fluxo metabólico da síntese de nucleotídeos de purina de protozoários [Lafon et al, 1982 e Iovannisci et al, 1984]. Pelo fato desses organismos não possuírem a *via de síntese*

de novo, a enzima HGPRT tem sido considerada por vários autores, como uma proteína alvo para o desenvolvimento de drogas de doenças parasitárias [Ullman e Carter, 1997 e Marr e Ullman, 1995].

Vários trabalhos da estrutura cristalina da HGPRT de protozoários em complexo com inibidores comerciais têm sido publicados, como para HGPRT de *Trypanosoma cruzi* com formicina-B e 7HP, sendo esses inibidores análogos à purina [Focia et al, 1998ab]. A HGXPRT de *Plasmodium falciparum* com imucilinaHP, um inibidor análogo ao estado de transição, que, juntamente com imucilinaGP, foram desenhados para mimetizar os aspectos esperados para o oxicarbonium no estado de transição [Shi et al, 1999ab]. A HGXPRT de *Toxoplasma gondii* com 9-deaza-guanina, um substrato análogo à purina, que não é reativo, pelo fato de apresentar um átomo de carbono na posição do N9 da base purina [Héroux et al, 2000].

A validação da *via de recuperação* dos nucleotídeos de purina como alvo para o desenho de drogas tem sido discutida. Para dissecar as contribuições da HGPRT, APRT e AK (adenosina quinase) na *via de recuperação* de purinas em *Leishmania donovani*, foram gerados mutantes deficientes em HGPRT e ou APRT [Hwang e Ullman, 1997]. A substituição do gene marcado se deu em células selvagens e em cepas de mutantes deficientes em APRT ou AK. Os fenótipos resultantes foram avaliados através de ensaios enzimáticos, resistência a drogas citotóxicas, habilidade de incorporar bases purinas marcadas e crescimento em relação a várias fontes de purina. Os mutantes homozigotos apresentaram atividades extremamente baixas para HGPRT e os EC₅₀ (concentração efetiva de droga para a inibição de 50% do crescimento) para o inibidor alopurinol (HPP), um potencial

composto de partida para tratamento de leishmanioses. Nas células selvagens o EC₅₀ que era de aproximadamente 10 µM, teve aumento expressivo para 2 mM em mutantes de HGPRT. Esse fato também ocorreu quando foi administrado APP (4-aminopirazolopirimidina) em mutantes para APRT. Todos os mutantes propagaram em meio de crescimento contendo qualquer fonte de purina, foram capazes de metabolizarem [H³]-hipoxantina exógena em nucleotídeo. A surpreendente capacidade dos mutantes de *Leishmania donovani*, faltando HGPRT, APRT e ou AK, de incorporar e crescer em meio com hipoxantina poderia ser atribuída à capacidade da enzima XPRT do protozoário, em recuperar hipoxantina. A hipoxantina não pode ser oxidada a xantina para ser utilizada pela XPRT, uma vez que a atividade da xantina oxidase/desidrogenase não é detectada em promastigota [Tuttle e Krenitsky, 1980]. Esse estudo genético indica que HGPRT, APRT e AK, individualmente ou em qualquer combinação, não são essenciais para a sobrevivência e crescimento do estágio promastigota de *Leishmania donovani*. Assim fica evidenciada a importante função da XPRT, se não crucial, na recuperação de purinas [Hwang e Ullman, 1997]. A especificidade da XPRT ao substrato não foi avaliada devido à instabilidade inerente dessa enzima nativa em solução [Tuttle e Krenitsky, 1980].

Outros trabalhos de nocaute utilizando a AK [Schwartzman e Pfefferkorn, 1982] e HGXPRT [Donald et al, 1996] de *Toxoplasma gondii*, também não apresentaram efeitos aparentes na sobrevivência do protozoário. Experimentos preliminares sugerem que o duplo nocaute de ambos genes pode ser letal [Marr e Berens, 1983]. No entanto, com *Tritrichomonas foetus* que não possui a enzima XPRT, apenas a HGXPRT, foi obtida a inibição do crescimento desse parasita

[Aronov et al, 2000]. Nesse trabalho foi utilizada a metodologia para o desenho racional de droga: a partir de um composto líder, previamente identificado como inibidor da HGXPRT, o 4-(3-nitroanilino) ftálico anidrido (**TF1**), foi construída uma biblioteca virtual através de substituições do 4-fitalimidocarboxanilidos. Os compostos dessa biblioteca foram desenhados, baseados na interação do modelo com a enzima, e posteriormente sintetizados. Desses compostos, o (4'-fitalimido)carboxamido-3-benziloxibenzeno foi utilizado como um composto líder secundário, para a segunda etapa de química combinatória. Nessa etapa, foram obtidos compostos que inibem a HGXPRT em concentrações de nanomolar. Um desses compostos, **TF2** [(4'-fitalimido)carboxamido-3-(4-bromobenziloxi)benzeno], foi caracterizado como um inibidor competitivo, com K_i de 0,49 μM em relação à guanina, sendo 30 vezes mais seletivo para a HGXPRT de *Tritrichomonas foetus* do que para HGPRT humana. **TF2** inibiu o crescimento da cultura de célula com ED_{50} de 2,8 μM . O efeito inibitório pôde ser revertido com a adição de hipoxantina exógena ao meio de cultura [Somoza et al, 1998].

O trabalho com nocaute dos genes para AK, APRT e HGPRT [Hwang e Ullman, 1997] tem mostrado que a intrincada rede metabólica na *via de recuperação*, apresenta grande plasticidade das reações enzimáticas, devido ao fato do protozoário ainda conseguir sobreviver. Isto confirma a importância da enzima XPRT nessa via, pois é sabido que hipoxantina e xantina são os principais produtos da rota [Berens et al, 1995]. Os resultados de inibição *in vivo* da HGXPRT de *Tritrichomonas foetus* [Aronov et al, 2000] vêm reforçar ainda mais o fato que tanto HGPRT e XPRT, devem ser enzimas essenciais para o bloqueio dessa via.

Dessa forma, tem sido mostrado, que para o estágio de promastigota de *Leishmania donovani*, um inibidor específico para somente uma dessas enzimas, HGPRT AK e a APRT, não deve ser efetivo terapeuticamente. No entanto, é sugerido, que XPRT em conjunto com HGPRT são indispensáveis para recuperação de purinas pelo protozoário parasita. Portanto, um inibidor comum para HGPRT e XPRT, baseado no mecanismo, possa ter potencial terapêutico. Além disso, inibidores específicos para ambas enzimas, pode ser uma estratégia terapêutica racional [Hwang e Ullman, 1997]. Alvos com múltiplos passos em vias metabólicas têm considerável precedência em terapias antiparasitárias [Geary e Jensen, 1986 e Kovacs e Masur, 1986].

As enzimas APRT, HGPRT e XPRT, bem como todas PRTases do tipo I, apresentam um sítio de ligação comum ao PRPP, tornando possível a busca de um intermediário comum para as três enzimas, uma vez que, a estrutura para o sítio de ligação do PRPP é bastante conservada. Pequenas diferenças impostas a um intermediário comum a essas enzimas, podem trazer resultados animadores para o bloqueio da via de recuperação. A busca de drogas utilizando o sítio de ligação da base purina como alvo pode apresentar maiores dificuldades. A região do sítio de ligação da purina é menos conservada que aquela do PRPP entre as PRTases do tipo I. Assim, inibidores específicos para cada uma dessas enzimas parece ser mais provável que um intermediário para ambas. Além disso, o próprio mecanismo cinético mostra que as bases purinas se ligam à estrutura apoenzima somente em altas concentrações [Xu et al, 1997]. A purina pode, facilmente, entrar no sítio de ligação na apoenzima, mas sem a apropriada pré-organização da enzima, causada pela ligação do PRPP, sendo facilmente difundida do sítio ativo [Héroux et al,

1999a]. Isso pode justificar os altos valores de IC_{50} para vários inibidores análogos à purina [Eakin et al, 1997 e Tuttle e Krenitsky, 1980].

I.3 – A síntese de purinonucleotídeos

Os nucleotídeos de purina e pirimidina são fundamentais à vida, pois estão envolvidos em quase todos os processos bioquímicos. Dentre eles, os nucleotídeos são as unidades monoméricas de DNA e RNA, o ATP e GTP são as fontes universais de energia celular, os nucleotídeos de adenina fazem parte de co-enzimas essenciais para o metabolismo tais como NAD, FAD e CoA, são utilizados como intermediários ativadores (UDP-glicose) e servem como reguladores metabólicos.

Em mamíferos, os nucleotídeos de purina são produzidos *via síntese de novo*, a partir de precursores não nucleotídicos tais como: aminoácidos, ribose, dióxido de carbono e formiato, também podendo ser reciclados pela *via de recuperação* [Marr et al, 1978; Lafon et al, 1982 e Berens et al, 1995]. Os passos enzimáticos da via de síntese *de novo* são bem conservados ao longo de diversos taxa, como mamíferos, aves, fungos e bactérias. O metabolismo dos nucleotídeos de purina em protozoários parasitos e helmintos é significativamente diferente daquele dos mamíferos, pois eles apresentam apenas a *via de recuperação*.

Na *via de recuperação* as purinas reagem com PRPP formando os nucleosídeos-5'-monofosfatos correspondentes. Essas reações reversíveis são catalisadas por distintas fosforribosiltransferases (PRTases). Em mamíferos, essas reações são catalisadas por duas enzimas distintas: adenina-fosforribosil-transferase (APRT; AMP:pirofosfato fosforribosil-transferase; EC 2.4.2.7) e hipoxantina-

guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT; IMP:pirofosfato-fosforribosil-transferase; EC 2.4.2.8).

A *via de recuperação* permite ao organismo a reutilização de purinas obtidas da degradação de ácidos nucleicos ou nucleotídeos. Esta via está presente em todos os organismos estudados, incluindo protozoários parasitos [Marr et al, 1978 e Berens et al, 1995]. Em *Kinetoplastida* e diversos outros protozoários, a *via de recuperação* (Figura 1) consiste na única forma de obtenção dos nucleotídeos de purina [Berens et al, 1995 e Hassan e Coombs 1986]. Como consequência, cada gênero de parasito auxotrófico para nucleotídeos de purina, possuem um conjunto específico de enzimas da *via de recuperação* que lhes permite utilizar purinas pré-formadas. Na ordem *kinetoplastida* são encontradas quatro enzimas envolvidas na síntese de nucleotídeos de purina: a adenosina quinase e APRT, envolvidas na síntese de AMP; a HGPRT, envolvida na síntese de IMP e GMP e a XPRT, envolvida na síntese de XMP. Além disso, esses organismos apresentam a via de interconversões, onde um nucleotídeo de purina pode ser convertido a outro, formando uma intrincada rede metabólica na síntese de nucleotídeos de purina [Berens et al, 1995].

As diferenças nas seqüências metabólicas para o metabolismo de purina, nas várias formas morfológicas dos kinetoplastidas patogênicos, parecem somente quantitativa e não qualitativa, com exceção das leishmanias. Neste gênero, a forma amastigota difere da forma promastigota em relação às enzimas que metabolizam, a adenina e adenosina, pois na forma amastigota não é encontrada a adenina desaminase e, portanto não pode converter outras purinas a hipoxantina [Looker et al, 1983].

Os substratos mais importantes das PRTases na *via de recuperação* são a hipoxantina e xantina. Estudos do fluxo metabólico demonstraram que as purinas exógenas são rapidamente desaminadas a hipoxantina, na forma promastigota de *Leishmania* [Marr et al, 1978 e Lafon et al, 1982]. Essa observação é corroborada pela análise de mutantes de *Leishmania donovani* deficientes em diversas enzimas da *via de recuperação* [Iovannisci et al, 1984]. Tais resultados indicam a HGPRT como uma enzima chave no metabolismo das leishmanias.

A heterogeneidade dos componentes enzimáticos da *via de recuperação* dos nucleotídeos de purina, dentre os protozoários, pode ser uma consequência da pressão seletiva ocorrida em seus nichos ecológicos específicos. A maioria dos parasitos incluindo, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Toxoplasma*, depende das atividades das fosforribosiltransferases para a recuperação dos nucleotídeos de purina [Berens et al, 1995].

As seqüências de aminoácidos da enzima HGPRT de parasitas da família Tripanosomatidae revelam que três peptídeos na porção C-terminal (Ser-Lys-Val para *Leishmania donovani*) são consistentes com a sinalização de proteínas marcadas para a entrada no glicossomo. Esse endereçamento tem sido encontrado em *Leishmania donovani* [Shih et al, 1998], *Leishmania mexicana* [Hassan et al, 1985], *Trypanosoma brucei* [Hammond et al, 1985] e *Trypanosoma cruzi* [Gutteridge & Davies, 1982]. As análises de várias seqüências de HGPRT mostraram uma aceitável degenerância para o tripeptídeo de sinalização [Blattner et al, 1992 e Sommer et al, 1992].

As diferenças do metabolismo dos nucleotídeos de purina entre as espécies de *Leishmania* e dos hospedeiros mamíferos, fazem com que as resoluções das

estruturas tridimensionais da HGPRT e de outras PRTases sejam muito atraentes como alvos para o desenho racional de drogas [Ullman e Carter, 1997, Marr e Ullman, 1995 e Aronov et al, 2000].

I.4 – A enzima HGPRT

As bases purinas e pirimidinas são constantemente liberadas na célula durante a degradação metabólica de nucleotídeos, sendo que grande parte delas é recuperada e reusada para formar nucleotídeos, sendo essa via metabólica denominada *via de recuperação*. Essa via se diferencia da *via de síntese de novo*, pela qual a base purina é totalmente sintetizada sobre a molécula de PRPP (5'-fosforribosil-1-pirofosfato). A enzima HGPRT (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase) participa da *via de recuperação*. Dessa forma, essa enzima catalisa a remoção do grupo pirofosfato (PP_i) do PRPP (fosforribosil-pirofosfato) e a adição de uma base púrica (hipoxantina ou guanina), na presença do co-fator Mg^{2+} . O produto dessa reação reversível é a formação de IMP (inosina monofosfato) ou GMP (guanosina monofosfato) (Figura 2), o que favorece a formação dos nucleotídeos [Xu et al, 1997].

Figura 2 – Esquema da reação enzimática catalisada pela enzima HGPRT, onde R representa o radical diferente para as bases hipoxantina (Hx) e guanina (Gua).

A enzima HGPRT tem sido encontrada geralmente como dímero em solução, nos organismos *Tritrichomonas foetus* (HGXPRT) [Somoza, et al 1996], *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania donovani* [Ullman e Carter, 1997] e *Leishmania tarentolae* [Monzani et al, 2002]. É encontrada na forma tetramérica em solução, em *Escherichia coli* (HPRT) [Guddat et al, 2002], *Toxoplasma gondii* (HGXPRT) [Héroux et al, 1999b], *Plasmodium falciparum* (HGXPRT) [Keough et al, 1999] e em enzima humana [Xu et al, 1997].

A enzima HGPRT pertence à família das PRTases, que catalisam a transferência do grupo ribose 5' fosfato vindo do PRPP, para uma variedade de substratos secundários na presença de Mg^{+2} , com liberação de pirofosfato. As PRTases são encontradas na *síntese de novo* dos nucleotídeos de purina, nas *vias de recuperação* de purinas, pirimidinas e piridinas ribonucleotídeos e na biossíntese de histidina e triptofano [Musick, 1981]. Embora exista pouca identidade da sequência primária, foram identificados aproximadamente 10 tipos de PRTases, que foram classificadas estruturalmente em duas classes (Figura 3) [Eads et al, 1997].

Figura 3 – Representação estrutural das duas classes de PRTases. A- Enzima OPRT pertencente à classe I, com PRPP e oratato no sítio ativo. Pode ser visualizado o domínio capuz, o qual é pouco

conservado para as PRTases e o domínio núcleo, sendo este bastante conservado entre as PRTases do tipo I. Também são identificados quatro *loops* (I, II, III e IV) envolvidos no sítio ativo. O sítio ativo está localizado entre os dois domínios. **B**- Enzima QAPRT pertencente à classe II e está representada com ácido quinolínico no sítio ativo, onde é visualizado um barril α/β irregular.

A classe I inclui enzimas como a APRT (adenina fosforribosiltransferase), HGPRT (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase), OPRT (orato fosforribosiltransferase) e GPAT (glutamina-PRPP-amidotransferase), enquanto a classe II é estruturalmente semelhante as QAPRT (ácido quilonílico fosforribosiltransferase).

As PRTases da classe II apresentam um núcleo de estrutura terciária em comum, reunindo um empacotamento de ligação di-nucleotídeo tipo Rossman. Este consiste de cinco fitas- β paralelas, e se encontra circundado por três ou quatro hélices- α [Eads et al, 1994 e Vos et al, 1997]. Nas estruturas das PRTases da classe I existe uma sequência de 13 aminoácidos que se refere ao sítio de ligação do PRPP, localizado na porção N-terminal na fita- β 3 da folha- β , sendo uma sequência conservada para as PRTases da classe I. As PRTases classe I apresentam um grande *loop* flexível, envolvido na catálise quando na conformação fechada, enquanto a conformação aberta permite a ligação dos substratos e liberação dos produtos [Eads et al, 1994; Scapin et al, 1994 e Krahn et al, 1997].

A PRTase do tipo II não possui o motivo de ligação do PRPP e apresenta um empacotamento bastante diferenciado das PRTases do tipo I. Sua estrutura terciária consiste de um barril α/β irregular, com sete fitas- β e seis hélices- α [Eads et al, 1997], sendo conhecido apenas um membro desta classe, a QAPRT (ácido quinolínico fosforribosiltransferase).

I.4.1 – Especificidade da enzima HGPRT aos substratos purinos

Nos diferentes organismos, a enzima HGPRT apresenta diferenças em especificidade para as bases purinas. A *via de recuperação* apresenta diferenças em termos das enzimas que as compõem, e de especificidade de algumas enzimas entre protozoários, helmintos e mamíferos [Berens et al, 1995]. A especificidade da HGPRT de protozoários da ordem Kinetoplastida (*Trypanosoma* sp. e *Leishmania* sp., entre outros) tem sido encontrada apenas para as bases hipoxantina e guanina [Ullman e Carter, 1997]. Este fato também ocorre em humanos [Turtle e Krenitsky, 1980] e no helminto trematoda *Schistosoma mansoni* [Dovey et al, 1984]. Os organismos da ordem Kinetoplastida possuem uma enzima específica para a recuperação da xantina (XPRT), enquanto que, em humanos e *Schistosoma mansoni* essa enzima não é encontrada. A enzima HGPRT pode apresentar especificidade também para a base xantina (HGXPRT), como encontrado em protozoários da ordem Amitochondriates (*Tritrichomonas foetus*), porém dentro dessa mesma ordem, os organismos dos gêneros *Giardia*, *Trichomonas* e *Entamoeba* são incapazes de recuperar hipoxantina, inosina e xantina, bem como fazer a interconversão dos nucleotídeos de purina de adenina e guanina [Berens et al, 1995]. Outros protozoários também apresentam a enzima HGXPRT, como aqueles da ordem Apicomplexa (*Plasmodium* sp, *Toxoplasma gondii* e *Eimeria tenella*). Os mamíferos de uma forma geral, não apresentam XPRT e possuem afinidade apenas para as bases hipoxantina e guanina através da HGPRT [Berens et al, 1995]. Em bactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Lactobacillus casei*) são encontradas as enzimas HPRT e XGPRT, estando separada a especificidade para hipoxantina e guanina em duas enzimas diferentes [Krenitsky et al, 1970 e Miller et al, 1972].

As análises das estruturas da HGPRT de *Toxoplasma gondii* ligadas a GMP, IMP e XMP revelaram que as ligações das bases no sítio ativo são muito similares àquela presente em seres humanos, porém diferenças sutis nas estruturas contribuem para a ligação produtiva de xantina somente nas enzimas de protozoários [Héroux et al, 1999b]. Os mecanismos de reconhecimento da base xantina envolvem dois aspectos estruturais, que contribuem para a ligação produtiva de xantina.

O primeiro aspecto é que a ligação de hidrogênio entre o átomo de nitrogênio da cadeia lateral do Trp199 e o átomo de oxigênio da cadeia principal do Asp206, reposiciona o *loop* IV fazendo com que o grupo amina (NH) do Asp206 faça ponte de hidrogênio com o átomo de O2 da xantina (Figura 3). Esse deslocamento é reforçado por movimentos coordenados envolvendo todo o domínio capuz. A orientação do *loop* IV é similar àquela encontrada na estrutura da HGXPRT de *Tritrichomonas foetus*, porém com o oxigênio da cadeia lateral da Tyr156 (correspondente ao Trp199 de *Toxoplasma gondii*) fazendo ponte de hidrogênio com Asp163 (correspondente ao Asp206 de *Toxoplasma gondii*), mediado por uma molécula de água [Somoza et al, 1996].

O segundo aspecto é que a plasticidade do núcleo hidrofóbico do domínio capuz permite que o átomo de oxigênio do grupo carbonila do resíduo Ile200, seja afastado do átomo O2 da xantina, evitando uma interação eletrostática desfavorável entre esses dois átomos. O movimento da Ile200 é acompanhado pela rotação de aproximadamente 20° da xantina (e hipoxantina), em relação à guanina, para fora dos átomos de oxigênio dos resíduos Ile200 e Asp206 (Figura 4) [Héroux et al, 1999b].

De certo modo, parece que as pontes de hidrogênio dos heteroátomos das cadeias laterais aromáticas dos resíduos Tyr156 e Trp199, em *Tritrichomonas foetus*

e *Toxoplasma gondii*, respectivamente, podem ocorrer através de molécula de água ou diretamente sobre as cadeias laterais do Asp163 e Asp206 respectivos. Isso ajuda a colocar o *loop* IV nas posições adequadas para a ligação de guanina, hipoxantina ou xantina. Esses resíduos aromáticos contribuem, mas não são requeridos para atividade da xantina PRTase, pois a HGXPRT de *Plasmodium falciparum* possui uma fenilalanina nessa posição, assim como a HGPRT humana e de *Trypanosoma cruzi* que possuem baixa especificidade para xantina [Héroux et al, 1999b]. Além disso, a mutação sítio dirigida em HGXPRT de *Toxoplasma gondii*, trocando Trp199 por Phe199 não afeta a atividade da enzima em relação à base xantina [Héroux et al, 1999b].

O fato da HGPRT humana apresentar baixa eficiência para a reação com xantina poderia ser devido ao deslocamento dos resíduos no *loop* IV, particularmente dos resíduos 191 a 195 (204 a 208 em *Toxoplasma gondii*). Tal ocorrência permite o correto posicionamento para a ponte de hidrogênio do O2 da xantina ou para N2 da guanina, sendo presumivelmente desfavorável nessa estrutura (Figura 4).

Através de dados de mutagênese da HGPRT de *Toxoplasma gondii* com substituições no trecho correspondendo aos resíduos 199 a 220 da humana, pode-se observar uma dramática redução da atividade para a xantina, sendo comparável ao nível da atividade da HGPRT humana. Assim, esse trecho de 22 resíduos do domínio capuz impede a adoção de uma geometria que permite o eficiente uso de xantina em ambas HGPRTs, humana e das mutantes de *Toxoplasma gondii* [Héroux et al, 1999b].

Figura 4 – A sobreposição dos sítios ativos dos complexos da HGPRT_{GMP} (azul) e HGPRT_{XMP-PPi-Mg} (verde) de *T. gondii* e a HGPRT_{GMP} (laranja). São visualizadas as ligações de hidrogênio que distinguem entre complexo com GMP (N2 da guanina com O do Asp206 de *T. gondii* e O do Asp193 humano) e com XMP (O2 da xantina com N do Asp206 – *T. gondii*).

I.4.2 – Mecanismo cinético da reação da HGPRT

Estudos cinéticos da reação da HGPRT humana [Xu et al, 1997] mostraram o mecanismo de reação sequencial (Figura 5) em que primeiro ocorre à ligação de PRPP-Mg²⁺ seguida da ligação da base purina. Feita a reação de transferência do grupo fosforribosil com a k_{cat} (k_3) de 131 s⁻¹, o produto PP_i-Mg²⁺ dissocia-se rapidamente, com k_{cat} (k_4) maior que 12 s⁻¹, e depois libera o IMP ($k_{\text{cat}} = k_5 = 6$ s⁻¹). Na reação inversa, primeiro ocorre a ligação do IMP e depois a do PPi-Mg²⁺. Essa reação ocorre com a k_{cat} (k_{-3}) de 9 s⁻¹, sendo dissociada a hipoxantina na ordem de 9.5 s⁻¹ (k_{-2}) e posteriormente o PRPP-Mg²⁺, mais vagarosamente, na ordem de 0,24 s⁻¹ (k_{-1}). Nesse trabalho foi verificado que a reação ocorre mais rapidamente com a guanina do que com a hipoxantina. Tal fato se dá devido a dissociação do GMP ($k_D = 7,1$ μM) ocorrer mais rapidamente que a do IMP ($k_D = 61$ μM), e não por diferenças nas velocidades dos passos químicos. A liberação dos produtos IMP ($k_5 = k_{\text{cat}} 6$ s⁻¹)

ou do PRPP ($k_{-1} = k_{\text{cat}} 0,24 \text{ s}^{-1}$) na direção reversa são os passos limitantes na reação (Figura 5).

Figura 5 – Esquema do mecanismo cinético proposto para HGPRT humana, incluindo passos funcionalmente significantes.

Vários aspectos do mecanismo cinético servem para explicar a baixa razão na reação inversa. Primeiramente, a vagarosa dissociação do PRPP do complexo E-PRPP ($k_{-1} = k_{\text{cat}} 0,24 \text{ s}^{-1}$) ou do complexo E-PRPP-HX ($k_6 = k_{\text{cat}} 0,28 \text{ s}^{-1}$), os quais podem estar envolvidos no movimento do *loop* flexível. Posteriormente, a rápida pirofosforólise de IMP ($k_2 = 1,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e a firme ligação de HX ao complexo E-PRPP ($k_D = 0,50 \text{ } \mu\text{M}$), que fazem com que a re-ligação de HX ao complexo E-PRPP seja, aproximadamente, 100 vezes mais rápida que a dissociação do complexo E-PRPP. No esquema da Figura 5, pode ser visualizado um complexo “beco sem saída” E-HX-PP_i, onde esse complexo foi detectado pela ligação de [³²P]-PP_i na presença de 2,2 mM de HX, que pode ser indicado como responsável pela inibição competitiva do PPi em relação ao PRPP ($k_i = 240 \text{ } \mu\text{M}$), como já foi sido descrito na literatura [Giacomello e Salerno, 1978].

O mecanismo de reação seqüencial ordenado descrito para a HGPRT humana também foi observado em HGPRT de *Schistosoma mansoni* [Yuan et al, 1992].

A catálise da reação de transferência do grupo fosforribosil vindo do PRPP para as bases purinas, pela HGPRT, pode ocorrer por dois mecanismos propostos: o mecanismo tipo S_N1 (ataque nucleofílico de primeira ordem) ou o mecanismo tipo S_N2 (ataque nucleofílico de segunda ordem).

I.4.3 – Mecanismo de reação da HGPRT

No mecanismo tipo S_N1 , a reação se dá com a inversão da estereo-química no carbono C1' da ribose e o estado de transição envolvendo um íon oxicarbonium carregado [Goitein et al, 1978 e Eads et al, 1994]. O *loop* flexível (*loop* II) atuaria no fechamento do sítio ativo, pois esse mecanismo requer um ambiente isolado do solvente. Dessa forma, protegendo o intermediário oxicarbonium, altamente reativo, do ataque não produtivo por moléculas de água [Focia et al 1998b]. Esse mecanismo foi proposto para a enzima OPRT, tendo sido confirmada a presença de um intermediário oxicarbonium no estado de transição [Tao et al, 1996].

No mecanismo tipo S_N2 , a reação é mais de associação do que de dissociação e, portanto, a formação de íon intermediário oxicarbonium não é esperada. Nesse mecanismo, a enzima facilita o ataque simultâneo sobre o átomo N9 da purina e a saída do PP_i do átomo C1' da ribose [Focia et al 1998b]. A rápida transferência do grupo fosforribosil pode ocorrer via complexo ternário [Munagala et al, 1998].

Ambos os tipos de mecanismos devem envolver o rearranjo eletrostático durante o estado de transição, na quebra da ligação C1' - O1 do PRPP e na formação da ligação C1' - N9 no nucleotídeo [Focia et al 1998b]. Estudos estruturais da HGPRT, em complexo ternário com PRPP e um substrato análogo a hipoxantina, de

Trypanosoma cruzi [Focia et al 1998b] e de *Toxoplasma gondii* [Héroux et al, 1999b] indicam um mecanismo tipo S_N2 .

Na estrutura de HGPRT de *Trypanosoma cruzi* [Focia et al 1998b] foi verificado que os dois íons de magnésio movimentam-se juntos, com o *loop* flexível na conformação fechada, e com isso, ocorre uma leve redução no ângulo entre o PP_i e o grupo 5' fosfato do PRPP. Essa redução pode conduzir a uma conformação mais plana do anel da ribose e também resultar em um aumento da tensão sobre a ligação $C1' - O1$ no PRPP [Balendiran et al, 1999]. Esse fato é contrário à hipótese do mecanismo tipo S_N1 , que necessariamente deve resultar em um intermediário carregado positivamente. Além disso, se a reação for dirigida pela hidrólise do PRPP altamente instável e a formação de um intermediário oxicarbonium, então dificilmente seria esperado encontrar PRPP intacto no sítio ativo. Portanto, é esperada a formação de um estado de transição, com ataque nucleofílico pela base purina, ocorrendo simultaneamente a saída do PP_i , deixando o grupo via complexo ternário. O PRPP é posicionado para remoção do PP_i por contatos com os íons de magnésio e o *loop* flexível fechado (Figura 6) [Focia et al 1998b].

No *loop*, o resíduo conservado Tyr104 pode fazer a estabilização eletrostática do estado de transição (Figura 6). Esse passo depende, aparentemente, da ativação do nucleófilo, o qual não pôde ser verificado nessa estrutura, uma vez que utilizaram um análogo a hipoxantina, o 7HP (7-hidroxi[4,3-d]pirazolopirimidina), na co-cristalização. Assim, essa estrutura apresenta o sítio ativo cataliticamente armado, com PRPP, Mg^{2+} e HPP, esperando a ativação do nucleófilo. As posições relativas dos dois íons metálicos e seus ligantes mudam entre as subunidades abertas e

fechadas, consistentes com suas funções no posicionamento do substrato e na ativação catalisada pela enzima [Focia et al 1998b].

Figura 6 – Interações do *loop* flexível (*loop* II) fechado e as ligações com o ligante no sítio ativo. As interações dos íons metálicos (roxo) com a proteína e moléculas de água (vermelho) podem ser visualizadas, bem como as pontes de hidrogênio dentro do *loop* e entre os *loop* e as ligações dos ligantes. Os *loops* I, III e IV são mostrados como fitas (ribbons), enquanto que os átomos do *loop* II estão desenhados. Os ligantes HPP, PRPP e íons metálicos hidratados (M1 e M2), além do Asp193 e outras três moléculas de água adicionais (A, B e C) também apresentam seus átomos desenhados. O resíduo Tyr104 está localizado no centro, precedido pela Ser103, a qual forma pontes de hidrogênio com a molécula de água C, Ser109 e com o grupo 5' fosfato do PRPP.

Na estrutura da HGPRT_{XMP-PPi-Mg} de *Toxoplasma gondii* [Héroux et al, 1999b], o ângulo entre o átomo N9 da xantina, C1' da ribose e O1A do PP_i é de 160°, próximo ao de 180° requerido pelo mecanismo tipo S_N2. A geometria dos íons magnésio indica um aumento da propensão do PP_i do PRPP deixar o grupo, pois esses íons atuam para a formação da geometria ótima para esse processo. Nessa estrutura foi verificado que quando o *loop* flexível está na conformação aberta, o sítio ativo apresenta 10 moléculas de água na proximidade do átomo C1' da ribose. Essas mesmas 10 moléculas de água também são encontradas presas dentro do sítio ativo, nas estruturas da HGPRT_{HPP-PRPP-Mg} de *Trypanosoma cruzi* [Focia et al, 1998b], na HGPRT_{ImmGP-PPi-Mg} humana [Shi et al, 1999a] e na HGXPRT_{dZG-PRPP-Mg} de

Toxoplasma gondii [Héroux et al, 2000], quando o *loop* está na conformação fechada. Isso demonstra que o *loop* flexível não está envolvido em excluir ou expelir moléculas de água do sítio ativo, mas sim em dirigir o substrato a um estado de transição. O fato de essas estruturas apresentarem moléculas de água tanto na conformação aberta quanto fechada, inviabiliza a hipótese de um mecanismo tipo S_N1 , onde significante reação não produtiva do intermediário oxicarbonium pela água seria esperada. Dessa forma, a geometria dos produtos na estrutura da HGPRT_{XMP-PPi-Mg} é consistente com mecanismo tipo S_N2 .

I.4.4 – Mecanismo enzimático da HGPRT

O mecanismo cinético [Xu et al, 1997], juntamente com as mudanças de conformações observadas nas estruturas de HGPRT dos diferentes organismos, foram utilizados para construção de um mecanismo de reação enzimática para a enzima HGPRT, envolvendo 10 passos (Figura 7) [Héroux et al, 1999a]. Para tal, foram utilizadas as estruturas em diferentes formas de cristalização, como na forma apoenzima [Schumacher et al, 1996 e Somozoa et al, 1996], na presença dos dois substratos (PRPP e base) [Focia et al, 1998b; Héroux et al, 2000 e Balendiran et al, 1999], na presença dos dois produtos (base e PP_i) [Héroux et al, 1999a e Shi et al, 1999ab] e na presença apenas dos nucleotídeos de purina [Xu et al, 1997; Somozoa et al, 1996; Héroux et al, 1999b e Eads et al, 1994];

No primeiro passo, os resíduos que coordenam a ligação do Mg^{2+} e as moléculas de água, estão em posição e orientação corretas para o recebimento da ligação do PRPP-Mg, sendo que o íon Mg^{2+} deve se ligar primeiro [Focia et al, 1998b], seguido do PRPP. Para que essa ligação se efetive, é necessário que Leu78 e

Lys79 (humana) adotem uma configuração *cis*, podendo esses eventos, ocorrerem concomitantemente. O *loop* III e o N-terminal da hélice G ajustam suas posições para se ligação ao fosfato 5' do PRPP, enquanto que, para que a ligação da base purina aconteça, é necessário o deslocamento de um resíduo na cadeia principal (Ile200) e três resíduos nas cadeias laterais (Ile148, Lys178 e Trp199), adotando assim suas posições corretas. O domínio capuz deve aproximar-se sobre a base purina, onde esses resíduos podem ser organizados devido à forte interação com a base.

No segundo passo, na parte inferior do sítio ativo, são formadas ligações de hidrogênio e uma grande rede de pontes salinas, especificamente na ligação do PRPP. Nessa parte inferior, o *loop* I, do domínio núcleo, e o *loop* IV, do domínio capuz, se encontram juntos. Os íons Mg posicionam o PP_i na geometria necessária para ocorrer a transferência do fosforribosil. Nesse momento, a parte superior do sítio ativo ainda está aberta, mesmo após a ligação do PRPP, com os resíduos Lys178 e Trp199 e a fita-β 9 posicionados como na forma apoenzima.

No terceiro passo, a ligação do fosfato 5' do PRPP torna o *loop* III ordenado, com o resíduo ILE148 posicionado no bolsão de ligação da purina. Com isso, o Asp150 é direcionado ao Asp197, servindo, dessa forma, como uma base no sítio ativo.

No quarto passo, com a ligação da purina, o topo do domínio capuz se fecha definitivamente sobre o domínio núcleo. Os resíduos Trp199 e Ile200 assumem suas posições, simultaneamente com a entrada da purina no bolsão de ligação, ou após o *loop* III' estar completamente ordenado com a cadeia lateral do resíduo conservado Arg182. Nessa etapa, esse resíduo se encontra direcionado ao Asp150 e Asp197 ambos já pré-posicionados, no início da fita-β 9 no domínio capuz. Esses

posicionamentos das cadeias laterais formam uma dupla ponte salina forte com o grupo guanidino do resíduo Arg182, posicionados entre os carboxilatos dos resíduos Asp150 e Asp197 [Shi et al, 1999a e Héroux et al, 2000]. Essa ponte salina fecha o domínio capuz sobre o domínio núcleo, sendo que o fechamento ordenado ocorre primeiramente pela parte inferior do sítio ativo e depois pela parte superior, explicando assim a alta constante de dissociação para as bases purinas ($k_D > 200 \mu\text{M}$) e K_m ao redor de $2 \mu\text{M}$.

Figura 7 – Movimentos envolvidos na catálise. O *loop* I está colorido de lilás, o *loop* II de rosa, o *loop* III de amarelo e *loop* III' de cinza e o *loop* IV de marrom. Os *loops* desordenados (abertos) são mostrados como uma seqüência de esferas. 1- Apoenzima com PRPP entrando no sítio ativo, sendo mostrados os átomos envolvidos na ligação da base purina (Ile148 e Trp199), juntamente com os *loops* II, III e III' nas conformações abertas. 2- Complexo PPRP-Mg está ligado e no *loop* I a Lys79 adota a configuração *cis* peptídeo. As interações do PPi do PRPP, *loop* I e *loop* IV aproximam o domínio capuz do núcleo. O *loop* III está ordenado ao redor do 5' fosfato e a guanina está entrando no sítio ativo. 3- Após a entrada da guanina, o bolsão de ligação de guanina é fechado e ordenado ao redor da base. O *loop* III está ordenado (fechado) permitindo que o *loop* III' torne-se fechado, colocando Arg182 entre o Asp150 e Asp197. Este fechamento, completa a ligação dos domínios capuz e núcleo. 4- O *loop* II é fechado e colocado o resíduo Tyr118 em posição de ligação de ponte de hidrogênio com o fosfato 5', permitindo a transferência fosforribosil. 5- *Loop* I e IV são abertos e ocorre a saída do PPi do sítio ativo. A Lys79 do *loop* I volta a *trans* configuração e o *loop* II é aberto. 6- O *loop* III' é aberto para liberar o GMP, seguido da abertura do *loop* III, permitindo a liberação do GMP e a HGPRT voltando para forma apoenzima.

No quinto passo, o *loop* II se fecha sobre o anel da ribose e o fosfato 5', fazendo interações entre os resíduos conservados Ser117 e Tyr118 e o grupo fosfato 5' [Shi et al, 1999a; Héroux et al, 2000 e Focia et al, 1998b]. O fechamento do *loop* II é o passo final precedendo a transferência do fosforribosil. Com o *loop* II na conformação fechada são feitas poucas pontes de hidrogênio adicionais ao PP_i do PRPP e esse movimento força os substratos a se aproximarem bastante um ao outro, tanto que eles atravessem o estado de transição.

No sexto passo, as detalhadas interações entre HGPRT e o PP_i diferem entre as várias estruturas de HGPRT em complexo ternário. A mudança na posição entre o fosfato 5' da ribose e o PP_i, antes e depois da transferência do fosforribosil, altera e enfraquece as interações entre o *loop* II e os produtos da reação, permitindo o retorno do *loop* II para a conformação aberta.

No sétimo passo, o PP_i é expelido do sítio ativo, sendo ajudado, em parte, pela energética favorável, acompanhando o retorno de *cis* peptídeo para *trans*.

No oitavo passo, quando o PP_i deixa o sítio ativo, ocorre a perda da rede de pontes de hidrogênio, que liga os domínios capuz e núcleo na parte inferior final do sítio ativo, enfraquecendo o vínculo da ligação entre os dois domínios. A perda do PP_i também enfraquece as interações do *loop* IV, especialmente Asp206 com a porção C2 – N3 do anel da purina. O domínio capuz começa a perder contato com a base purina, puxando a fita-β 9 e o Trp199 fora da base. Nessa etapa, o nucleotídeo ainda está fortemente ligado por dois conjuntos de interações (pontes de hidrogênio) com a enzima, pois são encontrados baixos valores para o fator de temperatura do anel purina e do grupo fosfato, o GMP apresenta alta constante de dissociação ($k_D = 7,1 \mu\text{M}$) e o *loop* III' ainda está fechado. Eventualmente, as interações entre os

resíduos Arg182 no *loop* III', Asp150 e Asp197 são quebradas, e o *loop* III' retorna à sua posição aberta.

No nono passo, agora com o *loop* III' aberto, o *loop* III está finalmente livre para ser desordenado na saída do fosfato 5'. Após a saída do nucleotídeo, a enzima HGPRT retorna ao estado conformacional de apoenzima. A exigência desses 3 passos sequenciais para liberação do nucleotídeo, isto é, a abertura do domínio capuz, a abertura do *loop* III' e a abertura do *loop* III, explica por que o nono passo é o limitante no mecanismo de reação da HGPRT. Segundo Xu et al (1997), a liberação do nucleotídeo (NMP) no complexo enzima–nucleotídeo ($E\text{-NMP} \rightarrow E + \text{NMP}$) é mais vagarosa que a liberação do PP_i no complexo $E\text{-NMP-PP}_i$. O passo determinante da reação envolve vários passos elementares, como mudanças conformacionais na enzima, no NMP e sua dissociação. As mudanças conformacionais na enzima são especificamente movimentos dos *loops* do sítio ativo e a alteração na conexão espacial entre os domínios capuz e núcleo. Na análise das estruturas em complexo ternário, o *loop* II deve adquirir a conformação aberta para a liberação do NMP, podendo ser o movimento de abertura do *loop* II o passo elementar mais vagaroso da reação da HGPRT. No entanto, na estrutura da $\text{HGPRT}_{\text{XMP-PP}_i\text{-Mg}}$ de *Toxoplasma gondii* o *loop* II é observado também na conformação aberta, o que indica que o passo limitante da reação está em algum passo subsequente à liberação do nucleotídeo do sítio ativo, podendo ser a abertura do domínio capuz, a abertura do *loop* III', a abertura do *loop* III, a mudança conformacional do NMP, a dissociação do NMP ou algumas combinações desses passos.

I.5 - Justificativa

Os agentes etiológicos pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, em particular o gênero *Leishmania*, causam doenças classificadas dentre as seis mais devastadoras, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). A busca por novas formas de quimioterapia para o combate e controle desses patógenos tem testemunhado avanços recentes, porém ainda insatisfatórios. Nesses protozoários parasitos, ao contrario de seus hospedeiros mamíferos, a aquisição dos nucleotídeos de purina é inteiramente dependente de fosforribosil-transferases (PRTases), que catalisam a reação de síntese dos nucleotídeos-5'-monofosfatos. Essa diferença bioquímica oferece atraentes oportunidades para o desenvolvimento de alternativas à quimioterapia já existente, como demonstrado pelos ensaios com alopurinol. Tendo em vista a importância da HGPRT de *Leishmania*, a determinação estrutural quaternária e o conhecimento do mecanismo cinético da enzima tornam-se imprescindíveis na busca de novas drogas.

A proeminência da HGPRT no metabolismo da *via de recuperação*, a habilidade dessa enzima de provocar a fosforribosilação de análogos de purinas, bem como a clonagem e caracterização dos genes de *aprt*, *hgprt* e *xgprt*, tornam essa via metabólica um alvo atraente para o desenho de inibidores e substratos subversivos para a quimioterapia de leishmanioses. Aliado a esses fatores, o conhecimento obtido pela resolução da estrutura cristalográfica dessas enzimas e de mutantes das mesmas, forma a base para a predição de compostos inibidores e melhoramento dos já encontrados. Os resultados obtidos podem ser empregados no estudo e desenvolvimento de inibidores e substratos subversivos, com a finalidade de obter agentes terapêuticos contra as leishmanioses. Além da aplicação prática ao desenho

de novas drogas, os resultados possibilitam a investigação de importantes questões acadêmicas com respeito à evolução e adaptação dessa enzima, por comparação com as estruturas já resolvidas.

I.6 – Objetivos

- Expressar e purificar a enzima HGPRT de *Leishmania tarentolae*;
- Caracterizar a enzima HGPRT e determinar IC₅₀ para inibidores comerciais;
- Cristalizar a enzima HGPRT;
- Co-cristalização da HGPRT com possíveis inibidores;
- Difração de raios-X dos cristais e possíveis co-cristais;
- Resolução da estrutura tridimensional da proteína isolada e com inibidores.

Capítulo 2

II – Clonagem, Expressão e Purificação da Enzima HGPRT de *Leishmania tarentolae*

Neste capítulo serão abordados os experimentos de clonagem, expressão e purificação da enzima HGPRT de *Leishmania tarentolae*, incluindo os resultados obtidos, a discussão e conclusão. Vale ressaltar que no início deste trabalho, o gene *hgprt* de *Leishmania tarentolae* já havia sido inserido no plasmídeo **pET-29a(+)** e clonado na bactéria BL-21 (DE3). Este trabalho foi realizado pelo Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann, no entanto, este processo será descrito.

II.1 – Clonagem do gene *hgprt* de *Leishmania tarentolae*

Um fragmento de 207 pares de bases do gene *hgprt* de *Leishmania tarentolae* foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se, como molde, o DNA genômico de *Leishmania tarentolae* e oligodeoxinucleotídeos degenerados para duas regiões conservadas. Uma região compreendendo o sítio de ligação da purina, YLLCVLKGS, e outra correspondendo ao sítio de ligação do PRPP, ILIVEDIV, nas posições de 121 a 128 da sequência da HGPRT de *Leishmania donovani* [Monzani et al, 2002]. O alinhamento de várias sequências da proteína HGPRT e os sítios utilizados para construção dos oligodeoxinucleotídeos degenerados podem ser visualizados na Figura 8.

Figura 8 – Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos representativas da HGPRT. As seqüências de várias proteínas da HGPRT estão alinhadas com as seqüências de *Leishmania tarentolae* e *Leishmania donovani*. As caixas indicam o domínio de ligação da base purina (sítio I) e do PRPP (sítio II). As seqüências são: Ttric (Trichomonas foetus L08622), Llact (Lactococcus lactis X67015), Tbruc (Trypanosoma brucei L10721), Tcruz (Trypanosoma cruzi L07486), Ldon (Leishmania donovani L25412), Ltart (Leishmania tarentolae AF139722), Human (Homo sapiens NM..000194), Clong (Cricetulus longicaudatus X17656), Rat (Rattus norvegicus M86443), Smans (Schistosoma mansoni X13531) e Tgond (Toxoplasma gondii U09219). “ * ” indica aminoácidos idênticos. “ : ” e “ . ” indicam substituições conservadas.

34

Leishmania tarentolae apresenta 87% de identidade com a sequência de *Leishmania donovani* [Allen et al, 1995], com a maior divergência nas regiões N- e C- terminais. A inspeção do alinhamento (Figura 8) mostra os domínios conservados de ligações para a base purina e o PRPP [Allen et al, 1995]. Esses domínios são flanqueados por regiões sem identidades de sequências significantes entre as HGPRs.

O gene *hgprt* de *Leishmania tarentolae* em fase aberta de leitura foi amplificado por reação de PCR com oligodeoxinucleotídeos específicos para as regiões 5' e 3' finais. Nesses “primers” (GIBCO-BRL), foram introduzidos os sítios de restrições de *NdeI* (CATATG) para a extremidade 5' e *HindIII* (AAGCTT) para a extremidade 3', sendo eles:

- 5' - AGCTCCCATATGAGCAACTCAGTCAAG - 3' - *NdeI*
- 5' - AGCTAAAGCTTGATGTCGAACGAGAGGCG - 3' - *HindIII*

A reação de PCR continha 2 pmol de cada “primer”, aproximadamente 0,5 ng do fragmento de 1500 pares de bases, isolado da biblioteca genômica, e 2,5 U de Ampli-Taq DNA polimerase (Promega), tendo sido feita a reação de acordo com as condições do fabricante. A reação foi realizada com o uso de termociclador GeneAmp 2400 (Perkin-Elmer CETUS). A amostra foi submetida à desnaturação por 2 minutos, a 94 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C, durante 30 segundos, anelamento a 40 °C, por 30 segundos e extensão a 72 °C, durante 1 minuto. Uma banda de DNA de aproximadamente 650 pares de bases de comprimento foi purificada do gel de agarose 1%, pelo método “NaI-glass powder” [Vogelstein e Gillespie, 1979]. O DNA purificado e o plasmídeo **pET-29a(+)** (Novagen) foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, seguido da ligação das extremidades complementares pela DNA ligase. A transformação foi realizada por eletroporação (GENE PULSER II – BIO RAD) em células competentes

BL21(DE3) com genótipo: F *amp^r hsdS_B(r_{BM}_B) gal dcm* (DE3), preparadas pelo método de cloreto de cálcio [Sambrook et al, 1989]. Após transformação as células foram crescidas em 500 µl de meio líquido Luria Bertane (LB), que contém 10 g de bactotripton, 5 g de extrato e levedura e 10 g de NaCl por litro, em pH de 7,5, durante 1 hora a 37 °C. As bactérias crescidas foram plaqueadas em meio sólido, (LB líquido acrescido de 15 g de agarose por litro), sendo adicionado 25 µg.mL⁻¹ de kanamicina, para seleção de colônias recombinantes, e incubado em estufa, a 37 °C.

As colônias transformantes foram repicadas em meio líquido LB, com 50 µg.mL⁻¹ de kanamicina, e cultivadas a 250 rpm de rotação. Parte dessas células foi utilizada para a extração e purificação plasmídial, com o uso do kit "IN CONCERT™ - Rapid Plasmid Miniprep System" (GIBCO BRL - Life Technologies), que se baseia no método de lise alcalina de células [Sambrook et al, 1989]. A outra parte das células, após adição de glicerol (50%), foi estocada a -80 °C. Todos os meios utilizados foram autoclavados para a esterilização.

A identidade da sequência do gene *hgprt* clonado foi confirmada pelo método de terminação "BigDye", sendo usado no seqüenciamento os "primers" T7 e do terminador T7, e utilizado o seqüenciador de DNA AB1377 (Perkin-Elmer).

Nessa construção, a proteína HGPRRT resultante não apresenta a cauda de histidina em fusão, que serve para a purificação por afinidade. O vetor **pET-29a(+)** apresenta o gene de resistência à kanamicina, utiliza o promotor do bacteriófago T7 e operador *lac*. Esse sistema controla a transcrição da proteína recombinante pela ação da enzima T7RNA polimerase. A expressão dessa polimerase é induzida por IPTG (isopropil-tiogalactosídeo) cuja molécula atua na desopressão do operador *lac*, tanto do gene para a T7RNA polimerase no genoma bacteriano, quanto daquele da proteína recombinante no vetor. Uma vez que esses operadores estão liberados a RNA

polimerase bacteriana transcreve o gene da *T7*RNA polimerase, e esta última pode fazer a transcrição da proteína recombinante. Esse sistema de expressão proporciona altos níveis de expressão da proteína recombinante e requer cepas bacterianas modificadas, que contêm a construção denominada DE3 em seu genoma.

II.2 – Expressão da proteína HGPRT recombinante

As células vindas de uma simples colônia foram crescidas durante 16 horas a 37 °C, sob agitação de 250 rpm, em 5 mL de meio LB contendo 25 µg.mL⁻¹ de kanamicina. Essas células foram utilizadas na inoculação de 50 mL de meio líquido 2XYT (16 g de bactotripton, 10 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl por litro, em pH 7,0) na proporção de 1:100. Após a inoculação, as células foram cultivadas sob agitação de 250 rpm, a 37 °C (C24 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific), até atingirem a densidade ótica de 0,6 (Ultrospec 2000 – Pharmacia Biotech) a 600 nm. Nesse estágio do crescimento foi realizada a indução da expressão da proteína recombinante, pela adição de 0,5 mM de IPTG, durante um período de 4 horas, nas mesmas condições. Após a indução, o extrato celular foi centrifugado a 4.000 g, durante 15 min, a 4 °C (Sorvall RC 50 Plus) e as células foram suspensas em 150 mL de tampão TMD (100 mM do tampão Tris, 10 mM de MgCl₂ em pH 7,5), e novamente centrifugada. Por fim, as células foram suspensas em 15 mL do mesmo tampão, adicionado de 1% de triton X100 e submetidas à lise celular.

A lise se deu através de 5 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, seguidos de 5 ciclos de sonicação, com duração de um minuto cada ciclo, e intervalos de 30 segundos entre eles. Outra centrifugação foi realizada a

20.000g, durante 30 minutos, a 4 °C, separando a porção solúvel no sobrenadante e a insolúvel no precipitado.

A porção solúvel foi submetida à precipitação com 60% de sulfato de amônio, em câmara fria a 4°C, por 20 minutos e centrifugada a 20.000g durante 20 minutos a 4 °C. A porção precipitada, foi suspensa em 8 mL de TMD, em pH de 7,5, e dialisadas contra esse mesmo tampão. A diálise foi feita em câmara fria, a 4 °C, sob leve agitação, sendo realizadas 4 trocas de tampão, com volume de 250 mL em cada troca. A amostra depois de dialisada foi centrifugada durante 20 minutos, em 20.000g, a 4 °C, para retirada das proteínas precipitadas no processo de diálise.

O sistema de expressão utilizando com vetor pET-29a(+) transformado na cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli* mostrou-se bastante satisfatório. A superexpressão da proteína recombinante solúvel pode ser observada em gel de eletroforese de poliacrilamida a 15%, com o detergente duodessil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) [Laemmli, 1979] (Figura 9).

Figura 9 – Gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) pré e pós-purificação da enzima HGPRT de *Leishmania tarentolae*. M– marcador de massa molecular. 1- extrato bruto lisado. 2- sobrenadante do lisado celular, mostrando a superexpressão da proteína recombinante, sendo a maior parte solúvel. 3- precipitado do lisado celular, mostrando as proteínas insolúveis. Parte da proteína recombinante encontra-se insolúvel, no entanto pode ser percebido que a lise celular não foi total. 4- precipitação com 60% de sulfato de amônio, mostrando quase toda proteína do extrato lisado sendo precipitada. 5- sobrenadante do sulfato de amônio, mostrando que uma parcela das proteínas não é precipitada. BSA- soro albumina bovina com 66 kDa. OVA- ovoalbumina com 45 kDa. ACB- anidrase carbônica com 30 kDa. ITS- inibidor de tripsina com 22,46 kDa.

II.3 – Purificação da proteína recombinante HGPRT de *Leishmania tarentolae*

Um dos métodos mais utilizados para fracionamento protéico é a cromatografia. Nessa técnica são utilizadas colunas contendo matriz sólida porosa, onde as proteínas são diferenciadas e coletadas em frações. De acordo com a característica da proteína de interesse, ela pode ser separada pela sua afinidade a produtos químicos, sua hidrofobicidade, carga ou massa molecular. Com isso, podem ser utilizadas colunas de afinidade, colunas hidrofóbicas, de troca iônica ou exclusão molecular, bem como serem traçadas estratégias que utilizem mais de um tipo cromatografia.

A proteína HGPRT tem sido purificada por cromatografia de afinidade, com uso da resina de GMP-agarose, em *Leishmania donovani* [Allen et al, 1995] e *Trypanosoma cruzi* [Eakin et al, 1997]. No entanto, para vários outros organismos, tem sido utilizada coluna de troca iônica, como em *Salmonella typhimurium* [Lee et al, 1998], ou esta em conjunto com outras cromatografias, como para a enzima humana [Eads et al, 1994] e de *Plasmodium falciparum* [Keough et al, 1999]. Para a purificação da HGXPRT de *Toxoplasma gondii* tem sido utilizado cromatografia de afinidade, Ni-agarose, e gel filtração após a clivagem da cauda de histidina [Héroux et al, 1999b]. Dessa forma, várias estratégias de purificação da enzima HGPRT têm sido estabelecidas, para os diferentes organismos.

Devido ao fato da HGPRT de *Leishmania tarentolae* apresentar 87% e 49% de identidade, com as enzimas de *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi*, respectivamente, poderia ser esperado que a HGPRT fosse purificada por afinidade em GMP-agarose. Contudo, a afinidade da HGPRT de *Leishmania tarentolae*, tanto

para GMP-agarose quanto para GTP-agarose, foi muito baixa (dados não mostrados). Dessa forma, outra estratégia de purificação foi desenvolvida.

A amostra de proteína proveniente da diálise e centrifugação, foi purificada em cromatografia de troca iônica, utilizando-se a coluna aniônica POROS 20HQ (PerSeptive Biosystems), com volume de resina de 1,6 mL. A corrida foi feita no cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) ÄKTA explorer (Pharmacia Biotech). O fluxo foi de 2 mL.min⁻¹ e as frações coletadas no volume de 1 mL. Inicialmente a coluna foi lavada 30 mL de água milli-Q deaerada, em seguida a coluna foi equilibrada com 10 mL de tampão TMD em pH 9,0. Após esta etapa, foram injetados 2 mL da amostra de proteínas e iniciada a coleta das frações de proteínas que eluíam da coluna. A coluna foi lavada com 15 mL de tampão TMD, em pH 9,0, sendo coletadas as frações de proteínas não adsorvidas na coluna. Posteriormente, foi iniciado um gradiente salino linear, utilizando-se o tampão TMD (pH 9,0) acrescido de 1 M de NaCl. O gradiente foi feito rapidamente, atingindo 100% do tampão salino em um volume de 10 mL, sendo mantido pela passagem de 6 mL desse tampão. Em seguida foi realizado o gradiente inverso, sendo que com 5 mL foi cessada a passagem do tampão salino. A coluna foi lavada com 10 mL de tampão TMD em pH 9,0. Vale ressaltar que a amostra da proteína estava em tampão TMD, em pH 7,5. Cada corrida demorava aproximadamente 30 minutos e para os 8 mL da amostra de proteínas eram feitas 4 corridas.

A proteína HGPRT foi coletada no eluato, nas frações de 2 e 8, sendo que a grande maioria das proteínas bacterianas era coletada no gradiente salino. A proteína HGPRT vinda do eluato apresentava uma pequena quantia de contaminantes (Figura 10). As frações coletadas do eluato, provenientes de cada corrida, totalizavam 32 mL, que foram concentrados em centrifuge 10 (Amicon) até um volume final de 4

mL e novamente passados na mesma coluna, sob as mesmas condições. Este procedimento foi feito devido à sobrecarga de proteínas na coluna, onde uma pequena parcela de proteínas bacterianas não era adsorvida. Dessa forma, com a segunda passagem, praticamente todas as proteínas bacterianas restantes da primeira passagem, eram retiradas no gradiente. Nessa etapa eram realizadas duas corridas.

As frações de 2 a 7 provenientes do eluato da segunda passagem continham a HGPRT recombinante e uma quantia de contaminantes muito pequena, que ainda persistiam (Figura 11). No entanto, a HGPRT recombinante apresentava um grau elevado de pureza que proporcionava sua utilização para os experimentos de caracterização e cristalização.

Os 12 mL resultantes da segunda passagem foram concentrados em centriprep 10, até aproximadamente 700 μ L, com concentração de HGPRT de 7 a 8 mg.mL⁻¹. A concentração de proteína era medida por método colorimétrico [Bradford, 1976].

Figura 10 – Gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) da primeira passagem na coluna POROS 20HQ. M- marcador de massa molecular. 1- pré-coluna proveniente da precipitado do sulfato de amônio, seguida da diálise e centrifugação. 2 a 8- frações de 2 a 8 coletadas no “void”, com 1 mL cada. 9- frações de 2 a 8 juntas. Foram aplicados 20 μ L das frações. BSA- soro albumina bovina com 66 kDa. OVA- ovoalbumina com 45 kDa. ACB- anidrase carbônica com 30 kDa. ITS- inibidor de tripsina com 22,46 kDa. CTC- citocromo C com 13,37 kDa.

Figura 11 – Gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) da segunda passagem na coluna POROS 20HQ. M- marcador de massa molecular 1- Aplicação de 5 μ l da proteína recombinante, concentrada a 7 mg.mL^{-1} . 2- Aplicação de 10 μ l da proteína recombinante, concentrada a 7 mg.mL^{-1} . BSA- soro albumina bovina com 66 kDa. OVA- ovoalbumina com 45 kDa. ACB- anidrase carbônica com 30 kDa. ITS- inibidor de tripsina com 22,46 kDa. CTC- citocromo C com 13,37 kDa.

Capítulo 3

III – Caracterização da enzima HGPRT de *Leishmania tarentolae*

Este capítulo é iniciado com uma breve introdução dos parâmetros obtidos no estudo de cinética enzimática, e o uso desses parâmetros para comparar e caracterizar as eficiências catalíticas das enzimas. Serão descritos os experimentos de caracterização da enzima HGPRT de *Leishmania tarentolae*, tais como determinação de K_m e V_{max} , massa molecular e pI. Além disso, serão mostrados os resultados obtidos para o IC_{50} de inibidores comerciais análogos à purina. Esses resultados serão comparados e discutidos com os dados encontrados na literatura da HGPRT de diversos organismos.

III.1 – Parâmetros cinéticos da enzima HGPRT

III.1.1 – Introdução teórica

Vários estudos são necessários para a compreensão do mecanismo de ação das enzimas. O conhecimento da estrutura tridimensional e de mutações sítio-dirigidas proporciona o exame da função e ação de aminoácidos individuais na estrutura da enzima. No entanto, a abordagem central no estudo do mecanismo de reação catalisado por enzima é a cinética enzimática. Ela determina a razão da reação e como essa razão varia em resposta às mudanças dos parâmetros experimentais.

A razão da equação de reação de um substrato catalisado por enzima (equação de Michaelis-Menten) é a relação quantitativa entre a velocidade inicial (V_0), a velocidade máxima ($V_{\max}$) e a concentração inicial de substrato ($[S]$), todos relacionados através da constante de Michaelis-Menten (K_m). A equação de Michaelis-Menten tem como hipótese básica que o passo limitante em reações enzimáticas é a quebra do complexo enzima-substrato (ES) para formar o produto e enzima livre. K_m é equivalente à concentração de substrato quando a velocidade é a metade da velocidade máxima.

A equação de Michaelis-Menten descreve o comportamento cinético da grande maioria das enzimas que apresentam uma dependência hiperbólica de V_0 sobre $[S]$, ou seja, as que seguem a cinética de Michaelis-Menten. As grandes exceções são as enzimas regulatórias. As enzimas que apresentam cinética de Michaelis-Menten, muitas vezes apresentam mecanismos de reação completamente diferentes, com reações envolvendo seis ou oito passos. No entanto, essas enzimas exibem o mesmo ambiente cinético de estado estacionário, onde a concentração do complexo de enzima-substrato mantém-se praticamente constante, porém, os valores de $V_{\max}$ e K_m diferem de uma enzima para outra.

Os parâmetros $V_{\max}$ e K_m podem ser medidos experimentalmente, contudo, pouco informam sobre o número, a razão ou a natureza química dos passos discretos da reação. A cinética do estado estacionário representa uma linguagem padrão, pela qual as eficiências catalíticas das enzimas são caracterizadas e comparadas. O número de passos e a identificação do passo limitante da razão de reação podem variar de enzima para enzima. A razão do passo limitante de qualquer reação catalisada por enzima, na saturação (ES ou EP), é definida de modo geral, como

constante da razão k_{cat} , que é equivalente à taxa constante do passo limitante da reação.

Os parâmetros cinéticos k_{cat} e K_m são utilizados para o estudo e comparação de diferentes enzimas, sendo os mecanismos de reação simples ou complexos. Os valores de k_{cat} e K_m refletem o ambiente celular, a concentração de substrato normalmente encontrada *in vivo* pela enzima e a química da reação catalisada. Experimentalmente, K_m para uma enzima tende a ser similar à concentração celular de seu substrato. Quando a concentração do substrato na célula for muito baixa, K_m será muito menor do que o K_m da enzima que atua em concentração de substrato abundante.

O melhor caminho para comparar-se as eficiências catalíticas de diferentes enzimas ou de diferentes substratos para uma mesma enzima, é comparar a razão k_{cat}/K_m das reações distintas. Esse parâmetro é muitas vezes chamado de constante de especificidade.

III.1.2 – Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max}

As atividades enzimáticas utilizadas para os cálculos dos parâmetros cinéticos, K_m e $V_{\text{máx}}$, foram realizadas para os substratos hipoxantina, guanina e PRPP, em temperatura ambiente de aproximadamente de 25 °C. O tempo de reação era de 1 minuto.

A reação ocorria em meio de reacional com o volume final de 1 mL, sendo 5 mM em MgSO_4 , 100 mM em Tris-HCl em pH 7,4, 1000 μM em PRPP, 40 μM em guanina ou 100 μM em hipoxantina [Tuttle e Krenitsky, 1980]. As concentrações desses substratos eram constantes, para o cálculo das razões constantes de primeira ordem, K_m e V_{max} , para guanina, hipoxantina e PRPP. As concentrações dos

substratos para as medidas de K_m e V_{max} foram variadas de 3, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 μM para guanina, 3, 5, 10, 15, 20, 50 e 100 μM para hipoxantina e de 10, 30, 50, 100, 200, 500 e 1000 μM para PRPP. A concentração de enzima utilizada para cada experimento foi constante e a reação ocorreu linearmente.

A atividade enzimática era medida espectrofotometricamente (U-2000 Spectrophotometer – HITACHI) em 255 nm para guanina e 243 nm para hipoxantina. A absorbância era devida à formação do produto da reação, GMP de IMP. Nos cálculos de atividades utilizaram-se os coeficientes de extinção ($\Delta\epsilon$) 4,2 para guanina e 2,2 para hipoxantina (Tuttle e Krenitsky, 1980). O cálculo da velocidade de reação (V_0 em $\mu mol.min^{-1}$) era feito através da variação da absorbância, no período de 1 minuto de reação ($\Delta ABS/minuto$), pelo coeficiente de extinção ($\Delta\epsilon$ em $mM^{-1}.cm^{-1}$), onde $V_0 = \Delta ABS.min^{-1}/\Delta\epsilon$. A linearização dos dados de velocidades para cada concentração de substrato foi realizada pelo gráfico de duplo recíproco (Lineweaver-Burk), onde é plotado o inverso da velocidade ($1/V_0$) e o inverso da concentração de substrato ($1/[S]$) para cada ponto. Por meio desse gráfico, é obtida a equação de uma reta, onde a validade dos dados obtidos é analisada com o valor do coeficiente de regressão linear. Nessa equação são encontrados os valores correspondentes aos termos da equação de Michaelis-Menten, podendo assim ser calculados os valores de K_m e V_{max} . As equações e os coeficientes das regressões lineares obtidos foram: $y = 7678x + 0,1746$ e $R^2 = 0,9589$ para hipoxantina; $y = 0,2531x + 0,092$ e $R^2 = 0,9616$ para guanina; $y = 26,359x + 0,1916$ e $R^2 = 0,9896$ para PRPP/hipoxantina; e $y = 11,705x + 0,0921$ e $R^2 = 0,9982$ para PRPP/guanina.

Os parâmetros de cinética da HGPRT de *Leishmania tarentolae* apresentaram valores de K_m de 2,8 μM para guanina, 4,4 μM para hipoxantina e para PRPP, de 127,1 μM com guanina fixa e 137,6 μM com hipoxantina fixa. Enquanto que os valores de $V_{\max}$ foram de 10,9 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ para guanina, 5,7 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ para hipoxantina e para PRPP, de 10,9 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ com guanina fixa e 5,2 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ para hipoxantina fixa. O gráfico do duplo recíproco para guanina e hipoxantina está representado na Figura 12, e o gráfico para PRPP, tendo sido fixadas as concentrações de guanina e de hipoxantina, está representado na Figura 13.

Figura 12 – Gráfico de Lineweaver-Burk para guanina e hipoxantina, sendo fixado o PRPP em 1 mM. No gráfico foram retirados os pontos de 3 μM de guanina e o de 50 μM de hipoxantina. Os pontos azuis pertencem à reta para guanina e os pontos lilás para hipoxantina.

Figura 13 – Gráfico de Lineweaver-Burk para PRPP, sendo fixado a guanina em 40 μM e a hipoxantina em 100 μM . Foram retirados os pontos de 10 μM para ambas as curvas. Os pontos azuis pertencem à reta para PRPP com guanina e os pontos lilás para PRPP com hipoxantina.

Os valores dos K_m s da HGPRT de *Leishmania tarentolae* estão comparados com os valores de vários outros organismos, na tabela 1.

Tabela 1 - Lista de K_m da HGPRT para os diferentes substratos dos diferentes organismos. De “^a até ⁱ” são mostrados os diferentes gêneros: ^a - *Leishmania*, ^b - *Trypanosoma*, ^c - *Trichomonas*, ^d - *Schistosoma*, ^e - *Plasmodium*, ^f - *Toxoplasma*, ^g - *Crithidia* e ^h - *Homo*. “*” representa reação feita em pH de 8,5. “**” representa reação feita em pH de 7,45. “^I” representa isoforma I, tipo selvagem. “^{II}” representa mutante natural resistente a 6-tioxantina.

Organismo	Hipoxantina (μ M)	Guanina (μ M)	PRPP/Hip (μ M)	PRPP/Gua (μ M)	Referências
^a <i>L. tarentolae</i>	4,4	2,8	137,6	127,1	Monzani et al, 2002
^a <i>L. donovani</i>	7,6	3,8	ND	ND	Tuttle e Krenitsky, 1980
^b <i>T. cruzi</i>	6,4	9,9	ND	ND	Allen e Ullman, 1994
^b <i>T. brucei</i>	2,3	4,8	ND	ND	Allen e Ullman, 1993
^c <i>T. foetus</i>	4,1	3,8	74,2	31,4	Beck e Wang, 1993
^d <i>S. mansoni</i>	5,4	3,0	9,3	18,2	Yuan et al, 1992
^e <i>P. falciparum</i>	0,9	1,4	59,8	362 [*]	Keough et al, 1999
			23	40 ^{**}	
^e <i>P. chabaudi</i>	2,5	2,0	ND	ND	Walter e Königk, 1974
^f <i>T. gondii</i>	1,7 ^I	1,0	58,7	58,7	Donald et al, 1996
	1,5 ^{II}	2,3			
^g <i>C. fasciculata</i>	7,3	8,7	ND	ND	Jiang et al, 1996
^h <i>H. sapiens</i>	3,1	1,9	126	134 [*]	Keough et al, 1999
			11,8	8,3 ^{**}	

Os valores baixos de K_m sugerem que as concentrações daqueles substratos na célula tendem a serem baixas [Nelson e Cox, 2000]. Na tabela 1 podemos comparar os valores de K_m dos diferentes organismos. Para os membros da família dos tripanosomatídeos, temos em *Leishmania* os menores valores de K_m para guanina em relação a hipoxantina, sugerindo que hipoxantina deva ser mais abundante que guanina. Porém, em *Trypanosoma* esses valores são invertidos, indicando que guanina seja mais abundante que hipoxantina.

Na forma promastigota de *Leishmania* é encontrada a presença da adenina desaminase, que converte adenina e adenosina em um intermediário comum, a hipoxantina [Marr et al, 1978], enquanto que em *Trypanosoma* a enzima adenina

desaminase é ausente [Berens et al, 1981 e Fish et al, 1982]. A *Leishmania* na forma amastigota também não apresenta a adenina desaminase [Looker et al, 1983]. Dessa forma, na fase amastigota não é esperado o fluxo na via de recuperação, através da hipoxantina e da xantina, pelas atividades das enzimas adenina e guanina desaminase, respectivamente [Lafon et al, 1982]. No entanto, o fato de que *Leishmania* apresenta, em pelo menos em uma forma de vida, o fluxo principal da via de recuperação através hipoxantina e xantina poderia explicar os valores de K_m para hipoxantina serem maiores do que aqueles para guanina. E em *Trypanosoma* ocorrendo o inverso, pelo fato da ausência da adenina desaminase, onde o fluxo metabólico da via de recuperação, não se dá pela hipoxantina em nenhuma fase da vida. Somente *Trypanosoma vivax*, dentre os tripanosomas, apresenta adenina desaminase [Ogbunude e Ikediobi, 1983]. Em *Crithidia fasciculata* os valores de K_m seguem aqueles dos tripanosomas, sendo maior para guanina.

A maioria dos organismos da Tabela 1 apresenta, assim como para o gênero *Leishmania*, K_m menores para guanina em relação a hipoxantina. O parasita *Toxoplasma gondii* possui a enzima adenina desaminase [Krug et al, 1989], sugerindo que hipoxantina possua uma função central no fluxo da via de recuperação [Schwartzman e Pfefferkorn, 1982], sendo condizente como os dados de K_m para HGXPRT para a isoforma I. No entanto, a isoforma II, é uma mutação natural da HGXPRT desse parasita, que confere resistência a 6-tioxantina, apresentou maior K_m para guanina.

Tritrichomonas foetus, assim como *Leishmania* e *Toxoplasma*, possuem adenina e guanina desaminase [Berens et al, 1995].

Humanos, como mamíferos em geral, possuem adenosina e guanina desaminase, as quais são convertidas em inosina e xantina, respectivamente. A

inosina formada pode ser catalisada pela nucleosídeo fosforilase e produzir hipoxantina, uma vez que eles não possuem a adenina desaminase [Berens et al, 1995]. Isso também ocorre no gênero *Plasmodium* que tem como em *Leishmania* preferência por hipoxantina para o fluxo na *via de recuperação* [Reyes et al, 1982], no entanto, foi verificado em *Plasmodium falciparum* (Tabela 1) um K_m menor para hipoxantina em relação à guanina, como nos tripanosomas; no *Plasmodium chabaudi* ocorre o inverso, como em *Leishmania*. As diferenças de K_m para hipoxantina e guanina, nessas duas espécies de *Plasmodium*, são bastante pequenas quando comparados aos dados dos outros organismos na tabela. No helminto *Schistosoma mansoni*, a formação de hipoxantina ocorre como na *via de recuperação* de mamíferos e não possui adenina desaminase, porém é sabido que o fluxo se dá preferencialmente por hipoxantina que guanina [Berens et al, 1995].

De modo geral, os organismos que apresentam a hipoxantina com uma função central no fluxo na *via de recuperação* mostram na Tabela 1, maiores K_m para hipoxantina que para guanina. Isso sugere que a concentração intracelular de hipoxantina seja mais abundante que de guanina nesses organismos.

Os valores de K_m para PRPP de *Leishmania tarentolae* são semelhantes àqueles encontrados para a enzima humana, em pH 8,5. Valores altos também foram obtidos em lisado de hemoglobina humana, sendo encontrado para PRPP com guanina o K_m de 243 μmol e de 250 μmol para o PRPP com hipoxantina [Keough et al, 1987]. Valores muito mais baixos foram encontrados em outros organismos (Tabela 1).

A comparação das constantes catalíticas (k_{cat}) e a razão k_{cat}/K_m da HGPRT de *Leishmania tarentolae* e de outros organismos estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Tabela comparando os valores de k_{cat} para guanina e hipoxantina e as razões k_{cat}/K_m para estes mesmo substratos. Os gêneros são os mesmos da tabela 1. Em *T. gondii* foi utilizado apenas os valores da isoforma I (selvagem). Em *Leishmania donovani* tem sido determinado V_{max}/K_m .

Organismo	k_{cat} (s^{-1}) guanina	k_{cat} (s^{-1}) hipoxantina	k_{cat}/K_m (guan.) ($1/s^{-1}/\mu M$)	k_{cat}/K_m (hipox.) ($1/s^{-1}/\mu M$)	Referências
<i>L. tarentolae</i>	64,6	33,8	23,0	7,6	Dados não publicados
<i>L. donovani</i>	-	-	26,0	5,0	Tuttle e Krenitsky, 1980
<i>T. brucei</i>	53,0	32,0	11,0	13,9	Allen e Ullman, 1993
<i>T. cruzi</i>	23,4	41,2	2,4	6,4	Allen e Ullman, 1994
<i>T. gondii</i>	6,5	6,5	6,3	3,9	Donald et al, 1996
<i>P. falciparum</i>	2,1	0,6	1,5	0,75	Keough et al, 1999
<i>S. mansoni</i>	5,7	2,8	1,9	0,5	Yuan et al, 1992
<i>H. sapiens</i>	14,2	8,4	7,5	2,7	Keough et al, 1999

Os valores da razão k_{cat}/K_m (constante de especificidade) na Tabela 2, mostram as eficiências catalíticas da enzima HGPRT dos diferentes organismos. Um valor muito elevado foi o de *Leishmania tarentolae* em relação à base guanina, que mostrou uma eficiência catalítica maior que duas vezes à de *Trypanosoma brucei*, sendo o segundo organismo a apresentar a maior taxa de eficiência catalítica para guanina. Esses dois organismos foram aqueles que apresentaram as maiores eficiências catalíticas, tanto para guanina como para hipoxantina.

As diferenças nas eficiências catalíticas para *Trypanosoma brucei* e para *Trypanosoma cruzi* são bastante marcantes. Esses organismos apresentam maiores eficiências catalíticas para hipoxantina do que para guanina, sendo uma relação inversa para todos os outros organismos da Tabela 2, como já mostrado na Tabela 1, onde os K_m s foram comparados. Este pode estar relacionado diretamente pela razão do fluxo da base purina na via de recuperação, pois nos tripanosomas citados, os purino ribonucleosídeos são utilizados, levemente de forma mais eficiente, que suas bases purinas correspondentes [Berens et al, 1995].

No trabalho de cinética da HGPRT humana [Xu et al, 1997], foi verificado que a reação ocorre mais rapidamente com guanina do que com hipoxantina. Tal fato

se dá devido à dissociação do GMP ($k_D = 7,1 \mu\text{M}$) ocorrer mais rapidamente que a do IMP ($k_D = 61 \mu\text{M}$), e não por diferenças na razão dos passos químicos. A liberação dos produtos IMP ($k_5 = k_{\text{cat}} 6 \text{ s}^{-1}$) ou do PRPP ($k_{-1} = k_{\text{cat}} 0,24 \text{ s}^{-1}$) na direção reversa são os passos limitantes na reação (Figura 4). No entanto, os dados de eficiências catalíticas provenientes dos tripanosomas indicam uma reação mais rápida com hipoxantina do que com guanina. Desse modo, podem existir diferenças no mecanismo cinético da HGPRT de *Trypanosoma*, em relação aos outros organismos da Tabela 2, pois, com exceção dos tripanosomas, todas as enzimas devem apresentar um mecanismo de reação similar àquele proposto para a HGPRT humana.

Apesar de humanos possuírem a *via de síntese de novo* dos nucleotídeos de purina, a comparação da eficiência catalítica dessa enzima com as de protozoários, tem demonstrado que essa enzima desempenha um papel importante no metabolismo humano. A HGPRT humana apresenta eficiência catalítica maior que a de vários protozoários (Tabela 2), os quais apresentam apenas a *via de recuperação*. Assim, mutantes que afetam a eficiência catalítica da HGPRT têm demonstrado estar envolvidos com a gota e a Síndrome de Lesch-Nyhan.

De modo geral, as enzimas dos diferentes organismos apresentam uma grande variação em suas eficiências catalíticas, podendo ser em função do seu nicho ecológico e co-evolução entre parasita-hospedeiro.

III.2 - Determinação da massa molecular da HGPRT de *Leishmania tarentolae*

A determinação da massa molecular da proteína HGPRT de *Leishmania tarentolae*, foi realizada através de cromatografia por exclusão de tamanho em

cromatografia líquida de rápida performance “FPLC” (FPLC System – Pharmacia Biotech), com o uso da coluna superose 12. A coluna foi equilibrada com 50 mL de tampão, contendo 150 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂ e 50 mL de Tris em pH de 7,4, com o fluxo de 0,5 mL.min⁻¹.

Após equilibrar a coluna, foi realizada a passagem do padrão de marcadores moleculares, com as seguintes proteínas: fosforilase B 97 kDa, soro albumina bovina com 66 kDa, ovo albumina com 45 kDa, anidrase carbônica bovina com 29 kDa e citocromo C com 12,4 kDa. Essas proteínas foram reunidas em uma solução com volume de 200 µL, contendo 1 mg de cada, com exceção da anidrase carbônica que foi usado 0,2 mg. Esse padrão de marcadores de massa molecular foi passado pela coluna, obtendo-se um perfil cromatográfico e os valores dos volumes de retenção. A proteína fosforilase B apresentou-se insolúvel na amostra, sendo realizada uma centrifugação para sua retirada, antes da aplicação da amostra, restando uma pequena porção solúvel observada no primeiro pico da eluição do padrão de massa molecular (Figura 14).

A proteína HGPRT foi eluída na coluna de três maneiras, uma como proteína pura (apoenzima), outra amostra foi incubada durante 30 minutos com PRPP antes da eluição, e a terceira foi incubada com GMP durante 30 minutos. Os picos e volumes de retenção foram acompanhados no cromatograma.

Os resultados obtidos na passagem da HGPRT apoenzima, incubada com PRPP e GMP, na coluna superose 12, podem ser observados na Figura 14. A massa molecular da HGPRT foi determinada pela plotagem em escala logarítmica “log” da massa molecular, contra o volume de retenção. Essa operação fornece a equação da reta que é utilizada para determinação da massa (Figura 15). A equação obtida foi $y = -0,2097x + 4,3163$, e o coeficiente de regressão linear $R^2 = 0,9797$.

Figura 14 – Cromatografia por exclusão de tamanho na coluna superose 12. De 1 a 5- marcadores de massa molecular. 1- fosfolipase B com 97 kDa. 2- Soro albumina bovina com 66 kDa. 3- Ovoalbumina com 45 kDa. 4- anidrase carbônica bovina com 29 kDa. 5- citocromo C com 12,4 kDa. Em preto mostra a eluição do padrão de massa molecular, em verde a HGPRT apoenzima, em azul a HGPRT incubada com PRPP e em vermelho a HGPRT incubada com GMP.

Figura 15 – Linearização pela escala logarítmica – log das massas moleculares em função do volume de retenção. Considerando o primeiro pico de 97 kDa da fosforilase B.

Os resultados para a determinação da massa molecular não foram precisos: 58,25 kDa para a HGPRT apoenzima, 54,70 kDa quando incubada com PRPP e de 53,92 quando incubada com a GMP. No entanto, esses números encontrados estão mais próximos de 46,8 kDa, o esperado para a forma dimérica, uma vez que a forma monomérica apresenta uma massa molecular esperada de 23,4 kDa. Assim, a forma trimérica com 70,2 kDa, estaria mais distante dos dados obtidos. Desta forma, a

HGPTR de *Leishmania tarentolae* deve ser considerada uma proteína dimérica em solução.

Na Figura 14 o primeiro pico é um tanto confuso, pois na preparação da amostra do padrão de massa molecular, a proteína fosforilase B, com 97 kDa apresentava-se insolúvel. A amostra foi centrifugada e aplicada na coluna apenas a porção solúvel. Contudo, o gráfico da eluição, apresentou um pequeno pico em relação aos demais, que pode corresponder a uma pequena porção da fosforilase B, que conseguiu ser solubilizada, ou uma pequena porção da proteína soro albumina bovina (BSA), na sua forma dimérica. Para proteína BSA, existe a informação do fabricante que pequena porção apresenta-se na forma dimérica. Os valores de massa molecular calculado, vindos da eluição da HGPRT, nas diferentes condições, foram obtidos utilizando-se o primeiro pico como o da fosforilase B. Tanto esses valores, como os encontrados, considerando-se o primeiro pico uma dimerização da BSA com 132 kDa, indicam que a proteína HGPRT comporta-se como um dímero (valores não mostrados). Visualmente é verificada a eluição da HGPRT sempre após o pico para BSA de 66 kDa (Figura 14).

A HGPRT de *Leishmania tarentolae* [Monzani et al, 2002] e *Trichomonas foetus* [Kanaani et al, 1997] foram observadas somente nas formas diméricas, na presença ou ausência de substratos, enquanto que em *Trypanosoma cruzi* verificou-se a forma monomérica na ausência de PRPP e dimérica em sua presença [Allen e Ullman, 1994]. A HGPRT humana é encontrada como dímero ou tetrâmero em solução, dependendo do pH e da força iônica [Johnson et al 1979]. Alguns resultados controversos têm sido encontrados para a HGPRT humana. Em experimento de eletroforese em gel nativo a forma dimérica foi encontrada [Kanaani et al, 1997],

enquanto que em gel filtração, tem sido encontrada como tetrâmero [Free et al, 1990; Xu et al, 1997 e Xu e Grubmeyer, 1998].

Nos protozoários parasitas *Plasmodium falciparum* [Keough et al, 1999] e *Toxoplasma gondii* [Heróux et al, 1999], as formas tetraméricas são encontradas para ambas HGPRT.

As massas moleculares dos monômeros das enzimas HGPRT, de vários organismos discutidos aqui, variam aproximadamente de 26 kDa a 22 kDa.

III.3 – O ponto isoelétrico da HGPRT de *Leishmania tarentolae*

O ponto isoelétrico (pI) é representado pelo pH em que a proteína apresenta sua carga líquida neutra. A amostra purificada da enzima HGPRT teve seu pI analisado por focalização isoelétrica, utilizando-se o FAST System (Pharmacia Biotech). O pI observado para a HGPRT de *Leishmania tarentolae* foi de 8,2 (Figura 16). Esse pI é consistente com o resultado obtido da purificação da proteína recombinante HGPRT, através da cromatografia de troca aniônica, na coluna POROS-20HQ. O fato da amostra de proteína a ser eluída na coluna estar em pH 7,5, faz com que a proteína HGPRT esteja levemente carregada positivamente, sendo incompatível com os grupos carregados positivamente, da coluna de troca aniônica.

O ponto isoelétrico apresenta uma grande variação para as enzimas HGPRT nos diferentes organismos. Alguns exemplos são as enzimas de *Tritrichomonas foetus* [Beck e Wang, 1993] e *Plasmodium chabaudi* [Walter e Königh, 1974] com pI de 5,00 e 5,25, respectivamente. Essas enzimas apresentam valores mais baixos de pI, quando comparados com aqueles de *Leishmania tarentolae* [Monzani et al, 2002] e de *Leishmania donovani* [Tuttle e Krenitsky, 1980], sendo de 8,2 e 7,0, respectivamente.

Figura 16 - Gel de determinação do pI. A banda da enzima HGPRT encontra-se entre os marcadores de pH 8,15 e 8,60, estando bem próxima do pH de 8,15. A proteína aplicada no gel encontra-se pura, no entanto várias bandas foram observadas no gel. Esse fato pode ter ocorrido pela proteína se alternar em dímero e monômeros, uma vez que com esta mesma amostra de proteína é observada apenas a uma banda, em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE).

III.4 – Ensaios de atividade da HGPRT na presença de inibidores comerciais

Os testes de atividade da HGPRT foram realizados com o meio de reação no volume final de 1 mL, contendo 5mM de MgSO_4 , 100 mM de tris, 1 mM de PRPP e 0,04 mM de guanina, com o pH = 7,4 [Tuttle e Krenitsky, 1980]. As medidas das atividades foram realizadas em triplicata, e para a condição descrita acima, era considerada como 100% de atividade. Os inibidores comerciais análogos à base purina ou pirimidina foram adicionados na condição anterior da reação, mantendo-se as concentrações iniciais, até encontrar-se 100% de inibição. A partir daí, a concentração de inibidor era gradualmente diminuída, sendo as medidas realizadas sempre em triplicata, para cada concentração de inibidor, e a curva de inibição composta por seis pontos, ou seja, seis concentrações de inibidor. Os compostos utilizados como inibidores, análogos à purina e pirimidina, foram: 8-aminoguanosina, alopurinol, azaadenina, formicina B, cafeína, 5-bromodesoxiuridina, 5-metilcitosina, ácido orótico, tubercidina e 6-cloroguanina. Além desses compostos, foi também utilizada nos testes de inibição, a cefotaxima um antibiótico cefalosporina de terceira geração. Para cada inibidor foi determinado

o IC_{50} , que corresponde à concentração de inibidor capaz de diminuir em metade a atividade total da enzima, através da curva obtida nos testes de inibição.

Os resultados de IC_{50} para os inibidores utilizados nos ensaios de inibição estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Tabela contendo os testes de IC_{50} de 11 inibidores comerciais análogos à purina e pirimidina, exceto cefotaxima que é um antibiótico cefalosporina de terceira geração.

Inibidores análogos à purina e pirimidina	IC_{50} (μM)
8-aminoguanosina	94
cefotaxima	180
alopurinol	194
azaadenina	210
formicina B	260
cafeína	336
5-bromodesoxiuridina	350
5-metilcitosina	412
ácido orótico	432
tubercidina	533
6-cloroguanina	838

Apesar dos resultados de IC_{50} serem altos para inibidores, os 5 melhores compostos poderiam ser utilizados como moléculas de partida para o desenho racional de drogas, quando co-cristalizados. O melhor composto testado, o 8-aminoguanosina é muito semelhante a guanosina, diferindo apenas no grupo amina que se encontra no carbono C8 da base.

Um resultado interessante foi o obtido com o antibiótico cefotaxima, que foi o segundo melhor inibidor. A inibição por esse composto é equivalente à inibição pelo alopurinol, um inibidor de xantina oxidase que diminui a produção de ácido úrico em pacientes com hiper-uricemia e gota [Palella e Fox, 1989]. Esse composto também tem apresentado bons resultados no tratamento da leishmaniose cutânea [Martinez e Marr, 1992] e doença de chagas [Gallerano et al, 1990], atuando como um substrato

subversivo. O alopurinol é metabolizado a nucleotídeos e eficientemente incorporado na transcrição de RNA, conduzindo a uma rápida degradação dos mesmos, acompanhado da inibição de síntese protéica [Marr e Berens, 1983].

Capítulo 4

IV – Cristalização da enzima HGPRT de *Leishmania tarentolae*

Neste capítulo serão abordados os experimentos realizados para a cristalização da proteína recombinante HGPRT de *Leishmania tarentolae*. A busca de condições iniciais de cristalização e o refinamento dessas condições, para a forma apoenzima e co-cristalizada com GMP, serão discutidos em relação aos resultados obtidos. Além disso, serão ressaltados alguns testes de co-cristalização, realizados com inibidores comerciais.

IV.1 – Introdução teórica

A cristalização de proteínas é um processo multiparamétrico envolvendo três passos: nucleação, crescimento e terminação do crescimento. A cristalização é iniciada por uma fase de nucleação, ocorrendo a formação do primeiro agregado, seguida pela fase de crescimento. A terminação do crescimento dos cristais ocorre devido aos defeitos no crescimento e também por desnaturação ou degradação da amostra protéica.

Os fatores envolvidos no processo de cristalização são: supersaturação, temperatura, pH, taxas de equilíbrio, força iônica e pureza dos reagentes, difusão e convecção, volume e geometria das amostras, densidade e viscosidade, pressão,

campos elétricos e magnéticos. Parâmetros bioquímicos e biofísicos das macromoléculas como sensibilidade da conformação a parâmetros físicos, presença de ligantes, aditivos especiais, propriedades como oxidação e idade das amostras, parâmetros relacionados à pureza, como contaminantes, além de outros, são também fatores importantes.

O crescimento de cristais de um composto ocorre quando sua solução atinge um estado de supersaturação, termodinamicamente instável, podendo ser desenvolvido em fase cristalina ou, nos casos desfavoráveis, em fase amorfa, quando o sistema retorna ao equilíbrio. A supersaturação pode ser atingida pela lenta evaporação do solvente ou variando-se alguns dos parâmetros mencionados anteriormente. Devido à necessidade de força iônica e pH adequados para a estabilidade e funcionalidade das macromoléculas, os cristais devem ser obtidos em soluções mais complexas, ao invés de soluções puramente aquosas. A nucleação requer um grau maior de supersaturação do que o crescimento, e a taxa de cristalização é diretamente proporcional à supersaturação.

Os cristais de macromoléculas são mantidos por interações como pontes de hidrogênio, pontes salinas, força de van der Waals, interações entre dipolos, somente em pequenas regiões de contatos, pois a maior parte das superfícies dessas moléculas interage com solvente, que constitui, normalmente, cerca de 50% do volume dos cristais. O volume de solvente pode chegar, em alguns casos, a valores baixos (cerca de 30%) e, em outros casos, a altos, como 80% do cristal. Um número bastante usado em cristalografia de proteínas, que envolve a quantidade de solvente nos cristais introduzido por Matthews [1968], indica a razão entre o volume da unidade assimétrica e a massa molecular da proteína contida nessa unidade, sendo, portanto dado em $\text{\AA}^3 \text{Da}^{-1}$, e comumente encontrado em torno de $2,7 \text{\AA}^3 \text{Da}^{-1}$.

A técnica mais utilizada em cristalização de proteínas é a difusão de vapor, que consiste em misturar uma gota de solução contendo a macromolécula biológica e tampão, com uma gota do agente cristalizante, tampão e aditivos. Essa mistura é equilibrada contra um reservatório contendo a solução do agente cristalizante em uma concentração mais elevada que a da gota. O equilíbrio vai ser atingido pela difusão das espécies voláteis na solução, como água e solvente orgânico, até a pressão de vapor na gota se igualar à do reservatório. Nessa técnica pode-se utilizar três métodos, “hanging drop” (da gota pendente), “sitting drop” (da gota sentada) e “sandwich drop” (da gota entre duas superfícies).

IV.2 – Ensaios de cristalização da apoenzima HGPRT de *Leishmania tarentolae*

A proteína HGPRT purificada (capítulo 2), com cerca de $8,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, foi utilizada nos ensaios de cristalização, através do método de cristalização por difusão a vapor, em gota suspensa [Ducruix e Giegé, 1992]. A concentração de proteína foi determinada por espectroscopia, em 595 nm [Bradford, 1976].

IV.2.1 – Ensaios iniciais de cristalização para a forma apoenzima

Na busca das condições iniciais de cristalização, geralmente são utilizadas grades de varreduras, que são soluções de cristalização pré-preparadas, de acordo com o método de Jancarik e Kim [1991]. O uso dessas grades facilita a busca para o melhor agente precipitante a ser utilizado, como sulfato de amônio, polietilenoglicol (PEG) e 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD) entre outros, bem como uma aproximação da melhor condição de pH para a cristalização. Inicialmente, foram utilizadas as grades de varreduras do fatorial I (HR2-110), do fatorial II (HR2-112), do fatorial

PEG 6000 (HR2-213), do fatorial sulfato de amônio (HR2-211) e do fatorial MPD (HR2-215), sendo todos produtos da Hampton Research. A gota de cristalização foi montada com 3 μ L da solução do poço e 3 μ L da solução de proteína, na temperatura de 18 °C.

Após uma semana, foram encontradas algumas condições promissoras nas seguintes grades: fatorial I, fatorial sulfato de amônio e fatorial PEG 6000.

No fatorial I, os ensaios de cristalização apresentaram algumas condições possíveis de serem exploradas, sendo observada a formação de precipitado cristalino, acentuada nucleação e microcristais (fotos não mostradas). As melhores condições encontradas foram em: 2 M de sulfato de amônio e 100 mM de Tris em pH 8,5 (condição 4); 30% PEG 4000, 200 mM cloreto de magnésio e 100 mM de Tris em pH 8,5 (condição 6); 30% PEG 4000, 200 mM sulfato de lítio e 100 mM de Tris em pH 8,5 (condição 17), 30% PEG 4000, 200 mM acetato de sódio e 100 mM de Tris em pH 8,5 (condição 22); e 2 M de sulfato de amônio (condição 32). Todas essas condições descritas apresentavam PEG 4000 ou sulfato de amônio como agente precipitante sendo quase todas com tampão Tris em pH 8,5.

No fatorial de sulfato de amônio, foram observados pequenos cristais em formato arredondado (Figura 17-A), na condição contendo 1,6 M de sulfato de amônio, 100 mM de ácido cítrico em pH 5,0 (condição 8). Nessa grade de varredura, a partir da condição 8, pôde ser notado um acentuado aumento da nucleação e diminuição do tamanho de microcristais. Isso ocorria, quando era mantida a concentração de sulfato de amônio e aumentado o valor de pH, no intervalo de 5 a 8. O inverso, com aumento da concentração de sulfato de amônio e pH mantido, também ocorreu diminuição do tamanho dos microcristais.

No fatorial PEG 6000 foram observados pequenos cristais hexagonais na condição 14, contendo 20% de PEG e 100 mM de ácido cítrico em pH 5,0 (Figura 18-A), e sua vizinhança apresentava elevada nucleação, com microcristais e precipitado. As condições com valores de pH abaixo de 5,0 apresentavam precipitação da proteína.

Os pequenos cristais, obtidos nas gotas da condição 8 do fatorial sulfato de amônio e da condição 14 do PEG 6000, foram corados com “Izit Crystal DyeTM”, indicando serem de proteínas. O “izit” é uma pequena molécula de corante que preenche todos os canais de solvente do cristal de proteína, colorindo-o de azul. Quando utilizado em diluição apropriada, a gota de cristalização permanece clara, enquanto que os cristais tornam-se azuis. Os cristais de sal não possuem grandes canais de solvente, então o “izit” não pode preenchê-los; assim, a gota fica azul e os cristais permanecem claros.

As condições 8 do fatorial sulfato de amônio e a 14 do PEG 6000 foram rastreadas na tentativa de obter-se cristais maiores para a difração de raios-X.

IV.2.2 – Refinamento da condição inicial do fatorial sulfato de amônio

A condição inicial contendo 1,6 M de sulfato de amônio, 100 mM de ácido cítrico, em pH 5,0 (condição 8), foi rastreada. O intervalo de pH rastreado foi de 4,8 a 5,3, em intervalos de 0,1 unidades de pH e as concentrações de sulfato de amônio, de 1,4M a 1,7 M, com intervalos de 0,1 M. Para isso, foram utilizadas as soluções de estoque dos tampões de ácido cítrico (item anterior) e solução estoque 2 M de sulfato de amônio, previamente filtrada em membrana de 0,22 μ m. Uma leve melhora da condição de cristalização inicial foi obtida (Figura 17-B), porém os cristais eram

pequenos e poucos resistentes à solução crioprotetora. Assim, não foram utilizados para difração os testes de difração de raios-X.

Figura 17 – Fotos de cristais usando sulfato de amônio como agente precipitante. **A**- condição 8 do fatorial sulfato de amônio, contendo 1,6 M de sulfato de amônio, 100 mM ácido cítrico e pH 5,0, sendo observado cristais pequenos e com formato arredondado. **B**- refinamento da condição inicial (**A**), em 1,4 M de sulfato de amônio, 100 mM ácido cítrico e pH 5,0; os cristais são morfologicamente melhores formados, porém ainda pequenos.

IV.2.3 – Refinamento da condição inicial do fatorial PEG 6000

Para o rastreamento da condição inicial com 20% de PEG 6000, 100 mM ácido cítrico, em pH de 5,0 (condição 14), foram preparadas soluções estoques com 50% de PEG 6000 e com 250 mM ácido cítrico. Para a solução do tampão, foi variado o pH de 4,9 a 6,0, com intervalos de 0,1 unidades de pH, ajustados em pHmetro (310 pH Meter – Beckman). As soluções estoques de ácido cítrico e PEG 6000, foram filtradas em membranas de 0,22 μm e 0,45 μm , respectivamente. Essas soluções foram usadas na preparação das soluções dos poços, que variavam de acordo com o pH acima. Na solução do poço, a concentração final foi de 100 mM de ácido cítrico, e as de PEG 6000 foram de 15%, 18%, 20% e 23%. As caixas de cristalização foram montadas a 4°C e 18°C.

Na cristalização a 18°C, foi observada melhora significativa, com cristais aparentemente bem formados e relativamente grandes, nas condições com 20% de PEG 6000 em pH 5,0 e 15% de PEG 6000 em pH 5,1 (Figura 18-B e C). Outras condições apresentaram cristais menores e até mesmo precipitado cristalino.

Na cristalização a 4°C, foram observados cristais grandes, porém na maioria das condições, aparentemente não bem formadas. Foram obtidos cristais em várias condições, tais como: em 15% de PEG 6000 nos pH 5,4 e 5,5; 18% de PEG 6000 em pH 5,2 e 5,3 (Figura 18-D) e 20% de PEG 6000 em pH 5,2; 20% de PEG 6000 em pH 5,3 e 5,4 (Figura 18-E). Na maioria dessas condições, os cristais apresentavam-se com formas mais alongadas em relação a todas as outras condições (Figura 18-E).

Figura 18 – Fotos de cristais utilizando PEG 6000 como agente precipitante. **A**- condição 14 do fatorial PEG 6000, contendo 20% de PEG 6000 e 100 mM de ácido cítrico em pH 5,0, sendo observados pequenos cristais hexagonais. De **B** a **E**- refinamento da condição inicial (**A**). **B**- condição idêntica à condição inicial (condição 14). No refinamento a repetição da condição inicial apresentou melhores resultados que aquele da condição inicial. **C**- condição contendo 15% de PEG 6000 e 100 mM de ácido cítrico em pH 5,0, sendo esta condição a que apresentou os melhores cristais. **D**- condição contendo 18% de PEG 6000 e 100 mM de ácido cítrico em pH 5,3, com alguns cristais aparentemente bem formados. **E**- condição contendo 20% de PEG 6000 e 100 mM de ácido cítrico em pH 5,4, os cristais são alongados e aparentam as superfícies irregulares. De **A** a **C** provêm dos ensaios realizados a 18 °C. **D** e **E** provêm dos ensaios a 4 °C.

Os melhores cristais provenientes dos ensaios de cristalização a 4 °C e 18 °C foram submetidos aos testes de difração de raios-X. Para esses testes, existia o problema de se obter uma condição crioprotetora adequada, na qual as moléculas crioprotetoras devem entrar nos canais de solvente dos cristais, evitando a formação de pequenos cristais de gelo que possam danificar a organização cristalina, bem como atuar na quebra desses cristais. A solução do poço demonstrava ser eficiente para o teste de crio-congelamento, no entanto, as moléculas de PEG 6000 possuem massa molecular elevada, o que dificulta sua entrada nos canais de solvente do cristal, não devendo então atuar como crioprotetoras. Dessa forma, para os testes de difração de raios-X, para cada solução do poço foi feita uma solução “crioprotetora”, mantendo as mesmas concentrações dessas soluções e acrescidas de 20% de etilenoglicol. Para esses testes de difração de raios-X foi utilizado o difratômetro RU200B (Rigaku-Rotaflex), com a placa de imagem R-AXIS IIC.

Nesse sistema de crio-congelamento os cristais não difratavam. No entanto, um cristal foi montado em capilar, e pôde ser observado um padrão de difração muito ruim, porém confirmando que esses cristais eram de proteína.

Os cristais obtidos nesse ensaio foram observados em 1 dia, assim o rápido processo de cristalização pode gerar uma desordem interna nos cristais e os mesmos não difrataram bem.

Deve ser ressaltado que a proteína concentrada para os ensaios de cristalização estava em tampão com 100 mM de Tris, proveniente da passagem da amostra de proteínas na coluna POROS20HQ em pH 7,5. A lavagem da coluna foi feita com o mesmo tampão em pH 9,0. As soluções tampões dos poços eram compostas por 100 mM de ácido cítrico em pH 5,0, ou 95 mM de citrato trissódico

em pH 5,6. Dessa forma, os valores de pH nas condições que ocorreram as cristalizações não devem ser os mesmos das soluções dos poços.

IV.3 – Ensaios de co-cristalização da enzima HGPRT de *Leishmania tarentolae* com o produto de reação GMP

Os ensaios de co-cristalização com o produto da reação GMP foram fortemente incentivados, pelo fato de somente a enzima HGXPRT de *Toxoplasma gondi* ter sido cristalizada na forma de apoenzima [Schumacher et al, 1996], e a grande maioria estar cristalizada na presença de ligante, entre eles o GMP [Eads et al, 1994; Somoza et al, 1996; Guddat et al, 2002 e Héroux, et al, 1999b]. Para os ensaios de cristalização, à solução de proteína HGPRT purificada, proveniente da segunda cromatografia de troca iônica na coluna POROS20HQ, foi adicionado 1 mM de GMP e concentrada em centriprep 10 (Amicon) até aproximadamente 7,0 mg.mL⁻¹, sendo a concentração de proteína determinada por espectroscopia, a 595 nm [Bradford, 1976].

IV.3.1 – Ensaios de co-cristalização utilizando - se as condições provenientes do refinamento de PEG 6000

As melhores condições no refinamento da condição PEG 6000, para a forma de apoenzima, foram utilizadas para esse experimento. Elas variavam na faixa de pH de 5,1 a 5,6 (100 mM de ácido cítrico), com intervalos de pH de 0,1, e as concentrações de PEG 6000 de 15%, 18%, 20% e 23%. Além disso, foi montada outra caixa de cristalização nessas mesmas condições, apenas substituindo o PEG 6000 por PEG 4000. Esses experimentos foram realizados a 4 °C e 18 °C. A morfologia dos cristais obtidos tanto em PEG 6000, como no PEG 4000 (Figura 19),

era a mesma daqueles obtidos na condição de apoenzima. Para os testes de difração de raios-X, novamente foi utilizada a solução do poço acrescida de 20% de etilnoglicol. Os dados de difração dos melhores cristais, obtidos tanto para PEG 4000, como para PEG 6000, mostraram que os cristais difratavam somente à baixa resolução (padrões de difração não mostrados).

Figura 19 – Cristais obtidos na substituição de PEG 6000 por PEG 4000. O formato dos cristais obtidos na co-cristalização com GMP apresentavam o mesmo formato daqueles sem GMP. Isso ocorria tanto para PEG 6000 como para PEG 4000, como agentes precipitantes.

IV.3.2 – Ensaios de co-cristalização com o uso de aditivos

A condição que proporcionou os melhores cristais (15% de PEG 6000, 100 mM ácido cítrico, pH 5,1) foi utilizada para a triagem de aditivos (additive screen 1, 2 e 3 – Hampton Research), na tentativa de melhorar a difração. A gota de cristalização foi montada em caixas de gota sentada, com 5 μ l da solução de proteína e 5 μ l da solução do poço. Os aditivos foram adicionados em diferentes quantidades, de acordo com a indicação do fabricante. Os ensaios de cristalização foram realizados em temperaturas de 4°C e 18°C.

Nesse experimento foram obtidos cristais com morfologias diferentes em relação à condição anterior, na presença de vários aditivos. Essa tentativa foi válida uma vez que foi conseguido melhorar o padrão de difração, porém esses cristais difratavam somente acima de 3,5 Å (fotos dos cristais e os padrões de difração não

mostrados). As caixas de cristalização foram analisadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, através de testes de difração de raios-X.

IV.3.3 – Ensaios de co-cristalização em condições crioprotetoras

Na tentativa de co-cristalizar a proteína HGPRT em condições crioprotetoras, foi utilizado o “kit crystal screen cryo - HR2-122” (Hampton Research). Esse método consiste em encontrar-se concentrações crioprotetoras adequadas que estabilizam o cristal e, ao mesmo tempo, combinam com o reagente de cristalização para formar estado amorfo, utilizando-se glicerol como crioprotetor. Foram montadas duas caixas de gota suspensa, uma a 18°C, e outra a 4°C, com o uso de 3 µl da solução do poço e 3 µl da solução de proteína.

Na condição 40 do fatorial crio foram obtidos cristais da proteína HGPRT, na morfologia de agulhas (Figura 20-A). A solução do poço continha 19% de PEG 4000, 19% de isopropanol, 5% de glicerol e 95 mM de citrato trissódico em pH 5,6. Esses cristais foram obtidos somente nos ensaios de cristalização, na temperatura de 18°C.

Para os testes de difração de raios-X, a solução do poço não se apresentava como crioprotetora, assim essa solução era acrescida de 15% de etilenoglicol. Nessa condição foi obtido um padrão de difração próximo a 3,5 Å. (padrão de difração não mostrado).

IV.3.4 – Refinamento dos ensaios de co-cristalização em condições crioprotetoras

Para o rastreamento da condição com 19% de PEG 4000, 19% de isopropanol, 5% de glicerol e 95mM de citrato trissódico em pH 5,6, foram montadas quatro caixas de cristalização, com as seguintes características.

Na primeira caixa, foram variadas as concentrações de glicerol entre 4% e 7%, com intervalos de 1%, e de PEG 4000 entre 17% e 22%, com intervalos de 1%. Os outros componentes foram mantidos. Na segunda caixa, foram variadas apenas as concentrações de isopropanol, entre 16,8 e 21,4%, com intervalos de 0,2%. Na terceira caixa, foi variado o pH de 5,3 a 5,8, em intervalos de 0,1, e a concentração de PEG 4000 de 18% a 21%, com intervalos de 1%, mantendo-se as concentrações dos outros componentes. Na quarta caixa, os valores de pH foram variados como na terceira, e as concentrações de isopropanol de 17,5% a 20,5%, com intervalos de 1%, e mantidas as concentrações dos outros componentes.

O rastreamento utilizado para a condição inicial não demonstrou mudanças morfológicas significativas. Pôde ser notado que o aumento gradativo na concentração de PEG 4000 de 17% até 22%, induzia a um aumento de nucleação e, conseqüentemente, grande quantidade de cristais pequenos (Figura 20-B e C). As variações de pH e concentrações de glicerol não apresentavam mudanças significativas em relação à condição inicial.

As condições nas quais as concentrações de isopropanol foram diferentes (Figura 20-D), não demonstraram variações sistemáticas dos cristais em número, forma e tamanho, no entanto, de uma forma mais geral, parece que o aumento da concentração de isopropanol diminuiu o número de cristais na gota.

Os melhores cristais provenientes do ensaio de refinamento foram criocongelados nas soluções correspondentes do poço, acrescidas de 15% de

etilenoglicol. Esses cristais foram utilizados para os testes de difração, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

A maioria dos cristais provenientes do refinamento foi exposta aos raios-X e difratavam acima de 3 Å. No entanto, dois cristais, em condições diferentes, provenientes da caixa onde apenas foi variada a concentração de isopropanol, difrataram com boa resolução. Um cristal dessa caixa, na condição contendo 19% de PEG 4000, 18,2% de isopropanol, 5% de glicerol e 95 mM citrato trissódico, em pH 5,6, difratou a aproximadamente 2,5 Å. Um outro cristal, da solução contendo 19% de PEG 4000, 20,6% de isopropanol, 5% de glicerol e 95 mM citrato trissódico em pH 5,6, difratou a aproximadamente 2,1 Å.

Para esses cristais foram coletados três conjuntos de dados de difração de raios-X, sendo um para o cristal a 2,5 Å de resolução e dois conjuntos de dados para o cristal a 2,1 Å de resolução.

Figura 20 - Fotos de cristais provenientes das condições crioprotetoras. A- condição inicial do fatorial “crio” contendo, 19% de PEG 4000, 19% de isopropanol, 5% de glicerol e 95mM de citrato trissódico, em pH 5,6. De B a D- refinamento da condição inicial. B- cristais obtidos na condição contendo 17% de PEG 4000, 19% de isopropanol, 5% de glicerol e 95mM de citrato trissódico em pH 5,6. C- pequenos cristais em forma de agulhas, na condição contendo 22% de PEG 4000, 19% de isopropanol, 6% de glicerol e 95mM de citrato trissódico em pH 5,6. D- cristais obtidos pela variação de

isopropanol, sendo que essa condição continha 19% de PEG 4000, 17,4% de isopropanol, 5% de glicerol e 95mM de citrato trissódico, em pH 5,6. Nessa caixa é que foram obtidos cristais que difratavam bem. OBS- A foto A foi documentada após ter sido retirado cristais da gota, para testes de difração, esse manuseio modificou um pouco o formato de agulha, depois de um período de tempo.

IV.4 – Testes de co-cristalização com inibidores comerciais

A enzima HGPRT purificada era concentrada por centrifugação em membranas permeáveis, centriprep 10 (Amicon), até aproximadamente 7 mg.mL⁻¹. Após isto, a proteína foi incubada em período mínimo de 1 hora, com os inibidores, partindo-se da concentração de aproximadamente 100% de inibição e aumentando-se de 1,5X, 2X, 2,5X, 3X e 4X a sua concentração. Além disso, outra caixa de cristalização foi montada com a proteína incubada na concentração do IC₅₀, e com 1mM de inibidor, como aquela condição com GMP. Esses testes foram realizados utilizando-se a mesma solução do poço que o cristal produziu melhor padrão de difração, sendo composta de 5% de glicerol, 19% de PEG 4000, 20,6% de isopropanol e 95 mM de citrato trissódico em pH 5,6.

Outro teste foi realizado concentrando-se a proteína na presença de 1mM dos cinco melhores inibidores (8-aminoguanosina, cefotaxima, alopurinol, azaadenina e formicina B), utilizando-se a mesma condição do poço, porém variando-se a concentração de isopropanol (19%, 19,5%, 20% e 20,5%) e PEG 4000 (18%, 19% e 20%). Quando foram variadas as concentrações do precipitante PEG, a de isopropanol foi mantida na condição inicial, e quando foram variadas as de isopropanol, a de PEG permaneceu na condição inicial. Apenas um teste, para cada um desses 5 inibidores, foi realizado na condição inicial, trocando-se o tampão citrato trissódico pH 5,6 para 100 mM de MES, em pH 6,0. Os ensaios de cristalização foram feitos a 18 °C.

Os testes de co-cristalização não apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que ocorreu a precipitação da proteína quando a gota foi montada. Durante esses testes pôde ser observado que a condição inicial de cristalização da HGPRT na presença de GMP não se reproduzia, quando a proteína era concentrada até aproximadamente 7 mg mL^{-1} e posteriormente incubada. Assim, foi testado concentrar-se a proteína na presença dos 5 melhores inibidores e também na presença de GMP. Nesse teste ocorreu novamente a cristalização da proteína com GMP como anteriormente, e foi verificado que era formado um precipitado cristalino em algumas condições com os inibidores.

O teste utilizando tampão MES, ao invés de citrato trissódico, pareceu ser uma boa opção, pois favoreceu a formação de dois cristais pequenos na condição com o inibidor formicina B (dados não mostrados). Isto pode ser devido ao tampão MES ocupar o sítio de ligação do fosfato, como foi observado na estrutura da HGPRT de *Trypanosoma cruzi* com o inibidor formicina B [Focia et al, 1998a].

Dessa forma, para a co-cristalização com inibidores comerciais, muitos parâmetros devem ser refinados, além disso, pode ser utilizada a técnica de semeadura de microcristais (“*seeding*”), com microcristais crescidos na presença de GMP.

Capítulo 5

V – Coleta e processamento dos dados de difração de raios-X

Neste capítulo são abordados os assuntos relacionados à coleta dos dados de difração de raios-X e o processamento destes dados. Inicialmente será introduzida a teoria sobre o uso de raios-X, e posteriormente serão discutidos os resultados obtidos na coleta e no processamento dos dados, bem como os pacotes de programas utilizados para essa etapa.

V.1 – Introdução teórica

V.1.1 – O uso de raios-X

A obtenção da imagem na escala atômica para moléculas de proteínas requer o uso de um comprimento de onda apropriado. O comprimento de uma ligação covalente é da ordem de 1 a 2 Å. Para a resolução da estrutura no nível atômico é necessário utilizar-se comprimentos de ondas não maiores que uma ligação, com unidade em Angstrom (Å), localizados na faixa do espectro dos raios-X.

Os raios-X são ondas eletromagnéticas com ambos os campos elétrico e magnético variando alternadamente, no tempo e no espaço. Quando o comprimento de onda é reduzido, a radiação torna-se mais penetrante, enquanto que comprimentos de onda acima de 2,0 Å são ditos raios-X “soft” (de energia mais baixa). Nessa

magnitude, os raios-X são significativamente absorvidos pelo ar e fortemente pela água. No entanto, se o comprimento de onda for reduzido para $0,2 \text{ \AA}$, eles se tornam muito penetrantes e interagem fracamente com a matéria, necessitando-se de amostras grandes para espalhar uma quantidade de energia observável. A faixa de comprimentos de onda mais utilizada em cristalografia está entre $0,5 \text{ \AA}$ a $1,6 \text{ \AA}$, os quais são suficientemente penetrantes e mais fortemente espalhados pela matéria.

Em um experimento de raios-X, só pode ser medida a intensidade espalhada em cada direção. Dessa forma, não pode ser observada a fase relativa de chegada dos feixes de raios-X difratados nas diferentes direções, impossibilitando assim a reconstrução numérica da imagem do objeto espalhante, no caso, os cristais. Diante dessa característica, conhecida como “o problema das fases”, requer-se a utilização de metodologias experimentais e/ou teóricas para recuperar-se essa informação.

V.1.2 – A geração de raios-X

Os raios-X são usualmente produzidos quando um feixe de elétrons, acelerados por alta voltagem, atinge um metal alvo e é rapidamente desacelerado pela colisão com os átomos do metal, no vácuo. O resultado é a produção de um contínuo espectro de raios-X, chamada de radiação branca, produzido pela desaceleração dos elétrons no alvo metálico. Quando a energia dos elétrons que atingem o metal alvo é superior a um certo valor limiar, um segundo espectro descontínuo e com linhas definidas, sobrepõem a radiação branca. Os elétrons são liberados vindo de um cátodo mantido em potencial elétrico muito menor que o do ânodo, tal que cada elétron é acelerado até atingir energia suficiente para remover elétrons de camada K do metal do ânodo. Os elétrons vindos dos orbitais mais altos (camada L e M) ocupam as posições vazias e a energia liberada neste processo é

emitida como radiação de raio-X, com comprimento de onda específico. O comprimento de onda dos raios-X produzidos depende da composição do metal ânodo: cobre produz um comprimento de onda de aproximadamente 1,54178 Å (CuK α), e molibidênio, de 0,7073 Å (MoK α).

Uma intensa fonte de raios-X pode ser obtida com o feixe de elétrons vindo de um filamento do catodo, que são acelerados no vácuo pela alta voltagem aplicada (–50 kV), e focalizado em uma pequena área do metal, gerando grande quantidade de calor em pequeno volume do material do ânodo. Para evitar a fusão do metal, geralmente o ânodo é um cilindro rotatório, bombardeado em um ponto externo por um feixe de elétrons, e resfriado internamente por circuitos de água.

Desde 1960, os aceleradores tipo síncrotron tornaram disponíveis fontes de raios-X muito mais intensas, com cerca de 10^5 vezes maior que o gerador anodo rotatório. Os síncrotrons são grandes dispositivos por onde os elétrons viajam no vácuo, com órbita forçada por campos magnéticos, onde são mantidos a uma velocidade maior que 99% da velocidade da luz. Nessas condições os elétrons emitem um intenso feixe de raios-X bem como outros tipos de radiação eletromagnética, na direção tangencial. Fontes de radiação síncrotron produzem um espectro contínuo de raios-X, permitindo a seleção dos comprimentos de onda mais adequados para os experimentos desejados.

V.1.3 – A interação dos raios-X com a matéria

A análise da estrutura do cristal é baseada sobre o fenômeno de difração causada pela interação da matéria com raios-X, elétrons ou nêutrons. O espalhamento é causado pela interação dos elétrons com o campo eletrostático dos átomos. Se alguns fótons do feixe incidente são desviados sem a perda de energia, com o mesmo

comprimento de onda do feixe incidente em todas as direções, tem-se o espalhamento Thomson. Alternativamente, os raios-X incidentes também podem transferir momento para os elétrons da amostra, sendo então espalhados com energia menor que a incidente (espalhamento Compton). Quando a energia transferida ao elétron é suficiente para causar transições no átomo que o hospeda, pode produzir o fenômeno da fluorescência. Nos casos em que o átomo permanece em um estado excitado, espécies iônicas criadas no cristal podem provocar a degradação da ordem cristalina, conhecida como danos da radiação. Assim, os danos da radiação são conseqüências de espalhamento incoerente (Compton), enquanto que a determinação da estrutura cristalográfica depende de espalhamento coerente (Thomson).

Dessa forma, a cristalografia de raios-X tem como evento fundamental os espalhamentos de raios-X pelos elétrons da amostra e assim o resultado estrutural final que pode ser obtido é a distribuição da densidade eletrônica no cristal.

O tamanho ideal dos cristais de proteínas é de 0,1 mm a 1,0 mm, sendo que sua capacidade de difração a mais alta resolução depende da ordem cristalina. Quando a fonte de raios-X for suficientemente intensa e adequadamente colimada e focalizada, cristais com dimensões de alguns microns podem ser utilizados. O dano por radiação pode ser minimizado congelando-se os cristais previamente tratados em soluções crioprotetoras.

V.1.4 – Detectores de raios-X

Os detectores de raios-X são dispositivos que têm por função registrar, através de algum fenômeno físico adequado, os feixes de raios-X difratados pelo cristal. O filme fotográfico foi o primeiro detector de raios-X utilizado. Na emulsão fotográfica, um fino cristal de iodeto de prata pode absorver os fótons de raios-X,

liberando energia suficiente para criar uma imperfeição na rede cristalina dos microcristais da emulsão do filme. Esse processo permite que o iodeto de prata seja reduzido à prata, somente nos locais de imperfeição.

Vários tipos de detectores sensíveis à posição têm sido desenvolvidos. Sua denominação decorre da sua capacidade em registrar a posição em que o feixe difratado incide sobre o detector e também a intensidade desse feixe. Em geral, esses detectores permitem o registro digitalizado das imagens de difração. Entre eles está a *placa de imagem*, que armazena a imagem de difração de forma temporária, onde átomos de microcristais da emulsão são levados a um estado excitado de meia-vida muito longa quando absorvem um fóton de raio-X. A placa de imagem pode ser lida pela incidência de um feixe de laser que promove outra transição a um estado ainda de maior energia, porém que decai rapidamente, com emissão fluorescente, que pode ser então lida com o auxílio de uma fotomultiplicadora. As intensidades de fluorescência são monitoradas pela varredura de um feixe de luz na placa, dando uma medida proporcional à energia total de raios-X que chegaram a cada ponto. A placa de imagem é então apagada por iluminação com luz visível sobre toda a superfície da placa, liberando todos os centros residuais fluorescentes.

Outros detectores utilizam tecnologias diferentes para registrar os fótons de raios-X. Um deles é o detector do tipo “multi-wire”, no qual uma malha de fios finos com alto potencial é colocada em uma câmara de gás que se ioniza com a absorção de fótons de raios-X. Os íons formados são registrados como pequenas correntes elétricas nos fios da malha. Os detectores mais modernos são aqueles que utilizam dispositivos semicondutores do tipo “charge-coupled device” (CCD), semelhantes aos utilizados em câmaras de vídeo digitais. O CCD é o detector com maior velocidade de leitura de imagens. Sua limitação tem sido o tamanho que esses

detectores são produzidos comercialmente. Como alternativa, têm-se feitos matrizes de detectores, em configurações tipo 2x2 ou 3x3.

V.1.5 – A técnica de difração de raios-X

O padrão de difração do cristal representa o conjunto das direções, amplitudes e fases das ondas espalhadas. Esse padrão resultante carrega a informação sobre a distribuição dos elétrons do material espalhador, ou seja, sobre a estrutura molecular. A difração de raios-X é devida à repetição periódica de átomos equivalentes, nas três dimensões do retículo cristalino. As direções de difração carregam as informações sobre os períodos da repetição no retículo cristalino.

O padrão de difração pode ser representado por um retículo tridimensional de pontos de difração no espaço recíproco, pesado pelo coeficiente de fator de estrutura (F), de forma que cada ponto do espaço recíproco represente uma onda difratada de amplitude F . A direção da onda difratada é determinada pela posição do ponto recíproco em relação à radiação incidente, na condição de reflexão de Ewald. O retículo recíproco é obtido diretamente da transformada de Fourier da rede direta cristalina. A densidade eletrônica ρ pode ser calculada pela transformada de Fourier inversa do padrão de difração, naturalmente com as fases incluídas. Assim, cada ponto no espaço recíproco está associado a um fator diferente de estrutura complexo $F(\mathbf{h})$, onde $\vec{h} = (h, k, l)$, referidos aos vetores (a^* , b^* , c^*), no retículo recíproco.

Devido a seu caráter repetitivo nas três dimensões do espaço, três vetores independentes (a , b , c) representam os períodos de repetição da função densidade eletrônica e que definem o retículo direto. Esses vetores (a , b , c) definem também a cela unitária. As equações de Laue estabelecem uma proporcionalidade inversa entre

a densidade de pontos do retículo direto e retículo inverso. Celas unitárias grandes correspondem a padrões de difração mais densos, e vice-versa.

Os cristais são compostos por moléculas altamente ordenadas e são construídos de maneira regular, tal que o espalhamento de radiação X por cada molécula interage de forma construtiva com os feixes espalhados pelas moléculas equivalentes na rede, produzindo os feixes difratados nas direções especificadas pela rede recíproca. Esse arranjo forma uma estrutura tridimensional estendida, obedecendo à simetria do grupo espacial correspondente a cada forma cristalina. Um cristal e o correspondente retículo recíproco possuem vários tipos de simetria. As translações rígidas definidas pelos vetores da rede cristalina constituem um conjunto de operações de simetria. Os tipos de operações de simetria tridimensionais são de rotação (ao longo de um eixo, seguida ou não de translação paralela ao eixo de rotação), reflexão (rotação ao longo de um eixo pela reflexão em relação a um plano normal) e inversão (rotação ao longo de um eixo seguida pela inversão através de um ponto do eixo). No caso dos cristais de proteínas, constituídos por moléculas de quiralidade definida (somente L-aminoácidos), não é possível haver elementos de simetria de reflexão e inversão. A combinação de eixos próprios e impróprios intersectando em um ponto são chamados de grupos pontuais. O conjunto de cristais que tendo o mesmo grupo pontual é chamado de classe cristalina. Os grupos pontuais são agrupados em 11 classes, denominadas classe de Laue. O grupo espacial cristalográfico é um conjunto de operações de simetria geométricas tomadas em um objeto periódico tridimensional dentro de si mesmo, dito um cristal. A existência de operações de simetria faz com que uma fração da cela unitária, a unidade assimétrica, seja suficiente para gerar a estrutura cristalina inteira, através das operações de simetria do grupo espacial sobre a unidade assimétrica.

Os arranjos das moléculas no cristal podem possuir, por si próprios, elementos de simetria local que não são elementos de simetria do cristal. Esse tipo de simetria é chamada de simetria não cristalográfica.

As componentes rotacionais das operações de simetria implicam em restrições nos valores dos parâmetros da rede cristalina, como o comprimento dos eixos a , b , c da cela unitária e os ângulos α , β , γ entre eles. São definidos 14 tipos de celas unitárias (retículos de Bravais), agrupados em 7 sistemas cristalinos [Giacovazzo et al, 1995].

O padrão de difração apresenta uma simetria maior que a classe cristalina correspondente, quando não há espalhamento anômalo. Nessa condição, os módulos dos fatores de estrutura F_h e F_{-h} se igualam (lei de Friedel) e o padrão de difração resulta ser centrossimétrico. Assim estas intensidades parecem estar relacionadas por um centro de simetria, embora imperfeito, e é dito que a difração por si mesma introduz um centro de simetria.

As translações do grupo espacial definem os espaçamentos entre os pontos recíprocos, segundo as equações de Laue. Outras componentes translacionais do grupo espacial apresentam-se no padrão de difração, como extinções sistemáticas ($F = 0$) em posições regularmente distribuídas ao longo de certos eixos ou planos de pontos recíprocos.

Na simetria cristalográfica, pode ser definida uma unidade assimétrica do cristal. A presença de elementos de simetria no padrão de difração faz com que a coleta de dados de difração seja limitada a uma determinada faixa de ângulo do retículo recíproco, para a obtenção de um conjunto completo de fatores de estrutura.

V.2 – Coleta dos dados de difração de raios-X vindos do cristal da HGPRT de *Leishmania tarentolae*

Os dados de difração foram coletados com o uso da técnica de crioproteção [Garman e Schneider, 1997], em que o cristal é resfriado até 100K pelo fluxo de vapor de nitrogênio. Essa técnica aumenta a longevidade do cristal no feixe de raios-X, pelo fato de retardar a degradação fotoquímica do material protéico, e conseqüentemente, reduzindo a perda da ordem cristalina. Além disso, a manipulação, montagem, conservação e transporte do cristal são mais vantajosos quando comparados a experimentos em temperatura ambiente, com capilares de vidro.

A imagem de difração de raios-X dos cristais conseguidos em condição crioprotetora, curiosamente, apresentava claramente o anel de gelo entre 3,8 Å e 2,25 Å. Dessa forma, foram refeitas as condições de cristalização com a adição de 15% de etilenoglicol. Alguns testes com até 10% de etilenoglicol ainda congelavam.

Os cristais eram pescados da solução de cristalização onde cresceram, com o uso de uma pequena alça de fibra de plástico (*loop*), ficando o cristal envolto pela solução de cristalização. O cristal era transferido para a solução crioprotetora por aproximadamente 20 segundos para a penetração do etilenoglicol nos canais de solvente e, posteriormente, montado na cabeça goniométrica do difratômetro RU200B (Rigaku-Rotaflex), onde era resfriado até 100K pelo fluxo de vapor de nitrogênio líquido, com cerca de 5 litros por minuto. A imagem de difração era coletada pelo detector de placa de imagem quadrada R-AXIS IIC, com área de detecção de 200 mm x 200 mm e o tamanho dos *pixels* de 105 µm x 105 µm. O tempo de coleta era por volta de 40 minutos e a distância do cristal até a placa de 140

mm. Os melhores cristais que apresentaram padrão de difração satisfatório foram armazenados em nitrogênio líquido, para coleta do conjunto de dados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

A coleta monocromática dos dados de difração de raios-X foi realizada na linha de luz CPr do LNLS em Campinas, com o comprimento de onda (λ) de 1,537 Å. Os cristais congelados em nitrogênio líquido foram montados na cabeça goniométrica da linha de luz. As imagens de difração foram coletadas numa placa de imagem MAR345 (MarResearch), com diâmetro de 345 mm, o tamanho dos *pixels* de 150 μm x 150 μm , rotacionando o cristal em 1° por imagem, sendo a distância do cristal até placa de 155 mm e o tempo de coleta de 5 minutos. Apenas dois cristais difrataram com boa resolução, um a 2,3 Å e o outro a 2,5 Å. A maioria dos cristais difratavam acima de 3,0 Å. A partir de uma imagem de difração de raios-X (Figura 21), os possíveis parâmetros da cela unitária (a , b , c , α , β e γ) e do grupo espacial eram determinados, e posteriormente, traçada uma estratégia de coleta com o programa MARSTRATEGY 2.0.

Figura 21 – Imagem de difração de raios-X do cristal da HGPRT de *L. tarentolae*, coletada no LNLS, com resolução de 2,3Å.

Para o cristal de mais alta resolução (2,3 Å) foram coletados dois conjuntos de dados, sendo que, para o segundo conjunto, o cristal foi colocado na mesma orientação daquela do término da primeira coleta. No primeiro conjunto foram coletadas 75 imagens, sendo que a estratégia seria coletar de 135° a 180°, porém foram coletados até 210°, dando uma completeza de 94,2% e inicialmente utilizados os dados até 2,3 Å. A segunda coleta iniciou novamente em 180° e terminou em 242°, totalizando 62 imagens. Nessa coleta a distância entre o cristal e a placa foi de 175 mm, a completeza foi de 68,5%, utilizando-se os dados até 2,15 Å de resolução. Decidiu-se encerrar a segunda coleta, pois a completeza estava sendo muito pouco alterada e entre os dois conjuntos de dados era observada uma pequena relação sinal/ruído.

V.3 – Processamento dos dados de difração de raios-X vindos do cristal da HGPRT de *Leishmania tarentolae*

As imagens bidimensionais coletadas num experimento de difração de raios-X devem ser analisadas e processadas, a fim de se obter os valores dos parâmetros do retículo cristalino, um conjunto não redundante dos módulos de fatores de estruturas indexados $\{|F_h|\}$, e as estimativas de seus erros $\{\sigma(|F_h|)\}$. Esse processo é chamado de redução dos dados [Bricogne, 1987]. A redução dos dados envolve: a determinação preliminar da cela unitária e da orientação do cristal; a indexação das reflexões e o refinamento dos parâmetros do cristal e do detector; a integração das intensidades das reflexões; redução à mesma escala relativa das intensidades nas diferentes imagens; refinamento dos parâmetros cristalinos usando-se o conjunto completo dos dados (pós-refinamento); fusão dos dados (*merging*) que é a adição das intensidades parciais e promediação dos dados com múltiplas medidas ou

equivalentes por simetria, e obtenção de um conjunto não redundante de intensidades $\{I_h\}$ e seus erros $\{\sigma(I_h)\}$; e transformação das intensidades e seus erros em módulos de fatores de estrutura $|F_h|$ e $\sigma(|F_h|)$.

Os passos importantes no processamento são a integração das intensidades difratadas e posteriormente o cálculo da média entre reflexões equivalentes, que vai fornecer R_{sym} ou R_{merge} , valor que mostra a qualidade do padrão de difração do cristal. R_{sym} corresponde ao erro médio da medida de uma intensidade, comparada à intensidade média, e calculada sobre um grupo de reflexões escolhidas. Enquanto que R_{merge} pode ser calculado incluindo-se todas as medidas de quaisquer padrões relacionados por simetria, esse cálculo é feito durante a fusão dos dados, vindo de todas as medidas de intensidades. Valores baixos de R_{sym} ou R_{merge} , como 0,05 (5%), evidenciam cristais e dados confiáveis quando o número de reflexões coletadas encontra-se em torno de quatro vezes o de reflexões únicas.

O pacote de programas HKL é utilizado para a análise dos dados de difração de raios-X coletados, vindo de um cristal. Ele consiste de 3 partes: o XdisplayF para a visualização do padrão de difração; o DENZO para a redução e integração dos dados e o SCALEPACK para a fusão e escalonamento das intensidades parciais obtidas pelo DENZO ou outros programas.

A indexação e a integração dos pontos de difração em cada imagem foram conduzidas no sistema cristalino ortorrômbico, através do programa DENZO [Otwinowski e Minor, 1997], produzindo um conjunto de intensidades integradas de 106.174 e 113.099 para o primeiro e segundo conjuntos de dados, respectivamente. A promediação entre as reflexões com múltiplas medidas ou equivalentes por simetria, dos dois conjuntos de dados, foi feita com o programa SCALEPACK [Otwinowski e Minor, 1997], utilizando-se o cenário para dois conjuntos de dados de

um mesmo cristal, disponível no programa. Isso gerou um conjunto de dados de 320.057 reflexões, sendo 18.895 não redundantes, com um fator de discrepância médio (R_{merge}) de 8,1% e de 25% na última camada (2,35 Å a 2,30 Å). A completeza média dos dados foi de 94,5%, e na última camada de 96,9%, com 78,94% das reflexões tendo $I/\sigma(I) > 3$ e a redundância média de 5,67%.

As intensidades foram ajustadas em escala absoluta, e transformadas em fatores de estrutura pelo programa TRUNCATE [French e Wilson, 1978] utilizando o método de Wilson [Wilson, 1949], onde este programa calcula as amplitudes dos fatores de estruturas vindo das intensidades e gera as estatísticas dessas intensidades.

Os fatores de estrutura experimentais foram utilizados para encontrar as fases das reflexões cristalográficas [Giacovazzo et al, 1995] necessárias para a resolução da estrutura, pelo método de substituição molecular com o pacote de programas AMoRe [Navaza, 1994]. Esse pacote de programas é utilizado para a resolução da estrutura cristalográfica de uma proteína desconhecida, utilizando-se como modelo uma proteína homóloga cuja estrutura já foi resolvida. Após iniciado o refinamento, e no estágio onde os fatores R_{work} e R_{free} se encontravam em 25% e 27%, foram realizadas novas indexação e integração dos dois conjuntos de dados. Nessa etapa os dados de difração foram estendidos desde 48,2 Å até 2,1 Å de resolução, e novamente escalonados.

Os parâmetros da cela unitária do cristal foram determinados durante o processamento dos dados de difração como sendo $a = 58,104$ Å, $b = 85,443$ Å, $c = 87,598$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ e o cristal como sendo da classe primitivo ortorrômbico.

A análise das extinções sistemáticas no conjunto de reflexões (tabela 4) demonstrou a existência de um eixo de ordem 2₁, porém o conjunto de dados coletados foi insuficiente para determinar-se se o grupo espacial era P2₁2₁2₁ ou

P2₁2₁2 ou P222₁, sendo eliminado o grupo P222. Para saber-se qual era o grupo espacial, foi rodado o programa AMoRe com as três possibilidades e analisadas as saídas, no diretório, sendo escolhido o grupo espacial P2₁2₁2₁ (capítulo 6).

O grupo espacial P2₁2₁2₁ é caracterizado pela presença de três eixos helicoidais de ordem 2, perpendiculares entre si, paralelos aos eixos da cela unitária, e não secantes. A simetria cristalina gera, por cada ponto na cela unitária, mais três posições equivalentes dentro da mesma cela.

Tabela 4 – Lista das extinções sistemáticas fornecidas pelo programa SCALEPACK

Intensities of systematic absences					
h	k	l	Intensity	Sigma	I/Sigma
0	0	5	3.9	86.3	0.0
0	0	7	52.0	55.3	0.9
0	0	9	26.1	72.7	0.4
0	0	11	-123.1	86.6	-1.4
0	0	13	34.8	101.3	0.3
0	0	15	-109.8	120.6	-0.9
0	0	17	-30.9	156.8	-0.2
0	0	19	-84.7	157.8	-0.5
0	0	21	-281.4	239.6	-1.2
0	0	23	612.5	298.1	2.1
0	0	25	317.0	364.5	0.9
0	0	27	431.7	507.1	0.9
0	0	29	37.4	473.7	0.1
0	0	31	-92.9	366.9	-0.3
0	0	33	301.2	352.9	0.9
0	0	35	208.6	369.9	0.6
0	0	37	115.2	329.5	0.3
0	15	0	221.3	66.8	3.3

Através do cálculo do coeficiente de Matthews [Matthews, 1968], foi verificado que o cristal apresenta 2 monômeros por unidade assimétrica, com 46,62% de solvente e com o coeficiente de Mathews de 2,32 Å³Da⁻¹ (tabela 5). Esses resultados são coerentes com aqueles encontrados para cristais de proteínas, sendo de 30% a 75% de solvente e o coeficiente de Mathews próximo ao valor de 2,7 Å³.Da⁻¹. Para o programa calcular o coeficiente de Matthews e o número de moléculas na unidade assimétrica, ele necessita dos parâmetros da cela unitária e da massa

molecular da molécula em questão. Pelo fato de serem encontrados 2 monômeros na unidade assimétrica e pertencerem ao grupo $P2_12_12_1$, há oito monômeros (ou quatro dímeros) por cela unitária. Além disso, existe a presença de simetria não cristalográfica (simetria local) de ordem 2 na unidade assimétrica, o que justifica o uso da simetria não cristalográfica no refinamento automático.

Tabela 5 – Resultado do método de Matthews, utilizado para encontrar o número de monômeros por unidade assimétrica e a porcentagem de solvente

NMOL	SOLV(%)	MATTHEWS COEFF(MC)
1	73.31	4.64
2	46.62	2.32
3	19.92	1.55

A enzima HGPRT de *Leishmania tarentolae* comporta-se como um dímero em solução (capítulo 3) e foi cristalizada com um dímero na unidade assimétrica.

A estatística do processamento do conjunto de dados coletados está resumida na tabela 6, tanto para os dados integrados e promediados a 2,3 Å, como para aqueles estendidos até 2,1 Å, mostrando um conjunto de dados coletados satisfatórios para resolução da estrutura.

Tabela 6 – Tabela das estatísticas dos processamentos dos dados de difração de raios-X.

Medida dos dados	Primeiro processamento	Segundo processamento
grupo espacial	$P2_12_12_1$	
a (Å)	58,1	
b (Å)	85,4	
c (Å)	87,6	
faixa de resolução	20 – 2,3	100 – 2,1
completeza	94,5 (96,9)	94,9 (96,8)
R_{merge}	0,081 (0,250)	0,093 (0,414)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	17,8 (5,3)	15,6 (3,8)
reflexões únicas	20052	26147
redundância	5,6	5,7

Entre parênteses estão os valores da última camada. Nos dados do segundo processamento é observado alto valor de R_{merge} , porém a relação sinal/ruído é de 3,8, na última camada, sendo dados ainda confiáveis.

Capítulo 6

VI - Resolução e refinamento da estrutura cristalográfica da HGPRT de *Leishmania tarentolae*

Nesse capítulo será descrita a resolução da estrutura cristalográfica da HGPRT de *Leishmania tarentolae*, bem como o refinamento dessa estrutura e sua validação. Serão descritos as metodologias e programas utilizados, e apresentada à discussão dos resultados obtidos. As imagens de difração de raios-X, provenientes da coleta do cristal de proteína, apenas fornecem as intensidades de cada reflexão, que podem ser convertidas nos fatores de estrutura. No entanto, as fases dos pontos difratados devem ser encontradas para obtenção da densidade eletrônica. Dessa forma, métodos indiretos são utilizados para encontrar as fases, tais como o uso de dispersão anômalo vindo de átomos pesados, ou utilização das fases vindas de estruturas homólogas, já resolvidas. Vários métodos utilizando dispersão anômala são encontrados na literatura, como o método de substituição isomórfica múltipla (MIR), o de dispersão anômala múltipla (MAD), substituição isomórfica simples (SIR) e substituição isomórfica simples com espalhamento anômalo (SIRAS). Contudo, com o grande aumento das estruturas depositadas no banco de dados de proteínas (PDB), cada vez mais tem sido utilizado o método de substituição molecular.

VI.1. – Introdução teórica

A determinação dos módulos dos fatores de estrutura, mediante a coleta e redução dos dados de difração de um cristal, não é suficiente para determinar a estrutura cristalográfica pela transformada de Fourier, pois é necessário o conhecimento das fases dos fatores de estrutura.

O método de substituição molecular é baseado nas propriedades da função de Patterson. A função de Patterson ($P(u)$) é definida como a convolução da densidade eletrônica do cristal ($\rho(r)$) com sua transformada centrossimétrica ($\rho(-r)$). A função de Patterson, ao contrário da densidade eletrônica, pode ser calculada utilizando os dados de difração reduzidos, uma vez que é a transformada de Fourier dos módulos quadrados dos fatores de estrutura.

Da utilidade da função de Patterson deriva a propriedade de apresentar picos em cada ponto u correspondente a um vetor de distância entre dois átomos da estrutura cristalina, com intensidade integrada proporcional ao produto dos números atômicos dos dois átomos correspondentes. Dessa forma, a estrutura cristalina encontra-se “embutida” na função de Patterson. O elevado número de vetores interatômicos presentes nas moléculas, e a maior largura dos picos de Patterson com respeito aos picos atômicos na função de densidade eletrônica, fazem com que o mapa de Patterson não seja diretamente interpretável para a determinação de estruturas de proteínas.

O mapa de Patterson apresenta uma periodicidade igual à correspondente densidade eletrônica. O grupo espacial do mapa de Patterson contém todos os elementos de simetria do grupo espacial do respectivo cristal, porém privados de suas componentes translacionais, que não sejam as translações do retículo cristalino, e

transladados sobre os pontos desse retículo. O mapa de Patterson sempre apresenta um centro de simetria.

No método de substituição molecular é necessário o cálculo dos fatores de estrutura teóricos $F_c(h)$ de modelos de estruturas cristalográficas, e sua comparação com os fatores de estruturas observados experimentalmente $F_o(h)$. Dada a posição de cada átomo na cela unitária de uma estrutura cristalina teórica, os fatores de estrutura correspondentes podem ser calculados.

VI.2. - O método de substituição molecular

A substituição molecular é empregada quando a proteína em estudo tem uma proteína homóloga com estrutura tridimensional já conhecida. Proteínas homólogas geralmente apresentam estruturas tridimensionais bastante similares. O método de substituição molecular inclui três etapas distintas:

- A determinação da orientação relativa (rotação) da estrutura não conhecida, no mesmo cristal ou em diferentes cristais da proteína homóloga, sendo essa etapa conhecida como função de rotação;
- A determinação da posição da estrutura conhecida no sistema cristalino da estrutura a ser determinada, sendo essa etapa a função de translação;
- A determinação das fases usando o conhecimento das operações não cristalográficas, obtidas nas funções de rotação e translação.

A função de rotação consiste em encontrar a orientação de uma estrutura molecular conhecida em uma cela unitária do cristal de interesse, que apresente o melhor acordo possível entre os dados de difração calculados pelo modelo e os dados de difração observados. Dessa forma, a molécula conhecida é usada para procurar um padrão similar na cela unitária não conhecida. Na função de rotação (R), a função

de Patterson para proteína estruturalmente conhecida é fixada, enquanto que a função de Patterson para proteína desconhecida é rotacionada. Esta função R vai apresentar um valor máximo quando os dois conjuntos de vetores tiverem a mesma orientação.

Uma vez determinada a orientação, pode-se posicionar a molécula no espaço, relativa aos elementos de simetria cristalográficos, ou seja, tendo a orientação da molécula com um modelo conhecido, é necessário definir sua posição na cela, relativa à origem selecionada, que é determinada pela função de translação.

O passo final consiste na função de translação, utilizando a orientação que produziu o melhor coeficiente de correlação na função de rotação.

VI.3 - Resolução da estrutura da HGPRT de *Leishmania tarentolae*

A resolução da estrutura da enzima HGPRT de *Leishmania tarentolae* foi realizada pelo método de substituição molecular. Como modelo foi utilizada a proteína homóloga HGPRT de *Trypanosoma cruzi*, com o código PDB 1TC1(PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/>) e resolvida a 1,4 Å [Focia et al, 1998a]. Ambas as proteínas foram cristalizadas como um dímero na unidade assimétrica e possuem cerca de 49% de identidade.

A solução da estrutura foi obtida com o uso do pacote de programas AMoRe [Navaza, 1994], sendo utilizados os dados de difração de 20 a 2,3 Å de resolução, e tendo sido obtidos coeficiente de correlação de 57% e fator R de 43,5% (Tabela 7). O programa AMoRe também foi utilizado para definir o grupo espacial, uma vez que não foi possível defini-lo pela tabela de extinção sistemática (Capítulo 5). Para isso, esse programa foi rodado com as três possibilidades e após a análise da saída no diretório, escolheu-se o grupo espacial $P2_12_12_1$. Para esse grupo, encontrou-se maior correlação (57%) e o menor R-factor (43,5%), em relação aos demais grupos

espaciais (Tabela 7). Além disso, quando as imagens de difração eram integradas utilizando-se os outros grupos, os valores de R_{merge} eram sempre maiores (valores não mostrados).

O empacotamento do modelo inicial mostrava claramente no mapa de densidade eletrônica, o conflito do *loop* flexível com as moléculas vizinhas.

Tabela 7 – Saída do AMoRe para os diferentes grupos espaciais com as respectivas correlações e fatores R, bem como as diferentes soluções.

Grupo espacial $P2_12_12_1$

```
mr2ic:  **HGPRT**
rotation and translation to be applied to the input coordinates
to be used with nort = 1
xout(mod) = rotation * xin(mod) + translation

solution with 1 fragments:  ++++++

                0.51109  0.85427 -0.09493                29.85
xout(mod=11) =  0.17144 -0.20955 -0.96265 * xin(mod=11) +  36.32
                -0.84226  0.47572 -0.25356                36.58

c-factor = 57.0          ,    r-factor = 43.5

#11  264.4  104.7   29.5   29.9   36.3   36.6
```

Grupo espacial $P2_12_12$

```
mr2ic:  **HGPRT**
rotation and translation to be applied to the input coordinates
to be used with nort = 1
xout(mod) = rotation * xin(mod) + translation

solution with 1 fragments:  ++++++

                -0.13005  0.97006 -0.20510                19.90
xout(mod=11) =  0.06924 -0.19746 -0.97786 * xin(mod=11) +  44.52
                -0.98909 -0.14138 -0.04149                 9.10

c-factor = 46.3          ,    r-factor = 47.7

#11  258.2   92.4  351.9   19.9   44.5    9.1
```

Grupo espacial $P222_1$

```
mr2ic:  **HGPRT**
rotation and translation to be applied to the input coordinates
to be used with nort = 1
xout(mod) = rotation * xin(mod) + translation

solution with 1 fragments:  ++++++

                -0.12483  0.97194 -0.19940                19.60
xout(mod=11) =  0.06858 -0.19204 -0.97899 * xin(mod=11) +  68.38
                -0.98981 -0.13588 -0.04268                 9.84

c-factor = 46.5          ,    r-factor = 47.8
```

```
#11  258.5   92.4  352.2   19.6   68.4    9.8
```

VI.4 – Refinamento da estrutura da HGPRT de *Leishmania tarentolae*

No modelo inicial vindo da substituição molecular, foi realizado um refinamento de corpo rígido com uso do pacote de programas CNS [Brünger, 1998], no entanto esse refinamento não alterou os valores finais dos fatores R_{factor} e R_{free} , que se encontravam em 47,1 e 47,5%, respectivamente. Dessa forma, o modelo inicial foi utilizado no refinamento automático, acrescido do refinamento de anelamento torsional simulado [Rice e Brünger, 1994], pelo mesmo pacote CNS [Brünger, 1998]. Nesse refinamento foram obtidos os valores dos fatores R_{factor} e R_{free} de 34,8 e 42%, respectivamente, utilizando dados de difração de raios-X de 20 a 2,3 Å.

O modelo gerado foi manipulado na estação gráfica, com o uso do programa O [Jones et al, 1991], no qual os aminoácidos diferentes vindos do alinhamento da sequência das duas proteínas (estrutura conhecida e desconhecida), tiveram suas cadeias laterais trocadas por alanina, e os ligantes excluídos do modelo. Esse modelo foi novamente submetido a refinamento de anelamento torsional simulado [Rice e Brünger, 1994]. Esse método permite movimentos relativamente grandes do modelo quando é simulado um aumento grande de temperatura, permitindo que o modelo supere eventuais mínimos locais da função de minimização. O vínculo das ligações atômicas é mantido, assim no processo de resfriamento, o modelo pode passar para um mínimo de energia global da função de minimização.

O uso do anelamento torsional simulado reduz o número de parâmetros a ser refinado, reduzindo, desse modo, o grau de “*overfitting*” dos dados. O refinamento de minimização de energia é realizado antes e depois do anelamento. Foi utilizada temperatura de 5000 K e posteriormente de 0 K, diminuição esta realizada em intervalos de 25K.

A partir desse momento, o refinamento automático foi feito no pacote CNS, com imposição de simetria não cristalográfica e uso do dicionário dos parâmetros de estéreo-química para proteínas [Engh e Huber, 1991]. O refinamento do modelo era feito em várias etapas, alternando-se ciclos de refinamento automático e a manipulação da estrutura na estação gráfica, com o uso do programa O [Jones et al, 1991].

O refinamento automático foi conduzido utilizando uma função de minimização tipo máxima verossimilhança [Murshudov et al, 1997], incluindo restrições cristalográficas e estéreo-químicas. As restrições cristalográficas direcionaram o refinamento de forma a obter-se o mínimo desvio entre os fatores de estrutura calculados com base no modelo (F_c) e os fatores de estrutura experimentais (F_o). A função de minimização foi introduzida junto às restrições cristalográficas e estéreo-químicas para obtenção de uma relação restrições/parâmetros. A relação deve ser superior a 10, devido à existência de um grande número de átomos em macromoléculas e ao fato dos dados de difração geralmente não serem à alta resolução. As restrições estéreo-químicas limitam os desvios excessivos dos valores ideais, das distâncias de ligação, ângulo de ligação, ângulos torsionais, planaridade de ligações múltiplas conjugadas e contatos entre átomos. À medida que o mapa de densidade eletrônica melhorava, os resíduos substituídos por alanina eram trocados pelos resíduos da enzima HGPR de *Leishmania tarentolae*.

O refinamento automático foi conduzido pelo pacote CNS até que os valores de R_{factor} e R_{free} ficaram próximos a 25 e 27%, respectivamente. A partir deste momento, foram introduzidos refinamento automático REFMAC [Murshudov et al, 1997] e refinamento TLS [Schomaker e Trueblood, 1998]. Nessa etapa de refinamento, os dados de difração de raios-X foram estendidos de 48,2 até 2,1 Å de

resolução. O uso do refinamento TLS e dos dados de difração até 2,1 Å, apresentaram melhoras significativas no mapa de densidade eletrônica.

No pacote REFMAC, o refinamento automático minimiza os parâmetros de coordenadas, utilizando como função de minimização o critério de “*Maximum Likelihood*” (máxima verossimilhança). Nesse programa é possível introduzir-se parâmetros de TLS, ação impossível no programa CNS. O refinamento TLS é um método que inclui o deslocamento anisotrópico, possibilitando a medida do deslocamento quadrático médio de corpo rígido, podendo ser de grupos de átomos ou da proteína total. O fator U anisotrópico é derivado de cada átomo em um grupo TLS. Os fatores U estão correlacionados pelo fato de pertencerem a um mesmo corpo rígido. Para cada grupo TLS são requeridos 20 parâmetros de refinamento. Os fatores térmicos B são refinados em adição aos parâmetros TLS.

A manipulação do modelo na estação gráfica foi realizada pela análise das diferenças observadas e calculadas dos mapas de Fourier, para reduzir o tendenciamento dos erros contidos no modelo [Read, 1986]. Para os mapas de Fourier foram utilizados os coeficientes $3mF_o - 2DF_c$ derivados do σ_A , no refinamento o CNS, e $2mF_o - DF_c$ quando utilizado o REFMAC. O mapa de omissão [Hodel et al, 1992] foi usado para reconstrução de regiões pouco claras nos mapas, nos trechos onde o modelo foi reconstruído, e onde foram encontrados resíduos em conformações incomuns.

Na reconstrução de trechos da cadeia principal, foi utilizado o programa O [Jones et al, 1991], baseado em banco de dados de estrutura de proteínas resolvidas à alta resolução. As modificações das cadeias laterais foram realizadas por escolha dentro do banco de dados de rotâmeros [Lovell et al, 2000].

As restrições de simetria não cristalográfica foram utilizadas, com um terço da máxima restrição pelo programa CNS e gradualmente retiradas no programa REFMAC a medida em que os valores de R_{factor} e R_{free} foram diminuindo. Essa etapa foi realizada dando maior liberdade primeiramente para as cadeias laterais, e posteriormente para cadeia principal.

Após cada passo de refinamento automático do REFMAC era realizada uma avaliação do modelo pelo programa WHAT IF [Hooft et al, 1996], e seus resultados utilizados pelo programa OOPS2 [Kleywegt, 2000], gerando assim uma avaliação de cada resíduo, ligante e moléculas de água. Esse procedimento era realizado para uma melhor orientação das modificações a serem feitas no modelo, utilizando o programa O.

Moléculas de água foram introduzidas gradualmente de maneira automática no modelo pelo programa ARP/wARP [Lamzin e Wilson, 1993], com entrada de no máximo 20 moléculas de água por ciclo. A busca de águas foi realizada procurando picos acima de 3σ no mapa mF_o-DF_c , em posições possíveis de pelo menos uma ponte de hidrogênio entre a molécula de água e a proteína, ou outras águas.

Os fatores de discordância, R_{factor} e R_{free} com 5% dos dados, entre os fatores de estruturas teóricos e experimentais [Kleywegt e Brünger, 1996], e vários índices de qualidade do modelo [Hooft et al, 1996], foram monitorados durante o refinamento. Os valores de R_{factor} e R_{free} no início do refinamento eram de 47,12% e 47,48% e no final de 17,34 e 21,53%, respectivamente.

No modelo final utilizou-se o programa TLSANL [Howlin et al, 1993], pois tal ferramenta recalcula os valores do fator de temperatura B isotrópico, sem a adição dos parâmetros TLS e cria os seis parâmetros de anisotropia, separadamente no arquivo tipo *pdb* de saída. Essa saída foi utilizada pelo programa BAVEAGE ⁴⁶

para a geração dos fatores de temperatura B da cadeia principal, cadeias laterais, fator global para proteína, para o ligante e para as moléculas de água.

VI.5 – Avaliação da qualidade do modelo refinado

A avaliação da qualidade do modelo refinado foi realizada utilizando-se métodos implementados nos programas PROCHECK [Laskowski et al, 1993], WHATIF e OOPS2, sendo realizada validação cruzada.

A estrutura cristalográfica no final do refinamento da HGPRT de *Leishmania tarentolae* é constituída por dois monômeros (cadeias A e B), duas moléculas de GMP e 243 moléculas de água, na unidade assimétrica. O modelo não inclui os átomos de hidrogênio.

Cada monômero da proteína é constituído por 210 resíduos. No entanto vários deles não apresentaram densidade eletrônica interpretável: os primeiros 19 resíduos da região N-terminal das duas cadeias (A e B), os resíduos de 95 até 107 da cadeia A e os resíduos de 94 até 105 da cadeia B (ambos pertencentes ao *loop* flexível), e ainda os 8 últimos resíduos da região C-terminal das duas cadeias. Com isso, dos 420 resíduos esperados da proteína na unidade assimétrica, 79 não são encontrados no modelo, cerca de 18%.

A maior parte dos outros 82% dos resíduos encaixam-se muito bem no mapa de Fourier-diferença $2mF_o - DF_c$ (Figura 22), porém um total de 73 átomos de 19 cadeias laterais não puderam ser localizados no mapa de densidade eletrônica, sendo estes átomos de diversas regiões, como da região do *loop* flexível, da região dos últimos resíduos pertencentes a região C-terminal, outros da região N-terminal e outros das regiões superficiais da proteína.

Figura 22 - Mapa de Fourier-diferença $2mF_o - DF_c$ com o nível de contorno 1σ , da região do sítio ativo. Neste mapa pode ser visualizado que os resíduos do sítio ativo que participam da ligação com o GMP, bem como esse ligante, encaixam-se muito bem no mapa.

O modelo apresenta três cadeias laterais em dupla conformação, sendo encontradas nos resíduos Glu31 e Lys162 da cadeia A, e no resíduo Asp56 da cadeia B. (Figura 23).

Figura 23 – Duplas conformações observadas para os resíduos Glu31 e Lys162 da cadeia A e o resíduo Asp56 da cadeia B.

O ligante GMP da cadeia A apresenta-se em dupla conformação. Das seis possíveis conformações que a molécula de GMP pode adotar, quatro podiam ser utilizadas no mapa de densidade eletrônica, sendo elas com o carbono da ribose C2' -

endo, o C2'-exo, o C3'-endo e o C3'-exo. *Endo* refere-se ao mesmo lado do plano do anel da ribose, em relação ao carbono C5', e *exo* refere-se ao lado oposto ao carbono C5' nesse plano. As conformações escolhidas foram a com o carbono C3'-endo, como ocorre na cadeia B, com do carbono C2'-endo que apresentava R_{free} ligeiramente menor comparado às outras duas conformações restantes (Figura 24).

Figura 24 – Dupla conformação do ligante GMP, sendo C3'-endo e C2'-endo

O *loop* flexível envolvido na abertura e fechamento da estrutura para reação enzimática, inicia no aminoácido 92 e termina no 118 na cadeia A. Na cadeia B, os resíduos de 106 a 115 estão na conformação de α -hélice, porém com qualidade não muito boa, com existência de alguns picos no mapa de diferença de Fourier $mF_o - DF_c$, explicados pelo modelo (Figura 25). As cadeias laterais dos resíduos 106, 107, 108 e 111 não estão bem definidas, assim como a cadeia principal dos três primeiros resíduos (Figura 26). Contudo, a cadeia principal é observada, e a estereo-química dessa cadeia não apresenta valores incomuns para os ângulos ϕ e ψ e empacotamento atômico (contatos atômicos). Apesar da retirada de aproximadamente metade dos resíduos (13 da cadeia A e 12 da cadeia B) que constituem este grande *loop* flexível,

os resíduos que permaneceram no modelo foram modelados com muita dificuldade em ambas cadeias, sendo melhores definidos com a eliminação da simetria não cristalográfica.

Figura 25 – Hélice- α na região do *loop* flexível. Pode ser visualizada a existência de alguns picos no mapa de diferença de Fourier $mF_o - DF_c$, com o nível de contorno de $2,5\sigma$ os quais não são explicados pelo modelo

Figura 26 - Cadeias laterais e cadeia principal dos resíduos 106, 107 e 108. Essas cadeias não estão bem definidas no mapa de densidade eletrônica $2mF_o - DF_c$, com nível de contorno de 1σ . O resíduo 111 não é mostrado na Figura.

Na região de dimerização, os resíduos Trp34, Asp74, Arg77, Phe78 e Arg194 das duas cadeias formam dois bolsões, que em seu interior apresentam densidades

eletrônicas que foram modeladas com moléculas de água, porém a presença dessas densidades parece ser proveniente de outro composto desconhecido não usado na cristalização, ou essas moléculas de água podem estar desordenadas (Figura 27). Outras regiões de contato no empacotamento cristalino das moléculas de proteína apresentam alguns picos no mapa de Fourier-diferença $mF_o - DF_c$, que não são explicados pelo modelo.

Figura 27 – Dois bolsões de água encontrados na interface do dímero com três moléculas de água no interior deles

Os valores de temperatura B são altos para os resíduos da região N-terminal, C-terminal e do *loop* flexível, acompanhados por altos valores de R_{real} [Jones et al, 1991]. Esse valor mede o desvio entre a densidade eletrônica teórica e a densidade eletrônica experimental (Figura 28), sendo utilizado o mapa $2mF_o - DF_c$. Na cadeia A pode ser observado maior número de resíduos (46) com valores de fator R_{real} não usual, quando comparados aos da cadeia B (23). Além das regiões problemáticas citadas acima, a região compreendendo os resíduos de 49 a 58, 136 a 150 e de 160 a 166, apresentavam valores de fator R_{real} acima do usual para a cadeia A e não para cadeia B. O ligante GMP apresenta um valor do fator R_{real} de 0,225 na cadeia A e de

0,097 para a cadeia B. De modo geral, o fator R_{real} mostra uma desordem maior da cadeia A em relação à cadeia B. De um total de 243 moléculas de água 80 apresentam um fator R_{real} acima de 0,25.

Figura 28 – Gráfico do fator R_{real} para os resíduos das cadeias A e B. O fator R_{real} mede o desvio entre a densidade eletrônica teórica e a densidade eletrônica experimental, com o uso de mapa de diferença de Fourier $2mF_o - DF_c$. Acima de 0,25 (linha vermelha) estão os resíduos com valores impróprios.

O modelo possui uma geometria covalente boa, mostrada pelos desvios quadráticos médios (d.q.m.) daqueles valores ideais. A cadeia principal da proteína apresenta uma ótima distribuição dos ângulos torsionais ϕ e ψ em torno dos valores favoráveis [Ramakrishnan e Ramachandran, 1965], com 90% dos resíduos dentro das regiões mais favorecidas do diagrama de Ramachandran (Figura 29), excluindo prolina e glicinas, e nenhum resíduo encontrado em regiões proibidas. Todos os seis resíduos com os piores valores do fator G ($< -3,0$) para ϕ e ψ [Laskowski et al, 1993], bem como seus vizinhos, estão de acordo com a densidade eletrônica calculada (Figura 30). As posições das carbonilas da cadeia principal apresentam apenas 13 resíduos com valores acima do usual (Figura 31). Dentre eles, cinco resíduos fazem interação com o ligante e a grande maioria encontra-se no sítio ativo.

Figura 29 – Gráfico de Ramachandran para os ângulos ϕ e ψ dos resíduos do modelo. Todos resíduos encontram-se nas regiões permitidas. Apenas 4 resíduos estão em regiões generosamente permitidas. Em vermelho – regiões mais favorecidas. Em amarelo – regiões adicionais permitidas. Em bege – regiões generosamente permitidas. Triângulos correspondem a glicinas.

Figura 30 – Gráfico do fator $G(\phi/\psi)$ para os resíduos das cadeias A e B. O fator $G(\phi/\psi)$ mede o desvio da conformação da cadeia principal do resíduo, daquelas regiões permitidas, para aquele tipo de resíduo. Os valores menores que -3 (linha vermelha) para o fator $G(\phi/\psi)$ não são usuais.

Figura 31 – Gráficos dos desvios das posições das carbonilas, dos resíduos da cadeia principal nas duas cadeias A e B. Acima de 2 (linha vermelha) são encontrados os resíduos com posições desfavoráveis das carbonilas.

A qualidade da estereo-química das cadeias laterais também é boa, pois apenas 16 resíduos presentes nas cadeias laterais apresentam um d.q.m. $> 1,0\text{\AA}$ quando comparados com seus rotâmeros mais próximos (Figura 32). Esses resíduos se encontram de acordo com o mapa de densidade eletrônica.

Figura 32 – Gráfico dos desvios em angstroms da cadeia lateral em relação ao rotâmero mais próximo. Desvios acima de $1\text{\AA}$ (linha vermelha) não são usuais.

A Figura 33 demonstra que o empacotamento dos resíduos na proteína está correto. Apesar de nove resíduos se apresentarem empacotados de maneira

desfavorável, nenhum seguimento de três ou mais aminoácidos, obteve uma pontuação menor que -2 .

Figura 33 – Gráfico da qualidade do empacotamento dos resíduos no modelo. Valores menores que -2 (linha vermelha), considerando um seguimento de 3 ou mais resíduos são considerados impróprios.

O modelo apresenta duas ligações peptídicas *cis*, sendo uma para cadeia A e outra para a B, no resíduo de leucina 65. Nenhuma ponte dissulfeto foi encontrada.

As duas cadeias polipeptídicas estão relacionadas entre si por um eixo de simetria não cristalográfico de ordem 2. A superposição das cadeias A e B para todos os átomos C α apresentou um d.q.m. de 1,46 Å. Este valor pode estar um pouco elevado devido às diferenças existentes nas regiões N e C-terminais e no *loop* flexível, entre as duas cadeias A e B. Essas regiões apresentam vários problemas e por isso, novo alinhamento foi realizado utilizando-se a função “lsq-explicit” do programa O. Esse comando do programa O calcula o d.q.m. das distâncias dos átomos explícitos em duas estruturas superpostas, sendo estocada a transformação na base de dados. Posteriormente, foi realizado o comando “lsq-improve” do programa O, que utiliza um algoritmo envolvendo uma pesquisa para fragmentos da estrutura, que podem ser alinhados sem um dado limite de remoção. Esse comando fornece um alinhamento de regiões da proteína e a partir do novo alinhamento obtido, foi

realizado outro “lsq-explicit”. Com esse procedimento, dos 170 átomos de carbono C α , foram utilizados 155 átomos e obteve-se um d.q.m de 0,44 Å. Esse procedimento foi realizado para o alinhamento das estruturas das HGPRT depositadas no PDB.

As estatísticas globais da estrutura cristalográfica refinada da HGPRT de *Leishmania tarentolae* estão sumarizadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Tabela das estatísticas globais da estrutura cristalográfica da HGPRT de *Leishmania tarentolae*, refinada a 2,1 Å de resolução.

Número de átomos no modelo (excluindo H)		
- proteína (341 resíduos dos 420 previstos)		2715
- moléculas de GMP (2)		61
- moléculas de água		243
Resolução		2,1Å
Número de reflexões usadas durante o refinamento		
- conjunto de trabalho (94,9%)		23525
- conjunto excluído para cálculo de R_{free} (5,1%)		1276
R final		17,34%
R_{free} final		21,53%
D.q.m. dos valores ideais		
- comprimento de ligação	0,024Å	(17 violações)
- ângulos de ligação	2,028°	(15 violações)
- ângulos torsionais	16,894°	(06 violações)
- ângulos impróprios (chiralidade)	0,134°	(20 violações)
Fator B em Å²	média	d.q.m.
- global para a proteína (3019 átomos)	33,065	1,816
- cadeia principal (1364 átomos)	31,073	1,132
- cadeia lateral (1351 átomos)	34,706	2,517
- moléculas de GMP (61 átomos)	29,421	
- moléculas de água (243)	38,911	
Distribuição de ϕ/ψ no diagrama de Ramachandran		
- regiões mais favorecidas	278	90%
- regiões adicionais permitidas	27	8,7%
- regiões generosamente permitidas	4	1,3%
- resíduos finais	8	
- resíduos de glicina	10	
- resíduos de prolina	14	
D.q.m. da posição das cadeias laterais do rotâmero mais próximo		
- média (341 cadeias laterais)		0,344Å
- desvio padrão		0,242Å
Acordo no espaço real		
Número de resíduos com $R_{\text{real}} > 0,25$ no mapa ($2mF_o - DF_c$)		
- resíduos da cadeia A (170 resíduos)		46
- resíduos da cadeia B (171 resíduos)		23
- moléculas de água (243)		80
- média para GMP da cadeia A		0,225
- média para GMP da cadeia B		0,097

Capítulo 7

VII – Análise da estrutura tridimensional da HGPRT de *Leishmania tarentolae*

Neste capítulo será analisada a estrutura tridimensional da HGPRT de *Leishmania tarentolae*. Os resultados da análise estrutural serão comparados com outras enzimas da HGPRT de diferentes organismos, cujas estruturas foram resolvidas. A discussão será realizada através das diferenças encontradas para as enzimas nos diferentes organismos. A estrutura da HGPRT de *Leishmania tarentolae* em complexo com o produto da reação GMP, resolvida neste trabalho, é a primeira estrutura solucionada para o gênero *Leishmania*, e a segunda da ordem *kinetoplastida*. A enzima HGPRT de *Trypanosoma cruzi* foi a primeira a ser resolvida nessa ordem [Focia et al, 1998a].

VII.1 – O enovelamento e topologia da HGPRT de *Leishmania tarentolae*

A cadeia polipeptídica de cada monômero se enovela em 2 domínios do tipo α/β , passando uma vez de um domínio para o outro. Esses domínios são denominados domínio núcleo e domínio capuz (Figura 34). O domínio núcleo é bastante conservado em todas as PRTases do tipo I e está envolvido com a ligação do substrato PRPP, enquanto o domínio capuz diverge entre as PRTases do tipo I, e está envolvido com a ligação do substrato purina (guanina e hipoxantina). Essa forma

estrutural é comum para todas as PRTases do tipo I [Eads et al, 1994 e Vos et al, 1997].

Figura 34 – Representação das estruturas secundárias do monômero A da enzima HGPRT, com o domínio capuz iniciando no N-terminal (resíduo 20), sendo formado uma fita β , seguida de uma longa α -hélice e uma pequena hélice 3.10, as quais fazem a transição para o domínio núcleo, na parte inferior. Este domínio é formado por uma folha β com cinco fitas paralelas e três hélices, sendo uma do tipo 3.10 e duas α -hélices. Na constituição da folha existe 2 motivos $\beta/\alpha/\beta$, onde ocorre a ligação com fosfato. Após a formação do domínio núcleo, a cadeia principal volta para o domínio capuz e forma uma pequena folha antiparalela que deixam próximos os N e C-terminais. No domínio capuz ocorre a ligação da base. O sítio ativo é formado em uma fenda entre os dois domínios.

O domínio núcleo da HGPRT de *Leishmania tarentolae* é constituído por uma folha- β central com cinco fitas- β paralelas (B2, B3, B4, B5 e B6) e 3 hélices (A3, A4 e A5), sendo duas (A3 e A4) do tipo hélice- α e uma do tipo 3.10 (A5). Enquanto que o domínio capuz é formado por uma pequena folha- β antiparalela (B1, B7 e B8) e duas hélices, uma do tipo hélice- α (A1) e outra do tipo 3.10 (A2), respectivamente (Figura 34).

A folha- β paralela do domínio núcleo é formada pelo empacotamento de dois motivos $\beta/\alpha/\beta$, onde a primeira fita de cada motivo, B2 e B4, são posicionadas paralelamente, gerando uma folha- β com quatro fitas. A folha- β , completa com cinco fitas, ocorre com a adição paralela da outra fita B6. Cada motivo $\beta/\alpha/\beta$ forma um sítio de ligação fosfato para o substrato PRPP. Esses sítios estão localizados entre a primeira fita- β e a hélice- α de cada motivo $\beta/\alpha/\beta$, sendo que o *loop* I pertence ao primeiro motivo $\beta/\alpha/\beta$, e o *loop* III ao segundo motivo. O primeiro motivo $\beta/\alpha/\beta$ compreende os aminoácidos de 59 a 91, enquanto o segundo envolve os resíduos de 120 a 156. O segundo motivo está representado na Figura 35, podendo ser observado o *loop* III e o posicionamento do GMP, orientado pelo sítio de ligação fosfato.

Figura 35 - Figura mostrando o segundo motivo $\beta/\alpha/\beta$ da HGPRT de *Leishmania tarentolae*. O *loop* III se encontra entre a fita B4 e a hélice- α A4. Nesta Figura é mostrado o posicionamento do grupo fosfato do ligante GMP em direção ao *loop* III.

Os *loops* I e III são bastante conservados em todas as PRTases do tipo I com as estruturas conhecidas, recordando em seqüência e função os *loops* de ligação ao fosfato encontrados em outras proteínas de ligação a nucleotídeos [Creighton, 1993].

O *loop* II compreende os resíduos de 92 a 118 e está localizado entre os dois motivos $\beta/\alpha/\beta$. Essa região não foi bem definida no mapa de densidade eletrônica e cerca de 13 resíduos não foram localizados em ambas as cadeias do dímero. No entanto, foram observadas diferenças nas conformações adotadas desses *loops*,

quando comparadas às cadeias A e B. Em ambas as cadeias o *loop* II se encontrava na posição aberta. Na cadeia A, o *loop* II é semelhante àquele encontrado na estrutura de *Trypanosoma cruzi* na conformação aberta [Focia et al, 1998a], enquanto que na cadeia B, é verificada a formação de uma hélice- α na região do *loop* flexível. Essa conformação também é observada na estrutura da HGPRT de *Homo sapiens* [Eads et al, 1994], porém sem boa superposição do *loop* entre essa estrutura e a de *Leishmania tarentolae*. Nas estruturas, da HGPRT de *Trypanosoma cruzi* [Focia et al, 1998ab], *Tritrichomonas foetus* [Somoza et al, 1996], *Plasmodium falciparum* [Shi et al, 1999b] e *Toxoplasma gondii* [Schumacher et al, 1996], não são observados a formação de hélice neste *loop* II.

O fato da cadeia B apresentar a formação de hélice- α no *loop* II pode ser devido aos contatos cristalinos. No monômero B as moléculas vizinhas estão muito mais próximas da região do sítio ativo, quando comparado com o monômero A. Assim, no monômero A, é possível que esse *loop* adquira uma conformação mais estendida [Focia et al, 1998a], enquanto que no monômero B, isso não é possível. As diferenças nos contatos cristalinos, para o monômero A e B, evidenciam o choque estéreo que ocorre com esse *loop*, na estrutura solucionada pela substituição molecular, utilizando como modelo a estrutura da HGPRT de *Trypanosoma cruzi* [Focia et al, 1998a].

A região da hélice- α no *loop* II do monômero B apresenta alguns picos no mapa de diferença de Fourier ($mF_o - DF_c$), que não puderam ser explicados pelo modelo, sendo que as cadeias laterais dos resíduos 106, 107, 108 e 111 não foram bem definidas. Contudo, a cadeia principal apresenta boa estéreo-química e bom empacotamento dos átomos. Esse *loop* II é muito flexível e está envolvido na catálise, na formação do estado de transição, e pode ser encontrado na forma aberta,

para entrada do substrato e saída do produto, e na forma fechada, durante a reação no estado de transição [Focia et al, 1998b e Héroux et al, 1999a].

O domínio capuz é constituído por uma pequena folha- β antiparalela com três fitas- β (B1, B7 e B8) e o *loop* IV. O *loop* IV inicia-se após a fita- β B6 no domínio núcleo, seguindo até a fita- β B8. Neste intervalo está localizada a fita- β B7 onde ocorre a ligação da base purina. As cadeias laterais desse *loop* IV fazem interações com o ligante, estando tal *loop* localizado na interface entre o domínio núcleo e domínio capuz. A Figura 36 mostra a região do *loop* IV no domínio capuz.

Figura 36 - Figura mostrando o *loop* IV da HGPRT de *Leishmania tarentolae*. Nesta Figura pode ser visualizada a fita- β B7, na região do *loop* IV e o posicionamento do produto da reação o GMP. O *loop* IV inicia após a fita- β B6 e vai até a fita- β B8 (não mostrada). Em cinza representa os resíduos envolvidos na ligação.

A conexão entre os domínios núcleo e capuz é feita pela grande hélice- α A1. Esta hélice- α A1 termina como uma pequena hélice 3.10 A2, e parece ser importante para a manutenção estrutural da enzima HGPRT. Ela faz interações com todas as fitas- β da folha- β e com a hélice- α A3. Essa hélice- α A3 está envolvida na dimerização. A outra conexão é feita vinda da fita- β B6 do domínio núcleo para fita- β B7 do domínio capuz, através do *loop* IV.

A topologia da estrutura terciária da HGPRT de *Leishmania tarentolae* está representada na Figura 37.

Figura 37 – Figura da topologia dos dois monômeros da HGPRT de *Leishmania tarentolae*. Na esquerda encontra-se o monômero A e na direita o monômero B. Em ambos os monômeros podem ser observados, o domínio capuz (menor) e o domínio núcleo (maior). O domínio capuz está localizado a esquerda do domínio núcleo. Retângulos representam fita- β , os círculos, as hélices e as conexões sendo *loop*, volta β e grampo de cabelo. No monômero B pode ser observada a presença de uma hélice que não se encontra no monômero A. Retângulo azul a esquerda representa N-terminal e no centro C-terminal. Essa Figura foi gerada pelo programa PROMOTIF [Hutchinson e Thornton, 1996].

VII.2 – A interface dimérica da HGPRT de *Leishmania tarentolae*

A dimerização da enzima HGPRT de *Leishmania tarentolae* (Figura 38), ocorre principalmente através da hélice- α A3 para os dois monômeros A e B. Pode-se observar nesta região, um eixo de simetria não cristalográfica de ordem 2.

Figura 38- Representação da estrutura dimérica da HGPRT de *Leishmania tarentolae* por elementos de estrutura secundária, com GMP nos sítios ativos.

A interface dimérica consiste de muitas interações hidrofóbicas nos resíduos da hélice- α A3, vinda dos resíduos Leu61 e Ala73. Poucas interações polares foram observadas, sendo formadas pelos resíduos Lys66 (*loop* I) com Val88 (fita- β B3), e Glu192 (*loop* IV) com Val86 (fita- β B3). Na interface dimérica oito resíduos estão envolvidos em pontes salinas, sendo elas entre Asp74 e Arg77 da hélice- α A3, e entre Asp81 da hélice- α A3 e Arg194 do *loop* IV. Os resíduos Asp74 e Arg77 formam quatro pontes salinas paralelas. Juntamente a essas pontes salinas, o resíduo Tyr182 do *loop* IV faz ponte de hidrogênio com Asp74. Nessa região é observado claramente um eixo de simetria não cristalográfica de ordem 2 (Figura 39). Várias regiões do domínio núcleo estão envolvidas na dimerização, como a hélice- α A3, a fita- β B3, outros *loops* que não fazem parte do sítio ativo, como aquele localizado entre a hélice 3.10 A2 e a fita- β B2.

Figura 39 – Pontes salinas na interface dimérica da HGPRT de *Leishmania tarentolae*. No centro as pontes salinas entre Arg77 e Asp74. Nas extremidades da hélice- α A3 as pontes salinas entre Asp81 e Arg194. A ponte de hidrogênio entre Tyr182 e Asp74 também está mostrado na Figura.

O padrão de pontes salinas descritas para os resíduos Asp74 e Arg77, também é observado nas estruturas de *Escherichia coli* [Guddat et al, 2002] e *Tritrichomonas foetus* [Somoza et al, 1996], porém no último organismo é encontrado Lys ao invés de Arg, fazendo apenas uma ponte salina entre os resíduos.

O *loop* IV apresenta vários resíduos na interface dimérica. Além dos resíduos Tyr182, Glu192 e da Arg194 já citados, Met184 e Arg191 estão envolvidos com interação de pontes de hidrogênio nesta interface. Todos esses resíduos do *loop* IV estão muito próximos do sítio ativo. O resíduo Arg191 interage com o PP_i no sítio ativo [Focia et al, 1998b; Héroux et al, 1999b e Shi et al, 1999ab], e faz interação na interface dimérica com um empacotamento amarrado das cadeias laterais de resíduos hidrofóbicos, flanqueando o *loop* I.

O fato de vários resíduos próximos ao sítio ativo, principalmente Arg191 (*loop* IV) e Lys66 (*loop* I), participarem tanto da dimerização como do sítio ativo, pode justificar a atividade da HGPRT, somente na forma dimérica em ou tetramérica, como visto no capítulo 3.

Na enzima OPRT é necessária à formação de dímero para que ocorra a atividade catalítica [Otzurk et al, 1995 e Scapin et al, 1995], enquanto que na enzima HGPRT não há uma razão explícita para o requerimento de uma estrutura dimérica cataliticamente ativa. Diferentemente das OPRTs, as HGPRTs não compartilham os sítios ativos, pois estes se encontram bem separados na interface do dímero e portanto, sem a reunião do sítio ativo [Focia et al, 1998a]. Esse mesmo grupo de pesquisa tem proposto que a ligação do nucleotídeo entre dois sítios ativos apresenta uma cooperatividade positiva mensurável, que pode ser detectada na enzima mutante humana Lys68Ala [Balendiran et al, 1999]. Dessa forma, a cadeia lateral de Lys68 humana (*loop* I) pode ser responsável por mascarar interações cooperativas entre as subunidades, tão bem como outros resíduos. O resíduo Lys do *loop* I não está presente em todos organismos, como em *Tritrichomys foetus*, em cuja enzima pode ser observado, nesta posição, o resíduo Trh47, porém fazendo ponte de hidrogênio com o oxigênio da cadeia principal da Tyr68, na subunidade oposta [Somoza et al, 1996].

O átomo NZ da cadeia lateral da Lys66 do *loop* I faz interação com o átomo de oxigênio da cadeia principal da Val88 da fita- β B3 na subunidade oposta. Essa ponte de hidrogênio formada faz com que o resíduo invariável Arg191 fique orientado no sítio ativo, na posição para interação com PRPP ou PPi. Essa conformação de Lys e Arg pode ser observada nas estruturas de HGPRT de *Leishmania tarentolae*-GMP, de *Toxoplasma gondii*-_{9dz}-PRPP-Mg, de *Plasmodium falciparum*-ImmHP-PPi-Mg, de *Escherichia coli*-GMP, da humana-ImmGP-PPi-Mg e nas de *Trypanosoma cruzi*-FmB-MES e *Trypanosoma cruzi*-HPP-PRPP-Mg (Figura 40).

Figura 40 – Comparação das posições da Lys do *loop I* e da Arg do *loop IV*, na interface dimérica e no sítio ativo. As diferentes cores representam a HGPRT de diferentes organismos. Em amarelo *Leishmania tarentolae*-GMP, em azul claro *Toxoplasma gondii*-_{9dz}-PRPP-Mg, em azul escuro humana-ImmGP-PPi-Mg, em verde *Trypanosoma cruzi*-FmB-MES e em rosa *Trypanosoma cruzi*-HPP-PRPP-Mg.

A interação na interface das subunidades por Lys66 permite a orientação de Arg191 em direção ao sítio ativo para interagir com PRPP. A Arg191 fica empacotada por Glu188 e Asp185, sendo que esse último, está envolvido na ligação com Mg^{+2} [Focia et al, 1998b e Héroux et al, 1999b] (Figura 41).

As estruturas com a ligação peptídica na configuração *trans* no *loop I*, foram observadas em *Toxoplasma gondii* em complexo com GMP, na forma apoenzima, e na estrutura humana, em complexo com GMP e IMP. Nessas estruturas o resíduo de Lys não faz interação com o oxigênio da cadeia principal na subunidade oposta, e é encontrado com a cadeia lateral dessa Lys no sítio ativo, na região de ligação do PP_i. Nestas estruturas, o resíduo de Arg, não está orientado no sítio ativo e faz interações com outros resíduos. Na estrutura de *Toxoplasma gondii*-GMP, o resíduo Arg212 faz ponte de hidrogênio com oxigênio da cadeia principal em Pro107, na mesma subunidade. Na estrutura humana em complexo com GMP o resíduo Arg199 faz

ponte de hidrogênio com oxigênio da cadeia principal do resíduo Gly69 no *loop* I. Na HGPRT humana mutante Lys68Ala-HPP-PRPP-Mg, é observado apenas interação de Van der Waals para o oxigênio da Gly69, no *loop* I.

Figura 41 – Comparação das estruturas de *Leishmania tarentolae* com a humana. A- Configuração *trans* para HGPRT_{GMP} humana e *cis* para HGPRT_{GMP} de *Leishmania tarentolae*. B- Ambas estruturas em configuração *cis*. Aqui é comparada com o complexo HGPRT_{ImmGP-PPi-Mg} humano. Quando ocorre a configuração *cis* é notada a organização no sítio ativo da Arg191, Asp185 e Glu188 da *Leishmania tarentolae* e os resíduos correspondentes na humana.

Essas estruturas apresentam a cadeia lateral da Lys no sítio ativo, somente quando ocorre ligação peptídica *trans* do *loop* I, sugerindo que esta conformação evite a ligação do PRPP no sítio ativo [Héroux et al, 1999a]. No entanto, quando ocorre ligação peptídica na configuração *cis*, é verificado que Lys do *loop* I participa da comunicação entre as subunidades, nas estruturas diméricas e tetraméricas. O fato de ocorrer ligação peptídica nas configurações *cis* e *trans* no *loop* I e o posicionamento da cadeia lateral de Lys deste *loop* no sítio ativo, sugerem um mecanismo de interação alostérica entre as subunidades [Balendiran et al, 1999].

Estudos envolvendo dinâmica e propriedades conformacionais da HGPRT humana demonstraram que os peptídeos do sítio catalítico fecham em resposta ao análogo do estado de transição (ImmGP). Essa mudança é acompanhada por um movimento conformacional secundário nos resíduos de 78 a 98, mudando suas disposições na interface das subunidades [Wang et al, 2001].

Na interface do dímero da HGPRT de *Leishmania tarentolae* estão presentes dois bolsões, formados pelos resíduos Trp34, Asp74, Arg77, Phe78 e Arg194 das duas subunidades. No interior desses bolsões foram observadas densidades eletrônicas que foram modeladas como moléculas de água, porém esta densidade parece proveniente de um composto desconhecido não usado na cristalização ou estas moléculas de água estão desordenadas (capítulo 6). No entanto, na estrutura de *Trypanosoma cruzi*-_{FmB-MES} é observado moléculas de água nesta região.

VII.3 – O sítio ativo da HGPRT de *Leishmania tarentolae*

A estrutura da HGPRT de *Leishmania tarentolae* foi resolvida com o produto da reação GMP no sítio ativo. O sítio ativo das PRTases do tipo I, é constituído por quatro *loops* (I, II, III e IV). Esses *loops* aparecem conservados, com algumas

diferenças na sequência dos organismos, e estão localizados em uma fenda entre os domínios núcleo e capuz, como em *Trypanosoma cruzi*. Os *loops* I, II e III pertencem ao domínio núcleo e o *loop* IV ao domínio capuz. Ultimamente tem sido evidenciada a presença de um quinto *loop* III’.

VII.3.1 – O *loop* I

O *loop* I corresponde aos resíduos de 65 a 68 (LKGS) localizados entre a fita- β B2 e a hélice- α A3, que fazem parte do motivo $\beta/\alpha/\beta$ (Figura 42). Ele está envolvido na ligação do PP_i do PRPP. No *loop* I foi verificada a ligação peptídica na configuração *cis*, para o resíduo Leu65. Esta ligação foi observada em várias outras estruturas de PRTases do tipo I, como na HGXPRT de *Tritrichomas foetus* [Somoza et al, 1996], na HGPRT de *Trypanosoma cruzi* [Focia et al, 1998ab], na XPRT de *Escherichia coli* [Guddat et al., 2002], na OPRT [Vos et al, 1997] e na GAPRT [Henriksen et al, 1996], sendo que tem-se atribuído significado estrutural e funcional para essa ligação [Focia et al, 1998b].

Figura 42 – Representação do *loop* I. O *loop* está bem definido no mapa de Fourier-diferença $2mF_o - DF_c$. Ele apresenta a ligação *cis*-peptídica entre os resíduos Leu65 e Lys66 e está localizado entre a hélice- α A3 e a fita- β B2.

A ligação peptídica na configuração *cis* nas estruturas de HGPRT, no resíduo Leu65 e Lys66 (*Leishmania tarentolae*) do *loop* I, parece ser conservada, e é sempre seguida por um resíduo de Gly67. Esse fato permite o posicionando da hélice- α A3 em direção ao sítio ativo, favorecendo a interação com o PRPP [Focia et al, 1998b].

Foi proposto que a isomerização da ligação peptídica *trans-cis*, apresenta um papel fundamental na ligação do PRPP (*trans*→*cis*), onde a energia liberada da ligação do PRPP na apoenzima, é usada para conduzir a uma configuração *cis*. A volta para a configuração *trans* (*cis*→*trans*) libera energia suficiente para expelir o PP_i para fora do sítio ativo [Héroux et al, 1999a].

A ligação peptídica na configuração *cis* é observada em várias estruturas da HGPRT em complexo com o GMP, como em *Tritrichomonas foetus* [Somoza et al, 1996] e em *Leishmania tarentolae* apresentada neste trabalho, além daquelas em *Toxoplasma gondii* em complexo com IMP [Héroux et al, 1999b], em *Trypanosoma cruzi*-FmB-MES [Focia et al, 1998a] e as estruturas da HPRT em *Escherichia coli* na forma apoenzima, complexada com o GMP e com o IMP [Guddat et al, 2002]. O fato dessas estruturas, apresentarem as ligações peptídicas em configuração *cis*, conduz à discussão sobre o mecanismo proposto na isomerização. Focia e colaboradores [Focia et al, 1998b] propuseram que a ligação *cis* não é observada em algumas estruturas, devido a estas estruturas não serem resolvidas à alta resolução. Enquanto Héroux e colaboradores [Héroux et al, 1999b] sugeriram que as estruturas com GMP ou IMP apresentam a configuração *cis*, pelo fato desta configuração de alta energia, ter sido forçada pelas interações do empacotamento cristalino.

VII.3.2 – O *loop* II

O *loop* II compreende os resíduos de 92 até 119, formando um grande *loop* flexível, localizado entre as fitas- β B3 e B4 dos dois motivos $\beta/\alpha/\beta$. Infelizmente, este *loop* não pode ser modelado em sua totalidade, por causa da ausência de densidade eletrônica, possivelmente devido ao seu movimento constante. O movimento desse *loop* flexível foi estudado comparando as dinâmicas e as conformações da HGPRT humana apoenzima, em complexo HGPRT-GMP-Mg²⁺, no equilíbrio da mistura HGPRT-IMP-MgPPi-MgPPi $\leftrightarrow$ HGPRT-Hx-MgPRPP, e no complexo análogo ao estado de transição HGPRT-ImmGP-MgPPi. Nesse estudo era quantificada a troca de hidrogênio por deutério nas ligações amina, com o uso de HPLC e espectrometria de massa, para a HGPRT humana nas diferentes condições. Para o complexo HGPRT-ImmGP-MgPPi foi observado um movimento do *loop* flexível de aproximadamente 25 Å, para interagir em sua conformação fechada com o sítio ativo. Na conformação fechada ocorre a formação de pontes de hidrogênio, vinda da ligação de nitrogênio da cadeia principal dos resíduos conservados Ser103 e Tyr104 (humano) com um oxigênio do PP_i [Wang et al, 2001]. Nessa conformação, o *loop* flexível forma uma estrutura com duas fitas- β antiparalelas, com nove pontes de hidrogênio entre elas. Essas pontes não são encontradas na estrutura com GMP, onde o nitrogênio do grupo amina da cadeia principal é mais acessível ao solvente, e portanto, uma estrutura com duas fitas- β antiparalelas caracteriza o complexo análogo ao estado de transição [Wang et al, 2001].

A mutação Ser103Arg na proteína humana resulta na doença gota, pois aumenta em 75 vezes o K_m para a hipoxantina [Wilson et al, 1986]. A importância deste *loop* na atividade catalítica, também foi demonstrada pela mutagenese sítio-

dirigida para o dipeptídeo Ser-Tyr em *Leishmania donovani* [Jardim e Ullman, 1997].

O *loop* II em *Trypanosoma cruzi*-FmB-MES foi verificado na estrutura do cristal na conformação aberta, [Focia et al, 1998a] e na conformação aberta e fechada em complexo com PRPP e o análogo a hipoxantina (7HP) [Focia et al, 1998b]. Na conformação fechada são observadas interações entre o *loop* II com o PRPP e com os íons metálicos (Mg^{2+}) hidratados. Os átomos da cadeia principal dos resíduos invariáveis Ser81 e Tyr82 fazem pontes de hidrogênio com o átomo O1A do PPRP. O grupo hidroxila do resíduo Tyr82 faz forte ponte de hidrogênio com o átomo de oxigênio O3P do grupo 5'-fosfato. O anel aromático é quase perpendicular ao anel da ribose do PRPP, podendo fornecer a estabilização eletrostática durante o estado de transição. Esses autores sugerem que o *loop* II está envolvido na ligação do grupo PP_i do PRPP e pode ser responsável pela facilitação da remoção do grupo PP_i ativado. O resíduo Tyr possivelmente exerce um papel importante na estabilização eletrostática do estado de transição.

O *loop* II da HGXPRT-XMP- PP_i -Mg de *Toxoplasma gondii* foi encontrado nas conformações abertas e fechadas [Héroux et al, 1999b]. Nessa estrutura foi observado que as moléculas de água encontradas no sítio ativo, tanto para conformação aberta como para a fechada, são muito semelhantes. Esse fato também foi verificado em outras estruturas, como em *Trypanosoma cruzi*-HPP-PRPP-Mg com o *loop* II aberto e fechado, na de *Toxoplasma gondii*-dzG-PRPP-Mg na forma fechada, e na HGPRP-ImmGP- PP_i -Mg humana em sua forma fechada. Dessa forma, o *loop* flexível não atua em excluir ou expelir moléculas de águas, mas sim em dirigir o substrato ao estado de transição. Com o sítio ativo hidratado, o mecanismo de reação tipo S_N1 seria significativamente não produtivo devido à “quenching” do íon intermediário

oxicarbonium pela água. Dessa forma, esses autores propuseram um mecanismo de reação tipo S_{N2} para a reação no estado de transição, que teria uma carga positiva parcial no átomo C1' da ribose. Essa carga seria estabilizada por ressonância pelo par de elétrons do átomo O4 no estado de transição. O ataque nucleofílico se dá pela base purina, ocorrendo simultaneamente com saída do grupo PP_i do PRPP através do complexo ternário [Focia et al, 1998b e Heroux et al, 1999a].

VII.3.3 – O *loop* III

O *loop* III compreende os resíduos de 128 a 131 (VDSA) e está localizado no segundo motivo $\beta/\alpha/\beta$, entre a fita- β B4 e hélice- α A4 (Figura 43).

Figura 43 – Representação do *loop* III. O *loop* está bem definido no mapa de Fourier-diferença $2mF_o - DF_c$. Ele está localizado entre a hélice- α A4 e a fita- β B4. Atrás do *loop* III encontra-se o *loop* III'.

Na resolução da estrutura cristalográfica da HGPRT de *Leishmania tarentolae*, o *loop* III está bem definido no mapa de densidade eletrônica, e evidencia claramente as pontes de hidrogênio com o grupo 5'-fosfato do GMP (Figura 44). Todas as estruturas de HGPRT apresentam um invariável Asp129 (*Leishmania*

tarentolae) neste *loop*. Tem sido proposto para a HGPRT humana que este resíduo atua como uma base geral catalítica, que auxilia na desprotonação da base purina para ativá-la como um nucleófilo [Xu et al, 1998]. No entanto, a análise de quatro mutantes para o Asp do *loop* III em *Trypanosoma cruzi*, confirmou que este resíduo atua na catálise, mas não é requerido como uma base geral nessa posição [Canyuk et al, 2001].

Figura 44 – Representação das pontes de hidrogênio formada entre o *loop* III e o grupo 5'-fosfato do GMP.

O *loop* III apresenta algumas variações dos resíduos em sua composição, que podem ser visualizadas no alinhamento das seqüências (Figura 49). O resíduo de Thr130 é mudado quase sempre por Ser e o resíduo Gly131 por Ala. O resíduo 132 é muito variável e o resíduo Thr133 é conservado.

A interação do Asp129 do *loop* III com o ligante pode ser observada nas estruturas de *Trypanosoma cruzi*-FmB-MES, de *Escherichia coli*-GMP, da humana HGPRT-Ppo-PRPP-Mg e de *Toxoplasma gondii*-9dz-PRPP-Mg. No entanto, a cadeia lateral do Asp129 não interage com o ligante nas estruturas de *Leishmania tarentolae*-GMP, *Plasmodium falciparum*-ImmHP-PPi-Mg, *Tritrichomonas foetus*-GMP e na humana

HGPRT-GMP. A cadeia lateral do resíduo Asp aponta para o sítio ativo, na região do grupo fosfato do GMP, nas estruturas de *Trypanosoma cruzi*-FmB-MES e de *Escherichia coli*-GMP, enquanto que em *Leishmania tarentolae* e nas outras estruturas, a cadeia lateral do Asp está apontando para fora do sítio ativo.

VII.3.4 – O loop IV

O loop IV compreende os aminoácidos de 175 a 193, apresentando a pequena fita- β B7, com três resíduos (178 a 180) no interior desse loop. A fita- β B7 está envolvida na ligação da base purina no sítio ativo (Figura 45).

Figura 45 - Representação do loop IV. O loop IV está bem definido no mapa de Fourier-diferença $2mF_o - DF_c$, sendo representado no mapa apenas os resíduos de 178 a 180. Nesta Figura também está representada a disposição dos loops que constituem o sítio ativo, com exceção do loop II que não foi localizado totalmente no mapa de densidade eletrônica.

O loop IV de *Leishmania tarentolae* apresenta o produto da reação o GMP interagindo com vários resíduos. As pontes de hidrogênio são feitas através dos resíduos Val179 e Asp185 no loop IV (Figura 46). O resíduo Lys157 da fita- β B5 também faz ponte de hidrogênio com o GMP (Tabela 10). O loop IV é conservado

quando comparado à sequência da HGPRT de vários organismos (Figura 49). Esse *loop* sempre apresenta um resíduo aromático (Phe178), que participa com interação “ π - π stacking” com o anel aromático da base purina. Esse resíduo é às vezes Phe, mas pode ser encontrado com como Trp em *Toxoplasma gondii* e Tyr em *Tritrichomonas foetus*. Três outros resíduos são conservados nas estruturas de HGPRTs, como Gly181, Asp185 que se liga a Mg^{+2} e Arg191 que se liga ao PRPP ou PP_i .

Figura 46 – Representação das pontes de hidrogênio formada entre o *loop* IV e os átomos de oxigênio e nitrogênio da base guanina do GMP.

O *loop* IV pode exibir atividade para a base xantina, sendo eficientes em alguns organismos e pouco eficiente para outros. Em *Tritrichomonas foetus* foi proposto que a ligação da xantina se dá através do grupo hidroxila da cadeia lateral do resíduo Tyr156, fazendo ponte de hidrogênio com o átomo O2 da xantina. Essa hipótese foi descartada visto que outras HGXPRTs apresentam outros resíduos nessa posição, incapazes de realizar tal ligação, como Trp199 na estrutura de *Toxoplasma gondii* e Phe197 em *Plasmodium falciparum*.

Para a ligação da base xantina no *loop* IV, foi sugerida a ocorrência de um deslocamento dos resíduos nesse *loop*, particularmente, na cadeia principal dos resíduos de 204 a 208 da HGXPRT de *Toxoplasma gondii*. Tal ocorrência permite o correto posicionamento da cadeia principal desses resíduos, para a formação de ponte de hidrogênio do átomo O2 da xantina [Héroux et al, 1999b]. Esse deslocamento deve ser necessário, pois seria incoerente a mesma conformação na formação de ponte de hidrogênio para o átomo N2 da guanina. Esse deslocamento deve ser desfavorável para aquelas HGPRTs com baixa eficiência para xantina, como em *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Escherichia coli* e em *Homo sapiens*. Dados vindo de mutagênese na HGXPRT de *Toxoplasma gondii* indicam o uso reduzido de xantina, quando são substituídos os resíduos de 199 a 220 [Héroux et al, 1999b].

Foi observado através de mutação sítio dirigida na HGPRT humana e de *Salmonella typhimurium*, que quando mutam-se os resíduos Leu192 na enzima humana e aquele correspondente (Ile) em *Salmonella typhimurium*, por Thr, observa-se um aumento de 15 vezes no K_m para a guanina [Lee et al, 1998]. No entanto esses resíduos não são conservados, sendo encontrados nessa posição os resíduos Met, Tyr e Phe para *Leishmania tarentolae*, *Toxoplasma gondii* e *Trichomonas foetus*, respectivamente.

VII.3.5 – O *loop* III'

Para as estruturas em complexo da HGXPRT de *Toxoplasma gondii* foi observada a formação de um *loop* III' ordenado, incluindo os resíduos de 180 a 184 [Heroux et al, 1999]. Esse *loop* III' está localizado entre as fitas- β B7 e B8 na estrutura de *Toxoplasma gondii* e entre a hélice 5 (3.10) e a fita- β B6 de *Leishmania tarentolae*, ficando acima e atrás do *loop* III em ambas as estruturas (Figura 47).

Figura 47 – Representação do *loop* III'. O *loop* III' está bem definido no mapa de Fourier-diferença $2mF_o - DF_c$, sendo representado no mapa nos resíduos de 159 a 163. Esse *loop* fica localizado ficando acima e atrás do *loop* III.

Quando o *loop* III' está ordenado, observa-se o posicionamento do conservado resíduo Arg182 dentro do sítio ativo, onde o grupo guanidino é empacotado pelos grupos carboxilatos dos resíduos conservados Asp150 do *loop* III e pelo Asp197 [Héroux et al, 1999b].

Em *Leishmania tarentolae*, o resíduo Lys162 está na mesma posição ocupada pelo resíduo Arg182 na estrutura da HGXPRT de *Toxoplasma gondii*, e não pelo resíduo conservado Arg161 (*Leishmania tarentolae*). No entanto, é o resíduo Arg176 que interage com o resíduo Asp129 no *loop* I, sem a participação do resíduo Lys162. O resíduo Arg161 interage com o Asp156, correspondente ao Asp197 de *Toxoplasma gondii*. As diferenças observadas entre esse *loop* III' na estrutura de *Leishmania* e *Toxoplasma*, também ocorrem na estrutura da HGPRT-FmB-MES de *Trypanosoma cruzi*.

VII.3.6 – O co-fator magnésio

Embora a HGPRT de *Leishmania tarentolae* tenha sido cristalizada sem a presença do íon magnésio (Mg^{+2}) no sítio ativo, esse íon foi relatado em algumas estruturas da HGPRT, como na de *Toxoplasma gondii* [Héroux et al, 1999ab], de *Trypanosoma cruzi* [Focia et al, 1998b], de *Plasmodium falciparum* [Shi et al, 1999b] e na humana [Balendiran et al, 1999]. Foi proposto que estes íons estão envolvidos no ataque nucleofílico sobre o átomo C1' da ribose do PRPP para saída do grupo PP_i [Focia et al, 1998b]. Esses íons de magnésio apresentam uma geometria característica. O estado de transição foi observado e discutido por vários pesquisadores, sendo que o mecanismo da reação que envolve 10 etapas foi proposto por Héroux [Héroux et al, 1999a].

VII.3.7 – O GMP no sítio ativo

A Figura 48 ilustra a representação do GMP no sítio ativo.

Figura 48 – Representação do produto de reação GMP no sítio ativo da HGPRT de *Leishmania tarentolae*. Nesta Figura está representada as pontes de hidrogênio formadas entre o GMP e os resíduos do sítio ativo, a interação “ $\pi - \pi$ stacking” entre o anel aromático da Phe178 e o anel da base guanina e a interação de van der Waals entre a conservada Ile127 e a base guanina.

O ligante GMP parece adotar várias conformações diferentes que puderam ser observadas nas estruturas de HGPRT com GMP no sítio ativo. Em *Tritrichomonas foetus* apenas em uma cadeia foi encontrado o GMP, ele se encontra na conformação com o carbono C3'-exo. Na estrutura da enzima HGPR em *Homo sapiens* pode ser observada no monômero A, a conformação C2'-exo e, no monômero B, a conformação C3'-endo. Em *Leishmania tarentolae* é observada na cadeia A, uma dupla conformação sendo C2'-endo e C3'-endo, enquanto que na cadeia B observa-se a conformação C3'-endo. Na estrutura da HGXPRT de *Plasmodium falciparum* encontra-se no sítio ativo a imucilinaGP, um inibidor análogo ao GMP, que apresenta um átomo de nitrogênio fechando o anel da ribose ao invés do átomo de oxigênio. Além deste inibidor encontra-se também PP_i e Mg^{+2} . Nesta estrutura os carbonos C2' e C3' apontam para uma mesma direção, fazendo interação com Mg^{+2} . O anel da ribose assume uma forma quase que plana, sendo esse modelo proposto como aquele que deve ocorrer no estado de transição [Wang et al, 2001]. Assim, sem a presença de Mg^{+2} e de pirofosfato, o anel da ribose poderia assumir várias conformações, pelo fato dos carbonos C2' e C3' não estarem bem “amarrados” nas estruturas com apenas o GMP no sítio ativo.

VII.4 – Comparação das estruturas da enzima HGPRT

No banco de dados de proteínas foram encontradas estruturas da HGPRT dos diferentes organismos, sendo utilizadas para o propósito de comparação, as estruturas de *Tritrichomonas foetus*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* e de *Homo sapiens*. Essas estruturas foram comparadas com a HGPRT de *Leishmania tarentolae*. As maiores similaridades são observadas nos *loops* I, II, III e IV. No entanto, a fita- β B4 central na folha- β que antecede o *loop* III, no domínio

núcleo, parece ser mais conservada que os *loops* (Figura 49). Essa região, juntamente o *loop* III são similares nas PRTases tipo I e estão envolvidas na ligação de metais divalentes, de ribose e de fosfato [Eads et al, 1994; Somoza et al, 1996 e Scapin et al, 1994 e 1995], sendo de vital importância para o posicionamento do PRPP no sítio ativo e na coordenação do íon Mg^{2+} , para o estado de transição na reação [Focia et al, 1998b].

Figura 49- Alinhamento das sequências de aminoácidos da enzima HGPR de *Leishmania tarentolae*, *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas foetus*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* e *Homo sapiens*.

Alguns resíduos que não participam do sítio ativo são conservados nas estruturas, como os resíduos citados correspondentes àqueles de *Leishmania tarentolae*. Dentre eles pode-se citar os seguintes: o resíduo Ala41 que está localizado na hélice- α A1 e participa na região hidrofóbica entre as hélices- α A1 e A3; o resíduo Phe71 que participa de interação hidrofóbica entre a hélice- α A3 e a fita- β B5; e o resíduo Leu75 localizado na hélice- α A3 envolvido com interação hidrofóbica. Na fita- β B5, são observados dois resíduos conservados, Leu154 e Lys157, sendo que esse último interage com a base purina. Na fita- β B6 outros dois resíduos foram encontrados, Asp168 no início da fita- β , e Ile174 no final da fita- β . Os a maioria dos resíduos estão envolvidos em interações hidrofóbicas, na manutenção da estrutura terciária, pela interação das estruturas secundárias.

A superposição entre os monômeros A e B, envolvendo todos os átomos de carbono C α apresentou um d.q.m. de 1,46 Å, que é de certa forma um valor maior do que o esperado. Isso provavelmente se refere às diferenças encontradas nas regiões N-terminais e C-terminais dos monômeros, e nas regiões envolvendo o *loop* flexível, onde existe a formação de hélice no monômero B e não no monômero A. Essas regiões apresentaram os piores índices de qualidade na estrutura, como altos valores do fator de temperatura B. Aí também foram encontrados os maiores valores dos desvios das densidades eletrônica teórica e experimental, sendo que vários átomos foram colocados com ocupação zero, além de o mapa de densidade eletrônica em certos resíduos ter ficado pouco claro.

Devido às diferenças observadas de um monômero em relação a outro, e aos vários problemas citados acima, a sobreposição foi refeita, no intuito de obter-se um melhor alinhamento dos carbonos C α , considerando as diferenças observadas em certas regiões. As sobreposições foram realizadas no programa O, inicialmente

utilizado o comando “lsq-explicit”. Esse comando calcula os d.q.m. das distâncias dos átomos explícitos em duas estruturas superpostas, sendo estocada a transformação na base de dados. Posteriormente, era utilizado o comando “lsq-improve”, que usa um algoritmo envolvendo uma pesquisa para fragmentos da estrutura, que podem ser alinhadas sem um dado limite de remoção. Esse comando fornece um alinhamento de regiões da proteína e a partir deste novo alinhamento obtido, era realizado novamente o comando “lsq-explicit”. Este procedimento foi realizado para o alinhamento das estruturas das HGPRT depositadas no PDB, que foram utilizadas como base de comparação. Os desvios médios quadráticos obtidos foram sumarizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Comparação dos d.q.m. dos carbonos C α da HGPRT de *Leishmania tarentolae* entre as cadeias A e B, e com a HGPRT de outros organismos, sendo superposta apenas uma cadeia e as duas cadeias. Na última coluna encontra-se a porcentagem de similaridade entre a HGPRT de *Leishmania tarentolae* com os outros organismos.

Organismo	D.q.m. para um monômero (A)	Número de átomos utilizados na superposição de 170 átomos	D.q.m. para os dois monômeros	Número de átomos utilizados na superposição de 341 átomos	Porcentagem de identidade
<i>L. tarentolae</i>	0,436 Å	155			
<i>T. cruzi</i>	0,729 Å	167	0,908 Å	324	49%
<i>T. foetus</i>	1,111 Å	156	1,692 Å	294	29%
<i>P. falciparum</i>	1,224 Å	149	1,777 Å	294	20%
<i>H. sapiens</i>	1,342 Å	142	1,788 Å	287	22%
<i>T. gondi</i>	1,528 Å	118	2,519 Å	235	23%

A proteína utilizada como modelo no método de substituição molecular para resolver o problema das fases foi a HGPRT de *Trypanosoma cruzi*. A sobreposição da estruturas de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania tarentolae* apresentou um d.q.m. de 0,908Å em 324 átomos, dos 341 átomos de carbono C α presentes no modelo. Tal fato indica, como esperado, uma similaridade estrutural significativa devido a similaridade sequencial de 49%. Dessa forma, a enzima HGPRT de *Leishmania*

tarentolae e *Leishmania donovani* devem apresentar uma similaridade estrutural muito grande, pois elas exibem alta similaridade seqüencial (87%).

Apesar da baixa similaridade seqüencial da HGPRT dos outros organismos em relação a HGPRT de *Leishmania tarentolae*, pode ser notada uma boa conservação estrutural desta proteína ao longo da evolução. Isso pode ser observado pelos valores baixos de d.q.m. na superposição dos átomos. Vale notar que com exceção da HGPRT de *Homo sapiens*, todos os outros organismos são protozoários. Na análise de sobreposição poderíamos separar essas seis proteínas em dois grupos. Um grupo para os organismos *Leishmania tarentolae*, *Trypanosoma cruzi*, *Escherichia coli* e *Tritrichomonas foetus*, e outro grupo formado por *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* e *Homo sapiens*. No primeiro grupo, as três estruturas são mais semelhantes e melhores sobrepostas, e se comportam como dímeros em solução e na unidade assimétrica do cristal, com exceção da proteína de bactéria. Já no segundo, estruturas são melhores sobrepostas em relação ao primeiro grupo, sendo tetraméricas em solução e na unidade assimétrica do cristal (Figura 50).

Figura 50 – Sobreposição dos carbonos C α das estruturas de HGPRT. A- Sobreposição das estruturas de *L. tarentolae* (amarelo), *T. foetus* (azul), *T. cruzi* (verde) e *E. coli* (rosa). B- Sobreposição das estruturas de *P. falciparum* (azul claro), *T. gondii* (azul escuro) e *Homo sapiens* (vermelho).

A comparação da superposição das estruturas da HGPRT de *Leishmania tarentolae* e de *Trypanosoma cruzi*, para os carbonos C α s são mostrados na Figura 51.

Figura 51 – Superposição das estruturas da HGPRT de *Leishmania tarentolae* (vermelho) com a de *Trypanosoma cruzi* (verde). Os elementos de estrutura secundária estão bem alinhados, visto a grande similaridade encontrada entre estas estruturas, com exceção do grande *loop* flexível que não é encontrado na HGPRT de *Leishmania tarentolae* (monômero inferior da Figura).

A comparação dos desvios médios quadráticos (rmsd) do carbono C α encontrados na sobreposição das estruturas da HGPRT e a porcentagem de similaridade em relação a seqüência da *Leishmania tarentolae* (tabela 9), indicam que as estruturas de HGPRT são bastante conservadas. A comparação dos sítios ativos mostra que estes também são bastante conservados, o que dificulta o desenho de drogas específicas para as proteínas de protozoários. A tabela 10 mostra as distâncias das pontes de hidrogênio, entre o ligante GMP e os átomos aos quais tal composto se encontra ligado (Figura 52), para a proteína de *Homo sapiens* e de *Leishmania tarentolae*. É importante ressaltar que a grande maioria das interações ocorre com átomos da cadeia principal da proteína.

Tabela 10 – Comparação entre os resíduos da HGPRT de humano e de *L. tarentolae* e as pontes de hidrogênio formadas entre os átomos da base com os átomos da proteína e dos átomos do grupo fosfato com os átomos da proteína.

Átomo 1 GMP	Átomo 2 proteína	Resíduo humana	Distância (Å)	Átomo 2 proteína	Resíduo <i>L.tarentolae</i>	Distância (Å)
O2P	N	Thr-141	2,9	N	Thr-133	3,0
	OG1	Thr-138	3,0	OG1	Thr-133	2,6
	OG1	Thr-141	2,9			
O3P	OG1	Thr-138	2,6	OG	Ser-130	2,6
	N	Thr-138	2,9	N	Ser-130	2,9
O1P	N	Gly-139	3,1	N	Asp-129	2,9
	N	Asp-137	3,1	N	Ala-131	3,0
O3'	OE1	Glu-133	2,9	OD1	Asp-126	2,8
N7				NZ	Lys-157	2,9
O6	NZ	Lys-165	2,5	N	Val-179	2,8
				NZ	Lys-157	2,9
N1	O	Val-187	3,0	O	Val-179	2,8
N2	O	Val-187	3,0	O	Asp-185	2,8
	O	Asp-193	3,0			

Na Figura 52 são observadas algumas diferenças nos padrões de pontes de hidrogênio entre as estruturas da HGPRT de *Homo sapiens* e de *Leishmania tarentolae*. Entre elas, a ponte de hidrogênio para o átomo de oxigênio da ribose se dá através do Glu133 na enzima humana, e pelo Asp126 na enzima de *Leishmania tarentolae*. Na base guanina o átomo O6 é coordenado apenas por Lys167 na estrutura da enzima humana, enquanto que em *Leishmania tarentolae* ele é coordenado pelo átomo de N do resíduo Val179 e pelo átomo NZ do resíduo Lys157. O átomo NZ do resíduo Lys157 coordena concomitantemente o átomo N7 da base que não é observada na estrutura humana.

Na ligação do grupo 5'-fostato é observada uma ponte entre o resíduo de Thr138 e o átomo O2P do fosfato, na estrutura humana, ocorrência não observada em *Leishmania tarentolae*. Na estrutura de *Leishmania tarentolae* o resíduo Ser130 corresponde ao resíduo Thr138 da enzima humana.

Figura 52 – Comparação das interações entre o GMP e os resíduos do sítio ativo da HGPRT humana e de *Leishmania tarentolae*. **A** – Figura mostrando as pontes de hidrogênio entre a base guanina e os resíduos do sítio ativo na HGPRT humana. **B** - Figura mostrando as pontes de hidrogênio entre o grupo 5'-fosfato e os resíduos do *loop* III na HGPRT humana. **C** - Figura mostrando as pontes de hidrogênio entre a base guanina e os resíduos do sítio ativo na HGPRT de *Leishmania tarentolae*. **D** - Figura mostrando as pontes de hidrogênio entre o grupo 5'-fosfato e os resíduos do *loop* III na HGPRT de *Leishmania tarentolae*.

Apesar das diferenças observadas, a estrutura humana apresenta variações das pontes de hidrogênio formadas entre o ligante e o sítio ativo para cada monômero, em termos das distâncias das ligações, e no próprio padrão das pontes. Além disso, a estrutura humana apresenta o resíduo Lys68 do *loop* I na conformação *trans*, o que pode conduzir às mudanças observadas entre a estrutura humana e de *Leishmania*

tarentolae. Com isso, pode-se concluir que esses dados comparativos não são conclusivos para detectar diferenças significativas para o desenho específico de drogas para a enzima HGPRT de *Leishmania tarentolae*.

Capítulo 8

VIII – Conclusões e perspectivas futuras

VIII.1 - Conclusões

O sistema de expressão utilizando o vetor **pET29a** em células de *Escherichia coli* BL21(DE3) proporcionou um grande rendimento na produção da proteína HGPRT recombinante. O método desenvolvido para purificação da proteína HGPRT recombinante foi eficiente, sendo obtida a proteína em alto grau de pureza.

Os dados de constantes cinéticas mostraram que a HGPRT de *Leishmania tarentolae* apresenta elevada constante catalítica, semelhante àsquelas encontradas para *Leishmania donovani*. Nesses organismos foram encontrados valores mais elevados que os encontrados para o gênero *Trypanosoma* e os outros organismos comparados. A comparação das constantes cinéticas de diferentes organismos aponta para um mecanismo cinético diferenciado para o gênero *Trypanosoma*, onde o produto IMP deve ser liberado do sítio ativo mais rapidamente que o GMP.

A cristalização da proteína HGPRT recombinante de *Leishmania tarentolae* foi conseguida em diferentes condições, porém a grande maioria dos cristais obtidos difratavam acima de 3,0 Å, sendo que o melhor cristal obtido difratou a 2,1 Å, proporcionando a resolução da estrutura pesquisada. O fato de cristais provenientes da mesma gota do cristal que teve o conjunto de dados coletado, apresentarem padrões de difração acima de 3,0 Å e em novas tentativas de cristalização na mesma

condição, apresentarem cristais ainda piores, sugere que uma condição reproduzível para obtenção de cristais com boa resolução, não foi eficientemente determinada.

A estrutura cristalográfica da HGPRT de *Leishmania tarentolae* foi resolvida evidenciando grande semelhança do enovelamento da proteína de modo global e quanto à disposição dos resíduos do sítio ativo, quando comparada com a estrutura de HGPRT de *Trypanosoma cruzi* utilizada como modelo.

Embora a proteína HGPRT não compartilhe o sítio ativo, a formação de dímero ou tetrâmero é fundamental na reação enzimática. Na análise estrutural de várias HGPRTs é observado dois resíduos importantes presentes nos *loop* I e IV, que participam na ligação do PRPP e estão em contato direto na interface do dímero. Os resíduos Lys66 do *loop* I e Arg191 do *loop* IV, participam da ligação do grupo PP_i vindo PRPP. A diferença da ligação *cis-trans*, observada nas estruturas da HGPRT de *Homo sapiens* e de *Leishmania tarentolae*, reflete em certas mudanças dos arranjos da interação dimérica e no sítio ativo. Na configuração *cis*, o grupo guanidínico do resíduo Arg191 (*Leishmania tarentolae*) é empacotado pelos grupos carboxílicos dos resíduos Asp185 (interação com Mg⁺²) e Glu188, apenas por interação de van der Waals. O resíduo Glu188 faz ponte de hidrogênio com o resíduo Lys66. Na configuração *trans* o grupo guanidínico do resíduo Arg199 (humana) faz ponte de hidrogênio com o oxigênio do resíduo Gly69 dentro da mesma cadeia, enquanto que o resíduo Lys68 faz ponte de hidrogênio com o resíduo Asp193 (interação com Mg⁺²) e o resíduo Glu196 faz interação de van der Waals na interface das cadeias com o resíduo Thr95. Na estrutura humana em configuração *cis* é encontrado o mesmo padrão descrito para a estrutura de *Leishmania tarentolae*.

A sobreposição de várias estruturas de HGPRT de diferentes organismos mostrou que o sítio ativo parece ser bastante conservado e a maioria das ligações da

proteína com o ligante ocorre através dos grupos carbonilas e hidroxilas, da cadeia principal dos resíduos. No entanto, a grande mobilidade dos *loops*, que participam do sítio ativo na catálise, pode resultar em pequenas diferenças de movimentos e organizações desses *loops*, devido às diferenças dos resíduos que constituem a proteína HGPRT nos diferentes organismos. Como consequência, podem ser obtidos inibidores mais eficientes para a enzima de protozoários que para a humana, sendo tal fato, de vital importância no desenho racional de drogas. Inibidores mais eficientes para enzima de protozoário foram obtidos para a estrutura da HGXPRT de *Tritrichomas foetus* e a HGPRT de *Trypanosoma cruzi*. Apesar desses inibidores serem mais eficazes para a enzima de protozoários que para enzima humana, eles não são totalmente seletivos, afetando a atividade da enzima humana. Esse fato pode ocorrer devido à conservação estrutural do sítio ativo nos diferentes organismos.

O estudo da dinâmica da proteína HGPRT de protozoários e de humano, durante todo o processo de catálise, pode fornecer resultados interessantes em termos de diferenças na reação enzimática. Esse estudo poderia fornecer ainda, diferenças nos movimentos da proteína humana e de protozoário que poderiam ser utilizados no desenho racional de drogas. Para esse estudo deveriam ser utilizadas técnicas como dinâmica molecular, fluorescência, espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAX), ressonância magnética nuclear (NMR) e outras. Dentre essas técnicas, NMR seria limitada pelo tamanho das proteínas, uma vez que essas proteínas são ativas apenas nas formas diméricas e tetraméricas. A técnica de fluorescência evidencia as mudanças que podem ocorrer nos diferentes estágios da reação, porém estruturalmente essas diferenças não seriam visualizadas. Na técnica de SAX, poderiam ser obtidas as informações dos diferentes volumes e formas da enzima para os diferentes estágios de reação, porém sem a informação estrutural das distâncias

atômicas. No entanto, os resultados obtidos por SAX e aqueles das estruturas resolvidas por difração de raios-X podem ser utilizados para técnica computacional de dinâmica molecular, que pode apresentar resultados interessantes quando comparados para enzima humana e de protozoários, auxiliando no entendimento da complicada catálise realizada por essa enzima, possibilitando a aplicação no desenho de drogas seletivas.

A enzima HGPRT apresenta uma dificuldade intrínseca no que diz respeito ao desenho racional de drogas, que vem de um sítio ativo conservado nas diferentes espécies cujas estruturas foram resolvidas e, além disso, é facilmente observado que a integridade da reação enzimática depende não só apenas dos resíduos que fazem parte do sítio ativo, mas também de um grande número de resíduos distantes a este sítio. Um exemplo disso é a grande quantidade de mutações observadas na HGPRT humana, distantes do sítio ativo e que conduzem a artrites de gota.

Apesar da validação da HGPRT, bem como a via de recuperação de purinonucleotídeo, serem questionadas como alvo para o desenho racional de drogas, a resolução da estrutura cristalográfica da HGPRT de *Leishmania tarentolae* fornece informações relevantes que somada às outras estruturas resolvidas pode vir a auxiliar na compreensão dos aspectos estruturais e funcionais desta interessante proteína, além disso, a resolução da estrutura da HGPRT de *Leishmania tarentolae* demonstra ser de grande interesse no estudo acadêmico e comparativo.

A HGPRT sozinha não pode ser utilizada como alvo para o desenho de drogas, porém ela e a XPRT juntas, ainda não descartam a via de recuperação de purinonucleotídeos para esse fim. Com isso, a estrutura da HGPRT de *Leishmania tarentolae*, determina com resolução adequada para os estudos de modelagem com inibidores pode oferecer grandes perspectivas científicas futuras.

De maneira global os objetivos deste trabalho de expressão, purificação, cristalização e resolução da estrutura cristalográfica foram obtidos. Além disso, foi encontrado inibidor comercial com IC_{50} na ordem de 94 μM , que pode ser inicialmente utilizado como composto guia para o desenho de droga. No entanto, nos testes de co-cristalização com esses inibidores não foram obtidos cristais para iniciar atividades direcionadas para o desenho de drogas. Um resultado interessante em relação aos inibidores foi o IC_{50} de 180 μM apresentado pela cefotaxima, que é um antibiótico cefalosporina de terceira geração, sendo menor que o IC_{50} de 194 μM apresentado pelo alopurinol. Esse último composto é um substrato subversivo que tem dado bons resultados no tratamento de leishmanioses cutâneas e doenças de chagas. Testes *in vivo* utilizando a combinação de alopurinol e cefotaxima, em *Leishmania* e *Trypanosoma*, podem resultar em fatos interessantes, podendo aumentar a eficácia obtida do que aquela quando é administrado somente alopurinol.

VIII.2 – Perspectivas futuras

Como a estrutura da HGPRT de *Leishmania tarentolae* foi solucionada com boa resolução (2,1 Å), ela pode ser utilizada na busca de compostos líderes através de métodos computacionais de “virtual screening”, cujo princípio se baseia na docagem das moléculas, vindas de uma biblioteca de compostos comerciais disponíveis. O uso desse método ajuda a encontrar bons compostos guias. Outro método para a busca de compostos guias é a triagem de compostos naturais, onde compostos previamente isolados, ou semi-purificados, são testados diretamente na atividade da enzima, enquanto no método de docagem, os melhores compostos obtidos devem ser testados na inibição da atividade enzimática.

Os compostos que demonstrarem boa capacidade inibitória na ordem de poucos μM para nM , obtidos pelo método de docagem ou vindo de produtos naturais, devem ser utilizados em experimentos de co-cristalização e difração de raios-X. A partir da resolução da estrutura cristalográfica da enzima em complexo com o composto de partida, se iniciaria o desenho racional de drogas. A visualização do composto de partida no sítio ativo nos permite direcionar as possíveis modificações a serem efetuadas nesse composto de partida, nas posições que possam promover uma maior interação entre ele e o sítio ativo aumentando sua eficiência. As mudanças no composto de partida podem ser realizadas pela química combinatória, que pode disponibilizar testes referentes aos diferentes grupos orgânicos, na eficiência da interação entre o composto modificado e o sítio ativo.

Um dos aspectos preocupantes com respeito a drogas desenvolvidas é o desenvolvimento de resistência às drogas pelos organismos através de mutações. A técnica de DNA-Shuffling (evolução *in vitro*) gera mutações aleatórias que podem ser selecionadas de acordo com as características desejadas pelo pesquisador. A seleção dos genes mutantes pode ser feita com uso do composto em potencial (droga), onde os genes mutantes selecionados terão a informação das mutações que conferem resistência àquele composto particular. A resolução da estrutura dessa proteína mutante pode informar as possíveis modificações daquele composto potencial. Assim poderia ser gerada uma droga que atuasse na proteína selvagem, bem como produzir compostos (drogas) que atuariam nos organismos que apresentassem resistência àquela droga inicial.

Capítulo 9

IX – Referências Bibliográficas

- Alencar, J. E. & Neves, J. In: Veronesi, R. (ed). *Doenças Infecciosas e Parasitárias*, Guanabara, Rio de Janeiro, v. 7, p. 724-738, 1987.
- Allen, T. & Ullman, B. Cloning and expression of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene from *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research*, v. 21 (23), p. 5431-5438, 1993.
- Allen, T. E. & Ullman, B. Molecular characterization and overexpression of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 65, p. 233- 245, 1994.
- Allen, T., Hwang, H. Y., Wilson, K., Hanson, S., Jardim, A. & Ullman, B. Cloning and expression of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 74, p. 99-103, 1995.
- Aronov, A. M., Munagala, N. R., Montellano, P. R. O., Kuntz, I. D. & Wang, C. C. Rationa Design of Selective Submicromolar Inhibitors of *Trichomonas foetus* Hypoxanthine-Guanine-xantine Phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, v. 39, 4684 – 4691, 2000.
- Balendiran, G. K., Molina, J. A., Xu, Y., Torres-Martinez, J., Stevens, R., Focia, P. J., Eakin, A. E., Sacchettine, J. C. & Craig III, S. P. Ternary complex structure of human HGPRTase, PRPP, Mg 2+, and the inhibitor HPP reveals the involvement of the flexible loop in substrate binig. *Protein Science*, v. 8, p. 1023-1031, 1999.

- Beck, J. T. & Wang, C. C. The hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase from *Tritrichomonas foetus* has unique properties. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.60, p. 187-194, 1993.
- Berens R. L., Marr, J. J., Lafon, S. W. and Nelson, D. J. Purine metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 3. p. 187 – 196, 1981.
- Berens, R. L., Krug, E. C. & Marr, J. J. Purine and pirimidine metabolism. In: Marr, J.J. & Muller, M., (eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*, Academic Press, London, p. 89-117, 1995.
- Blattner, J., Swinkels, B., Dorsan, H., Prospero, T., Subramani, S. & Clayton, C. Glycosome assembly in trypanosomes: variations in the acceptable degeneracy of a COOH-terminal microbody targeting signal. *The Journal of Cell Biology*, v. 119, p. 1129-1136, 1992.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- Bricogne, G. The EEC cooperative programming workshop on position-sensitive detector software. In: Helliwell, J. R., Machin, P. A. & Papiz, M. Z. (eds). *Proceedings of the CCP4 study weekend. Computational aspects of protein crystal data analysis*, Daresbury, Chadwick Library, p. 120-146, 1987.
- Brünger, T. A., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nigles, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., Warren, G. L.. Crystallography and NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica*, v. D54, p. 905-921, 1998.

- Canyuk, B., Focia, P. J. & Eakin, A. E. The role for invariant aspartic acid in hypoxanthine phosphoribosyltransferases is examined using saturation mutagenesis, functional analysis, and X-ray crystallography. *Biochemistry*, v. 40, p. 2754-2765, 2001.
- Creighton, T. E. Proteins-structures and molecular properties, *W. H. Freeman and Company*, New York, 1993.
- Donald, R. G. K., Carter, D., Ullman, B. & Roos, D. S. Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hipoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gen. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 14010-14019, 1996.
- Dovey, H. F., Mckerrrow, J.H. & Wang, C. C. Purine salvage in *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 11, p. 157-167, 1984.
- Ducruix, A., Giegé, R. (eds). *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach*, Oxford University Press, 1992.
- Eads, J. C., Ozturk, D., Wexler, T. B., Grubmeyer, C. & Sacchettini, J. C. A new function for a common fold: the crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase. *Structure*, v. 5, p. 47-58, 1997.
- Eads, J. C., Scapin, G., Xu, Y., Grubmeyer, C., Sacchettini, J. C. The crystal structure of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase with bound GMP. *Cell*, v. 78, p. 325-334, 1994.
- Eakin, A. E., Guerra, A., Focia, P. J., Torres-Martinez, J. & Craig, S. P. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi* as a target for structure-based inhibitor design: crystalization and inhibition studies with purine analogs. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.41, n. 8, p. 1686-1692, 1997.
- Engh, R., Huber, R. Accurate bond and angle parameters for X-ray protein-structure refinement. *Acta Crystallographica*, v. A47, p. 392-400, 1991.

- Fish, W. R., Looker, D. L., Marr, J. J. & Berens, R. L. Purine metabolism in the bloodstream forms of *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma rhodesiense*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 719, p. 223 – 231, 1982.
- Focia, P. J., Craig III, S. P., Nieves-Alicea, R., Fletterick, R. J., Eakin, A. E.. A 1.4Å crystal structure for the hypoxanthine phosphoribosyltransferase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry*, v. 37 (43), p. 15066-15075, 1998a.
- Focia, P. J., Craig III, S. P. & Eakin, A. E. Approaching the transition state in the crystal structure of a phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, v. 37 (49), p. 17120-17127, 1998b.
- French, G. S. & Wilson, K. S. On the treatment of negative intensity observations. *Acta Crystallographica*, v. A34, p. 517-525, 1978.
- Free, M. L. Gordon, R. B., Keough, D. T., Beacham, I. R., Emmerson, B. T. & de Jersey, J. Expression of active human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, v 1087, p. 205 - 211, 1990.
- French, G. S. & Wilson, K. S. On the treatment of negative intensity observations. *Acta Crystallographica*, v. A34, p. 517-525, 1978.
- Gallerano, R. H., Sosa, R. R. & Marr, J. J. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. V. 43, p. 159-166, 1990.
- Garman, E. F., Schneider, T. R. Macromolecular Cryocrystallography. *Journal of Applied Crystallography*, v. 30, p. 211-237, 1997.
- Geary, T. G. & Jensen, D. J. In: Campbell, W. C. & Rew, R. S. (eds). *Chemotherapy of Parasitic Diseases*, Plenum Press, New York, p. 87-114, 1986.

- Geary, T. G., Edgar, A. & Jensen, J. B. In: Campbell, W.C. & Rew, R.S. (eds). *Chemoterapy of Parasitic Diseases*, Plenum Press, New York, p. 209-238, 1989.
- Giacomello, A. & Salerno C., Human hypoxanthine-guanine phosphoribosiltransferas steady state kinetics of the forward and reverse reactions. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 253, n. 17, p. 6030-6044, 1978.
- Giacovazzo, C., Monaco, H. L., Viterbo, D., Scordari, F., Gilli, G., Zanotti, G., Catti, M. *Fundamentals of Crystallography*. Oxford University Press, cap. 8, p. 540-560, 1995.
- Goitein, R. K., Chelsky, D. & Parsons, S. M. Primary ¹⁴C and alpha secondary ³H substrate kinetic isotope effects for some phosphoribosyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 253, p. 2963-2971, 1978.
- Greer, J., Erickson, J. W., Baldwin, J. J. & Varney, M. D. Application of the three-dimensional structures of protein target molecules in structure-based drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 37, p. 1035-1054, 1994.
- Guddat, L. W. Vós, S. martin, J. L. Keough, D. T. & De Jersey J. Crystal structure of free, IMP-, and GMP-bound *Escherichia coli* hypoxanthine phosphoribosyltransferase. *Protein Science*, v. 11, p. 1626 – 1638, 2002.
- Gutteridge, W. E. & Davies, M. J. Properties of the purine phosphoribosyltransferases of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 13, p. 207-212, 1982.
- Hammond, D. J., Aman, R. A. & Wang, C. C. The role of compartmentation and glycerol kinase in the synthesis of ATP within the glycosome of *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 260, p. 15646-15654, 1985.
- Hassan, H. F. & Coombs, G. H. A comparative study of the purine- and pyrimidine metabolizing enzymes of a range of trypanosomatids. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 84B, p. 217-223, 1986.

- Hassan, H. F., Mottram, J. C. & Coombs, G. H. Subcellular localization of purine-metabolising enzymes in *Leishmania mexicana mexicana*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 81B, p. 1037-1040, 1985.
- Hwang, H. Y & Ullman, B. Genetic analysis of purine metabolism in *Leishmania donavani*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272 (31), p. 19488 – 19496, 1997.
- Henriksen, A., Aghajari, N., Jensen, K. F. & Gajhede, M. A flexible loop at the dimer interface is a part of the active site of the adjacent monomer of *Escherichia coli* orotate phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, v. 35, p. 3803-3809, 1996.
- Héroux, A., White, E. L., Ross, L. J., Davis, R. L. & Borhani, D. W. Crystal structures of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase with XMP, pyrophosphate, and Two Mg²⁺ ions bound: Insights into catalytic mechanism. *Biochemistry*, v. 38 (44), p. 14495-14506, 1999a.
- Héroux, A., White, E. L., Ross, L. J., Davis, R. L. & Borhani, D. W. Crystal structures of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase –GMP and –IMP complexes: Comparison of purine binding interactions with the XMP complex. *Biochemistry*, v. 38 (44), p. 14485-14494, 1999b.
- Héroux, A., White, E. L., Ross, L. J., Kuzin, A. P. & Borhani, D. W. Substrate deformation in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase ternary complex: The structural basis for catalysis. *Structure*, v. 8, p. 1309-1318, 2000.
- Hodel, A., Kim, S. H., Brünger, A. T. Model bias in macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica*, v. 48A, p. 851-858, 1992.
- Hooft, R. M., Vriend, G., Sander, C. & Abola, E. E. Errors in protein structures. *Nature*, v. 381, p. 272-272, 1996.

- Howlin, B., Butler, S.A., Moss, D. S., Harris, G. W. & Driessen, H. P. C. TLSANL: TLS parameters analysis program for segmented anisotropic refinement of macromolecular structures. *Journal of Applied Crystallography*, v. 26, p. 622-624, 1993.
- Hutchinson, E. G. & Thornton, J. M. PROMOTIF: A program to identify and analyze structural motifs. *Protein Science*, v. 5, p. 212-220, 1996.
- Iovannisci, D. M., Goebel, D., Allen, K., Kaur, K. & Ullman, B. Genetic analysis of adenine metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. Evidence for diploidy at the adenine phosphoribosyltransferase locus. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 259, p. 14617-14623, 1984.
- Jancarik, J. & Kim, S. H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography*, v. 24, p. 409-411, 1991.
- Jardim, A. & Ullman, B. The conserved serine-tyrosine dipeptide in *Leishmania donovani* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase is essential for catalytic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 8967-8973, 1997.
- Jiang, Y., Allen, T. E., Carter, D., Ray, D. S. & Ullman, B. *Crithidia fasciculata*: Isolation, sequencing, and expression of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. *Experimental Parasitology*, v. 82, p. 73-75, 1996.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in this models. *Acta Crystallographica*, v. A47, p. 110-119, 1991.
- Johnson, G. G., Eisenberg, L. R. & Migeon, B. R. Human and mouse hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferases: dimmers and tetramers. *Science*, v. 203, p. 174-176, 1979.

- Kanaani, J., Maltby, D., Somoza, J. R. & Wang, C. C. Inactivation of *Tritrichomonas foetus* and *Schistosoma mansoni* purine phosphoribosyltransferase by arginine-specific reagents. *Europe Journal of Biochemistry*, v. 244, p. 810 – 817, 1997.
- Kelley, W. N., Greene, M. L., Rosenbloom, F. M., Henderson, J. F., Seegmiller, J. E. Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase deficiency in gout. *Annals of Internal Medicine*, v. 70, p. 155-206, 1969.
- Keough , D. T., McConachie, L. A., Gordon, R. B., de Jersey, J. & Emmerson, B. T. Human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. Development of a spectrophotometric assay and its use in detection and characterization of mutant forms. *Clinica Chimica Acta*, v. 163, p. 301-308, 1987.
- Keough, D. T., Ng , A-L, Winzor, D. J., Emmerson, B. T., de Jersey, J. Purification and characterization of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase and comparison with the human enzyme. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 98, p. 29 – 41, 1999.
- Kidder, G. W., Dewey, V. C. & Nolan, L. L. Adenine deaminase of a eukaryotic animal cell, *Crithidia fasciculata*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 183, p. 7-12, 1977.
- Kleywegt, G. J., Brünger, A. T. Checking your imagination: applications of the free R value. *Structure*, v. 4, p. 897-904, 1996.
- Kleywegt, G. J. Validation of protein crystal structure. *Acta Crystallographica*, v. D56, p. 249-265, 2000.
- Kovacs, J. A. & Masur, H. In: Campbell, W. C. & Rew, R. S. (eds). *Chemotherapy of Parasitic Diseases*, Plenum Press, New York, p. 139-158, 1986.
- Krahn, J. M., Kim, J. H., Burns, M. R., Parry, R. J., Zalkin, H. & Smith, J. L. Coupled formation of an amidotransferase interdomain ammonia channel and a phosphoribosyltransferase active site. *Biochemistry*, v. 36, p. 11061-11068, 1997.

- Krenitsky, T. A., Neil, S. M. & Miller, R. L. Guanine and xanthine phosphoribosyltransfer activities of *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli*. Their relationship to hypoxanthine and adenine phosphoribosyltransfer activities. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 245 (10), p. 2605-2611, 1970.
- Krug, E. C., Marr, J. J. & Berens, R. L. Purine metabolism in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 264, p. 10601-10607, 1989.
- Kubinyi, H. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, v. 1, p. 4-15, 1998.
- Laemmili, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1979.
- Lafon, S. W., Nelson, D. J., Berens, R. L. & Marr, J. J. Purine and pyrimidine salvage pathways in *Leishmania donovani*. *Biochemistry and Pharmacology*, v. 31, p. 231-238, 1982.
- Lamzin, V. S., Wilson, K. S. Automated refinement of protein models. *Acta Crystallographica*, v. D49, p. 129-147, 1993.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. PROCHECK: A program to check stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, v. 5, p. 212-220, 1993.
- Lee, C. C., Craig III S. P. & Eakin, A. E. A single amino acid substitution in the human and a bacterial hypoxanthine phosphoribosyltransferase modulates specificity for the binding of guanine. *Biochemistry*, v. 37 (10), p. 3491-3498, 1998.
- Nelson, L. D. & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, third edition, Worth Publishers, 2000.

- Looker, D. L., Berens, R. L. & Marr, J. J. Purine metabolism in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 9, p. 15 – 28, 1983.
- Lovell, S. C., Word, J. M., Richardson, J. S., Richardson, D. C. The penultimate rotamer library. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, v. 40, p. 389-408, 2000.
- Mardsen, P. D. & Arruda, Z. In: Veronesi, R. (ed). *Doencas infecciosas e parasitarias*, Guanabara, Rio de Janeiro, v. 7, p. 739-752, 1987.
- Marr, J. J. & Berens, R. L. Pyrazolopyrimidine metabolism in the pathogenic trypanosomatidae. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 7, p. 339-356, 1983.
- Marr, J. J. & Ullman, B. In: Marr, J.J. & Muller, M. (eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*, Academic Press, London, p. 323-336, 1995.
- Marr, J., Berens, R. & Nelson, D. Purine metabolism in *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 544, p. 360-371, 1978.
- Martinez, S. & Marr, J. J. Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine*, v. 326, p. 741-744, 1992.
- Matthews, B. W. Solvent content of protein crystal. *Journal of Molecular Biology*, v. 33, p. 491-497, 1968.
- Miller, R. L., Ramsey, G. A., Krenitsky, T. A. & Elion, G. B. Guanine phosphoribosyltransferase from *Escherichia coli*. Specificity and properties. *Biochemistry*, v. 11, p. 4723-4731, 1972.
- Monzani, P. S., Alfonso, J. D., Simpson, L., Oliva, G. & Thiemann, O. H. Cloning, characterization and preliminary crystallographic análisis of *Leishmania* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1598, p. 3-9, 2002.

- Munagala, N. R., Chin, M. S. and Wang, C. C. Steady-state kinetics of the hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase from *Tritrichomonas foetus*: The role of threonine-47. *Biochemistry*, v. 37, p. 4045-4051, 1998.
- Murshudov, G., Vagin, A., Dodson, E. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica*, v. D53, p. 240-255, 1997.
- Musick, W. D. Structural features of the phosphoribosyl transferase and their relationship to the human deficiency disorders of purine and pyrimidine metabolism. *CRC - Critical Review in Biochemistry*, v. 11, p. 1-34, 1981.
- Navaza, J. AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallographica*, v. A50, p. 157-163, 1994.
- Ogbunode, P. O. & Ikediobi, C. O. Comparative aspects of purine metabolism in some African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 9, p. 279 – 287, 1983.
- Otzurk, D. H., Dorfman, R. H., Scapin, G., Sacchettini, J. C. & Grubmeyer, C. Structure and function of *Salmonella typhimurium* orotate phosphoribosyltransferase: Protein complementation reveals shared active sites. *Biochemistry*, v. 34, p. 10764-10770, 1995.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology*, v. 276, p. 307-326, 1997.
- Palella, T. D. & Fox, I. H. In: Scriver, C.S., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. (eds). *The metabolic basis of inherited diseases*, McGraw-Hill, New York, p. 965-1006, 1989.
- Ramakrishnan, C. & Ramachandran, G. N. Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. 2. Allowed conformations for a pair of peptide units. *Biophysics Journal*, v. 5, p. 909-933, 1965.

- Read, R. J. Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors in these models. *Acta Crystallographica*, v. A42, p. 140-149, 1986.
- Reyes, P., Rathod, P. K., Sanchez, D. J., Mrema, J. E., Rieckmann, K. H. & Heidrich, H. G. Enzymes of purine and pyrimidine metabolism from the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 5, p. 275-290, 1982.
- Rice, L. M., Brünger, A. T. Torsion angle dynamics: Reduced variable conformational sampling enhances crystallographic structure refinement. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, v. 19, p. 277-290, 1994.
- Sambrook, J. Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning - a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press), Cold Spring Harbor, 1989.
- Scapin, G., Grubmeyer, C. & Sacchettini, J. C. Crystal structure of orotate phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, v. 33, p. 1287-1294, 1994.
- Scapin, G., Ozturk, D. H., Grubmeyer, C. & Sacchettini, J. C. The crystal structure of the orotate phosphoribosyltransferase complexed with orotate and .alpha.-D-5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate. *Biochemistry*, v. 34, p. 10744-10754, 1995.
- Schwartzman, J. D. & Pfefferkorn, E. R. *Toxoplasma gondii*: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. *Experimental Parasitology*, v. 53, p. 77-86, 1982.
- Schomaker, V. & Trueblood, K. N. Correlation of internal torsional motion with overall molecular motion in crystals. *Acta Crystallographica*, v. B54, p. 507-512, 1998.
- Schumacher, M. A., Carter, D., Roos, D. S. & Ullman, B. Crystal structure of *Toxoplasma gondii* HGXPRTase reveal the catalytic role of a long flexible loop. *Nature Structural Biology*, v. 3 (10), p. 881-887, 1996.

- Seegmiller, J. E., Rosenbloom, F. M. & Kelley, W. N. Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. *Science*, v. 155, p. 1682-1684, 1967.
- Shi, W., Li, C. M., Tyler, P. C., Furneaux, R. H., Grubmeyer, C., Schramm, V. L. & Almo, S. C. The 2.0 Å structure of human hypoxanthine-guanine fosforibosyltransferase in complex with a transition-state analog inhibitor. *Nature Structural Biology*, v. 6 (6), p. 588-593, 1999a.
- Shi, W., Li, C. M., Tyler, P. C., Furneaux, R. H., Cahill, S. M., Girvin, M. E., Grubmeyer, C., Schramm, V. L. & Almo, S. C. The 2.0 Å structure of malarial purine fosforibosyltransferase in complex with a transition-state analog inhibitor. *Biochemistry*, v. 38 (31), 9872-9880, 1999b.
- Shih, S., Hwang, H. Y., Carter, D., Stenberg, P., Ullman, B. Localization and Targeting of the *Leishmania donovani* Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase to the Glycosome. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 3, p. 1534-1541, 1998.
- Sommer, J. M., Cheng, Q. L, Keller, G. A. & Wang, C. C. In vivo import of firefly luciferase into the glycosomes of *Trypanosoma brucei* and mutational analysis of the C-terminal targeting signal. *Molecular Biology of the Cell*, v. 3, p. 749-759, 1992.
- Somozoa, J. R., Skillman, A. G., Munagala, N. R., Oshiro, C. M., Knegtel, R. M. A., Mpoke, S., Fletterick, R. J., Kuntz, I. D. & Wang, C. C. Rational design of novel antimicrobials: Blocking purine salvage in a parasitic protozoan. *Biochemistry*, v. 37, p. 5344- 5348, 1998.
- Somozoa, J. R., Chin, M. S., Focia, P. J., Wang, C. C. & Fletterick, R. J. Crystal structure of the hypoxanthine-guanine-xantine phosphoribosyltransferase from the protozoan parasite *Tritrichomonas foetus* - *Biochemistry* v.35, 7032-7040, 1996.
- Stout, J. T. & Caskey, C. T. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. & Valle, D. (eds). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Sixth edition, New York: Mc Graw-Hill, p. 1007-1028, 1989.

- Tao, W., Grubmeyer, C. & Blanchard, J. S. Transition state structure of *Salmonella typhimurium* orotate phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, v. 35, p. 14-21, 1996.
- Trager, W. Nutrition of hemoflagellate (*Leishmania tarentolae*) having an interchangeable requirement for choline or pyridoxal. *Journal of Protozoology*, v. 4, p. 269-276, 1957.
- Tuttle, J. V. & Krenitsky, A. T. Purine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 255 (3), p. 909-916, 1980.
- Ullman, B. & Carter, D. Molecular and biochemical studies on the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase of the pathogenic haemoflagellates. *International Journal for Parasitology*, v. 27 (2), p. 203-213, 1997.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 76, p. 615-619, 1979.
- Vos, S., de Jersey, J. & Martin, J. L. Crystal structure of *Escherichia coli* xanthine phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, v. 36, p. 4125-4134, 1997.
- Walter R. D. & König E. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and adenine phosphoribosyltransferase from *Plasmodium chabaudi*, purification and properties. *Tropenmed Parasitology*, v. 25, p. 227 – 235, 1974.
- Wang, F., Shi, W., Nieves, E., Angeletti, R. H., Schramm, V. L. & Grubmeyer, C. A transition-state analogue reduces protein dynamics in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, v. 40, p. 8043-8054, 2001.
- Wilson, A. J. C. The probability distribution of X-ray intensities. *Acta Crystallographica*, v. 2, p. 318-321, 1949.

Wilson, J. M., Stout, J. T., Pallela, T. D., Davidson, B. L., Kelley, W. N. & Caskey, C. T. A molecular survey of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency in man. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 77, p. 188-195, 1986.

Xu, Y., Eads, J. C., Sacchettini, J. C. & Grubmeyer, C. Kinetic mechanism of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: rapid phosphoribosyl transfer chemistry. *Biochemistry*, v. 36 (12), p. 3700-3712, 1997.

Xu, Y., & Grubmeyer, C. Catalysis in human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: asp 137 acts as a general acid/base. *Biochemistry*, v. 37 (12), p. 4114-4124, 1998.

Yuan, L., Craig, S. P., III, McKerrow, J. H. & Wang, C. C. Steady-state kinetics of the schistosomal hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Biochemistry* v. 31, p. 806-810, 1992.