UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LARISSA ROMANELLO

Estudos das enzimas adenosina kinase isoforma 1, hipoxantina-guanina
fosforibosiltransferase isoformas 1, 2 e 3, adenilsuccinato liase,
adenilsuccinato sintetase de *Schistosoma mansoni*

São Carlos
2016

LARISSA ROMANELLO

Estudos das enzimas adenosina kinase isoforma 1, hipoxantina-guanina
fosforibosiltransferase isoformas 1, 2 e 3, adenilsuccinato liase,
adenilsuccinato sintetase de *Schistosoma mansoni*

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto
de Física de São Carlos da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Doutora em
Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Humberto
D'Muniz Pereira

Versão Original

São Carlos
2016

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

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Romanello, Larissa

Estudos das enzimas adenosina kinase isoforma 1, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase isoformas 1, 2 e 3, adenilsuccinato liase, adenilsuccinato sintetase de Schistosoma mansoni. / Larissa Romanello; orientador Humberto D`Muniz Pereira -- São Carlos, 2016.
160 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Schistosoma mansoni. 2. Via de salvação de purinas. 3. Hipoxantina-Guanina. 4. Fosforibosiltransferase. 5. Adenilsuccinato Liase. I. Pereira, Humberto D`Muniz, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Larissa Romanello

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

Aprovado(a) em: 03/06/2016

Comissão Julgadora

Dr(a). Humberto D'Muniz Pereira

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Andrea Soares da Costa Fuentes

Instituição: (UFSCar/São Carlos)

Dr(a). Carlos Henrique Inacio Ramos

Instituição: (UNICAMP/Campinas)

Dr(a). Ariel Mariano Silber

Instituição: (ICB/USP)

Dr(a). Richard John Ward

Instituição: (FFCLRP/USP)

Dedicado à minha mãe Vera Aparecida Horvatte, meu maior exemplo de vida, de força, de espiritualidade e de amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Humberto pelos anos de convivência e aprendizado constante. Que na ausência do meu pai, ao longo desses anos foi minha referência como tal. Gratidão por me dizer “sim” em 2008 e sempre acreditar no meu trabalho. Todo o crescimento pessoal e profissional nesse período, assim como as conquistas materiais são frutos dessa confiança e companheirismo. Você é e sempre será pra mim uma grande referência como profissional e orientador.

À Deus pela presença constante em meu viver. Por me proporcionar experiências e pessoas grandiosas ao longo dessa jornada.

À minha amada mãe Vera e minhas queridas irmãs Karen e Vanessa pelo suporte familiar e apoio incondicional.

Ao meu companheiro Rafa (Bonito) por me ensinar sobre o amor na mais pura essência. Por todo suporte emocional e por tornar a minha vida mais completa e feliz todos os dias. Eu não teria conseguido sem você.

Aos queridos irmãos que a generosidade da vida me proporcionou Tati, Renan, Tiago e Serginho.

Às tchubis Aline, Fá e Josi por sempre me lembrarem como é maravilhoso ser rodeada de pessoas tão iluminadas.

Às negas Daia e Lívia por tão especial amizade desde meu primeiro dia na USP.

Aos meus amigos da Bio 05, que muito além de amigos, são uma grande família.

Ao amigo Alexandre Cassago por toda paciência e ensinamentos na minha iniciação na ciência.

Aos colaboradores do projeto José Brandão-Neto, Louise Bird, Joanne Nettleship, Ray Owens, Yamini Reddivari, Dr. Ricardo De Marco, Vitor Hugo Balasco Serrão e Ana Elisa Zeraik.

Aos professores do LBest Dr. Richard Charles Garratt, Dr. Otávio Henrique Thiemann e Dr. Eduardo Horjales.

Aos amigos do LBest: Bianca, Michel, Taty, Túlio, Gabi, Fer, Paola, Alan, Matheus, Naty, Tomás, Diego, Juliana, Marília, Ivan e Suzana e todos os outros que tive a oportunidade de conviver ao longo desses anos.

Aos queridos amigos que passaram pelo lab Maycou, Malu, Bachega, Ivani e Gustavo pelos maravilhosos dias de convivência e tão valiosa amizade.

Ao amigo Angelo Fragelli, que como proprietário da Orion Bartenders me deu grande suporte no início no doutorado sem bolsa.

Aos amigos do centro espírita Murilo, Nicole, Alex, Bianca, Diogo, Victor e Erik.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

“Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois...

A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor.”

CHICO XAVIER

RESUMO

ROMANELLO, L. **Estudos das enzimas adenosina kinase isoforma 1, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase isoformas 1, 2 e 3, adenilsuccinato liase, adenilsuccinato sintetase de *Schistosoma mansoni***. 2016. 160 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

O *Schistosoma mansoni*, parasita responsável pela esquistossomose (barriga d'água), doença que afeta cerca de 300 milhões de pessoas em todo mundo, não possui a via de síntese de purinas, dependendo integralmente da via de salvação de purinas para seu suprimento dessas bases. Uma vez que a terapia se resume a administração de um único fármaco, o praziquantel, diversos casos de resistência do parasita a esse medicamento foram reportadas, sendo assim esta via tem sido citada como alvo potencial para o desenvolvimento de novos fármacos contra a doença. As enzimas adenosina kinase (AK), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT), adenilsuccinato liase (ADSL) e adenilsuccinato sintetase (ADSS) são enzimas chave desta via. Este trabalho faz parte de um projeto maior que visa a obtenção de todas as estruturas das enzimas envolvidas na via de salvação de purinas de *Schistosoma mansoni*. O cDNA correspondente às enzimas foi amplificado e clonado no vetor de expressão pOPIN; as enzimas AK isoforma 1, HGPRT isoforma 1 e ADSL foram expressas em *E. coli* Lemo21(DE3) e HGPRT isoforma 3 em *E. coli* B834(DE3); purificadas em coluna de cobalto agarose por afinidade, concentradas e cristalizadas no kit de cristalização Morpheus (Molecular Dimensions) no Oxford Protein Production Facility (OPPF) em Harwell – UK. As coletas de dados por difração de raio-X foram realizadas no Síncrotron Diamond Light Source (DLS) - UK. Foram coletadas duas estruturas de ADSL, a 2.36Å de resolução em complexo com AMP e 2.14Å na forma Apo. A análise das estruturas revelou uma estrutura tetramérica bastante conservada entre as ADSLs, sendo este estado de oligomerização requerido, uma vez que resíduos de três das quatro subunidades compõem o sítio ativo. Apesar do sítio ativo ser altamente conservado entre *SmADSL* e ADSL humana, a interface dimérica dessas enzimas tem se apresentado suficientemente distintas, o que pode representar um potencial alvo para o desenvolvimento de um inibidor. O ensaio de atividade enzimática de ADSL revelou uma reação endotérmica, indicando que a contribuição da entropia relacionada a grande quantidade de moléculas de água presentes no sítio ativo é importante para a reação cinética. Após diversos experimentos de otimização dos cristais de HGPRT1 e aproximadamente 200 cristais testados, foi obtida uma estrutura em complexo com IMP a 2.8Å de resolução. A análise da estrutura revelou uma estrutura tetramérica. Apesar das subunidades não compartilharem o sítio ativo, este estado de oligomerização é requerido, uma vez que resíduos que compõem o sítio ativo também estão envolvidos em interações na interface dimérica, orientando o resíduo invariável Arg206 na direção do sítio ativo. Foram identificadas quatro mutações na região do sítio ativo entre *SmHGPRT* e HGPRT humana: Ile149Met, Pro176Arg, Val189Ile e Arg192Lys. Desta forma, a obtenção das estruturas contribui para o entendimento bioquímico desta via essencial para o parasita e de como este pode ser seletivamente privado de recursos.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Via de salvação de purinas. Hipoxantina-Guanina. Fosforibosiltransferase. Adenilsuccinato Liase.

ABSTRACT

ROMANELLO, L. **Studies of adenosine kinase isoform 1, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase isoforms 1, 2 and 3, adenylosuccinate lyase, adenylosuccinate synthetase enzymes from *Schistosoma mansoni***. 2016. 160 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Schistosoma mansoni is the parasite responsible for schistosomiasis, disease that affects about 300 million people worldwide, and does not have the purine “de novo” pathway, depending entirely on the purine salvage pathway to supply its demands on purines. Currently, both direct treatment and most disease control initiatives, rely on chemotherapy using a single drug, praziquantel. Concerns over the possibility of resistance developing to praziquantel, has stimulated efforts to develop new drugs for the treatment of schistosomiasis. The purine salvage pathway has been reported as a potential target for developing new drugs against schistosomiasis. Adenosine kinase (AK), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT), adenylosuccinate lyase (ADSL), adenylosuccinate synthetase (ADSS) are key enzymes in this pathway. This work is part of a larger project aimed at obtaining all the structures of enzymes involved in purine salvage pathway of *Schistosoma mansoni*. The cDNA corresponding to the enzymes was amplified and cloned in vector pOPIN, AK isoform 1, HGPRT isoform 1 and ADSL were expressed in *E. coli* Lemo 21 (DE3) and HGPRT isoform 3 in *E. coli* B834(DE3); purified in cobalt agarose column, concentrated and crystallized in several conditions of the Morpheus (Molecular Dimensions) crystallization kit at the Oxford Protein Production Facility (OPPF) in Harwell – UK. The data collection by x-ray diffraction were performed at Diamond Light Source – UK. Two ADSL structures were obtained, ADSL in complex with AMP at 2.36Å resolution and ADSL Apo form at 2.14Å. The analysis revealed a tetrameric structure highly conserved between ADSLs, and this oligomerization state is required since residues three of the four subunits comprise the active site. Despite the active site being highly conserved between human ADSL and *Sm*ADSL, the dimeric interface of these enzymes it has been shown sufficiently distinct, which may represent a potential target for the development of an inhibitor. The ADSL enzymatic activity assay showed an endothermic reaction, indicating the contribution of the entropy related to the large quantity of water molecules present in the active site is important for the reaction kinetics. After several optimization experiments of HGPRT1 crystals and about 200 crystals tested was obtained a structure in complex with IMP at 2.8Å resolution. The structure analysis revealed a tetrameric structure. Despite the subunits do not share the active site, this oligomerization state is required, since residues that make up the active site are also involved in interactions in dimeric interface, guiding the invariable residue Arg206 toward the active site. Four mutations were identified in the region of the active site between *Sm*HGPRT and human HGPRT: Ile149Met, Pro176Arg, Val189Ile e Arg192Lys. These structures increase the important structural information available about the *Schistosoma mansoni* purine salvage pathway and how it can be selectively private resources.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. Purine salvage pathway. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. Adenylosuccinate lyase.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Levantamento dos países endêmicos para esquistossomose em 2014..... 32
- Figura 2 - Ciclo de vida do *Schistosoma*. Ovos são eliminados nas fezes ou urina, em condições ideais há eclosão dos ovos e liberação de miracídios, que nadam e penetram em hospedeiros intermediários específicos (moluscos). Os estágios no caramujo incluem duas gerações de esporocistos e a produção de cercárias. Após liberadas do caramujo, as cercárias infectantes nadam e penetram na pele do hospedeiro humano, perdem sua cauda, passando a ser esquistossômulo. (,) Os esquistossômulos migram através de diversos tecidos para se instalarem as veias. Os vermes adultos nos seres humanos residem nas vênulas mesentéricas em várias localizações, que parecem ser específicas para cada espécie. As fêmeas (com tamanho de 7 a 20 mm, macho um pouco menor) depositam ovos em pequenas vênulas do sistema portal e perivesical. Os ovos são movidos progressivamente para o lúmen do intestino (*S. mansoni* e *S. japonicum*) e da bexiga e ureteres (*S. haematobium*), e são eliminados com as fezes ou urina, respectivamente..... 33
- Figura 3 - Origem dos átomos do anel de purinas (via de novo). 35
- Figura 4 - Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em *S. mansoni*. ADA - adenosina desaminase, PNP - purina nucleosídeo fosforilase, HGPRT - hipoxantina guanina fosforibosiltransferase, APRT - adenina fosforibosiltransferase, AK - adenosina kinase, ADK - adenilato kinase, NDPK - nucleosídeo difosfato kinase, MTAP - metiltioadenosina fosforilase, ADSL - adenilosuccinato liase, ADSS - adenilosuccinato sintase, IMPDH - inosina-5'-fosfato desidrogenase, GMPS - guanilato sintase, GK - guanilato kinase. Em destaque com contorno vermelho as enzimas alvo de estudo deste projeto, e as estruturas das enzimas já resolvidas por nosso grupo de pesquisa..... 36
- Figura 5 - Estrutura cristalográfica da enzima adenosina kinase de *Schistosoma mansoni* em modelo de fitas. Pode ser observada a ligação de uma molécula de adenosina e uma de AMP na estrutura..... 40
- Figura 6 - Análise do nível de expressão de RNAs da via de salvaguarda de purinas por PCR em tempo real. O número de cópias dos genes foi normalizado para a tubulina pela divisão do número de cópia de cada gene pelo número de cópias de tubulina em cada reação de cDNA. Um nível de expressão de um indica que o nível de expressão é equivalente à tubulina. Adenilosuccinato liase – barra branca; adenina fosforibosiltransferase – barra preta; hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase – barra cinza. 43
- Figura 7 - Segundo passo do procedimento de purificação do produto de amplificação de cDNA por PCR utilizando o sistema de purificação por interação magnética..... 48

Figura 8 - Esquema da construção dos vetores pOPIN, cedidos pelo grupo OPPF.....49

Figura 9 - Análise da expressão-teste das enzimas em *E.coli* Lemo21(DE3) no meio de cultura *Power Broth*TM em gel SDS-PAGE. Padrão de peso molecular. ADSS – pOPIN S3C, TRX, E, F e M (A1, B1, C1, D1 e E1 respectivamente). IMPDH – pOPIN S3C, TRX, E, F e M (F1, G1, H1, A2 e B2 respectivamente). ADSL - pOPIN S3C, TRX, E, F e M (C2, D2, E2, F2 e G2 respectivamente). HGPRT short -pOPIN S3C, TRX, E, F (H2, A3, B3 e C3). HGPRT 148820 -pOPIN S3C, TRX, E, F (D3, E3, F3 e G3). HGPRT 168500-pOPIN S3C, TRX, E, F (H3, A4, B4, C4). PNP2 - pOPIN S3C, M e TRX (D4, E4 e F4). NDPK -pOPIN S3C, TRX, E e F (G4, H4, A5, B5). AK1 - pOPINF e S3C (C5 e D5). GMPS- pOPIN S3C, TRX, E, F e M (H5, A6, B6, C6, D6). GK - pOPIN S3C, TRX, E e F (E6, F6, G6 e H6).....52

Figura 10 - Análise da expressão-teste em gel SDS-PAGE, do lado esquerdo, expressão em *E.coli* Lemo21(DE3) e indução com IPTG; do lado direito, expressão em *E.coli* Lemo21 (DE3) em meio de auto indução ONEX. Padrão de peso molecular. ADA – pOPINE, F, S3C, TRX, e M (C7, D7, E7, F7, G7). NDPK short– pOPINE, F, S3C, TRX, e M (H7, A8, B8, C8, D8). NDPK large– pOPINE, F, S3C, TRX, e M (E8, F8, G8, H8, A9). IMPDH short–pOPINE, F, S3C, TRX, e M (B9, C9, D9, E9, F9). IMPDH large– pOPINE, F, S3C, TRX, e M (G9, H9, A10, B10, C10). ADSS– pOPINE, F, S3C, TRX, e M (D10, E10, F10, G10, H10). Esta sequência se repete no teste de expressão utilizando o meio de auto indução ONEX.....54

Figura 11 - Análise da purificação das enzimas AK1 e HGPRT1 em gel de poliacrilamida 15%. Poço 1: Marcador de peso molecular. Poço 2 - 7. Enzima AK1 (42kDa). Poço 9 - 17: Enzima HGPRT1 (24 kDa).56

Figura 12 - Análise da purificação da enzima HGPRT3 em gel de poliacrilamida 15%. Poço 1: Marcador de peso molecular. Poço 6 - 18. Enzima HGPRT3 (24 kDa).....56

Figura 13 - Análise da purificação da enzima ADSL em gel de poliacrilamida 15%. Poço 1: Marcador de peso molecular. Poço 2, 3 e 4: Lavado. Poço 5 - 8. Enzima ADSL (54.5 kDa).....57

Figura 14 - Cristais de HGPRT1 à 2,5mg/mL de proteína incubada com IMP à 18°C na condição A4 do kit Morpheus.62

Figura 15 - Análise da purificação da enzima HGPRT1SeMet em gel de poliacrilamida 15%. Poço 1: Marcador de peso molecular. Poço 2. Expressão da enzima. Poço 3: Eluato. Poço 4: Lavado. Poço 5 e 6: Eluição da enzima (24kDa).64

Figura 16 - Cristais de HGPRT1 com selenometionina na condição de cristalização B3 do Bloco 1.68

Figura 17 - Cristal de ADSL da condição E12 do kit de cristalização Morpheus (30mM de etilenos glicóis, 120mM de Tris base/bicina pH8.5, 12.5% de MPD, PEG1000 e PEG3350).	69
Figura 18 - Mapa de densidade eletrônica (Fo-Fc) para o AMP no sítio ativo da ADSL de <i>S.mansoni</i> . O sítio ativo é formado pela participação de três das quatro subunidades da enzima.	72
Figura 19 - Diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros para a estrutura ADSL-AMP. A região representada em vermelho corresponde à região mais favorável para os valores dos ângulos, a região amarelo escuro é a adicionalmente permitida, amarelo claro é a generosamente permitida e a região em branco é a região não permitida. As glicinas são representadas por triângulos.	74
Figura 20 - Diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros para a estrutura ADSL-Apo. A região representada em vermelho corresponde à região mais favorável para os valores dos ângulos, a região amarelo escuro é a adicionalmente permitida, amarelo claro é a generosamente permitida e a região em branco é a região não permitida. As glicinas são representadas por triângulos.	75
Figura 21 - Estrutura de ADSL de <i>S. mansoni</i> (monômero) é composta por 3 domínios: domínio I (vermelho), domínio II (azul) e domínio III (amarelo).	76
Figura 22 - Estrutura secundária de SmADSL em complexo com AMP em função da sequência de aminoácidos. As fitas β são representadas por setas rosas, as α -hélices por espirais roxas com a respectiva numeração em cima (H1, H2...H25), as 2 folhas β são classificadas como A e B, sendo essas letras colocadas acima das fitas identificando a qual folha pertencem. Os símbolos: β - beta turn, γ - gamma turn e - beta hairpin.	77
Figura 23 - Topologia de ADSL-AMP. As fitas β são representadas por setas rosa, as α -hélices em tubos vermelhos e os loops em azul. O N-terminal é indicado pela letra N e o C-terminal pela letra C.	78
Figura 24 - Alinhamento de ADSL humana e de <i>Schistosoma mansoni</i> . A primeira linha corresponde à estrutura secundária formada, a segunda linha a sequência de aminoácidos de ADSL de <i>S. mansoni</i> e a terceira linha de ADSL humana. Os resíduos brancos grifados em vermelho são conservados nas duas estruturas, os em vermelho grifados em branco são os resíduos não conservados, porém similares.	80
Figura 25 - Análise das regiões conservadas à partir do alinhamento da sequência de aminoácidos de ADSL de <i>S. mansoni</i> e ADSL humana. A. Regiões conservadas destacadas em vermelho. B. Resíduos idênticos entre ambas destacados em pink.	81

Figura 26 - Análise das regiões conservadas à partir do alinhamento da sequência de aminoácidos de ADSL de <i>S. mansoni</i> com todas as ADSLs depositadas no PDB. Regiões conservadas destacadas em degradê de vermelho a branco, da mais conservada a não conservada respectivamente. Resíduos idênticos entre as estruturas destacados em pink.....	82
Figura 27 - Estrutura dimérica de SmADSL em complexo com AMP (preto) (subunidade A: verde, subunidade B: vermelho).....	83
Figura 28 - Estrutura tetramérica de SmADSL em complexo com AMP (preto) (subunidade A: verde, B: vermelho, C: amarelo, D: azul).....	84
Figura 29 - Sobreposição do monômero da ADSL-AMP (vermelho) com os monômeros da ADSL-APO (azul). A maior diferença é observado no domínio III, que possui orientação diferente em A e é parcialmente desordenado em B.	85
Figura 30 - Sobreposição dos tetrâmeros da <i>S. mansoni</i> em complexo com AMP (vermelho) e APO (azul) o RMSd é de 1.14Å.	86
Figura 31 - Sobreposição das estruturas de ADSL de <i>S.mansoni</i> (monômero) em vermelho e ADSL humana em amarelo. AMP em preto. RMSd = 0,589Å.....	87
Figura 32 - Sobreposição das ADSL de <i>S. mansoni</i> (ADSL-AMP vermelho), (APO-azul) contra a ADSL humana em complexo com AMP (amarelo).	88
Figura 33 - Participação de três das quatro subunidades da enzima SmADSL em complexo com AMP na formação do sítio ativo.....	89
Figura 34 - Ligações de hidrogênio (pontilhado amarelo) do ligante AMP no sítio ativo de SmADSL.....	90
Figura 35 - Modelo esquemático para a ligação da AMP no sítio ativo da ADSL de <i>S. mansoni</i>	91
Figura 36 - Loop correspondente a sequência de aminoácidos de 281 à 293 na SmADSL-AMP correspondente à região conservada considerada a assinatura das enzimas da superfamília de β-eliminação na região do sítio ativo.....	92
Figura 37 - Loop correspondente a sequência de aminoácidos de 281 à 293 na SmADSL-Apo correspondente à região conservada considerada a assinatura das enzimas da superfamília de β-eliminação na região do sítio ativo.	93
Figura 38 - Sobreposição dos loops de ADSL-AMP (amarelo) e ADSL-Apo (verde) onde a conformação da Arg291 e Lys290 difere entre ambos.....	94

Figura 39 - Sobreposição dos sítios de ligação ao AMP nas ADSLs de <i>S. mansoni</i> (Branco-AMP e amarelo-APO) e humana (magenta).	95
Figura 40 - ADSL catalisa a clivagem de adenilsuccinato (ADS) em AMP e Fumarato.....	96
Figura 41 - Esquema geral mostrando a clivagem de adenilsuccinato (SAMP) pela enzima ADSL. Os 5 passos envolvidos são: (1) Abstração de um próton pela base catalítica (B) do átomo CB do grupo succínico; (2) estabilização do carbânion intermediário formado; (3) protonação de N1 ou N6 da porção do AMP pelo ácido catalítico; (4) clivagem da ligação de C α -N entre AMP e o grupo succínico; e (5) liberação dos produtos AMP e fumarato.	97
Figura 42 - Posicionamento estrutural em <i>SmADSL</i> dos resíduos identificados cujas mutações implicam na deficiência severa de ADSL em humanos e consequentemente retardo mental em pacientes.	100
Figura 43 - Posicionamento do resíduo Lys241 em <i>SmADSL</i> na interface dimérica A-B.	101
Figura 44 - Ligações de hidrogênio (pontilhado amarelo) entre os resíduos Lys241A com Thr256B, Asp176B e Asn252B em <i>SmADSL</i>	102
Figura 45 - Posicionamento do resíduo Arg298 em <i>SmADSL</i> na interface B-C.	103
Figura 46 - Ligações de hidrogênio (pontilhado amarelo) entre os resíduos Arg298B, Ile480B, Glu75C, Arg14B e uma molécula de água como mediadora em <i>SmADSL</i>	104
Figura 47 - Determinação da entalpia molar aparente (ΔH_{app}) de ADS.	106
Figura 48 - Determinação da entalpia molar aparente (ΔH_{app}) de SAICAR.	106
Figura 49 - Moléculas de água (esferas vermelhas) presentes em um dos quatro sítios ativos da estrutura <i>SmADSL</i> -Apo.	107
Figura 50 - Determinação da entalpia molar aparente (ΔH_{app}) de AICAR.	108
Figura 51 - Determinação da entalpia molar aparente (ΔH_{app}) de fumarato/AICAR. $\Delta H \sim 0$ – sem reação.	108
Figura 52 - Determinação da entalpia molar aparente (ΔH_{app}) de AMP.	109
Figura 53 - Determinação da entalpia molar aparente (ΔH_{app}) de Fumarato. $\Delta H \sim 0$ – sem reação.	109
Figura 54 - Cinética enzimática de <i>SmADSL</i> para ADS.	110

Figura 55 - Cinética enzimática de <i>SmADSL</i> para SAICAR.....	111
Figura 56 - Esquerda: Cristais de HGPRT1 à 2,5mg/mL de proteína incubada a 18°C na condição A4 do kit Morpheus. Direita: Cristal em loop, coletado à 2,8Å de resolução por difração de raio-X.....	114
Figura 57 - Mapa de densidade eletrônica fo-fc na região do sítio ativo das quatro subunidades (A, B, C e D) da enzima HGPRT1 de <i>S. mansoni</i> . É possível observar a densidade correspondente ao ligante IMP.	116
Figura 58 - Diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros para a estrutura HGPRT-IMP. A região representada em vermelho corresponde à região mais favorável para os valores dos ângulos, a região amarelo escuro é a adicionalmente permitida, amarelo claro é a generosamente permitida e a região em branco é a região não permitida. As glicinas são representadas por triângulos.....	118
Figura 59 - Estrutura de HGPRT de <i>S. mansoni</i> (monômero) é composta por 2 domínios: domínio Hood (vermelho), domínio Core (azul).	119
Figura 60 - Estrutura secundária de <i>SmHGPRT</i> em complexo com IMP em função da sequência de aminoácidos. As fitas β são representadas por setas rosas, as α -hélices por espirais roxas com a respectiva numeração em cima (H1, H2...H25), as 2 folhas β são classificadas como A e B, sendo essas letras colocadas acima das fitas identificando a qual folha pertencem. Os símbolos: β - beta turn, γ - gamma turn e - beta hairpin.....	120
Figura 61 - Topologia de <i>SmHGPRT</i> -IMP gerada pelo PDB sum. As fitas β são representadas por setas rosa, as α -hélices em tubos vermelhos e os loops em azul. O N-terminal é indicado pela letra N e o C-terminal pela letra C.....	121
Figura 62 - Alinhamento de HGPRT humana (1HMP) e de <i>Schistosoma mansoni</i> em função da estrutura secundária. Os resíduos brancos grifados em vermelho são conservados nas duas estruturas, os em vermelho grifados em branco são os resíduos não conservados, porém similares. A quarta linha corresponde a exposição dos resíduos ao solvente, em azul escuro os mais expostos, azul claro podem estar expostos e branco hidrofóbicos.....	122
Figura 63 - Análise das regiões conservadas à partir do alinhamento da sequência de aminoácidos de HGPRT de <i>S. mansoni</i> e HGPRT humana. A. Regiões conservadas destacadas em vermelho. B. Resíduos idênticos entre ambas destacados em pink.	123
Figura 64 - Análise das regiões conservadas à partir do alinhamento da sequência de aminoácidos de HGPRT de <i>S. mansoni</i> com todas as HGPRTs depositadas no PDB. Regiões conservadas destacadas em degradê de vermelho a	

branco, da mais conservada a não conservada respectivamente. Resíduos idênticos entre as estruturas destacados em pink.....	124
Figura 65 - Estrutura tetramérica de <i>SmAHGPRT</i> em complexo com IMP (preto) (subunidade A: amarelo, B: magenta, C: azul, D: verde).....	126
Figura 66 - Sobreposição das quatro subunidades da estrutura tetramérica de HGPRT. A – vermelho, B – amarelo, C- azul e D verde.	127
Figura 67 - Sobreposição das estruturas de HGPRT de <i>S.mansoni</i> (monômero) em vermelho e ADSL humana em amarelo. RMSd = 1,154 Å.....	128
Figura 68 - Localização do sítio ativo na interface dos domínios “core” (azul) e “hood” (vermelho) e compreende 4 loops, I – IV.	129
Figura 69 - <i>Loop</i> I correspondente aos resíduos de 73 à 78 (VLKGGF) localizados entre a fita β 2 e a hélice α 4 do domínio core.	130
Figura 70 - <i>Loop</i> II correspondente aos resíduos 107 à 134 entre as fitas β 3 e β 4 do domínio core.	131
Figura 71 - <i>Loop</i> III correspondente aos resíduos de 141 à 146 (DIIDTG) entre as fitas β 4 e hélice α 5 no domínio core.....	132
Figura 72 - <i>Loop</i> IV correspondente aos resíduos de 190 à 211 no domínio hood.	132
Figura 73 - Ligações de hidrogênio (pontilhado amarelo) do ligante IMP no sítio ativo de <i>SmHGPRT</i>	133
Figura 74 - Modelo esquemático para a ligação da IMP no sítio ativo da <i>SmHGPRT</i>	134
Figura 75 - Sobreposição dos sítios de ligação do IMP na HGPRT de <i>S. mansoni</i> (verde) e humana (branco).	135
Figura 76 - Posicionamento e conformação dos resíduos Lys75 e Pro176 em <i>SmHGPRT</i> (verde) e seus correspondentes Lys68 e Arg169 em HGPRT humana (branco).....	136
Figura 77 - Esquema da reação catalisada pela enzima HGPRT.	136
Figura 78 - Mecanismo de reação enzimática da HGPRT. 1- Apoenzima com PRPP entrando no sítio ativo. Os loops II, III e III' na conformação aberta. 2- Complexo PRPP-Mg ligado e Lys79 adota a conformação <i>cis</i> peptídeo. As interações do PPi do PRPP, loop I e loop IV aproximam o domínio hood do domínio core. Loop III ordenado ao redor do 5'fosfato e guanina entra no sítio ativo. 3- Bolsão de ligação à guanina é fechado e ordenado ao redor da	

base. Loop III fechado permite que o loop III' se feche colocando Arg182 entre Asp150 e Asp197 completando a ligação dos domínios hood e core. 4- Loop II se fecha colocando o resíduo Tyr118 em posição de ligação de hidrogênio com o fosfato 5' permitindo a transferência fosforibosil. 5- Loop I e IV são abertos e PPi sai do sítio ativo. Lys79 do loop I retorna a configuração trans e o loop II é aberto. 6- Loop III' e III se abrem e liberam GMP e HGPRT retoma a forma apoenzima.140

Figura 79 - Ligação do resíduo Lys75B do *loop* I com Val103A em *SmHGPRT*.....142

Figura 80 - Interação entre os resíduos Lys75B do *loop* I com Val103A, Asp207B com três moléculas de água e Glu89A, este com Lys79B em *SmHGPRT*.143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identidade sequencial entre homólogos da HGPRT.....	40
Tabela 2 - Construções realizadas na primeira etapa.....	49
Tabela 3 - Construção realizada na segunda etapa.	49
Tabela 4 - Resultado sumarizado dos testes de expressão das enzimas.	53
Tabela 5 - Resultado sumarizado do segundo teste de expressão da enzima ADSS.	54
Tabela 6 - Enzimas e suas respectivas construções, meio de cultura, método de indução e volume escolhidos para expressão em larga escala.	54
Tabela 7 - Ligantes e kits de cristalização utilizados para testes de cristalização das enzimas.	59
Tabela 8 - Cristais obtidos para as enzimas do projeto.....	60
Tabela 9 - Condições de cristalização do kit Morpheus utilizadas para “ <i>screening</i> ”	65
Tabela 10 - Estatísticas da coleta de dados e refinamento para os cristais de ADSL.	70
Tabela 11 - Análise da geometria de ADSL gerada pelo programa MOLPROBITY. (78)	73
Tabela 12 - Comparação dos resíduos entre a ADSL humana nativa, ADSL humana mutada e <i>SmADSL</i> que foram identificados cujas mutações implicam na deficiência severa de ADSL em humanos e consequentemente retardo mental em pacientes.....	99
Tabela 13 - Valores dos parâmetros da cinética enzimática de <i>SmADSL</i> para ADS.....	110
Tabela 14 - Valores dos parâmetros da cinética enzimática de <i>SmADSL</i> para SAICAR.	111
Tabela 15 - Estatísticas da coleta de dados e refinamento para os cristais de HGPRT1.....	114
Tabela 16 - Análise da geometria de HGPRT gerada pelo programa MOLPROBITY. (78).....	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA- adenosina desaminase

ADK - adenilato kinase

ADSL - adenilosuccinato liase

ADSS - adenilosuccinato sintase

AICAR - aminoimidazol carboxamida ribosídeo

AK - adenosina kinase

AMP – adenosina monofosfato

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

AP - adenosina fosforilase

APRT- adenina fosforibosiltransferase

ATP – adenosina trifosfato

BRENDA – *BRaunschweig ENzyme DAtabase*

cDNA – ácido desoxirribonucleico codificante

DLS - *Diamond Light Source*

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO – densidade óptica

EST – *expressed sequence tag*

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

FMR – fumarato

GDP - Guanosina difosfato

GK - guanilato kinase

GMP - Guanosina monofosfato

GMPC – Guanosina trifosfato cíclico

GMPS - guanilato sintase

GTP – Guanosina trifosfato

HGPRT- hipoxantina guanina fosforibosiltransferase

HGXPRT - hipoxantina guanina xantina fosforibosiltransferase

IFSC – Instituto de Física de São Carlos

IMP – inosina monofosfato

IMPDH - inosina-5'-fosfato desidrogenase

IPTG – isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

ITC - calorimetria de titulação isotérmica

kDa – kilodaltons

MBP - maltose

mg – miligrama

mM – milimolar

MPD – 2-Methyl-2,4-pentanediol

MTAP - metiltioadenosina fosforilase

NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NDPK - nucleosídeo difosfato kinase

nL – nanolitro

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPPF - *Oxford Protein Production Facility*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDB – *Protein data bank*

PEG – *polietilenoglicol*

PNP- purina nucleosídeo fosforilase

PRPP - 5-fosforribosil-1-pirofosfato

PZQ – Praziquantel

RMSd – *root-mean-square deviation*

RNA – ácido ribonucleico

RNAi - ácido ribonucleico de interferência

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

RPKM - *reads per kilobase per million*

rpm – rotação por minuto

S-Ado - succiniladenosina

SAICAR - succinilaminoimidazol carboxamida ribosídeo

SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TRX - Tiorredoxina

UDP – uridina difosfato

μg – micrograma

μL – microlitro

μM – micromolar

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	31
1 INTRODUÇÃO	31
1.1 Esquistossomose	31
1.1.1 Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	32
1.1.2 Tratamento	33
1.2 Metabolismo de nucleotídeos	34
1.2.1 Metabolismo de Purinas em <i>Schistosoma mansoni</i>	35
1.3 Enzimas alvos do estudo	38
1.3.1 Adenosina Kinase (AK)	39
1.3.2 Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT).....	40
1.3.3 Adenilsuccinato Sintetase (ADSS).....	42
1.3.4 Adenilsuccinato Liase (ADSL)	42
CAPÍTULO 2	45
2 OBJETIVOS	45
2.1 Geral	45
2.2 Específicos	45
CAPÍTULO 3	47
3 PRODUÇÃO DAS ENZIMAS RECOMBINANTES	47
3.1 Amplificação dos genes de interesse.....	47
3.2 Purificação do produto de PCR.....	47
3.3 Ligação do produto de PCR em vetores pOPIN e transformação de células de propagação	48
3.4 Escolha das colônias e transformação de células de expressão.....	50
3.5 Teste de expressão e purificação das enzimas.....	51
3.6 Expressão e purificação das proteínas em larga escala	55
CAPÍTULO 4	59
4 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DOS CRISTAIS.....	59
4.1 Ensaios de Cristalização.....	59
4.2 Coleta de dados e otimização dos cristais	61
4.2.1 Variação de concentração da enzima e temperatura.....	62

4.2.2 Expressão e purificação de HGPRT com selenometionina	63
CAPÍTULO 5	69
5 ESTRUTURA CRISTALOGRAFICA E CINÉTICA ENZIMÁTICA DE ADSL de <i>Schistosoma mansoni</i>	69
5.1 Coleta de dados, processamento, resolução e refinamento de dados de difração de raios-X	69
5.2 Validação das estruturas	72
5.3 Análise das estruturas tridimensionais obtidas de ADSL de <i>Schistosoma mansoni</i>	76
5.3.1 Estrutura secundária, topologia e regiões conservadas	76
5.3.2 Enovelamento	82
5.3.3 O sítio ativo	88
5.3.4 Mecanismo catalítico	95
5.4 Determinação de parâmetros cinéticos da enzima ADSL de <i>Schistosoma mansoni</i> através de calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	105
CAPÍTULO 6	113
6 ESTRUTURA CRISTALOGRAFICA DE HGPRT isoforma 1 de <i>Schistosoma mansoni</i>	113
6.1 Coleta de dados, processamento, resolução e refinamento de dados de difração de raios-X	113
6.2 Validação da estrutura	116
6.3 Análise da estrutura tridimensional obtida de HGPRT de <i>Schistosoma mansoni</i>	119
6.3.1 Estrutura secundária, topologia e regiões conservadas	119
6.3.2 Enovelamento	124
6.3.3 O sítio ativo	129
6.3.4 Mecanismo catalítico	136
CAPÍTULO 7	145
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	145
7.1 Conclusões	145
7.2 Perspectivas Futuras	146
REFERÊNCIAS	149

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose

A esquistossomose, popularmente conhecida como barriga d'água, é uma doença parasitária crônica, debilitante e, em alguns casos fatal. Afeta indivíduos principalmente em áreas rurais, sendo endêmica em países tropicais e subtropicais. Nestes países ela constitui um dos principais problemas de saúde pública e está associada diretamente às condições socioeconômicas da população, uma vez que a transmissão da doença ocorre pela utilização de água contaminada com a forma infectante do parasita. (1)

É uma das doenças mais negligenciadas do mundo, a segunda em importância mundial atrás da Malária (2), sendo esquistossomose o nome coletivo para a infecção causada por uma das cinco espécies do platelminto trematodo do gênero *Schistosoma*, na qual o *Schistosoma mansoni* é o único predominante na América e um dos mais predominantes na África. (3)

Atualmente a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 700 milhões de pessoas em todo o mundo estão em áreas de risco para a esquistossomose. O índice de mortalidade atinge mais de 200.000 pessoas por ano e inclui hepatomegalia, esplenomegalia, fibrose hepática e ascite. (1,3-4) A doença é associada com uma morbidade crônica e debilitante que manifesta suas consequências num déficit cognitivo, cansaço e redução do crescimento. (5-6)

Dos 78 países considerados endêmicos para esquistossomose (Figura 1), apenas 52 países recebem quimioterapia preventiva. O número total de pessoas infectadas que necessitavam de quimioterapia a nível global em 2014 foi de 258,9 milhões, dos quais 123,3 milhões eram crianças em idade escolar. Os dados reportados em 2014 mostram que pouco mais de 61 milhões de pessoas receberam quimioterapia preventiva para a esquistossomose, o que é equivalente a uma cobertura global de apenas 20,8%. (1)

Figura 1 - Levantamento dos países endêmicos para esquistossomose em 2014.
Fonte: WHO ...⁽¹⁾

1.1.1 Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

O *S. mansoni* possui um ciclo de vida heteroxênico (Figura 2), que se alterna entre dois hospedeiros distintos: hospedeiro intermediário representado principalmente pelo caramujo do gênero *Biomphalaria* (*B. glabrata* no Brasil), onde ocorre a reprodução assexuada e o hospedeiro definitivo vertebrado, representado pelo homem, onde ocorre a fase sexuada da reprodução. (7)

A infecção tem início quando o indivíduo se expõe à água contaminada com a forma larval (cercária) liberada pelo caramujo. As cercárias penetram ativamente na pele, perdem a cauda e se transformam em vermes imaturos (esquistossômulos). Esses vermes migram para o sistema sanguíneo ou linfático e chegam aos pulmões onde passam para o sistema porta intra-hepático e atingem a maturidade sexual. Os machos e fêmeas vivem acasalados e migram até as veias mesentéricas inferiores onde ocorre a oviposição. Os ovos eliminados nas fezes eclodem em contato com a água liberando o miracídio, que penetra o caramujo se transformando em esporocistos que dão origem às cercárias, reiniciando o ciclo. Uma parte dos ovos liberados pelos vermes adultos se aloja na mucosa intestinal e posteriormente nos capilares do sistema porta levando a formação de granulomas ou provocam hemorragias e ulcerações durante a sua passagem para a luz intestinal. (7)

Figura 2 - Ciclo de vida do *Schistosoma*. ① Ovos são eliminados nas fezes ou urina, ② em condições ideais há eclosão dos ovos e liberação de miracídeos, ③ que nadam e penetram em hospedeiros intermediários específicos (moluscos). ④ Os estágios no caramujo incluem duas gerações de esporocistos ⑤ e a produção de cercárias. ⑥ Após liberadas do caramujo, as cercárias infectantes nadam e penetram na pele do hospedeiro humano, ⑦ perdem sua cauda, passando a ser esquistossômulo. (⑧, ⑨) Os esquistossômulos migram através de diversos tecidos para se instalarem as veias. ⑩ Os vermes adultos nos seres humanos residem nas vênulas mesentéricas em várias localizações, que parecem ser específicas para cada espécie. ⑪ As fêmeas (com tamanho de 7 a 20 mm, macho um pouco menor) depositam ovos em pequenas vênulas do sistema portal e perivesical. Os ovos são movidos progressivamente para o lúmen do intestino (*S. mansoni* e *S. japonicum*) e da bexiga e ureteres (*S. haematobium*), e são eliminados com as fezes ou urina, respectivamente.

Fonte: CDC...(131)

1.1.2 Tratamento

Na ausência de uma vacina, de um eficiente controle do vetor e de saneamento básico, o tratamento e controle da esquistossomose residem em um único fármaco, o praziquantel (PZQ). O principal problema com o PZQ é que é praticamente inativo contra esquistossômulos imaturos, nos quais a atividade só é alcançada cerca de 6 a 8 semanas após a

infecção. (3) Além disto, o extensivo uso do PZQ por mais de 30 anos, especialmente em programas de administração de medicamentos em massa, levanta sérias preocupações sobre o desenvolvimento de resistência ao medicamento. Essa preocupação levou a um renovado interesse científico na investigação de novos medicamentos, incluindo a identificação de potenciais alvos moleculares. (8)

Várias comunicações com indicativos da falha no tratamento com PZQ têm sido ultimamente reportadas. (6,8-15) A detecção de falha de um tratamento é frequentemente o primeiro indicativo do fim da vida efetiva de um fármaco. Além de que não é estrategicamente eficaz depender deste único agente para o controle sustentado da esquistossomose. Idealmente, uma gama de opções de tratamento e controle deveria ser disponível, de preferência incluindo o uso de diferentes classes de fármacos a fim de evitar o desenvolvimento de resistência, e que atuassem em todos os estágios de vida do parasita para um tratamento efetivo. (16) Dentro desse contexto surge a necessidade da busca de novos alvos para o desenvolvimento de fármacos contra a esquistossomose.

1.2 Metabolismo de nucleotídeos

Os nucleotídeos são moléculas constituídas por uma base nitrogenada púrica (A ou G) ou pirimídica (C, T, ou U), uma ribose e um grupamento fosfato, as quais desempenham uma variedade de importantes papéis em todas as células de todos os organismos vivos. São precursores de DNA e RNA, sendo inclusive carregadores essenciais da energia química - função especialmente atribuída ao ATP e, em uma menor extensão, ao GTP. Além disso, são componentes dos cofatores NAD, FAD, S-adenosilmetionina e coenzima A, bem como de intermediários biosintéticos ativados, tais como UDP-glicose. Também são precursores de moléculas sinalizadoras na célula, tais como AMPc e GMPc. (17)

Os conjuntos (*pools*) de nucleotídeos são geralmente pequenos nas células, perfazendo aproximadamente 1% ou menos das quantidades requeridas para síntese do DNA. Portanto, a síntese de nucleotídeos precisa ocorrer paralelamente à síntese de ácidos nucleicos, podendo inclusive ser um fator limitante dos processos celulares de replicação e transcrição. (17)

Considerando a importância desses processos para as células em divisão, agentes que inibem a síntese de nucleotídeos têm se tornado de grande importância para a medicina atual.

Dois tipos de vias levam à síntese de nucleotídeos nos seres vivos: via de síntese de novo e via de salvação. A via de novo para biossíntese de purinas e pirimidinas são idênticas

diretamente AMP, e a via indireta: adenosina → inosina → hipoxantina → IMP → AMP, sendo que a via indireta é muito mais ativa que a via direta utilizando a kinase.

Extratos de *S. mansoni* convertem mais da metade da adenosina utilizada como substrato, convertendo-a para inosina e hipoxantina *in vitro*, utilizando as enzimas adenosina desaminase (ADA) e purina nucleosídeo fosforilase (PNP), hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HGPRT), adenilosuccinato sintase (ADSS) e adenilosuccinato liase (ADSL). (19-20)

Quando vermes intactos de *S. mansoni* são incubados com hipoxantina $^{-8-14}\text{C}$, quantidades substanciais de AMP e GMP são sintetizados, indicando a presença das enzimas ADSS, ADSL, IMPDH e GMPS. (22)

Uma parte da adenosina é clivada em adenina via adenosina fosforilase (a enzima responsável por esta atividade é a metiltioadenosina fosforilase - MTAP - Pereira e colaboradores, dados ainda não publicados), quando PRPP (5-fosforibosil-1-pirofosfato) está presente, com posterior formação de AMP pela fosforibosilação da adenina pela enzima APRT. (19) Miech e colaboradores (27) reportaram que extratos e o vômito de *S. mansoni* possuem uma atividade enzimática que catalisa a fosforólise de adenosina produzindo adenina e ribose-1-fosfato, e que esta atividade é devido à enzima adenosina fosforilase. Esta atividade é inteiramente separada da enzima purina nucleosídeo fosforilase, fato confirmado por nossos experimentos. (28-29)

Uma das vantagens da via de salvação é o fato de que a via de novo requer grande quantidade de energia para síntese de bases púricas. Com relação à via de salvação de purinas vale ressaltar que ao contrário da biossíntese de purinas, que é idêntica em todas as células, a via de salvação é diversa em características e distribuição.

Buscas no Genoma Paulista do *S. mansoni* (30), baseado em ESTs, e mais recentemente nos estudos de genoma e transcriptoma do parasita realizados por Protasio e colaboradores (31) confirmaram a presença de RNAm das enzimas relatadas por Senft; Crabtree. (20) Recentemente foi sequenciado o genoma do *S. mansoni* pelo Sanger Center na Inglaterra (32), onde foram encontrados os genes correspondentes a todas as enzimas da via, sendo que algumas possuem mais de uma isoforma (duas para AK, três pra HGPRT, duas para PNP), confirmando os trabalhos de identificação das enzimas da via de salvação realizados por Senft e colaboradores. (19,25,27)

Durante a identificação das enzimas da via de salvação de purinas em extratos livre nas células (22) foi observado que a degradação de adenosina continuava presente no meio, mesmo após a remoção dos vermes, sugerindo que durante a incubação os vermes liberam

enzimas ativas do catabolismo de adenosina, e que algumas enzimas relacionadas com o metabolismo de purinas são frouxamente ligadas às superfícies interna ou externa do parasita. Estes autores predisseram que enzimas do metabolismo de purina podem gerar respostas do sistema imune do hospedeiro e que estas enzimas podem ser úteis como sondas de imunodiagnóstico para a detecção de vermes vivos no paciente. (21)

Desde os experimentos de Senft e colaboradores, escassa literatura é encontrada sobre as enzimas da via de salvação de purinas. Com relação à estrutura destas enzimas apenas artigos produzidos em nosso grupo sobre PNP (28-29,33-34), ADK (35) e AK (36) estão disponíveis.

Um artigo que chama atenção é um artigo que apresenta as análises da estrutura do gene e expressão do RNAm da ADSL (37), no qual foi realizado o estudo por PCR em tempo real da expressão das enzimas HGPRT, APRT e ADSL em cercária, esquistossômulos, vermes adultos machos e fêmeas. Foi observado que a fêmea possui o dobro do nível de expressão da ADSL em comparação ao macho, indicando uma possível função fêmea específica (38). Hoffmann relata que outras enzimas da via de salvação de purinas devem ser estudadas para a avaliação da ligação a sexo específico. (38)

1.3 Enzimas alvos do estudo

Este projeto faz parte de um projeto mais abrangente que visa à obtenção da estrutura tridimensional de todas as enzimas da via de salvação de purinas e síntese de pirimidinas do parasita *Schistosoma mansoni*. Apesar da importância global que a esquistossomose tem, existem poucos estudos sobre as vias metabólicas do parasita. O entendimento bioquímico deste é de vital importância para a identificação de novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. Por este motivo, são estudadas todas as enzimas da via, uma vez que estas são expressas de forma distinta no parasita ao longo do seu ciclo de vida. No site GeneDB (<http://www.genedb.org/Homepage>) é possível encontrar os valores de RPKM (*reads per kilobase per million*) (39) que quantifica a expressão de genes em cercárias, esquistossômulos e vermes adultos. Permitindo a identificação de possíveis alvos terapêuticos em diferentes estágios de vida do parasita.

1.3.1 Adenosina Kinase (AK)

Uma das enzimas centrais da via de salvação é a adenosina kinase (E.C. 2.7.1.20), que catalisa a fosforilação de adenosina para adenosina monofosfato (AMP) utilizando ATP ou GTP como doadores de fosfato. (40)

No genoma do *Schistosoma mansoni* foram identificadas duas isoformas da enzima adenosina kinase. As duas sequências Smp_008360 (AK2) e Smp_008400 (AK1) contendo 352 aminoácidos possuem 79% de identidade sequencial.

Quando alinhadas individualmente as sequências da AK com seu homólogo humano a identidade sequencial é de 34 e 33% respectivamente.

Senft; Crabtree (21); relatam que os análogos de nucleotídeos 2-floroadenosina e 7-deazaadenosina são rapidamente incorporados no pool de nucleotídeos do *S. mansoni*. Nenhum destes análogos são substratos das enzimas adenosina desaminase e purina nucleosídeo fosforilase. Desta forma a conversão destes análogos as suas correspondentes bases, seguida da fosforibosilação gerando seus nucleotídeos não é realizada. Portanto a fosforilação direta mediada pela adenosina kinase é a rota do anabolismo de 2-floroadenosina e 7-deazaadenosina. Estes autores foram os primeiros a identificar a presença da enzima AK no parasita. Dovey e colaboradores (26) identificaram baixos níveis de atividade para enzima AK, ambos autores acima citados realizaram seus estudos com extratos de *S. mansoni*.

Durante o desenvolvimento do meu mestrado, a enzima recombinante AK2 foi amplificada, clonada, expressa, purificada e cristalizada. Foram obtidas e analisadas cinco estruturas tridimensionais com os diferentes ligantes: AMP, adenosina, 7-deazaadenosina (tubercidina) e 2-fluoroadenosina, cujos PDBs correspondentes são: 3VAS, 3VAQ, 3UQ9, 3UQ6 e 4DC3. (36)

Nesse trabalho, através da análise estrutural da enzima foi possível explicar a incorporação seletiva de análogos de adenosina de AK de *Schistosoma* em comparação com a AK humana observada por El Kouni e Cha na década de 80.

El Kouni e Cha (18) testaram a incorporação de nove análogos de adenosina: 5'-deoxi-5'-iodo-2-fluoroadenosina, tubercidina, nebularina, toiocamicina, sangivamicina, 3'-deoxisangivamicina, 9-deazaadenosina, 7,9-dideaza-7-tiaadenosina e 1-metiformicina, no verme adulto intacto e demonstraram que o *S. mansoni* poderia incorporar seis desses compostos no *pool* de nucleotídeos, exceto: sangivamicina, 3'-deoxisangivamicina e 1-metiformicina, em contraste com os outros análogos de adenosina testados. Fato esse que em nosso trabalho pôde ser atribuído ao tamanho do grupo inserido na posição 7 no lugar do

nitrogênio da base nitrogenada. Por ser muito volumoso este grupo provavelmente se chocaria com o resíduo Thr136 que está ligado ao N7 da molécula de adenosina com distância de 2.82Å.

Figura 5 - Estrutura cristalográfica da enzima adenosina kinase de *Schistosoma mansoni* em modelo de fitas. Pode ser observada a ligação de uma molécula de adenosina e uma de AMP na estrutura.
Fonte: Elaborada pela autora.

1.3.2 Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT)

A HGPRT (E.C 2.4.2.8) é codificada por um gene essencial do parasita. Catalisa a fosforibosilação reversível de hipoxantina e guanina para IMP ou GMP respectivamente. No genoma de *S. mansoni* foram encontrados três genes homólogos para a HGPRT (Smp_148820 – 227 aminoácidos, Smp_168500 – 228 aminoácidos, Smp_103560 – 249 aminoácidos). A tabela 1 mostra a identidade sequencial entre elas.

Tabela 1 - Identidade sequencial entre homólogos da HGPRT.

HGPRT	Identidade Sequencial
Smp_148820	Smp_168500 – 46%
Smp_168500	Smp_103560 – 46%
Smp_103560	Smp_148820 – 39%

Fonte: Elaborada pela autora

Quando alinhadas as 3 sequências com seu correspondente humano (PDB 2JBH) essa identidade é de 32% para Smp_148820, 38% para Smp_168500 e de 45% para Smp_103560.

Em humanos a completa ou quase completa deficiência da enzima HGPRT resulta em uma doença chamada Síndrome de Lesch-Nyhan (42), caracterizada pela superprodução e acúmulo de ácido úrico, chamada hiperuricemia. Os sintomas são graves e consistem basicamente em retardos psicomotores (43). Os devastadores efeitos dessa síndrome ilustram a importância da via de salvação. O cérebro é especialmente dependente dessa via, o que pode explicar os danos ao sistema nervoso central em crianças portadoras da síndrome.

Já quando a deficiência da HGPRT é parcial, a doença por manifestar sintomas mais leves, como formação e depósito de cristais nas articulações e no rim, é chamada de gota ou Síndrome de Kelley-Seegmiller. (44-45)

Hipoxantina e guanina surgem constantemente da quebra de ácidos nucleicos. Na ausência de HGPRT, os níveis de PRPP aumentam e purinas são, portanto mais produzidas pela via de novo, resultando no acúmulo de ácido úrico devido à redução do resgate de hipoxantina e guanina para produção de IMP e GMP. (46)

Diferentemente das outras enzimas da via de salvação de purinas, vários estudos já foram realizados utilizando a HGPRT de *S. mansoni*. (47-49) Esta proteína já foi expressa em *E. coli* anteriormente por outros pesquisadores na década passada. (50)

Em 2008 estudos utilizando a técnica de RNAi reforçaram a importância desta enzima para a sobrevivência do parasita. Pequenos RNAs interferentes (RNAis) foram produzidos contra HGPRT, injetados em camundongos infectados, cujo número de vermes foi contado seis dias após a injeção. O número total de parasitas foi reduzido em aproximadamente 27% após o tratamento. (51)

Apesar da existência de vários estudos com a HGPRT, até o presente momento não se conhecia sua estrutura tridimensional, a qual era buscada por pesquisadores há mais de 20 anos.

Durante o desenvolvimento do meu mestrado foi possível amplificar, clonar, expressar e purificar a enzima recombinante HGPRT Smp_103560. Bem como realizar ensaios de cristalização, sem sucesso. Novos estudos computacionais foram realizados pelo Prof. Dr. Ricardo de Marco analisando a sequência codificadora da enzima e identificou-se que a sequência do banco de dados, que foi previamente utilizada, possuía um éxon de 18 aminoácidos a mais no N-terminal. Novos primers foram desenhados para reinício dos estudos com essa enzima, aqui apresentados.

1.3.3 Adenilsuccinato Sintetase (ADSS)

Adenilsuccinato sintetase (IMP: aspartato ligase (GMP) E.C. 3.3.4.4) é a responsável pelo primeiro dos dois passos da conversão de IMP em AMP (52), catalisa a seguinte reação:

Somente uma isoforma foi identificada no genoma do parasita que codifica uma proteína com 433 aminoácidos, esta quando alinhada com sua correspondente humana (PDB 2V40) de 459 aminoácidos possui 54% de identidade.

Existem diversas estruturas dessa enzima depositadas no PDB, inclusive de *E. coli* com o inibidor hadacidina (N-formylhydroxyamino-acetic acid), análogo estrutural do ácido aspártico, além de estudos e descrição dos efeitos inibitórios de derivados deste. (53-62).

1.3.4 Adenilsuccinato Liase (ADSL)

Adenilsuccinato liase (ADSL, E.C. 4.3.2.2) é uma enzima que atua em duas vias de metabolismo de purinas. Na via de síntese catalisa a conversão de succinilaminoimidazol carboxamida ribosídeo (SAICAR) em aminoimidazol carboxamida ribosídeo (AICAR). (63) Já na via de salvação de purinas, que é o alvo de nosso estudo, esta enzima é responsável pelo segundo dos dois passos de conversão de IMP em AMP. (64) Responsável pela seguinte reação:

No parasita essa enzima possui 480 aminoácidos (54.5 kDa), o alinhamento com a enzima humana (PDB 2J91) que possui 503 aminoácidos demonstra que estas possuem 55% de identidade sequencial.

Diversos estudos foram realizados com a enzima humana pelo fato de sua deficiência estar relacionada a retardo mental e autismo (63,65-68) devido ao acúmulo das succinil-purinas; succinilaminoimidazol carboxamida (SAICA-ribosídeo) e succiniladenosina (S-Ado), no fluido cérebro-espinhal e urina. Dados sugerem que a lesão genética da ADSL determina a proporção de sua atividade com S-AMP e com SAICAR, que por sua vez determina a proporção S-Ado/SAICA-ribosídeo e o estado mental do paciente. (68)

Foulk e colaboradores estudaram a estrutura do gene de ADSL de *S.mansoni*, os níveis de expressão de RNAm, a predição da estrutura tridimensional e o potencial terapêutico da enzima. Estes pesquisadores demonstraram que os níveis de RNAs expressos de ADSL e HGPRT são mais baixos em esquistossômulos e cercárias do que em vermes adultos. Sugerindo que o nível de expressão desses genes é regulado e fornece evidências mais contundentes a trabalhos anteriores, onde Dovey e colaboradores (26) concluíram que esquistossômulos obtém a maior parte de AMP via APRT através da via de salvaguarda de purinas e Senft e colaboradores (25) demonstraram que vermes adultos de *S. mansoni* incorporaram uma quantidade significativa de adenosina marcada em AMP por meio de IMP. O que implicaria em algum grau de regulação da expressão gênica na via de salvaguarda de purinas.

Além de ser regulada positivamente em adultos, foi demonstrado que os níveis de expressão de RNAm de ADSL são mais elevados em fêmeas do que em machos. Também foi demonstrado um aumento de 2,5 vezes na atividade enzimática nas fêmeas em comparação com vermes machos. (37) Sendo assim, ADSL parece estar regulada positivamente nas fêmeas quanto em comparação com as outras fases do ciclo de vida examinada.

Figura 6 - Análise do nível de expressão de RNAs da via de salvaguarda de purinas por PCR em tempo real. O número de cópias dos genes foi normalizado para a tubulina pela divisão do número de cópia de cada gene pelo número de cópias de tubulina em cada reação de cDNA. Um nível de expressão de um indica que o nível de expressão é equivalente à tubulina. Adenilosuccinato liase – barra branca; adenina fosforibosiltransferase – barra preta; hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase – barra cinza.

Fonte: FOULK et al. (37)

Duas explicações são possíveis para esta regulação positiva da expressão de RNAm e atividade de adenilossuccinato liase: (1) fêmeas necessitam de um maior número de nucleótidos para a síntese de DNA associados com a produção de ovos e (2) as fêmeas são mais dependentes da via de salvação mediada adenilossuccinato liase- AMP que os machos. (37)

No entanto, a falta de um aumento correspondente nos níveis de RNAs de HGPRT e APRT em fêmeas indica que ADSL tem uma regulação específica, em vez de ser parte de uma supra regulação de RNAm geral na síntese de nucleotídeos ou mesmo na regulação positiva das outras enzimas da via de salvação de purinas na produção de AMP mediada por ADSL. Uma explicação alternativa para o aumento da produção de RNAm de ADSL é que esta está sendo usado para fins além da produção de AMP. (37)

CAPÍTULO 2

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar a clonagem, expressão, purificação, caracterização bioquímica, teste de atividade e determinar a estrutura tridimensional das enzimas adenosina kinase 1 (AK), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1, 2 e 3 (HGPRT), adenilsuccinato sintetase (ADSS) e adenilsuccinato liase (ADSL) de *Schistosoma mansoni*.

2.2 Específicos

1. Amplificação, clonagem, expressão heteróloga em *E. coli* e purificação das enzimas recombinantes.
2. Testes de cristalização das enzimas com diferentes substratos e/ou inibidores.
3. Experimentos de difração de raios-X com os cristais obtidos.
4. Resolução e refinamento das estruturas.
5. Teste de atividade enzimática e determinação das constantes catalíticas das enzimas com estrutura tridimensional obtida.
6. Publicação dos resultados.

CAPÍTULO 3

3 PRODUÇÃO DAS ENZIMAS RECOMBINANTES

3.1 Amplificação dos genes de interesse

Os experimentos de amplificação, clonagem, transformação em bactérias, testes de expressão e cristalização das enzimas AK1, HGPRT 1 (Smp_103560) ou HGPRT_short, HGPRT 2 (Smp_148820) e HGPRT 3 (Smp_168500), ADSL e ADSS foram realizados nas instalações do laboratório da *Oxford Protein Production Facility* (OPPF) em Harwell - Inglaterra. A utilização do OPPF é uma colaboração do Dr. Humberto Pereira com o pesquisador do síncrotron inglês *Diamond Light Source* (DLS), José Brandão-Neto.

Junto à equipe do OPPF os genes sintéticos foram amplificados por PCR, utilizando-se a enzima *PhusionTM Flash High-Fidelity*. A reação foi feita em termociclador, sendo o anelamento a 60°C por 5 minutos e a extensão, a 72°C por 1 minuto (1 minuto/kbp). Após a reação completa, confirmou-se a amplificação das 6 enzimas por eletroforese em gel de agarose 1,25% corado com *SYBR[®] Safe DNA Stain* (Invitrogen).

3.2 Purificação do produto de PCR

Uma vez verificada a qualidade do produto da reação e PCR em gel de agarose, fez-se a purificação do produto em 2 etapas:

- 1- Incubando o produto do PCR a 37°C por 1 hora com a enzima DpnI que cliva DNA metilado.
- 2- Sistema de purificação por interação magnética “*Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter)*” seguindo as instruções do fabricante. 90 uL desta solução são adicionados a solução de cada poço da placa, tornando-a marrom bem escura. Então a placa é inserida sobre uma placa contendo ímãs. As moléculas de cDNA que interagiram com as partículas magnéticas se acoplam próximo ao ímã tornando a solução transparente novamente. Esta solução é retirada do poço e este é lavado com etanol 70% por 2 vezes (Figura 7). Para eluição do cDNA, 30 uL de água são adicionados aos poços ressuspensando o produto acoplado ao ímã. Novamente a placa é inserida na placa magnética e a solução transparente é coletada.

Figura 7 - Segundo passo do procedimento de purificação do produto de amplificação de cDNA por PCR utilizando o sistema de purificação por interação magnética.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Ligação do produto de PCR em vetores pOPIN e transformação de células de propagação

Após confirmada através de análise em gel de agarose a purificação do produto de amplificação, os insertos foram ligados aos vetores. O OPPF emprega uma família de vetores chamados pOPIN que são derivados do vetor pTriEx2, que permite a expressão em múltiplos hospedeiros (*E. coli*, células de mamíferos e de insetos) e a ligação direta de produtos de PCR (69). Todos os vetores possuem um sítio para clivagem da proteína de interesse da sua fusão com a protease 3C (Figura 8). Os vetores escolhidos foram: pOPINS3C que produz uma proteína em fusão com Histag-SUMO, pOPINTRX- Histag-thioredoxina., pOPINE - histag no C-terminal, pOPINF- N-histag e pOPINM N-his-MBP.

Figura 8 - Esquema da construção dos vetores pOPIN, cedidos pelo grupo OPPF.
Fonte: Elaborada pela autora.

A construção dos vetores para expressão das proteínas foi feita em duas etapas. Na primeira etapa, foram feitas as construções listadas na Tabela 2 e na segunda etapa, foi feita a construção listada na Tabela 3.

Tabela 2 - Construções realizadas na primeira etapa.

Gene	aa_N	aa_C	Vetores
AK1	2	345	pOPINF e pOPINS3C
HGPRT1	2	227	pOINTRX, pOPINF,pOPINE e pOPINS3C
HGPRT2	2	227	pOINTRX, pOPINF,pOPINE e pOPINS3C
HGPRT3	2	228	pOINTRX, pOPINF,pOPINE e pOPINS3C
ADSS	2	433	pOINTRX, pOPINF, pOPINE, pOPINS3C e pOPINM
ADSL	2	480	pOINTRX, pOPINF, pOPINE, pOPINS3C e pOPINM

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 3 - Construção realizada na segunda etapa.

Gene	aa_N	aa_C	Vetores
ADSS	21	433	pOINTRX, pOPINF, pOPINE, pOPINS3C e pOPINM

Fonte: Elaborada pela autora

Os insertos foram inseridos nos vetores através da enzima *In-Fusion*. Em uma placa de PCR foi adicionado 100 ng do vetor linearizado, acrescentou-se de 10 a 250 ng de produto de PCR purificado e ajustou-se o volume com água. 10 µl dessa solução foram transferidos para o kit *In-Fusion*[®] *HD Cloning Kits* (Clontech) contendo a enzima *In-Fusion* liofilizada. A placa foi mantida a 42°C por 30 minutos.

Após a ligação do inserto, os vetores foram utilizados para transformar bactérias de propagação competentes *E.coli* OmniMax[®] II (Invitrogen). As células foram mantidas por 30 minutos no gelo na presença do vetor ligado ao inserto, posteriormente foram submetidas a um choque térmico (30 segundos a 42°C e retornadas imediatamente ao gelo). Após o choque térmico foi adicionado 300 µL de meio *SOC*-Invitrogen (sem antibiótico), e então as células foram incubadas a 37°C por uma hora a 125 rpm.

Terminado o período de incubação, as bactérias foram plaqueadas em LB ágar contendo 50 mg/mL de carbenicilina, 20% de X-Gal e 0,5 mM de IPTG. Este processo foi realizado em duplicata, onde uma das placas recebeu 25 µL do meio contendo as bactérias e a outra 5 µL. As placas foram incubadas a 37°C “*overnight*”.

3.4 Escolha das colônias e transformação de células de expressão

Observou-se nas placas o crescimento de colônias isoladas brancas e azuis. Colônias azuis são derivadas de bactérias não recombinantes e por isso foram escolhidas duas colônias brancas para cada construção. Essas colônias foram transferidas para blocos (ABgene AB-0932) que continham 1,2 mL de meio *Power Broth*TM suplementado com 50 mg/mL de carbenicilina. Os blocos foram vedados com adesivo poroso (ABgene AB-0718) e mantidos a 37°C “*overnight*” sob agitação.

No dia seguinte, a cultura dos blocos foi centrifugada e submetida à extração de DNA plasmidial usando o sistema robotizado *The Onyx*. Para confirmar a presença do inserto no vetor, foi realizado um PCR com a enzima *Phusion*TM *Flash High-Fidelity* usando *primers* específicos para os vetores pOPIN. A reação foi feita em termociclador, sendo que a temperatura de anelamento foi 60°C por 30 segundos e a temperatura de extensão foi 68°C por 2 minutos (2 minutos por kbp).

O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1,5% corado com SYBR[®] Safe DNA Stain (Invitrogen). Após confirmação do inserto nos vetores, esse produto de ligação foi utilizado para transformar bactérias de expressão competentes: *E.coli* B834(DE3) e *E.coli* Lemo21(DE3), utilizando o mesmo processo descrito anteriormente. Terminado o período de

incubação, as bactérias foram plaqueadas em LB ágar contendo 50 mg/mL de carbenicilina, 35 mg/mL de clorafenicol, 20% de X-Gal e 0,5 mM de IPTG. Este processo também foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C “overnight”.

3.5 Teste de expressão e purificação das enzimas

Observou-se novamente o crescimento de colônias isoladas brancas e azuis. Uma colônia branca por construção foi escolhida a fim de se fazer um pré-inóculo, visando à expressão das enzimas. Os testes de expressão foram realizados em pequena escala e por isso as colônias escolhidas foram transferidas para blocos (ABgene AB-0932) que continham 0,7 mL de meio *Power Broth*TM suplementado com 50 mg/mL de carbenicilina e 35 mg/mL de clorafenicol. Os blocos foram vedados com adesivo poroso (ABgene AB-0718) e mantidos a 37°C “overnight” sob agitação de 240 rpm.

No dia seguinte, 250 µL da cultura foram utilizados para produção de um estoque glicerinado que foi armazenado a -80°C, outros 250 µL foram transferidos para blocos similares que continham 3 mL de meio de cultura *Power Broth*TM suplementado com os antibióticos apropriados citados anteriormente. Os blocos foram novamente vedados com adesivo poroso e mantidos sob agitação de 240 rpm a 37°C de 3 a 5 horas, tempo necessário para que a densidade óptica (D.O.) a 595 nm fosse de aproximadamente 0,5. Neste ponto a temperatura das culturas foi reduzida a 20°C e então foi feita a indução da expressão com 1 mM de IPTG. As culturas foram mantidas “overnight” (~18 horas) sob agitação de 225 rpm a 20°C.

Foram realizados também testes de expressão para as enzimas utilizando o meio de autoindução *Overnight Express*TM(ONEX) *Instant TB medium* (Novagen®). O processo utilizado foi o mesmo descrito para o meio de cultura *Power Broth*TM excetuando-se apenas a etapa de indução.

Após a expressão-teste os blocos foram centrifugados a 6000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, ressuspenso em 210 µL de tampão de lise (50 mM Tris, 500mM NaCl, 30mM imidazol e 0,2% Tween com pH ajustado para 8,0) suplementado com uma alíquota (~1 mg/mL) de inibidores de protease e uma alíquota de DNase tipo I (~400 U/mL). A solução foi homogeneizada e mantida sob agitação a 1000 rpm por 30 minutos. Os blocos foram novamente centrifugados a 5000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aplicado no *Biorobotic 8000* (Qiagen), que realiza a purificação das

proteínas em placas de forma automatizada. A purificação da expressão teste foi analisada em SDS-PAGE.

Analisando o resultado dos testes de expressão das enzimas após protocolo de purificação foi constatado que a melhor cepa de bactéria para a expressão da maioria das enzimas foi a *E. coli* Lemo21(DE3) em meio de cultura *Power Broth*TM com expressão induzida por IPTG, portanto, este sistema foi utilizado para a expressão das enzimas em larga escala. Somente para a enzima HGPRT3 foi utilizada a cepa *E. coli* B834(DE3). Na Figura 9 pode-se observar o resultado do teste de expressão em SDS-PAGE da primeira rodada de construções (juntamente com o teste de expressão de outras enzimas do projeto mais abrangente ao qual este faz parte).

Figura 9 - Análise da expressão-teste das enzimas em *E.coli* Lemo21(DE3) no meio de cultura *Power Broth*TM em gel SDS-PAGE. Padrão de peso molecular. ADSS – pOPIN S3C, TRX, E, F e M (A1, B1, C1, D1 e E1 respectivamente). IMPDH – pOPIN S3C, TRX, E, F e M (F1, G1, H1, A2 e B2 respectivamente). ADSL - pOPIN S3C, TRX, E, F e M (C2, D2, E2, F2 e G2 respectivamente). HGPRT short -pOPIN S3C, TRX, E, F (H2, A3, B3 e C3). HGPRT 148820 -pOPIN S3C, TRX, E, F (D3, E3, F3 e G3). HGPRT 168500-pOPIN S3C, TRX, E, F (H3, A4, B4, C4). PNP2 - pOPIN S3C, M e TRX (D4, E4 e F4). NDPK -pOPIN S3C, TRX, E e F (G4, H4, A5, B5). AK1 - pOPIN F e S3C (C5 e D5). GMP5- pOPIN S3C, TRX, E, F e M (H5, A6, B6, C6, D6). GK - pOPIN S3C, TRX, E e F (E6, F6, G6 e H6).

Fonte: Elaborada pela autora.

A tabela 4 apresenta o resultado sumarizado da análise do padrão de expressão, apresentado no gel, para todas as construções que foram realizadas. Para a análise dos testes de expressão, adotando a seguinte simbologia: + corresponde a um rendimento de 0,1 a 1 mg/litro de cultura; ++ Rendimento de 1 a 5 mg/litro de cultura; +++ > 5 mg/litro de cultura, () usado para delimitar baixos limites. Ex. +(+) espera-se rendimento mais próximo de 1 do que 5; MBP - Apenas a proteína de ligação de maltose foi expressa; SUMO - Apenas a proteína Sumo foi expressa, TRX - Apenas a proteína Tiorredoxina foi expressa.

Tabela 4 - Resultado sumarizado dos testes de expressão das enzimas.

PCR199							Expressão			
Poço	Nome do Gene	aa_N	aa_C	OPPF N°.	Vetor	Verificação do PCR	B_IPTG	L_IPTG	B_ONEX	L_ONEX
A01	ADSS	2	433	11273	S3C					
B01	ADSS	2	433	11274	TRX					
C01	ADSS	2	433	11270	E					
D01	ADSS	2	433	11271	F			(+)		
E01	ADSS	2	433	11272	M		(+)			
C02	ADSL	2	480	11283	S3C		++	+++		
D02	ADSL	2	480	11284	TRX			+++		
E02	ADSL	2	480	11280	E		++	+++		
F02	ADSL	2	480	11281	F		++	+++		
G02	ADSL	2	480	11282	M		++	++	++	+
H02	HGPRT1	2	227	11287	S3C		+++		+	++
A03	HGPRT1	2	227	11288	TRX				++	+
B03	HGPRT1	2	227	11285	E		++			++
C03	HGPRT1	2	227	11286	F		+++	+++	++	
D03	HGPRT2	2	227	11291	S3C			+	++	++?
E03	HGPRT2	2	227	11292	TRX			+		+
F03	HGPRT2	2	227	11289	E					
G03	HGPRT2	2	227	11290	F					
H03	HGPRT3	2	228	11295	S3C		++	++	++	++
A04	HGPRT3	2	228	11296	TRX		+	++		
B04	HGPRT3	2	228	11293	E		+			
C04	HGPRT3	2	228	11294	F		++			
C05	AK1	2	345	11304	F			+		++
D05	AK1	2	345	11305	S3C			+		

Fonte: Elaborada pela autora

O resultado do teste de expressão foi satisfatório (++ ou +++) para as enzimas ADSL, HGPRT1 e HGPRT3. As enzimas AK1 e HGPRT2 apresentaram baixa expressão (somente +) e ADSS não apresentou expressão satisfatória.

Portanto, na segunda etapa foi realizado um novo teste de expressão utilizando a construção de ADSS compreendendo os resíduos 21-433.

Na segunda rodada foi utilizada a linhagem de *E. coli* Lemo 21(DE3) em meio de cultura *Power Broth*TM com indução por IPTG e o meio de cultura auto indutor ONEX. Como pode ser observado na Figura 10 (juntamente com análise do teste de expressão de outras enzimas do projeto) e na Tabela 5 com o sumário da expressão.

Figura 10 - Análise da expressão-teste em gel SDS-PAGE, do lado esquerdo, expressão em *E.coli* Lemo21(DE3) e indução com IPTG; do lado direito, expressão em *E.coli* Lemo21 (DE3) em meio de auto indução ONEX. Padrão de preso molecular. ADA – pOPINE, F, S3C, TRX, e M (C7, D7, E7, F7, G7). NDPK short– pOPINE, F, S3C, TRX, e M (H7, A8, B8, C8, D8). NDPK large– pOPINE, F, S3C, TRX, e M (E8, F8, G8, H8, A9). IMPDH short– pOPINE, F, S3C, TRX, e M (B9, C9, D9, E9, F9). IMPDH large– pOPINE, F, S3C, TRX, e M (G9, H9, A10, B10, C10). ADSS– pOPINE, F, S3C, TRX, e M (D10, E10, F10, G10, H10). Esta sequência se repete no teste de expressão utilizando o meio de auto indução ONEX.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5 - Resultado sumarizado do segundo teste de expressão da enzima ADSS.

Poço	Nome do gene	aa_N	aa_C	Vetor	OPPF No.	Verificação do PCR	L21_IPTG	L21_ONEX
D10	ADSS	21	433	E	13546			
E10	ADSS	21	433	F	13547			
F10	ADSS	21	433	S3C	13548			SUMO
G10	ADSS	21	433	TRX	13550			TRX
H10	ADSS	21	433	M	13549		MBP	(+)? MBP

Fonte: Elaborada pela autora

Conforme observado na análise do gel e tabela não houve expressão solúvel para ADSS.

Para a expressão em larga escala das enzimas ADSL, AK1, HGPRT1, HGPRT2 e HGPRT3 foram escolhidas as construções destacadas em vermelho na tabela 4 apresentadas na Tabela 6. O volume do meio de cultura foi ajustado de acordo com a efetividade apresentada no teste de expressão.

Tabela 6 - Enzimas e suas respectivas construções, meio de cultura, método de indução e volume escolhidos para expressão em larga escala.

Enzima	Nº OPPF	Cepa de <i>E.coli</i>	Vetor	Meio/Indução	Volume
ADSL	11281	Lemo 21(DE3)	F	<i>Power Broth</i> +IPTG	1 L
HGPRT1	11286	Lemo 21(DE3)	F	<i>Power Broth</i> +IPTG	1 L
HGPRT2	11291	Lemo 21(DE3)	S3C	<i>Power Broth</i> +IPTG	4 L
HGPRT3	11295	B834(DE3)	S3C	<i>Power Broth</i> +IPTG	4 L
AK1	11304	Lemo 21(DE3)	F	<i>Power Broth</i> +IPTG	4 L

Fonte: Elaborada pela autora

Na expressão em larga escala ADSL, HGPRT1, HGPRT3 e AK1 foram expressas e purificadas satisfatoriamente. Não sendo observada expressão para a enzima HGPRT2.

3.6 Expressão e purificação das proteínas em larga escala

Na expressão em larga escala, para o crescimento dos pré-inóculos foi utilizado o glicerinado de bactérias previamente estocado em -80°C . Foram crescidos 20 mL de pré-inóculo para cada 1L de expressão, em meio *Power Broth*TM. Os meios foram suplementados com os antibióticos carbenicilina e clorafenicol, mantidos “*overnight*” sob agitação a 37°C . Posteriormente realizou-se os experimentos de expressão das enzimas em volumes que variaram de 1 a 4L ajustados de acordo com o rendimento obtido nos testes. A expressão aconteceu sempre sob agitação a 20°C “*overnight*”.

Para a purificação as células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de lise (30 mL para cada 10 gramas de *pellet*) e imediatamente aplicadas no ÄktaXpress, um sistema automatizado de purificação e análise de proteínas recombinantes em larga escala que realiza a purificação baseado na técnica de cromatografia. A purificação foi feita primeiramente em coluna de níquel (Tampão lavagem: 50 mM Tris, 500mM NaCl, 50mM imidazol e 0,2% Tween com pH ajustado para 8,0 e Tampão de eluição: 50 mM Tris, 500mM NaCl, 200mM imidazol e 0,2% Tween com pH ajustado para 8,0) e automaticamente aplicada em uma coluna de gel filtração (coluna His-Gel Filtration S200). As frações foram coletadas para posterior análise em gel SDS-PAGE.

Em seguida as proteínas foram concentradas em concentrador MWCO e submetidas à clivagem com 0,5 mg/mL da protease 3C (*Humanrhinovirus 3C protease* – GE) para a retirada da cauda de histidinas. Após a clivagem, as proteínas foram submetidas à uma segunda purificação, que se deu manualmente em coluna His-Trap, a fração coletada foi novamente aplicada em gel SDS-PAGE e analisada.

Analizados os resultados e determinado o protocolo de expressão e purificação das enzimas, este foi reproduzido nas dependências do laboratório de Cristalografia no IFSC/USP com algumas adaptações sem comprometer a qualidade da amostra obtida. No protocolo de expressão, o antibiótico carbenicilina foi substituído por ampicilina em mesma concentração. Para o procedimento de purificação os tampões foram modificados visando estabilizar as enzimas purificadas, uma vez que estas precipitaram durante o processo de concentração com os tampões originais utilizados no OPPF. Inicialmente as bactérias foram lisadas em tampão de lise (50mM Tris, 500mM NaCl, 30mM imidazol, 5mM β -mercaptoetanol e 10% de

glicerol com pH ajustado para 7,4) através de sonicação e a purificação da enzima foi realizada em um único passo utilizando coluna de afinidade de Cobalto Agarose (tampão lavagem: 50 mM Tris, 500mM NaCl, 50mM imidazol, 5 mM β -mercaptoetanol e 10% de glicerol com pH ajustado para 7,4 e Tampão de eluição: 50 mM Tris, 500mM NaCl, 200mM imidazol, 5 mM β -mercaptoetanol e 10% de glicerol com pH ajustado para 7,4).

O resultado da análise de purificação de AK1 e HGPRT1 é possível ser observado na Figura 11, HGPRT3 na Figura 12 e ADSL na Figura 13.

Figura 11 - Análise da purificação das enzimas AK1 e HGPRT1 em gel de poliacrilamida 15%. Poço 1: Marcador de peso molecular. Poço 2 - 7. Enzima AK1 (42KDa). Poço 9 - 17: Enzima HGPRT1 (24 kDa).

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 12 - Análise da purificação da enzima HGPRT3 em gel de poliacrilamida 15%. Poço 1: Marcador de peso molecular. Poço 6 - 18. Enzima HGPRT3 (24 kDa).

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13 - Análise da purificação da enzima ADSL em gel de poliacrilamida 15%. Poço 1: Marcador de peso molecular. Poço 2, 3 e 4: Lavado. Poço 5 - 8. Enzima ADSL (54.5 kDa).

Fonte: Elaborada pela autora.

Puras e concentradas as enzimas foram submetidas a ensaios de cristalização.

CAPÍTULO 4

4 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DOS CRISTAIS

4.1 Ensaios de Cristalização

Os experimentos de cristalização e co-cristalização foram realizados em placas greiner de 96 poços utilizando 100nL de solução de proteína por poço (9.6μL por placa) para o *screening* de condições de cristalização utilizando o sistema Cartesian Microsys.

Para experimentos de co-cristalização foram selecionados ligantes naturais das enzimas, bem como possíveis inibidores, como, por exemplo, análogos de ATP para a enzima AK1. A proteína e os ligantes foram incubados em gelo por no mínimo 30 minutos. Foram realizados os seguintes *screenings* para cada proteína, conforme apresentado na tabela 7.

Tabela 7 - Ligantes e kits de cristalização utilizados para testes de cristalização das enzimas.

Enzima	Ligante (mM)	Kits de Cristalização
ADSL	Apo, AMP (5), Ácido Fumárico (2) Adenilsuccinato (2)	Morpheus, JCSG+, Index e Wizzard I e II
HGPRT 1 e 3	Apo, Hipoxantina (5), Guanina (5), PRPP (5), IMP (5), GMP (5)	Morpheus, JCSG+ e Index
AK1	Apo, Adenosina (5), AMP (5), ATP (2), AMP-PNP*(2), ATPα5* (2), ApCpp*(2), AppCp*(2), AppNHp*(2)	Morpheus e JCSG+

*análogos de ATP não hidrolisáveis

Fonte: Elaborada pela autora

Os cristais resultantes destes ensaios podem ser observados na Tabela 8. Foram obtidos cristais para as enzimas ADSL, AK1 e HGPRTs em diversas condições do kit de cristalização Morpheus (70) que apresentou excelentes resultados com as enzimas testadas. Centenas de cristais foram congelados para a coleta de dados no DLS.

Tabela 8 - Cristais obtidos para as enzimas do projeto.

Proteína	Ensaio	Kits de Cristalização	Cristais obtidos		
ADSL	AMP	Morpheus
	APO	Morpheus
AK1	ADO	Morpheus
	APO	Morpheus
	ApCpp	Morpheus
	AppNHp	Morpheus

continua

continuação

ATP

Morpheus

ATP_γS

Morpheus

GMP

Morpheus

HGPRT

IMP

Morpheus

 Fonte: Elaborada pela autora

4.2 Coleta de dados e otimização dos cristais

A primeira coleta de dados foi realizada testando os cristais obtidos e congelados no OPPF. Os cristais das HGPRTs e AK1 difrataram pobremente, sendo difícil obter um conjunto abaixo de 3.2Å. No caso dos cristais de HGPRT, estes possuem ~30μm em sua maior dimensão o que tornou esta coleta de dados muito desafiadora, os cristais sofreram um severo dano por radiação durante a coleta. Portanto, a utilização das linhas do DLS foi de fundamental importância para a obtenção dos resultados aqui apresentados.

Cristais da ADSL foram testados, na sua grande maioria em forma de placas. Estas placas difrataram pobremente, em torno de 6-7 angstroms de resolução. Um cristal em forma de agulha obtida na condição E12 do kit de cristalização Morpheus (30mM de etileno glicóis, 120mM de Tris base/bicina pH8.5 12.5% de MPD, PEG1000 e P3350), crescido na presença de 2mM de AMP difratou a 2,36Å de resolução.

Nas duas coletas posteriores, os cristais de ADSL e HGPRT1 obtidos no Brasil foram congelados e enviados para a coleta de dados via FEDEX. Já os cristais de AK1 e HGPRT3 não foram reproduzidos nas instalações do nosso laboratório.

Na segunda coleta de dados, foram obtidos diversos conjuntos de HGPRT1 na região de 3 Å de resolução, mas nenhum cristal com resolução adequada para resolução da estrutura. Sendo assim, para a terceira coleta de dados, houve um grande esforço na tentativa de otimizar os cristais visando a obtenção de uma estrutura com resolução mais alta em relação às obtidas. A otimização dos cristais incluiu experimentos de (1) variação de concentração da enzima incubada em diferentes temperaturas, (2) expressão e purificação de HGPRT com selenometionina e (3) “*screening*” das condições de cristalização incubadas em diferentes temperaturas.

4.2.1 Variação de concentração da enzima e temperatura

Foram testadas 3 diferentes concentrações de enzima: 2,5 mg/mL, 3 mg/ml e 5 mg/mL incubadas em três temperaturas: 4°C, 10°C e 18°C. Os experimentos foram realizados com a enzima Apo e incubada com os ligantes: hipoxantina, guanina, PRPP, GMP e IMP, entretanto, somente na presença do ligante IMP foi possível observar o crescimento dos cristais.

Figura 14 - Cristais de HGPRT1 à 2,5mg/mL de proteína incubada com IMP à 18°C na condição A4 do kit Morpheus.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Expressão e purificação de HGPRT com selenometionina

A enzima foi expressa em M9 meio mínimo suplementado com selenometionina seguindo o seguinte protocolo:

Solução de sais M9 – 5x

Em 800 ml de água foi adicionado:

- 34,07g Na_2HPO_4
- 15g KH_2PO_4
- 2,5g NaCl
- 5g NH_4Cl

A solução foi agitada até completa dissolução dos sais e o pH ajustado para 7.4.

O volume foi completado para 1000ml com água destilada e a solução esterilizada em autoclave.

M9 Meio Mínimo

Foram autoclavados 780 ml de água deionizada em 4 frascos utilizados para expressão de proteínas. Após frios, foram adicionados em cada frasco:

- 200 ml da Solução de sais M9 – 5x
- 20 ml de glucose 20% (esterilizada através de filtração)
- 2 ml de 1M MgSO_4 (esterilizada através de filtração)
- 100 μl de 1M CaCl_2 (esterilizada através de filtração)

Os meios de cultura foram suplementados com antibiótico ampicilina e clorafenicol. Foram retirados 200 ml de cada frasco para a preparação dos pré-inóculos em frascos previamente esterilizados em autoclave. Os 4 pré-inóculos cresceram sob agitação à 37°C “*overnight*”.

Após crescidos, os pré-inóculos foram inoculados nos frascos contendo meio mínimo, estes permaneceram sob agitação de 150 rpm à 37°C até que a densidade óptica (DO) fosse igual ou superior a 0,6. Diferente do protocolo original, cuja DO era atingida após 4 horas de crescimento celular, nesse caso levou-se 6 horas.

Nesse momento foi adicionado um mix de aminoácidos para inibir a síntese de metionina e suplementar selenometionina.

Mix de aminoácidos:

- 100mg Lisina (K), Fenilalanina (F) e Treonina (T)
- 50mg Isoleucina (I), Leucina (L) e Valina (V)
- 60mg SelenoMetionina (SeMet)

Por litro.

Os meios permaneceram sob agitação por 15 minutos para homogeneização dos aminoácidos. Posteriormente, a temperatura do agitador foi ajustada para 20°C e a expressão induzida com 1mM de IPTG. Esta seguiu o protocolo original cuja enzima é expressa “*overnight*”.

O protocolo de purificação também foi mantido conforme o original, utilizando coluna de Cobalto Agarose para purificação por afinidade.

O resultado da purificação foi analisado em gel de poliacrilamida 15%, conforme Figura 15.

Figura 15 - Análise da purificação da enzima HGPRT1SeMet em gel de poliacrilamida 15%. Poço 1: Marcador de peso molecular. Poço 2. Expressão da enzima. Poço 3: Eluato. Poço 4: Lavado. Poço 5 e 6: Eluição da enzima (24kDa).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 “Screening” das condições de cristalização em diferentes temperaturas

A HGPRT1SeMet e HGPRT1 nativa puras foram submetidas à testes de cristalização utilizando o kit a qual a enzima nativa cristaliza, o kit de cristalização Morpheus. Identificadas as melhores condições de cristalização da enzima (Tabela 9), estas tiveram o valor de pH e concentração de precipitantes variados, visando melhorar os cristais da enzima que são bastante pequenos (~30µm na sua maior dimensão) portanto de difícil manuseio e difração.

Tabela 9 - Condições de cristalização do kit Morpheus utilizadas para “screening”

Poço	Mix de precipitantes	Mix de aditivos	Tampão
A1	10% PEG 20.000, 20% PEG MME 550	0,03M cátions divalentes	0,1M MES/imidazol pH 6,5
A4	12.5% PEG 1000, 12.5% PEG 3350, 12.5% MPD	0,03M cátions divalentes	0,1M MES/imidazol pH 6,5
A5	10% PEG 20.000, 20% PEG MME 550	0,03M cátions divalentes	0,1M MOPS/HEPES pH 7,5
A8	12.5% PEG 1000, 12.5% PEG 3350, 12.5% MPD	0,03M cátions divalentes	0,1M MOPS/HEPES pH 7,5
A9	10% PEG 20.000, 20% PEG MME 550	0,03M cátions divalentes	0,1M Bis/Tris base pH 8,5
A12	12.5% PEG 1000, 12.5% PEG 3350, 12.5% MPD	0,03M cátions divalentes	0,1M Bis/Tris base pH 8,5

Fonte: Elaborada pela autora

Para as otimizações foram utilizados 4 blocos de soluções contendo 96 poços cada. Cada bloco de soluções foi utilizado para teste de cristalização através de gotas sentadas também em placas de 96 poços utilizando robô de cristalização.

Dois blocos foram utilizados para o grupo de precipitantes 10% PEG 20.000 e 20% PEG MME 550, cuja variação foi:

- PEG MME 550: 20%, 18%, 16% e 14%,
- PEG 20.000: 10%, 8%, 6% e 4%.
- MES/imidazol: pH 6.3, 6.5, 6.7 e 6.9,
- MOPS/HEPES: pH 7.3, 7.5, 7.7 e 7.9,
- Bis/Tris base: pH 8.3, 8.5, 8.7 e 8.9

F	7.5 x 7.5 x 12.5											
G	7.5 x 12.5 x 7.5											
H	12.5 x 7.5 x 7.5											

Os cristais, ainda muito pequenos, aparecem em cerca de 3 dias (Figura 16).

Figura 16 - Cristais de HGPRT1 com selenometionina na condição de cristalização B3 do Bloco 1.
Fonte: Elaborada pela autora.

Após vários experimentos de otimização dos cristais, a análise das gotas revelou que estes ainda possuíam $\sim 30\mu\text{m}$ na sua maior dimensão. Sendo assim, entre 150 e 200 cristais de HGPRT1 foram testados e na terceira coleta de dados foi possível obter uma estrutura inédita de HGPRT1 abaixo de $3\text{\AA}$, esta contém $2,5\text{mg/mL}$ de proteína incubada a 18°C na condição A4 do kit Morpheus.

Nessa mesma coleta de dados foi possível obter outra estrutura de ADSL na forma Apo com resolução de $2,14\text{\AA}$.

De todos os cristais testados nas três coletas de dados, foram obtidos 30 conjuntos de dados de HGPRT1 entre $5.24\text{\AA}$ e $2.8\text{\AA}$; 4 conjuntos de dados de AK1 (provenientes somente da primeira coleta de dados, uma vez que os cristais obtidos nas instalações do OPPF ainda não foram reproduzidos) entre $4.49\text{\AA}$ e $3.44\text{\AA}$; 12 conjuntos de dados de ADSL entre $3.64\text{\AA}$ e $2.14\text{\AA}$.

CAPÍTULO 5

5 ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA E CINÉTICA ENZIMÁTICA DE ADSL de *Schistosoma mansoni*

5.1 Coleta de dados, processamento, resolução e refinamento de dados de difração de raios-X

Foram obtidos dois conjuntos de dados de ADSL, o primeiro complexo binário ADSL-AMP à 2.36Å de resolução coletado na linha de luz I02 no DLS crescido na condição E12 do kit de cristalização Morpheus (30mM de etilenos glicóis, 120mM de Tris base/bicina pH8.5, 12.5% de MPD, PEG1000 e PEG3350). O segundo conjunto de dados coletado na linha I04-01, ADSL na forma Apo à 2.14Å de resolução crescido na condição F2 (0,12M de monossacarídeos, 0,1M de MES/imidazol pH6.5, 30% de etileno glicol e PEG8000).

Figura 17 - Cristal de ADSL da condição E12 do kit de cristalização Morpheus (30mM de etilenos glicóis, 120mM de Tris base/bicina pH8.5, 12.5% de MPD, PEG1000 e PEG3350).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os parâmetros da coleta de dados e refinamento das duas estruturas podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10 - Estatísticas da coleta de dados e refinamento para os cristais de ADSL.

Coleta de Dados	ADSL - AMP	ADSL - APO
Grupo Espacial	<i>I</i> 222	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2
Dimensão da célula (Å) <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> .	70.50, 73.06, 180.35	76.16, 82.63, 163.78
Ângulos da célula (°)	$\alpha = \beta = \gamma = 90$	$\alpha = \beta = \gamma = 90$
Detector	PILATUS 6M	PILATUS 2M
Fonte de Raio-X	DLS I02	DLS I04-1
Comprimento de onda (Å)	0.9795	0.9200
Resolução (Å)	35.23 - 2.36 (2.49 - 2.36)*	58.16 - 2.14 (2.20 - 2.14)*
Redundância	5.4 (5.6)*	7.2 (7.1)*
<i>R</i> _{pim} (%)**	6.2 (29.7)*	5.2 (29.8)*
CC (1/2)	0.987 (0.730)*	0.996 (0.701)*
Completeza (%)	99.8 (98.2)*	99.8 (99.9)*
Reflexões totais	105164 (15589)*	414384 (29958)*
Reflexões únicas	19416 (2774)*	57766 (4219)*
I / σ (I)	8.5 (2.6)*	10.4 (2.6)*
Parâmetros Refinamento		
Reflexões usadas refinamento	19399	57730
<i>R</i> (%)***	19.16	22.24
<i>R</i> _{Free} (%)***	23.12	25.57
No. átomos proteína	3735	6871
No. átomos ligante	23	-
Erro coordenada (ML baseado) (Å)	0.27	0.28
Erro de fase (°)	23.58	24.85
<i>Clashscore</i>	5.83	5.24
RMSD da geometria ideal****		
r.m.s. distância ligações (Å)	0.002	0.002
r.m.s. ângulos de ligação (°)	0.544	0.493
PDB ID	5EYT	5EYV

Fonte: Elaborada pela autora

*Valores entre parênteses referem-se aos valores da mais alta resolução.

** $R_{pim} = \sum_{hkl} [1/(N(hkl) - 1)]^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ *** $R = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ onde $|F_c|$ é a amplitude do fator de estrutura calculado do modelo e $|F_o|$ é a amplitude do fator de estrutura observado do modelo. R_{free} é calculado com base em 5% do conjunto de reflexões que não é utilizado durante o refinamento (71).

****RMSD "root mean square deviation", desvio quadrático médio do conjunto de parâmetros de estereoquímica ideal (72).

A primeira estrutura foi resolvida por substituição molecular utilizando o programa Phaser (73) tendo ADSL humana em complexo com AMP (PDB 2J91) como modelo de busca, a identidade sequencial entre a ADSL humana e de *S. mansoni* é de 57%. Conforme observado na tabela, o cristal pertence ao grupo espacial *I*222 e possui apenas uma molécula por unidade assimétrica.

Após a resolução da estrutura, o modelo resultante foi submetido a um ciclo automático de construção do modelo utilizando o programa wARP/ARP (74). Após o ciclo automático de refinamento vários ciclos de construção manual do modelo e refinamento foram realizados utilizando o programa Coot (75) e Phenix. (76)

Analisando os mapas de densidade eletrônica da primeira estrutura coletada, nota-se a presença de ligante na região do sítio ativo da molécula de ADSL presente na unidade assimétrica, este foi identificado como sendo uma molécula de AMP (Figura 18).

Figura 18 - Mapa de densidade eletrônica (Fo-Fc) para o AMP no sítio ativo da ASDL de *S.mansoni*. O sítio ativo é formado pela participação de três das quatro subunidades da enzima.

Fonte: Elaborada pela autora.

O AMP foi adicionado manualmente e as águas com o auxílio do programa Phenix.

A estrutura da forma APO também foi resolvida pelo mesmo processo de substituição molecular e teve como modelo de busca a estrutura da ADSL com AMP previamente refinada. A estrutura da ADSL APO possui dois monômeros na unidade assimétrica do grupo espacial $P2_12_12$.

5.2 Validação das estruturas

Os modelos tridimensionais de ADSL obtidos após o completo refinamento foram

validados de três formas: primeiro avaliando-se o valor do R_{work} e R_{free} obtidos ao final do refinamento, que correspondem a $R_{\text{work}} = 0.1916$ e $R_{\text{free}} = 0.2312$ para ADSL-AMP e a $R_{\text{work}} = 0.2224$ e $R_{\text{free}} = 0.2557$ para ADSL Apo. Valores considerados coerentes e adequados em relação ao valor da resolução obtida (77).

A segunda, foi a avaliação da geometria da proteína através do programa MOLPROBITY (78). O resultado pode ser visualizado na tabela 11.

Tabela 11 - Análise da geometria de ADSL gerada pelo programa MOLPROBITY. (78)

Parâmetro analisado	ADSL-AMP	ADSL-Apo	Parâmetros referenciais (ideal)
Rotâmeros ruins	2.46%	2.46%	<0.3%
Desvio $C\beta > 0.25\text{\AA}$	0	0	0
Resíduos com ligações ruins	0%	0%	0%
Resíduos com ângulos ruins	0%	0.02%	<0.1%

Fonte: Elaborada pela autora

Apesar da estrutura de ADSL Apo apresentar uma resolução melhor que o complexo ADSL-AMP, o refinamento manual exigiu maior empenho devido a falta de densidade eletrônica clara em diversas regiões. Ambas estruturas apresentam o número de “rotâmeros ruins” acima do padrão de referência considerado ideal. ADSL-Apo apresentou uma porcentagem de resíduos com “ângulos ruins” maior que ADSL-AMP. Entretanto, esta, apesar de não ideal em alguns parâmetros analisados, é a melhor geometria alcançada após o refinamento das estruturas. Estando em um padrão aceitável.

A terceira forma de validação utilizada foi a avaliação dos ângulos diédricos Φ (phi) versus Ψ (psi) dos aminoácidos da estrutura no diagrama de Ramachandran gerado pelo programa Procheck. (79) O resultado do gráfico de Ramachandran gerado pode ser visualizado na Figura 19 para a estrutura de ADSL-AMP e Figura 20 para a estrutura de ADSL-Apo.

Figura 19 - Diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros para a estrutura ADSL-AMP. A região representada em vermelho corresponde à região mais favorável para os valores dos ângulos, a região amarelo escuro é a adicionalmente permitida, amarelo claro é a generosamente permitida e a região em branco é a região não permitida. As glicinas são representadas por triângulos.

Fonte: Elaborada pela autora

Na estrutura de ADSL-AMP é possível observar que os resíduos em regiões mais favoráveis (vermelho) correspondem a 92.8%, adicionalmente permitida (amarelo escuro) a 6.9%, generosamente permitida (amarelo claro) a 0,2% não permitida a 0%.

Figura 20 - Diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros para a estrutura ADSL-Apo. A região representada em vermelho corresponde à região mais favorável para os valores dos ângulos, a região amarelo escuro é a adicionalmente permitida, amarelo claro é a generosamente permitida e a região em branco é a região não permitida. As glicinas são representadas por triângulos.

Fonte: Elaborada pela autora

Na estrutura de ADSL-Apo os resíduos em regiões mais favoráveis (vermelho) correspondem a 91%, adicionalmente permitida (amarelo escuro) a 8.5%, generosamente permitida (amarelo claro) 0.5% e não permitida a 0%.

Baseado na análise de 118 estruturas com resolução em torno de 2Å e R-factor próximo de 20%, é de esperar que um modelo de boa qualidade tenha mais de 90% de resíduos nas regiões mais favorecidas. (79)

A partir dos métodos utilizados para a validação do modelo podemos considerá-los confiáveis para a análise da estrutura tridimensional da enzima ADSL de *Schistosoma mansoni*.

5.3 Análise das estruturas tridimensionais obtidas de ADSL de *Schistosoma mansoni*

5.3.1 Estrutura secundária, topologia e regiões conservadas

A subunidade de ADSL é quase completamente composta por α -hélices. Pode ser dividida em três domínios (Figura 21) que se combinam para formar uma estrutura alongada. Os domínios I e III são encontrados nas extremidades do feixe helicoidal longo formado pelo domínio II. O domínio I ou N-terminal compreende os resíduos de 1 – 101, o qual é formado por 7 hélices ($\alpha 1 - \alpha 7$).

O domínio II ou central, consistindo dos resíduos 102 – 358 que formam um feixe helicoidal alongado montado por $\alpha 8$ até $\alpha 15$, bem como uma curta folha beta formada por 2 fitas antiparalelas ($\beta 1$, $\beta 2$) posicionadas entre $\alpha 8$ e $\alpha 9$. O domínio III ou C-terminal compreende 9 hélices ($\alpha 16 - \alpha 25$) construídas dos resíduos 359 – 480.

Figura 21 - Estrutura de ADSL de *S. mansoni* (monômero) é composta por 3 domínios: domínio I (vermelho), domínio II (azul) e domínio III (amarelo).

Fonte: Elaborada pela autora.

A estrutura secundária em função da sequência de aminoácidos da ADSL em complexo com AMP e a topologia da estrutura podem ser visualizadas nas Figuras 22 e 23.

Figura 22 - Estrutura secundária de SmADSL em complexo com AMP em função da sequência de aminoácidos.

As fitas β são representadas por setas rosas, as α-hélices por espirais roxas com a respectiva numeração em cima (H1, H2...H25), as 2 folhas β são classificadas como A e B, sendo essas letras colocadas acima das fitas identificando a qual folha pertencem. Os símbolos: β - beta turn, γ - gamma turn e ββ - beta hairpin.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise de estrutura secundária de ADSL-AMP gerada pelo programa PROMOTIF mostrou que 17 resíduos de aminoácidos (3,6%) estão em fitas β , 289 (61,2%) em α -hélices, 18 (3,8%) em hélices 3-10, 148 (31,4%) em outros, totalizando 472 aminoácidos. A estrutura possui: 2 folhas β antiparalelas, 2 beta hairpins, 1 beta bulge, 4 fitas β , 25 α -hélices, 44 interações hélice-hélice, 25 β -turns e 4 gama-turns.

Figura 23 - Topologia de ADSL-AMP. As fitas β são representadas por setas rosa, as α -hélices em tubos vermelhos e os loops em azul. O N-terminal é indicado pela letra N e o C-terminal pela letra C.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise de estrutura secundária de ADSL-Apo gerada pelo programa PROMOTIF

mostrou que 17 resíduos de aminoácidos (3,6%) estão em fitas β , 296 (63,5%) em α -hélices, 17 (3,6%) em hélices 3-10, 136 (29,2%) em outros, totalizando 466 aminoácidos. A estrutura possui: 2 folhas β antiparalelas, 2 beta hairpins, 1 beta bulge, 4 fitas β , 26 α -hélices, 62 interações hélice-hélice, 23 β -turns e 7 gama-turns.

O alinhamento da sequência de aminoácidos de ADSL de *Schistosoma mansoni* com a correspondente humana pode ser visualizado na Figura 24.

Figura 24 - Alinhamento de ADSL humana e de *Schistosoma mansoni*. A primeira linha corresponde à estrutura secundária formada, a segunda linha a sequência de aminoácidos de ADSL de *S. mansoni* e a terceira linha de ADSL humana. Os resíduos brancos grifados em vermelho são conservados nas duas estruturas, os em vermelho grifados em branco são os resíduos não conservados, porém similares.

Fonte: Elaborada pela autora.

O alinhamento da sequência de aminoácidos de ADSL com sua correspondente humana revelou longas regiões extremamente conservadas entre ambas. Na região dos resíduos 281 – 293 é possível observar que a sequência assinatura Q*GSS*MP*K*NP comum a todos os membros da superfamília de β -eliminação (64) é exatamente igual na ADSL de *S. mansoni* e humana. As regiões conservadas podem ser observadas na estrutura apresentada Figura 25. Em A, essas regiões estão destacadas em vermelho, em B é possível observar os 261 resíduos idênticos entre ambas destacados em pink.

Figura 25 - Análise das regiões conservadas à partir do alinhamento da sequência de aminoácidos de ADSL de *S. mansoni* e ADSL humana. A. Regiões conservadas destacadas em vermelho. B. Resíduos idênticos entre ambas destacados em pink.

Fonte: Elaborada pela autora.

Já a análise do alinhamento da sequência de aminoácidos com todas as outras enzimas depositadas no PDB revelou similaridade nos domínios I e II com outras espécies. Na Figura 26 é possível observar a análise dos resíduos conservados e idênticos entre ADSL de *S. mansoni* (*SmADSL*) com todas as ADSLs depositadas no PDB. O degrade de vermelho a branco, passando por tons de rosa indica o grau de conservação dessas regiões, sendo vermelho mais conservado e branco não conservado. Destacados em pink estão os 5 aminoácidos que são idênticos em todas as ADSLs analisadas: Ala157, Gly198, Pro288, Lys290 e Asn292.

Figura 26 - Análise das regiões conservadas à partir do alinhamento da sequência de aminoácidos de ADSL de *S. mansoni* com todas as ADSLs depositadas no PDB. Regiões conservadas destacadas em degradê de vermelho a branco, da mais conservada a não conservada respectivamente. Resíduos idênticos entre as estruturas destacados em pink.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.2 Enovelamento

Atualmente (além das estruturas de *S. mansoni* aqui descritas) existem 23 estruturas de ADSLs depositadas no banco de dados PDB que correspondem a 15 organismos diferentes: *Thermotoga maritima* (2) (64), *Pyrobaculum aerophilum* (1) (81), *Bacillus subtilis* (1) (81), *Caenorhabditis elegans* (1), *Plasmodium Vivax* (2) (82), Humano (4) (83), *Bacillus anthracis* (1), *Escherichia coli* (4) (84), *Legionella pneumophila* (1), *Staphylococcus aureus* (1) (85), *Francisella tularensis* (1), *Trypanosoma Brucei* (1), *Mycobacterium smegmatis* (1) (86), *Leishmania donovani* (1), *Salmonella typhimurium*. (1)

Experimentos de “*Dynamic light scattering*” (DLS) indicaram que em amostras frescas de ADSL concentradas a 1 mg/mL existem 2 espécies em solução, sendo de aproximadamente 8% dímeros e 92% tetrâmeros. Em amostras congeladas há uma semana essa relação era de 15% dímeros e 85% tetrâmeros na mesma concentração.

Alterações no estado multimérico entre dímeros e tetrameros de ADSLs foram previamente reportadas. A enzima de *Bacillus subtilis* é descrita como dimérica em sua maioria quando a concentração da proteína é baixa (0.1 mg/ml). No entanto, quando a concentração de proteína aumenta, as espécies tetraméricas tornam-se o mais abundantes. (87)

O dímero de ADSL pode ser visualizado na Figura 27 e o tetramero na Figura 28.

Figura 27 - Estrutura dimérica de SmADSL em complexo com AMP (preto) (subunidade A: verde, subunidade B: vermelho).

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 28 - Estrutura tetramérica de *SmADSL* em complexo com AMP (preto) (subunidade A: verde, B: vermelho, C: amarelo, D: azul).

Fonte: Elaborada pela autora.

É observado que estruturas cristalográficas de ortólogos também revelaram a formação de tetrâmeros. Esta é descrita como a estrutura funcional da enzima, uma vez que o tetrâmero contém 4 sítios ativos e cada um deles é formado por regiões de 3 diferentes subunidades. (82,85-86)

Sobrepondo as estruturas ADSL em complexo com AMP (vermelho) contra a ADSL APO (azul) obtêm-se o valor de RMSd de 1.3Å (quando sobreposto os monômeros A) e de 0.28Å (quando sobreposto o monômero B) (Figura 29). A diferença mais significativa é observada no domínio III, que possui orientação diferente em A e é parcialmente desordenado em B.

Figura 29 - Sobreposição do monômero da ADSL-AMP (vermelho) com os monômeros da ADSL-APO (azul). A maior diferença é observado no domínio III, que possui orientação diferente em A e é parcialmente desordenado em B.

Fonte: Elaborada pela autora.

Quando sobrepostos os tetrâmeros de ADSL-AMP e ADSL-APO o RMSd foi de 1.14Å (Figura 30).

Figura 30 - Sobreposição dos tetrâmeros da *S. mansoni* em complexo com AMP (vermelho) e APO (azul) o RMSd é de 1.14Å.

Fonte: Elaborada pela autora.

Sobrepondo a estrutura de *SmADSL* com a estrutura da ADSL humana (Figura 31) é possível observar que seu enovelamento é bastante similar, apresentando somente uma diferença na orientação do domínio III entre as duas estruturas. É reportado que a estrutura do core, referente ao domínio II da enzima é altamente conservado entre os membros da superfamília de β -eliminação, enquanto os domínios I e III podem mudar significativamente.

(64)

Figura 31 - Sobreposição das estruturas de ADSL de *S.mansoni* (monômero) em vermelho e ADSL humana em amarelo. AMP em preto. RMSd = 0,589Å.

Fonte: Elaborada pela autora.

Quando comparados os tetrâmeros da *SmADSL* com a ADSL humana em complexo com AMP o RMSd é de 1.43Å para o complexo com AMP e de 1.46Å para a estrutura APO. (Figura 32).

Figura 32 - Sobreposição das ADSL de *S. mansoni* (ADSL-AMP vermelho), (APO- azul) contra a ADSL humana em complexo com AMP (amarelo).

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.3 O sítio ativo

Conforme descrito anteriormente, o sítio ativo da ADSL, assim como das outras ADSLs depositadas no banco de dados, é formado por resíduos provenientes de três das quatro subunidades que compõe a estrutura catalítica da enzima (Figura 33).

Figura 33 - Participação de três das quatro subunidades da enzima *SmADSL* em complexo com AMP na formação do sítio ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na estrutura de *SmADSL* em complexo com AMP, o fosfato do AMP faz ligação de hidrogênio com Arg14C, Tyr15C, Arg298C, Ser329A, Arg333A e uma molécula de água.

O O2 da ribose faz ligação de hidrogênio com o grupo carbonila da Arg79A e O3 faz ligação de hidrogênio com o grupo carbonila da Arg79A, com o grupo amina da Asp81A e uma molécula de água.

O N1 da adenina faz ligação de hidrogênio com Ser106A e uma molécula de água. N6 da adenina com Gln236A.

Figura 34 - Ligações de hidrogênio (pontilhado amarelo) do ligante AMP no sítio ativo de *SmADSL*.
Fonte: Elaborada pela autora.

Um modelo esquemático da ligação do AMP no sitio ativo da *SmADSL* foi gerado através do programa Ligplot + pode ser visualizado na Figura 35.

Figura 35 - Modelo esquemático para a ligação da AMP no sítio ativo da ADSL de *S. mansoni*.
Fonte: Elaborada pela autora.

O maior número de ligações de hidrogênio ocorre entre a ADSL e o grupo fosfato do AMP.

A sequência de aminoácidos de 281 à 293 na *SmADSL* correspondente à região conservada considerada a assinatura das enzimas da superfamília de β -eliminação, é uma região de loop que circunda o sítio ativo.

Na estrutura *SmADSL* em complexo com AMP, esta região é uma região difusa, não sendo observada densidade eletrônica clara para os resíduos 281QIGSSA286. Somente são observados os resíduos 287MPYKRNP293 (Figura 36). Nesse loop encontram-se três, dos cinco resíduos (Pro288, Lys290 e Asn292) invariáveis encontrados em todas as ADSLs depositadas no PDB.

Figura 36 - Loop correspondente a sequência de aminoácidos de 281 à 293 na *SmADSL*-AMP correspondente à região conservada considerada a assinatura das enzimas da superfamília de β -eliminação na região do sítio ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resíduo Lys80 está representado na Figura como referência para ligação da sequência da cadeia cuja densidade eletrônica não foi possível observar.

Fyfe e colaboradores (85) descrevem essa região da estrutura de ADSL de *Staphylococcus aureus* como uma parte do sítio ativo formada por um loop móvel, uma vez que a densidade eletrônica nessa região também se apresentou de forma difusa. Corroborando com esses dados na ADSL de *E.coli* (*EcADSL*) esse loop é desordenado na estrutura Apo, mas a presença de um ligante induz a reorganização parcial do loop para perto do sítio de ligação. (84)

Assim como em *EcADSL*, na estrutura *SmADSL* Apo esta região é ainda mais difusa, onde são observados somente os resíduos Lys290, Arg291, Asn292 e Pro293 (Figura 37). Sugerindo que a presença do ligante gere certa estabilidade ao local.

Figura 37 - Loop correspondente a sequência de aminoácidos de 281 à 293 na *SmADSL*-Apo correspondente à região conservada considerada a assinatura das enzimas da superfamília de β -eliminação na região do sítio ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível observar através da sobreposição dos loops (Figura 38), que conformação da cadeia lateral do resíduo Arg291 difere entre ambos. Na estrutura em complexo com AMP, Arg291 aponta para baixo e para fora do sítio ativo enquanto que na estrutura Apo a cadeia lateral aponta para dentro do sítio ativo. A continuação do loop pela ligação da Lys290 mostra que na ADSL-AMP, o loop se afasta mais do sítio ativo em relação à ADSL-Apo. Essa diferença sugere que existe uma adaptação do loop ao volume do ligante presente no sítio ativo.

Figura 38 - Sobreposição dos loops de ADSL-AMP (amarelo) e ADSL-Apo (verde) onde a conformação da Arg291 e Lys290 difere entre ambos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Através da comparação dos sítios ativos das estruturas da *SmADSL* e da ADSL humana (Figura 39), é possível observar que estrutura de ligação de AMP no sítio ativo de *S. mansoni* é bastante similar ao complexo de ADSL humana com AMP. Um alto grau de conservação ao redor do sítio de ligação e ativo é observado em todas ADSLs, sugerindo que o mecanismo enzimático é estritamente conservado.

O sítio de ligação ao AMP é totalmente conservado entre as ADSLs humana e de *S. mansoni*. A conformação das cadeias laterais é bastante similar entre os complexos com AMP, entretanto quando comparamos os complexos com AMP com a estrutura APO se observa diferentes conformações para a cadeia lateral especialmente para os resíduos Arg79 e His80.

Figura 39 - Sobreposição dos sítios de ligação ao AMP nas ADSLs de *S. mansoni* (Branco-AMP e amarelo-APO) e humana (magenta).

Fonte: Elaborada pela autora.

Além dos resíduos que fazem ligação de hidrogênio com a molécula de AMP, os resíduos conservados da região do loop, outros resíduos que merecem atenção na descrição do sítio ativo são os resíduos catalíticos.

A identificação da base catalítica de ADSLs tem sido um extenso debate. (81,84-86,88) Os resíduos catalíticos seguem uma reação ácido-base geral, envolvendo dois grupos separados para função de ácido e base catalíticos. (88)

5.3.4 Mecanismo catalítico

ADSL catalisa a clivagem de adenilsuccinato (ADS) através de um mecanismo ácido-base geral envolvendo a β -eliminação de fumarato.

Figura 40 - ADSL catalisa a clivagem de adenilsuccinato (ADS) em AMP e Fumarato.
 Fonte: FYFE et al. (85)

A base catalítica está envolvida na abstração de um próton (Figura 41, passo 1), seguido da protonação do ácido catalítico (Figura 41, passo 3).

A reação tem início com a abstração do próton do C β do substrato pela base geral, resultando na formação de um carbânion intermediário. O intermediário é estabilizado por formas de ressonância do acil-carboxilato, que transporta duas cargas negativas no seu grupo δ -carboxílico (Figura 41, passo 2). Subseqüente doação de prótons pelo ácido catalítico para o átomo N1 ou N6 do substrato resulta na clivagem da ligação de C α -N (Figura 41, passo 4) e liberação do produto (Figura 41, passo 5). A reação prossegue através de um mecanismo de uni-bi com fumarato deixando o sítio ativo antes do AMP. (84)

Figura 41 - Esquema geral mostrando a clivagem de adesnilosuccinato (SAMP) pela enzima ADSL. Os 5 passos envolvidos são: (1) Abstração de um próton pela base catalítica (B) do átomo CB do grupo succínico; (2) estabilização do carbânion intermediário formado; (3) protonação de N1 ou N6 da porção do AMP pelo ácido catalítico; (4) clivagem da ligação de Cα-N entre AMP e o grupo succínico; e (5) liberação dos produtos AMP e fumarato.

Fonte: TSAI et al. (84)

A estereoquímica trans da reação sugere que dois grupos separados participam das etapas de abstração e doação de prótons. (89) Conforme descrito anteriormente, ainda não existe consenso de quais são os resíduos que atuam como ácido e base catalíticos no sítio ativo de ADSLs.

Nos primeiros estudos realizados em 1999 (90), ensaios de atividade envolvendo a enzima ADSL de *B. subtilis* sugeriram que os resíduos His68 e His141 são respectivamente ácido e base geral nessa reação (His80 e His153 em *SmADSL*). Foulk e colaboradores no estudo da estrutura do gene da enzima sugeriram que estes mesmos resíduos deveriam ser também os resíduos catalíticos em *SmADSL* devido a conservação exata em sua sequência. (37)

Posteriormente, estudos estruturais de ADSL de *T. marítima* complementaram esses dados bioquímicos, permitindo a construção manual de um modelo para o substrato ligado, evidenciando a participação de His68 e His141 na catálise e dos resíduos Gln212, Asn270 e Glu275 na orientação do substrato. (81)

Mais tarde em 2007 (84), foi proposto que o resíduo His153 ou uma molécula de água funcionariam como ácido e Ser284 como base (resíduos correspondentes em *SmADSL*). Estes estudos propuseram que uma vez que a serina conservada está posicionada no loop móvel perto do sítio ativo, esta pode abstrair o próton do substrato, ajudando a criar o carbânion intermediário. A histidina seria o doador de próton de N6 para suportar a quebra da ligação C-N. A colocação da adenina no sítio ativo em relação a histidina sugere que é improvável que a protonação de N1 ocorra durante a catálise.

Em um estudo mais recente com ADSL de *Staphylococcus aureus* realizado em 2010 (85) foi proposto que o resíduo His153 e Lys290 (resíduos correspondentes em *SmADSL*) são os resíduos ácido e base respectivamente.

Mutagênese da lisina equivalente em ADSL de *B. subtilis* diminuiu significativamente a atividade da enzima. (91)

Ainda mais recentemente em 2014 (86), a primeira estrutura de ADSL apo com o loop móvel, conservado na região do sítio ativo, ordenado foi reportada. Essa ADSL de *Mycobacterium smegmatis* sugere que His153, Lys290 e Ser284 são os resíduos mais prováveis para as funções de ácido e base catalíticos.

5.3.5 Interface dimérica, estabilidade estrutural e o potencial para desenvolvimento de inibidores

Fyfe e colaboradores (85) em seus estudos da estrutura de ADSL de *Staphylococcus aureus* em complexo com AMP, ficaram intrigados com duas observações. A primeira, que o tetrâmero (ou dímero de dímeros) é requerido para a produção da enzima funcional, uma vez que os resíduos de três subunidades são requeridos para a formação do sítio ativo. Em segundo lugar, há menos conservação da sequência entre os resíduos de ADSLs envolvidas na montagem da estrutura quaternária do que aqueles em torno dos sítios ativos que são extremamente conservados. A partir dessas observações, decidiram considerar a interface do dímero como um potencial alvo para desenvolvimento de novos fármacos baseados na estrutura da enzima.

Este ponto de vista é bastante interessante e reforçado por pesquisas que identificaram onze mutações pontuais que causam a deficiência de ADSL em humanos e consequentemente retardo mental, sendo que algumas dessas mutações influenciam a estabilidade do tetrâmero. (66)

Comparando os resíduos da ADSL humana nativa e a forma inativa, quando mutada, com os resíduos correspondentes em *SmADSL* (tabela 12), foi mostrado que sete de onze desses resíduos são exatamente conservados com respeito ao grupo funcional da cadeia lateral em relação a enzima nativa. Sugerindo que esses resíduos também são importantes para *SmADSL*. (37) O posicionamento dos onze resíduos na estrutura tridimensional pode ser observado na Figura 42.

Tabela 12 - Comparação dos resíduos entre a ADSL humana nativa, ADSL humana mutada e *SmADSL* que foram identificados cujas mutações implicam na deficiência severa de ADSL em humanos e consequentemente retardo mental em pacientes.

ADSL humana	ADSL humana mutante	ADSL <i>Schistosoma</i> <i>mansoni</i>
M26	L26	M20
I72	V72	V66
P100	A100	P94
R141	W141	R135
R190	Q190	K184
K246	R246	K241
R303	C303	R298
S395	R395	A390
D422	Y422	S418
R426	H426	K422
S438	P438	S434

Fonte: FOULK et al. (37)

No entanto, o resíduo V66 é equivalente ao resíduo encontrado na enzima humana mutada e os resíduos A390 e S418 não são conservadas em relação ao grupo funcional da sua cadeia lateral. Isto sugere que esses resíduos podem ser menos importantes para a estrutura e função de *SmADSL* ou que a estrutura da enzima humana e de *S.mansoni* alcançam sua estrutura e estabilidade de uma forma diferente. (37)

Figura 42 - Posicionamento estrutural em *SmADSL* dos resíduos identificados cujas mutações implicam na deficiência severa de ADSL em humanos e consequentemente retardo mental em pacientes.

Fonte: Elaborada pela autora.

A mutação de Lys246 (Lys241 em *SmADSL* – Figura 43) para ácido glutâmico na enzima humana situa-se na interface dimérica A-B ou na interface C-D e resulta numa proteína predominantemente monomérica com atividade enzimática insignificante. (92)

Figura 43 - Posicionamento do resíduo Lys241 em *SmADSL* na interface dimérica A-B.
Fonte: Elaborada pela autora.

Na estrutura *SmADSL*, o resíduo Lys241 da cadeia A faz uma ligação de hidrogênio com o resíduo Thr256, duas ligações com Asp176 e duas com Asn252 da cadeia B (Figura 44).

Figura 44 - Ligações de hidrogênio (pontilhado amarelo) entre os resíduos Lys241A com Thr256B, Asp176B e Asn252B em *SmADSL*.

Fonte: Elaborada pela autora.

A mutação de Arg303 (Arg298 em *SmADSL* – Figura 45) para cisteína na enzima humana situa-se na interface B-C ou na interface A-D na formação do tetrâmero. A importância do resíduo equivalente na estabilidade tetramérica e atividade da enzima, em ADSL de *Bacillus subtilis* foi demonstrada através de experimentos de mutação sítio dirigida. (93)

Posteriormente, Ray e colaboradores (83) realizaram estudos termodinâmicos e enzimáticos dessa mutação na enzima humana e observaram a perda de cooperatividade por causa da mutação R303C devido à remoção de ligações de hidrogênio com um dos três monômeros que compreendem o sítio ativo. Curiosamente, perceberam que ao contrário de outras mutações que conduzem a deficiência de ADSL, essa mutação afetaria mais significativamente a capacidade da enzima para catalisar a conversão de ADS do que a de SAICAR aos seus respectivos produtos.

Figura 45 - Posicionamento do resíduo Arg298 em *SmADSL* na interface B-C.
Fonte: Elaborada pela autora.

Na estrutura *SmADSL*, o resíduo Arg298 da cadeia B interage com a cadeia C mediado por uma ligação de hidrogênio com o resíduo Ile480B ligado à uma molécula de água que Glu75 da cadeia C também faz ligação. Glu75C faz uma ligação de hidrogênio com o resíduo Arg14B que se liga na mesma molécula de água que Ile480B e Glu75C (Figura 46).

Figura 46 - Ligações de hidrogênio (pontilhado amarelo) entre os resíduos Arg298B, Ile480B, Glu75C, Arg14B e uma molécula de água como mediadora em *SmADSL*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outras mutações dos resíduos que não se encontram na interface dimérica ou tetramérica também foram relatadas como sendo importantes na estabilidade estrutural da enzima. Polenchar e colaboradores (87,93) realizaram experimentos de mutação sítio dirigida em ADSL de *Bacillus subtilis* correspondente à outras três mutações descritas (M26L, R141W, S395R) para a severa deficiência de ADSL em humanos. Esses pesquisadores demonstraram a importância desses resíduos na estabilidade da estrutura quaternária da enzima.

Ter como alvo a forma transiente de interações proteína-proteína ou a interface de conjuntos oligoméricos por métodos de busca baseados em estrutura para encontrar inibidores apresenta um desafio significativo. Os fatores de complicação incluem o elevado grau de especificidade e as grandes áreas de interações envolvidas na formação do complexo. (94)

No entanto, ADSL existe em formas diméricas e tetraméricas, com a atividade da enzima restrita à forma tetramérica. Por conseguinte, a prevenção da formação ou desestabilização do tetrâmero proporciona uma via para a inibição da enzima.

É importante lembrar que a ADSL humana está envolvida em duas reações diferentes na via de síntese de purinas: a eliminação de fumarato de 50-phosphoribosyl-4-(Nsuccinocarboxamide)-5-aminoimidazole e de adenilsuccinato. Em contraste, em *Schistosoma*, somente a via de salvação de purinas é ativa, portanto, a *SmADSL* está

envolvida somente na conversão de adenilsuccinato em AMP. Essas diferentes funções bioquímicas podem ter resultado na evolução de diferenças estruturais entre parasita e hospedeiro. Sendo assim, estas diferenças podem conduzir ao desenvolvimento de fármacos anti-esquistossomose baseados na inibição seletiva de *SmADSL*. (37)

5.4 Determinação de parâmetros cinéticos da enzima ADSL de *Schistosoma mansoni* através de calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Os ensaios enzimáticos de ADSL foram realizados em colaboração com o aluno de doutorado do nosso grupo, Vitor Hugo Balasco Serrão.

Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram implementados conforme descrito por Todd e Gomez, (95) para investigar a cinética enzimática dos dois substratos: ADS e SAICAR, bem como a classificação “liase” de *SmADSL*, ou seja, investigar a formação de ADS através de AMP e fumarato e a formação de SAICAR a partir de AICAR e fumarato. Os experimentos de titulação foram realizados utilizando um calorímetro VP-ITC – Microcal. (96)

Inicialmente, uma injeção única, em concentração saturante de substrato, foi realizada para determinar a entalpia molar aparente (ΔH_{app}). Neste experimento, 500 nM de ADSL, preparada em tampão contendo 20mM NaH_2PO_4 , 200mM NaCl e 1mM MgCl_2 , foi colocada na cela do microcalorímetro (Microcal) a temperatura constante de 25° C. Na seringa, 300 μL de ADS (1mM) foram carregados usando o mesmo tampão. Para proceder com a determinação do ΔH_{app} , foi realizada uma única injeção de 20 μL de substrato e monitorada a troca de calor por 1200 segundos. Após subtrair o calor de diluição de ADS, previamente observado ao titular o mesmo volume de ADS em tampão, foi possível obter a entalpia molar aparente (ΔH_{app}) (Figura 47). O mesmo procedimento foi utilizado para a reação com SAICAR usando 11,2 μM em seringa (Figura 48).

ADS → AMP + Fumarato

Figura 47 - Determinação da entalpia molar aparente (ΔH_{app}) de ADS.
 Fonte: Elaborada pela autora

SAICAR → AICAR + Fumarato

Figura 48 - Determinação da entalpia molar aparente (ΔH_{app}) de SAICAR.
 Fonte: Elaborada pela autora

Como pode ser observado nas Figuras 44 e 45, a atividade enzimática de ADSL revelou uma reação endotérmica com reação de troca de entalpia de $\Delta H_{ADS} = +8,9$ kcal/mol e $\Delta H_{SAICAR} = +4.7$ kcal/mol.

Como é necessário $\Delta G < 0$ para que as reações biológicas sejam termodinamicamente favoráveis, a observação de $\Delta H > 0$ indica que um sistema endotérmico, na qual a contribuição da entropia é fundamental para que a reação seja favorável. Essa elevada contribuição entrópica pode estar relacionada com a grande quantidade de moléculas de água (aproximadamente 40) presentes no sítio ativo (Figura 49).

Figura 49 - Moléculas de água (esferas vermelhas) presentes em um dos quatro sítios ativos da estrutura *SmADSL*-Apo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Este ensaio foi também utilizado para medir a troca de calor dos produtos (AICAR + fumarato e AMP + fumarato, respectivamente) a fim de verificar se a enzima é ativa para a formação de ADS e SAICAR. Foram utilizados 1 mM de cada combinação carregado na seringa para a realização dos experimentos de injeção única.

Uma única injeção também foi usada para determinar a classificação “liase” de *SmADSL*, em outras palavras, a conversão de ADS ou SAICAR em AMP / Fumarato e AICAR / fumarato, respectivamente, não é reversível pela *SmADSL*. Esta condição “liase”

foi demonstrada pela determinação de entalpia molar aparente, resultando em valores próximos de valores de calor de diluição anteriores medidos nas mesmas condições experimentais ($\Delta H \sim 0$ kcal/mol), portanto, sem atividade enzimática mensurável nessas condições experimentais.

Figura 50 - Determinação da entalpia molar aparente (ΔH_{app}) de AICAR.
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 51 - Determinação da entalpia molar aparente (ΔH_{app}) de fumarato/AICAR. $\Delta H \sim 0$ – sem reação.
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 52 - Determinação da entalpia molar aparente (ΔH_{app}) de AMP.
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 53 - Determinação da entalpia molar aparente (ΔH_{app}) de Fumarato. $\Delta H \sim 0$ – sem reação.
Fonte: Elaborada pela autora

Para a determinação da cinética de ADS, a seringa foi carregada com 1mM de ADS e a cela com 50 nM de *SmADSL* utilizando o mesmo tampão como descrito anteriormente. O substrato foi titulada por 17 injeções de 4 μ L. Para analisar o segundo substrato, 18 injeções de 4 μ L de SAICAR (11,2 μ M) foram tituladas usando as mesmas condições previamente

estabelecidas. Estes experimentos foram realizados a temperatura constante (25° C) e uma velocidade de agitação de 300 rpm. Os resultados foram processados utilizando o software Origin 7.0 associada ao microcalorímetro, e a integral da curva obtida reflete a variação de calor no sistema. Essa metodologia de múltiplas injeções foi utilizada para determinar a cinética enzimática em função da quantidade de substrato, a qual é possível, ajustar através de uma função de Michaelis-Menten.

Figura 54 - Cinética enzimática de *SmADSL* para ADS.

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 13 - Valores dos parâmetros da cinética enzimática de *SmADSL* para ADS.

	ΔH (kcal/mol)	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_M (μMs) ⁻¹
ADS	+8991.2 $\pm$ 0.2	17.2 $\pm$ 2.3	0.73 $\pm$ 0.04	0,042 $\pm$ 0,006

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 55 - Cinética enzimática de *SmADSL* para SAICAR.
Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 14 - Valores dos parâmetros da cinética enzimática de *SmADSL* para SAICAR.

	ΔH (kcal/mol)	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_M (μMs) $^{-1}$
SAICAR	4712.8 ± 1.3	5.27 ± 1.2	1.8 ± 0.3	$0,3 \pm 0,1$

Fonte: Elaborada pela autora

Conforme observado nas Figuras 51 e 52 e tabelas 13 e 14, estes experimentos determinaram os valores de $K_M = (17.2 \pm 2.3) \mu M$ e $k_{cat} = (0.73 \pm 0.04) s^{-1}$ para o substrato ADS e $K_M = (5.27 \pm 1.2) \mu M$ e $k_{cat} = (1.8 \pm 0.3) s^{-1}$ para o substrato SAICAR.

O banco de dados BRENDA não apresenta qualquer valor desta enzima para *Schistosoma sp.*

Em comparação com a enzima humana (*HsADSL*), a *SmADSL* apresenta um valor de K_M 10 vezes maior ($1.46 \mu M$) para ADS e apresenta valores compatíveis com a enzima mutada nos resíduos I62D e D69E de *Bacillus subtilis* (*BsADSL*), mutação a qual foi responsável pela mudança nos valores de K_m de $2.1 \mu M$ para $17.7 \mu M$ de ADS. I62 e D69 correspondem respectivamente à E74 e D81 em *SmADSL*. Ambos encontrados em região de hélice α no domínio I.

O valor k_{cat} é único, onde a correspondência mais próxima é com a enzima mutante *BsADSL* S94A (1.14 s^{-1}). A única enzima de tipo selvagem, que apresenta valores de k_{cat} é a *BsADSL* (1.74 s^{-1}).

O valor do K_M para SAICAR apresentado é de *HsADSL* ($1.74 \text{ }\mu\text{M}$) e é próximo ao valor de *SmADSL* para este substrato. Infelizmente, não existem outras referências usando este substrato para comparação das propriedades enzimáticas.

O banco de dados BRENDA não contém valores de k_{cat} para *HsADSL*, consequentemente, não é possível estabelecer uma relação de k_{cat}/K_M .

CAPÍTULO 6

6 ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE HGPRT isoforma 1 de *Schistosoma mansoni*

6.1 Coleta de dados, processamento, resolução e refinamento de dados de difração de raios-X

A estrutura de HGPRT de *S. mansoni* foi buscada por mais de 20 anos por diversos pesquisadores em diferentes grupos de pesquisa, dentre estes, durante 8 anos em nosso grupo. A obtenção da estrutura dessa enzima representou um enorme desafio em diferentes etapas do processo. À princípio os experimentos de amplificação, clonagem, expressão, purificação e teste de cristalização foram realizados utilizando a sequência completa codificadora da enzima depositada no banco de dados. Após extensas tentativas de cristalizá-la sem sucesso, novos estudos de bioinformática identificaram que essa sequência do banco de dados possuía um éxon de 18 aminoácidos a mais no N-terminal. A nova sequência foi amplificada, clonada, expressa, purificada (Capítulo 3) e foi possível obter cristais dessa enzima (Capítulo 4). Entretanto, os cristais obtidos são muito pequenos, frágeis e difícil manuseio, alcançando em torno de 30µm em sua maior dimensão. Diversos experimentos de otimização dos cristais foram realizados (Capítulo 4) e não foi possível obter cristais maiores.

Nos últimos 4 anos de pesquisa foram congelados aproximadamente 200 cristais que foram submetidos à 4 coletas de dados no Síncrotron inglês *Diamond Light Source* (DLS). Na terceira coleta de dados foi obtido um único conjunto de dados de HGPRT1 com resolução abaixo de 3Å, o complexo binário HGPRT-IMP à 2.8Å de resolução coletado na linha de luz I04-1 do DSL. O cristal contém 2,5 mg/mL de proteína incubada a 18°C na condição A4 do kit Morpheus (12.5% PEG 1000, 12.5% PEG 3350, 12.5% MPD 0.03M de cátions divalentes, 0.1M MES/imidazol pH 6.5) (Figura 56).

Figura 56 - Esquerda: Cristais de HGPRT1 à 2,5mg/mL de proteína incubada a 18°C na condição A4 do kit Morpheus. Direita: Cristal em loop, coletado à 2,8Å de resolução por difração de raio-X.
Fonte: Elaborada pela autora.

Os parâmetros de coleta de dados e refinamento da estrutura pode ser visualizados na Tabela 15.

Tabela 15 - Estatísticas da coleta de dados e refinamento para os cristais de HGPRT1.

Coleta de dados	HGPRT - IMP
Grupo Espacial	$P2_12_12_1$
Dimensão da célula (Å) a, b, c .	59.95 117.96 139.37
Ângulos da célula (°)	$\alpha = \beta = \gamma = 90$
Detector	PILATUS 2M
Fonte Raio-X	DLS I04-1
Comprimento de onda (Å)	0.9200
Resolução (Å)	60.0 - 2.8 (2.95 - 2.8)*
Multiplicidade	3.8 (3.8)*
R_{pim} (%)**	6.3 (54.1)*
CC (1/2)	0.996 (0.605)*
Completeza (%)	98.0 (99.2)*
Reflexões Totais	92655 (13365)*
Reflexões únicas	24452 (3562)*
I / σ (I)	8.9 (1.4)*
Parâmetros Refinamento	
Reflexões usadas refinamento	24416
R (%)***	23.17

continua

Tabela 16 - Estatísticas da coleta de dados e refinamento para os cristais de HGPRT1.

continuação

Parâmetros Refinamento	
$R_{\text{Free}}(\%)^{***}$	29.00
No. átomos proteína	5604
No. átomos ligante	92
B ($\text{\AA}^2$)	61.56
Erro coordenada (ML baseado) ($\text{\AA}$)	0.50
Erro de fase ($^\circ$)	30.56
<i>Clashscore</i>	7.09
RMSD geometria ideal****	
r.m.s. distância ligações ($\text{\AA}$)	0.002
r.m.s. ângulos de ligação ($^\circ$)	0.544
PDB ID	5IPF

Fonte: Elaborada pela autora.

*Valores entre parênteses referem-se aos valores da mais alta resolução.

$$**R_{\text{pim}} = \sum_{\text{hkl}} [1/(N(\text{hkl}) - 1)]^{1/2} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle| / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})$$

*** $R = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ onde $|F_c|$ é a amplitude do fator de estrutura calculado do modelo e $|F_o|$ é a amplitude do fator de estrutura observado do modelo. R_{free} é calculado com base em 5% do conjunto de reflexões que não é utilizado durante o refinamento (71).

****RMSD "*root mean square deviation*", desvio quadrático médio do conjunto de parâmetros de estereoquímica ideal. (72)

A estrutura foi resolvida por substituição molecular utilizando o programa Phaser (73) tendo HGPRT humana (PDB 1HMP) como modelo de busca, a identidade sequencial entre a HGPRT humana e de *S. mansoni* é de 49%. Conforme observado na tabela, o cristal pertence ao grupo espacial $P2_12_12_1$ com 4 monômeros na unidade assimétrica.

Devido à baixa resolução da estrutura coletada, o refinamento foi bastante desafiador e de difícil interpretação em diversas regiões do mapa de densidade eletrônica. Vários ciclos de refinamento e construção manual do modelo foram realizados utilizando o programa Coot (75) e Phenix. (76) Foram utilizados os parâmetros para construção manual do modelo: *NCS Ghosts Coordinates*, *NCS Maps* e *NCS Restraints*; e para o refinamento: *bulk solvent correction*, *anisotropic scaling of the data*, *coordinate refinement*, *ADP refinement* e *refinement of occupancies*.

Analisando os mapas de densidade eletrônica da estrutura coletada é possível observar

a presença de ligante na região do sítio ativo da molécula de HGPRT presente na unidade assimétrica, este foi identificado como sendo uma molécula de IMP (Figura 57), o qual a enzima foi incubada para a cristalização, uma vez que durante nossos ensaios observamos que esta só cristalizava na presença do ligante IMP.

Figura 57 - Mapa de densidade eletrônica fo- σ c na região do sítio ativo das quatro subunidades (A, B, C e D) da enzima HGPRT1 de *S. mansoni*. É possível observar a densidade correspondente ao ligante IMP.

Fonte: Elaborada pela autora.

O IMP foi adicionado manualmente e as águas com o auxílio dos programas Phenix e Coot.

6.2 Validação da estrutura

Após completamente refinado, o modelo tridimensional de HGPRT1 foi validado de três formas: primeiro avaliando-se o valor do R_{work} e R_{free} obtidos ao final do refinamento, que correspondem a $R_{\text{work}} = 0.2317$ e $R_{\text{free}} = 0.2900$. Valores coerentes e considerados adequados em relação ao valor da resolução obtida. (77)

A segunda, foi a avaliação da geometria da proteína através do programa MOLPROBITY (78). Cujo resultado pode ser visualizado na tabela 3.

Tabela 17 - Análise da geometria de HGPRT gerada pelo programa MOLPROBITY. (78)

Parâmetro analisado	HGPRT-AMP	Parâmetros referenciais (ideal)
Rotâmeros ruins	2.62%	< 0.3%
Desvio C β >0.25Å	0	0
Resíduos com ligações ruins	0%	0%
Resíduos com ângulos ruins	0.01%	< 0.1%

Fonte: Elaborada pela autora

É possível observar na tabela a porcentagem de “rotâmeros ruins” exceder o valor considerado ideal. Entretanto, todos esses rotâmeros foram criteriosamente checados ao longo do refinamento manual. Diversas regiões possuem densidade eletrônica difusa e nas regiões com densidade eletrônica clara é possível observar que estes rotâmeros encontram-se na conformação considerada menos adequada nas quatro cadeias. Apesar de não ideal nesse parâmetro analisado, é a melhor geometria alcançada após o refinamento da estrutura. Estando em um padrão aceitável.

A terceira forma de validação utilizada foi a avaliação dos ângulos diédricos Φ (phi) versus Ψ (psi) dos aminoácidos da estrutura no diagrama de Ramachandran gerado pelo programa Procheck. (79) O resultado do gráfico de Ramachandran gerado pode ser visualizado na Figura 59 para a estrutura de HGPRT-IMP.

Figura 58 - Diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros para a estrutura HGPRT-IMP. A região representada em vermelho corresponde à região mais favorável para os valores dos ângulos, a região amarelo escuro é a adicionalmente permitida, amarelo claro é a generosamente permitida e a região em branco é a região não permitida. As glicinas são representadas por triângulos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resíduos em regiões mais favoráveis (vermelho) correspondem a 88.9%, adicionalmente permitida (amarelo escuro) a 10.9%, generosamente permitida (amarelo claro) a 0,1% não permitida a 0,1%.

A partir dos métodos utilizados para a validação em função da resolução obtida do modelo podemos considerá-lo confiáveis para a análise da estrutura tridimensional da enzima HGPRT.

6.3 Análise da estrutura tridimensional obtida de HGPRT de *Schistosoma mansoni*

6.3.1 Estrutura secundária, topologia e regiões conservadas

A subunidade de HGPRT é composta por α -hélices e folhas β . Pode ser dividida em dois domínios (Figura 60). O domínio altamente conservado entre as HGPRTs chamado de “core” é composto por 4 fitas paralelas ($\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ e $\beta 5$) formando uma folha β flanqueada por 3 α -hélices ($\alpha 3$, $\alpha 4$ e $\alpha 5$), o qual liga o substrato primário PRPP. (97) Compreende os resíduos 41 – 173 formando uma estrutura chamada de “*doubly wound α/β sheet*” (98), com hélices de ambos os lados da folha β . Esse domínio também compreende o loop II, o qual apresenta uma região desornada sem densidade eletrônica para os resíduos de 108 – 122.

O segundo domínio, localizado acima do domínio “core” é chamado domínio “hood”, este é composto por 4 pequenas fitas β ($\beta 1$, $\beta 6$, $\beta 7$ e $\beta 8$), divididas em 2 folhas, sendo uma paralela e outra antiparalela, 3 pequenas α -hélices ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 6$) e várias conexões de longos loops. Compreende os resíduos 8 – 40 e 174 – 224.

Figura 59 - Estrutura de HGPRT de *S. mansoni* (monômero) é composta por 2 domínios: domínio Hood (vermelho), domínio Core (azul).

Fonte: Elaborada pela autora.

A estrutura secundária em função da sequência de aminoácidos da HGPRT em complexo com IMP e a topologia da estrutura podem ser visualizadas nas Figuras 61 e 62.

Figura 60 - Estrutura secundária de *SmHGPRT* em complexo com IMP em função da sequência de aminoácidos. As fitas β são representadas por setas cor-de-rosa, as α -hélices por espirais cor-de-rosa com a respectiva numeração em cima (H1, H2...H25), as 2 folhas β são classificadas como A e B, sendo essas letras colocadas acima das fitas identificando a qual folha pertencem. Os símbolos: β - beta turn, γ - gamma turn e $\equiv$ - beta hairpin.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise de estrutura secundária gerada pelo programa PROMOTIF mostrou que 51 resíduos de aminoácidos (25,4%) estão em fitas β , 53 (26,4%) em α -hélices, 6 (3%) em hélices 3-10, 91 (45,3%) em outros, totalizando 201 aminoácidos (201 nas cadeias A e B, 186 na C e 189 na D). A estrutura possui: 2 folhas β paralelas, 2 beta-alfa-beta, 1 beta hairpins, 4 beta bulges, 8 fitas β , 6 α -hélices, 7 interações hélice-hélice, 20 β -turns e 2 gama-turns.

Figura 61 - Topologia de *SmHGPRT-IMP* gerada pelo PDB sum. As fitas β são representadas por setas rosa, as α -hélices em tubos vermelhos e os loops em azul. O N-terminal é indicado pela letra N e o C-terminal pela letra C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 62 - Alinhamento de HGPRT humana (1HMP) e de *Schistosoma mansoni* em função da estrutura secundária. Os resíduos brancos grifados em vermelho são conservados nas duas estruturas, os em vermelho grifados em branco são os resíduos não conservados, porém similares. A quarta linha corresponde a exposição dos resíduos ao solvente, em azul escuro os mais expostos, azul claro podem estar expostos e branco hidrofóbicos.

Fonte: Elaborada pela autora.

O alinhamento da sequência de aminoácidos de *SmHGPRT* com sua correspondente humana revelou longas regiões extremamente conservadas entre ambas. Principalmente nas regiões entre $\beta 3$ e $\alpha 2$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 8$ e $\beta 9$. As regiões conservadas podem ser observadas na estrutura apresentada na Figura 64. Em A, essas regiões estão destacadas em vermelho, em B é possível observar os resíduos idênticos entre ambas destacados em pink.

Figura 63 - Análise das regiões conservadas à partir do alinhamento da sequência de aminoácidos de HGPRT de *S. mansoni* e HGPRT humana. A. Regiões conservadas destacadas em vermelho. B. Resíduos idênticos entre ambas destacados em pink.

Fonte: Elaborada pela autora.

Já a análise do alinhamento da sequência de aminoácidos com todas as outras enzimas depositadas no PDB revelou alta similaridade com outras espécies. Na Figura 65 é possível observar que diversas regiões, principalmente a que circunda o sítio ativo são bastante conservadas. O degrade de vermelho a branco, passando por tons de rosa indica o grau de conservação dessas regiões, sendo vermelho mais conservado e branco não conservado. Destacados em pink estão os 10 aminoácidos que são idênticos em todas as HGPRTs depositadas no PDB: Leu74, Gly76, Leu84, Glu140, Asp141, Thr148, Lys172, Gly196, Asp200 e Arg206.

Figura 64 - Análise das regiões conservadas à partir do alinhamento da sequência de aminoácidos de HGPRT de *S. mansoni* com todas as HGPRTs depositadas no PDB. Regiões conservadas destacadas em degradê de vermelho a branco, da mais conservada a não conservada respectivamente. Resíduos idênticos entre as estruturas destacados em pink.

Fonte: Elaborada pela autora.

6.3.2 Enovelamento

Atualmente (além da estrutura de *S. mansoni* aqui descrita) existem 48 estruturas de HGPRTs depositadas no banco de dados PDB que correspondem a 10 organismos diferentes: Humano (18) (99-107), *Trypanosoma Cruzi* (9) (108-113), *Mycobacterium tuberculosis* (4) (114), *Toxoplasma gondii* (3) (115), *Escherichia coli* (3) (116), *Thermus thermophilus* (3) (117), *Caldanaerobacter subterraneus* (3) (97,118), *Saccharomyces cerevisiae* (3) (119), *Leishmania tarentolae* (1) (120), *Tritrichomonas foetus* (1). (121)

Canyuk e colaboradores em 2003 (113) destacam que enzimas que salvam 6-oxopurinas, incluindo as (HGPRTs), são potenciais alvos para o desenvolvimento de fármacos no tratamento de doenças causadas por parasitas. Por esse motivo, um grande número de estruturas cristalográficas de HGPRTs são reportadas.

Alterações no estado multimérico entre dímeros e tetrâmeros de HGPRTs foram previamente reportadas. A estrutura de *Thermus thermophilus*, assim como de *Toxoplasma gondii* é descrita como tetramérica (97). HGPRT humana existe como dímero e tetrâmero em solução, dependendo do pH e da força iônica (122) e foi cristalizada como um tetrâmero,

como várias outras HGPRTs (99). A enzima de *Trypanosoma Cruzi* cristalizou como um dímero (108), mas foi reportada como monômero em solução na forma apo e como um dímero quando PRPP está ligado (123), essa estrutura assim como de *T. foetus*, a qual é dimérica na estrutura cristalográfica, perderam regiões correspondentes à parte do N-terminal em que na HGPRT humana essa sequência se mostrou importante na contribuição de interações tetramérica (99).

A estrutura de *SmHGPRT* aqui descrita cristalizou como um tetrâmero e esse estado oligomérico foi confirmado através de experimentos de gel filtração. O tetrâmero de *SmHGPRT* pode ser visualizado na Figura 66.

Vista Frontal **Vista Superior**

Figura 65 - Estrutura tetramérica de *SmAHGPRT* em complexo com IMP (preto) (subunidade A: amarelo, B: magenta, C: azul, D: verde).

Fonte: Elaborada pela autora.

Sobrepondo as quatro subunidades da HGPRT obtêm-se os valores de RMSd de A-B = 0.304Å, A-C = 0.448Å, A-D = 0.315Å, B-C = 0.336Å, B-D = 0.336Å e C-D = 0.387Å. A diferença mais significativa é observada na região do *loop* II móvel, onde a cadeia A (vermelho) apresenta uma densidade eletrônica clara para um maior número de resíduos em relação às cadeias B (amarelo), C (azul) e D (verde).

Figura 66 - Sobreposição das quatro subunidades da estrutura tetramérica de HGPRT. A – vermelho, B – amarelo, C- azul e D verde.

Fonte: Elaborada pela autora.

A sobreposição da estrutura de *Sm*HGPRT com a estrutura da HGPRT humana (RMSd é de 1.154Å) (Figura 67) revelou que o perfil do enovelamento, dividida em dois domínios, é bastante similar. Entretanto, existem diversos pontos entre as estruturas que não se sobrepõem completamente e apresentam grandes diferenças na orientação e composição da estrutura secundária. Por exemplo, as fitas β são mais alongadas na estrutura humana e o *loop* II apresenta-se completamente ordenado.

Figura 67 - Sobreposição das estruturas de HGPRT de *S.mansoni* (monômero) em vermelho e ADSL humana em amarelo. RMSd = 1,154 Å.

Fonte: Elaborada pela autora.

6.3.3 O sítio ativo

O sítio ativo de *Sm*HGPRT, assim como de suas ortólogas, está localizado na interface dos domínios “core” e “hood” e compreende 4 loops, I – IV (Figura 68).

Figura 68 - Localização do sítio ativo na interface dos domínios “core” (azul) e “hood” (vermelho) e compreende 4 loops, I – IV.

Fonte: Elaborada pela autora.

O *loop* I (Figura 69) corresponde aos resíduos de 73 à 78 (VLKGGF) localizados entre a fita $\beta 2$ e a hélice $\alpha 4$, que fazem parte do motivo $\alpha/\beta/\alpha$ no domínio core. Nesse loop em diversas estruturas foi verificada a ligação peptídica na configuração *cis*, para o resíduo Leu74. (108,111,116,120-121) Tem-se atribuído um significado estrutural e funcional para esta ligação. (111)

Figura 69 - *Loop I* correspondente aos resíduos de 73 à 78 (VLKGGF) localizados entre a fita $\beta 2$ e a hélice $\alpha 4$ do domínio core.

Fonte: Elaborada pela autora.

O *loop II* (Figura 70) corresponde aos resíduos 107 à 134 localizados entre as fitas $\beta 3$ e $\beta 4$ do motivo $\alpha/\beta/\alpha$ do domínio core. Este loop foi caracterizado como flexível previamente em outras estruturas (99,108,121,124), não está completamente ordenado, por ausência de densidade eletrônica para os resíduos de 108 à 124. Foi observado que o sítio ativo nessas estruturas encontra-se aberto para a ligação de substrato ou liberação do produto. Sendo assim, para explicar o fechamento do sítio ativo, uma conformação fechada desse loop flexível foi levantada como hipótese para essa enzima. (99)

Devido à importância para o entendimento do mecanismo catalítico, a estrutura com o sítio ativo fechado foi por muito tempo buscada. Posteriormente, essa hipótese foi confirmada na estrutura de HGPRT de *T. cruzi* onde as duas subunidades diferem principalmente na conformação do "loop flexível" (loop II) e revelaram duas novas visualizações de sítio ativo da HGPRT no complexo ternário, uma aberta e exposta ao solvente e a outra fechada para o solvente. (111) Na conformação fechada são observadas interações entre o loop II com o PRPP e com íons metálicos (Mg^{2+}) hidratados.

Na estrutura de *SmHGPRT* o loop II apresentar-se de forma desordenada como observado na maioria das estruturas que apresentam conformação aberta, podendo ser atribuído ao fato da estrutura conter uma molécula do produto de reação (IMP) ligada no sítio ativo.

Figura 70 - *Loop* II correspondente aos resíduos 107 à 134 entre as fitas $\beta 3$ e $\beta 4$ do domínio core.
Fonte: Elaborada pela autora.

O *loop* III (Figura 71) compreende os resíduos de 141 à 146 (DIIDTG) entre as fitas $\beta 4$ e hélice $\alpha 5$, também no domínio core. Na estrutura cristalográfica de *SmHGPRT* este loop está bem definido.

Todas as estruturas de HGPRT apresentam no *loop* III um Asp141 invariável (*SmHGPRT*). Estudos com mutante desse resíduo em *T. cruzi* confirmaram que esse resíduo atua na catálise, mas não é requerido como base geral nessa posição, como era proposto previamente para a HGPRT humana. (112)

Figura 71 - *Loop* III correspondente aos resíduos de 141 à 146 (DIIDTG) entre as fitas $\beta 4$ e hélice $\alpha 5$ no domínio core.

Fonte: Elaborada pela autora.

O *loop* IV (Figura 72) é o único dos 4 que pertence ao domínio hood, é o maior dos quatro e compreende os resíduos de 190 à 211. Nesse loop é encontrado o resíduo aromático Phe193 que participa do sítio ativo com interação “ π - π stacking” com o anel aromático da base purina. Em diversas estruturas este loop contém uma pequena fita β no interior. Esta fita está envolvida na ligação da base purina no sítio ativo. (120)

Figura 72 - *Loop* IV correspondente aos resíduos de 190 à 211 no domínio hood.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na estrutura de *SmHGPRT* em complexo com IMP, o fosfato do IMP faz ligação de hidrogênio com Asp144, Thr145, Gly146 e Lys147 do loop III, Thr148 da hélice $\alpha 5$ e uma molécula de água.

O O2 da ribose faz duas ligações de hidrogênio com Asp141 do loop III e com duas moléculas de água. O3 faz ligação de hidrogênio com uma das moléculas de água que O2 liga.

A interação do Asp141 do *loop* III com o ligante pode ser observada nas estruturas de *T. cruzi*, *E. coli*, humana e de *T. gondii*, onde a cadeia lateral aponta para o sítio ativo. No entanto, a cadeia lateral do Asp141 aponta para fora do sítio ativo e não interage com o ligante na estrutura de *L. tarentolae*, *P. falciparum*, *T. foetus* e humana em complexo com GMP. (120)

O N1 da hipoxantina faz ligação de hidrogênio com Val194 do *loop* IV e o N6 da hipoxantina com Val194 e Lys172.

É possível observar que o *loop* III é o maior responsável por ancorar o IMP no sítio ativo através de ligações de hidrogênio. A maior parte dos contatos ocorre entre a *SmHGPRT* e o grupo fosfato do IMP.

Figura 73 - Ligações de hidrogênio (pontilhado amarelo) do ligante IMP no sítio ativo de *SmHGPRT*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Um modelo esquemático da ligação do IMP no sítio ativo da *SmHGPRT* foi gerado através do programa Ligplot + pode ser visualizado na Figura 74.

Figura 74 - Modelo esquemático para a ligação da IMP no sítio ativo da *SmHGPRT*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em algumas estruturas de HGPRT foi relatada a presença do íon magnésio (Mg^{+2}) na região do sítio ativo (101,102,108,125). Embora esse íon estivesse presente no tampão de diálise da proteína e no kit de cristalização Morpheus, não foi observada a presença de Mg^{+2} no sítio ativo de *SmHGPRT*.

Quando sobrepostas as regiões correspondentes ao sítio ativo da *SmHGPRT* e humana (Figura 75) um alto grau de conservação ao redor do sítio de ligação e ativo é observado. Destacam-se quatro mutações entre ambas Ile149 (*SmHGPRT*) por Met142 (HGPRT humana), Pro176 por Arg169, Val189 por Ile182 e Arg192 por Lys185.

Figura 75 - Sobreposição dos sítios de ligação do IMP na HGPRT de *S. mansoni* (verde) e humana (branco).
Fonte: Elaborada pela autora.

Dentre as quatro mutações encontradas na região do sítio ativo, três delas I149M, V189I e R192K encontram-se em regiões cuja cadeia principal é sobreponível. A mutação P176R encontra-se em uma região de *loop* que apresenta grande diferença conformacional entre a enzima humana e a de *S. mansoni*. Na HGPRT humana esse *loop* encontra-se em uma conformação mais fechada em torno do sítio em relação à *SmHGPRT* e a cadeia lateral do resíduo Arg 169 aponta para dentro do sítio ativo, enquanto seu correspondente Pro 176 encontra-se mais distal (Figura 76).

Dentre os resíduos conservados, são observadas diferenças na conformação da cadeia lateral do resíduo Lys75 que aponta para fora do sítio ativo, enquanto a cadeia lateral do resíduo Lys68 da HGPRT humana aponta para dentro do sítio (Figura 76). Esses resíduos compõem o *loop* I.

Figura 76 - Posicionamento e conformação dos resíduos Lys75 e Pro176 em *SmHGPRT* (verde) e seus correspondentes Lys68 e Arg169 em HGPRT humana (branco).

Fonte: Elaborada pela autora.

6.3.4 Mecanismo catalítico

A HGPRT catalisa a reação reversível de transferência do grupo 5-fosforribosil do α -D-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) para o N9 da base (hipoxantina ou guanina) para a formação do nucleotídeo de inosina-5-monofosfato (IMP) ou guanosina-5-monofosfato (GMP) (Figura 77).

Figura 77 - Esquema da reação catalisada pela enzima HGPRT.

Fonte: FOCIA et al. (108)

Yuan e colaboradores (48) em seus estudos cinéticos da *SmHGPRT* identificaram que o mecanismo de reação é bi-bi ordenado, o qual os substratos se ligam à enzima e os produtos são liberados em uma ordem definida. Primeiro ocorre a ligação de PRPP-Mg^{2+} seguido das

bases purina. Os produtos são liberados na sequência PPi-Mg, seguido de GMP-Mg ou IMP-Mg.

Héroux e colaboradores (115) baseados em análises de estruturas de HGPRT de diversos organismos construíram o mecanismo de reação enzimática (Figura 78). Foram utilizadas estruturas em diferentes formas de cristalização, na forma apo (121,126), na presença dos substratos PRPP, hipoxantina e guanina (102,108,127) e na presença dos produtos IMP, GMP e PPi (99,101,115,121,125,128). A descrição desses autores é baseada na estrutura da enzima HGPRT de *Toxoplasma gondii*. São propostos dez principais passos, transcritos por Monzani. (129)

Passo 1: Na apoenzima os resíduos Glu146, Asp147 e Asp206 em *T. gondii* (Glu140, Asp141 e Asp200 em *S. mansoni*) que se ligarão aos íons Mg^{2+} e coordenam as moléculas de água estão em posição e orientação corretas para a ligação do complexo PRPP-Mg. É proposto que o íon Mg^{2+} se ligue primeiro, antes do PRPP (111). Neste momento, Leu78 e Lys79 (Leu74 e Lys75) adotam uma conformação *cis*, concomitantemente à ligação de PRPP. O *loop* III e o N-terminal da hélice G ajustam sua conformação para a ligação ao fosfato 5' do PRPP. Para que a ligação da base purina aconteça, é necessário o deslocamento da cadeia principal do resíduo Ile200 (Val194) e das cadeias laterais dos resíduos Ile148, Lys178 e Trp199 (Ile142, Lys172 e Phe193) aproximando o domínio hood da base purina.

Passo 2: Após a ligação do PRPP são formadas ligações de hidrogênio e uma grande rede de pontes salinas na parte inferior do sítio ativo. Nessa região, o *loop* I, do domínio core, e o *loop* IV, do domínio hood, fecham juntos essa região do sítio ativo. Os íons Mg posicionam o PPi na geometria necessária para ocorrer a transferência do fosforibosil. Não existe interação entre o PRPP e a parte superior do sítio ativo do domínio hood, nesse momento, essa região ainda está aberta, os resíduos Lys178 e Trp199 (Lys172 e Phe193) e a fita- β 9 adotam conformações encontradas na apoenzima.

Passo 3: A ligação do fosfato 5' do PRPP torna o *loop* III ordenado, com o resíduo Ile148 (Ile142) posicionado no bolsão de ligação da purina. Com isso, o Asp150 (Asp144) é direcionado ao Asp197 (Asn191), servindo dessa forma, como uma base no sítio ativo.

Passo 4: Com a ligação da purina, o domínio hood se fecha completamente sobre o domínio core. Os resíduos Trp199 e Ile200 (Phe193 e Val194) 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 Arg182 (Pro176) direcionado aos resíduos Asp150 e Asp197 (Asp144 e Asn191), formando uma dupla ponte salina forte que fecha o domínio hood sobre o domínio core.

Passo 5: O *loop* II se fecha sobre o anel da ribose e o fosfato 5', fazendo interações entre os resíduos conservados Ser117 e Tyr118 (Ser110 e Tyr111) e o grupo fosfato 5' (101,111,127). O fechamento do *loop* II é o passo final que precede a transferência do fosforibosil. Com o *loop* II na conformação fechada são realizadas ligações de hidrogênio adicionais ao PPI do PRPP e esse movimento força os substratos se aproximarem um do outro até que eles atravessem o estado de transição.

Passo 6: As interações que ocorrem entre HGPRT e o PPI diferem entre as estruturas de HGPRT. A mudança na posição do fosfato 5' da ribose e o PPI antes e depois da transferência do fosforibosil altera e enfraquece as interações entre o *loop* II e os produtos da reação, permitindo o retorno do *loop* II para a conformação aberta.

Passo 7: O PPI é expelido do sítio ativo, sendo ajudado, em parte, pela energética favorável, acompanhando o retorno de peptídeo na forma *cis* para *trans*.

Passo 8: Quando o PPI deixa o sítio ativo, ocorre a perda da rede de ligações de hidrogênio que liga os domínios hood e core na parte inferior do sítio ativo, enfraquecendo o vínculo da ligação entre os dois domínios. A perda do PPI também enfraquece as interações do *loop* IV, especialmente Asp206 (Asp200) com a porção C2-N3 do anel da purina. O domínio hood começa a perder contato com a base purina, puxando a fita β 9 e o Trp199 (Phe193) para longe da base. Nessa etapa, o nucleotídeo ainda está fortemente ligado por ligações de hidrogênio com a enzima, pois são encontrados valores baixos para o fator de temperatura do anel purina e do grupo fosfato, o GMP apresenta alta constante de dissociação e o *loop* III' ainda está fechado. Eventualmente, as interações entre os resíduos Arg182 no *loop* III', Asp150 e Asp197 (Asp144 e Asp191) são quebradas, e o *loop* III' retorna à sua posição aberta.

Passo 9: Neste momento com o *loop* III' aberto, o *loop* III está 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 a liberação do nucleotídeo, isto é, a abertura do domínio hood, a abertura dos *loops* III' e III, explica por que esse passo é limitante no mecanismo de reação da HGPRT. Segundo (128), a liberação do nucleotídeo (NMP) no complexo enzima-nucleotídeo é mais vagarosa que a liberação do PPI.

Passo 10: O passo determinante da reação envolve vários passos elementares, como mudanças conformacionais da 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 hood e core. Na análise das estruturas em

complexo ternário, o *loop* II adquire conformação aberta para a liberação do NMP, podendo ser o movimento do *loop* II o passo elementar mais vagaroso na reação da HGPRT. No entanto, na estrutura da HGPRT-XMP-PPi-Mg de *T. 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 hood, a abertura do *loop* III, a abertura do *loop* III, a mudança conformacional do NMP, a dissociação do NMP ou algumas combinações desses passos.

Figura 78 - Mecanismo de reação enzimática da HGPRT. 1- Aoenzima com PRPP entrando no sítio ativo. Os loops II, III e III' na conformação aberta. 2- Complexo PRPP-Mg ligado e Lys79 adota a conformação *cis* peptídeo. As interações do PPi do PRPP, loop I e loop IV aproximam o domínio hood do domínio core. Loop III ordenado ao redor do 5'fosfato e guanina entra no sítio ativo. 3- Bolsão de ligação à guanina é fechado e ordenado ao redor da base. Loop III fechado permite que o loop III' se feche colocando Arg182 entre Asp150 e Asp197 completando a ligação dos domínios hood e core. 4- Loop II se fecha colocando o resíduo Tyr118 em posição de ligação de hidrogênio com o fosfato 5' permitindo a transferência fosforibosil. 5- Loop I e IV são abertos e PPi sai do sítio ativo. Lys79 do loop I retorna a configuração *trans* e o loop II é aberto. 6- Loop III' e III se abrem e liberam GDP e HGPRT retoma a forma aoenzima.

Fonte: HEROUX et al. (115)

6.3.5 Interface dimérica e influência na composição do sítio ativo de HGPRT

Na enzima ADSL previamente descrita, faz-se necessário a formação da estrutura tetramérica para que ocorra a atividade catalítica, uma vez que três das quatro subunidades compõem o sítio ativo. Entretanto, na enzima HGPRT não há uma razão explícita para o requerimento de uma estrutura dimérica ou tetramérica cataliticamente ativa, uma vez que as subunidades não compartilham os sítios ativos, pois estes se encontram bem separados da interface do dímero e tetrâmero. (111)

Estudos da HGXPRT de *Plasmodium falciparum* mostraram que uma mutação na interface da estrutura quaternária resulta em uma diminuição significativa da eficiência catalítica. (130)

Outros estudos realizados com mutantes da enzima HGPRT de *Trypanosoma cruzi* também indicaram que o *loop* I do sítio ativo, o qual participa da interface dimérica da enzima tem profunda influência na eficiência enzimática. (113)

A cadeia lateral da Lys75 (*S. mansoni*) do *loop* I da cadeia B faz interação com a cadeia principal da Val 103 da subunidade oposta A. Essa ligação de hidrogênio faz com que o resíduo invariável Arg206 fique orientado no sítio ativo (Figura 79), na posição correta para interação com o PRPP ou PPi. Essa conformação desses resíduos pode ser observada nas estruturas de HGPRT de *L. tarentolae*, *T. gondii*, *P. falciparum*, *E. coli*, *T. cruzi* e humana. (113,129)

Figura 79 - Ligação do resíduo Lys75B do *loop* I com Val103A em *SmHGPRT*.
Fonte: Elaborada pela autora.

O *loop* IV também apresenta diversos resíduos na interface dimérica em todas as HGPRTs depositadas no banco de dados. O *loop* IV é um dos loops que compõem o sítio ativo. Em *SmHGPRT* o resíduo Asp207B está envolvido com interações de hidrogênio nessa interface com três moléculas de água e o resíduo Glu89A (Figura 80). O fato de vários resíduos próximos ao sítio ativo do *loop* I e do *loop* IV participarem tanto da dimerização quanto da composição do sítio ativo, pode justificar a atividade da enzima HGPRT na forma dimérica e tetramérica. (113,129)

Figura 80 - Interação entre os resíduos Lys75B do *loop* I com Val103A, Asp207B com três moléculas de água e Glu89A, este com Lys79B em *SmHGPRT*.

Fonte: Elaborada pela autora.

CAPÍTULO 7

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

7.1 Conclusões

O sistema de expressão utilizando os vetores pOPIN em células de *E. coli* Lemo21 (DE3) para AK1, ADSL, HGPRT 1 e células de *E. coli* B834(DE3) para HGPRT 3 em meio de cultura *Power Broth*, proporcionou um grande rendimento na produção das proteínas recombinantes.

O método de purificação por afinidade estabelecido em um único passo, utilizando resina de cobalto agarose foi eficiente, sendo obtidas proteínas com alto grau de pureza.

Cristais das enzimas AK1, ADSL, HGPRT 1 e 3 foram obtidos em diversas condições do kit de cristalização Morpheus. Entretanto, cristais de AK1 e HGPRT3 difrataram pobremente e não foram reproduzidos nas dependências do LBest.

Foram obtidas duas estruturas de *SmADSL*, uma na forma Apo coletada à 2.14Å de resolução e outra em complexo com AMP coletada à 2.36Å. A estrutura apresenta o enovelamento e estado de oligomerização conservados em relação às enzimas ortólogas. O estado tetramérico é requerido para a funcionalidade da enzima, uma vez que resíduos de três das quatro subunidades participam da formação do sítio ativo.

O sítio ativo é altamente conservado entre as espécies, inclusive a região correspondente a um *loop* flexível na região do sítio ativo. Esse alto grau de conservação do sítio ativo dificulta a identificação de potentes inibidores espécie-específico no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Em contraste, a interface dimérica dessas enzimas tem se apresentado suficientemente distinta em comparação à ortóloga humana, o que pode representar um potencial alvo para o desenvolvimento de um inibidor. No entanto, é reconhecido que existe uma grande dificuldade em adotar essa abordagem.

O ensaio de atividade enzimática de *SmADSL* revelou uma reação endotérmica, com reação de troca de entalpia de $\Delta H_{ADS} = +8,9$ kcal/mol e $\Delta H_{SAICAR} = +4.7$ kcal/mol obtidos em condições de saturação. Esse $\Delta H > 0$ indica que no sistema endotérmico a contribuição da entropia é importante para a reação cinética. Essa elevada contribuição da entropia possivelmente está relacionada com a grande quantidade de moléculas de água presentes no

sítio ativo. Os valores obtidos foram de $K_M = (17.2 \pm 2.3) \mu\text{M}$ e $k_{\text{cat}} = (0.73 \pm 0.04) \text{ s}^{-1}$ para o substrato ADS e $K_M = (5.27 \pm 1.2) \mu\text{M}$ e $k_{\text{cat}} = (1.8 \pm 0.3) \text{ s}^{-1}$ para o substrato SAICAR.

Após experimentos de otimização e mais de 200 cristais testados, foi possível obter uma estrutura de *SmHGPRT* em complexo com IMP, cujo cristal crescido na condição A4 do kit Morpheus difratou à 2.8Å de resolução. A estrutura apresenta o enovelamento e estado de oligomerização dimérico e tetramérico conservados em relação às enzimas ortólogas. Apesar das subunidades não compartilharem o sítio ativo, este estado de oligomerização é requerido para a funcionalidade da enzima, uma vez que resíduos do *loop* I e *loop* IV que compõem o sítio ativo também estão envolvidos em interações na interface dimérica. A ligação de Lys75B (*loop* I) com Val103A orienta o resíduo invariável entre HGPRTs Arg206B (*loop* IV) na direção do sítio ativo para a ligação do PRPP.

O sítio ativo é conservado entre as espécies, situado na interface dos domínios hood e core, composto por quatro *loops* (I, II, III e IV). Foram identificadas quatro mutações na região do sítio entre *SmHGPRT* e HGPRT humana: Ile149Met, Pro176Arg, Val189Ile e Arg192Lys. A mutação Pro176Arg encontra-se em uma região de *loop* em conformação mais fechada na HGPRT humana em relação à *SmHGPRT*. A cadeia lateral do resíduo Arg169 aponta para dentro do sítio ativo, enquanto seu correspondente em *SmHGPRT* Pro176 encontra-se mais distal.

O *loop* II em *SmHGPRT* encontra-se desordenado, assim como em outras HGPRTs depositadas no banco de dados, essa desordem é comumente observada uma vez que esse *loop* é móvel. O movimento dos *loops* na região do sítio ativo é essencial para o mecanismo catalítico descrito como bi-bi ordenado.

7.2 Perspectivas Futuras

- ADSS

Novas análises de bioinformática da sequência codificadora da enzima. Testes de amplificação, clonagem, expressão, purificação e cristalização.

- HGPRT 2

Nova amplificação e clonagem em diferentes vetores de expressão. Testes de expressão, purificação, cristalização e atividade.

- HGPRT3 e AK1

Ensaaios de “*Differential Scanning Fluorimetry* (DSF)” para identificação de tampões e aditivos que estabilizem as enzimas e não comprometam a reprodução dos cristais obtidos no kit de cristalização Morpheus. Coleta de dados, resolução e análise das estruturas tridimensionais tendo como modelo de busca as enzimas AK2 e HGPRT1 previamente resolvidas em nosso grupo de pesquisa. Teste de atividade enzimática.

- ADSL

Experimentos de mutação sítio dirigida de resíduos pontuais da interface dimérica e tetramérica da enzima, visando a identificação de resíduos essenciais para a manutenção do estado de oligomerização requerido para a atividade enzimática.

- HGPRT1

Experimentos de mutação sítio dirigida de resíduos mutados em relação à enzima humana no sítio ativo e na interface dimérica e tetramérica da enzima, visando a identificação de resíduos essenciais para a manutenção do estado de oligomerização requerido e atividade enzimática.

REFERÊNCIAS

- 1 WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report on Schistosomiasis**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 10 jan. 2015.
- 2 HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; OTTESEN, E.; EHRLICH SACHS, S.; SACHS, J. D. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 5, p. e102, Jan. 2006.
- 3 VAN DER WERF, M. J.; DE VLAS, S. J.; BROOKER, S.; LOOMAN, C. W.; NAGELKERKE, N. J.; HABBEMA, J. D.; ENGELS, D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Tropica**, v. 86, n. 2-3, p. 125-39, May. 2003.
- 4 ABDULLA, M. H.; LIM, K. C.; SAJID, M.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C. R. Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 1, p. e14, Jan. 2007.
- 5 CAFFREY, C. R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 4, p. 433-9, Aug. 2007.
- 6 ABDULLA, M. H.; RUELAS, D. S.; WOLFF, B.; SNEDECOR, J.; LIM, K. C.; XU, F.; RENSLO, A. R.; WILLIAMS, J.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C. R. Drug discovery for schistosomiasis: hit and lead compounds identified in a library of known drugs by medium-throughput phenotypic screening. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 7, p. e478, 2009.
- 7 PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977. 986 p.
- 8 FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 1, p. 83-88, July 1994.
- 9 FENWICK, A.; WEBSTER, J. P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 577-582, Dec. 2006.
- 10 SILVA, I. M.; THIENGO, R.; CONCEICAO, M. J.; REY, L.; LENZI, H. L.; PEREIRA FILHO, E.; RIBEIRO, P. C. Therapeutic failure of praziquantel in the treatment of *Schistosoma haematobium* infection in Brazilians returning from Africa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 445-449, July 2005.
- 11 WOLFE, M. S. *Schistosoma mansoni* infection: failure of standard treatment with praziquantel in a returned traveller. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 720; Nov-Dec. 2003.

- 12 DANSO-APPIAH, A.; DE VLAS, S. J. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 3, p. 125-129, Mar. 2002.
- 13 ISMAIL, M. M.; TAHA, S. A.; FARGHALY, A. M.; EL-AZONY, A. S. Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 24, n. 3, p. 685-695, Dec. 1994.
- 14 DOENHOFF, M. J.; KUSEL, J. R.; COLES, G. C.; CIOLI, D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 465-469, Sept-Oct. 2002.
- 15 COLES, G. C. Drug resistance or tolerance in schistosomes? **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 7, p. 294, July 2002.
- 16 HAGAN, P.; APPLETON, C. C.; COLES, G. C.; KUSEL, J. R.; TCHUEM-TCHUENTE, L. A. Schistosomiasis control: keep taking the tablets. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 2, p. 92-97, Feb. 2004.
- 17 LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5th. ed. New York: W.H. Freeman, 2008.
- 18 EL KOUNI, M. H.; CHA, S. Metabolism of adenosine analogues by *Schistosoma mansoni* and the effect of nucleoside transport inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 7, p. 1099-1106, Apr. 1987.
- 19 CRABTREE, G. W.; SENFT, A. W. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*. V. Adenosine cleavage enzyme and effects of purine analogues on adenosine metabolism in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 649-660, Feb. 1974.
- 20 SENFT, A. W.; CRABTREE, G. W. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*--VII. Inhibition of adenine and guanine nucleotide synthesis by purine analogs in intact worms. **Biochemical Pharmacology**, v. 26, n. 20, p. 1847-1855, Oct. 1977.
- 21 SENFT, A. W.; CRABTREE, G. W. Purine metabolism in the schistosomes: potential targets for chemotherapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 20, n. 3, p. 341-356, 1983.
- 22 SENFT, A. W.; CRABTREE, G. W.; AGARWAL, K. C.; SCHOLAR, E. M.; AGARWAL, R. P.; PARKS JR, R. E. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*. 3. Identification of enzymes in cell-free extracts. **Biochemical Pharmacology**, v. 22, n. 4, p. 449-458, Feb. 1973.
- 23 SENFT, A. W.; SENFT, D. G.; MIECH, R. P. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*. II. Disposition of adenosine by whole worms. **Biochemical Pharmacology**, v. 22, n. 4, p. 437-447, Feb. 1973.
- 24 STEGMAN, R. J.; SENFT, A. W.; BROWN, P. R.; PARKS JR, R. E. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*. IV. incorporation of adenosine analogs in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 22, n. 4, p. 459-468, Feb. 1973.

- 25 SENFT, A. W.; MIECH, R. P.; BROWN, P. R.; SENFT, D. G. Purine metabolism in *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, v. 2, n. 2, p. 249-260, June 1972.
- 26 DOVEY, H. F.; MCKERROW, J. H.; WANG, C. C. Purine salvage in *Schistosoma mansoni* schistosomules. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 11, p. 157-167, Apr. 1984.
- 27 MIECH, F. P.; SENFT, A. W.; SENFT, D. G. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*--VI adenosine phosphorylase. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 407-411, Feb. 1975.
- 28 PEREIRA, H. D.; FRANCO, G. R.; CLEASBY, A.; GARRATT, R. C. Structures for the potential drug target purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni* causal agent of schistosomiasis. **Journal of Molecular Biology**, v. 353, n. 3, p. 584-599, Oct. 2005.
- 29 PEREIRA, H. M.; REZENDE, M. M.; CASTILHO, M. S.; OLIVA, G.; GARRATT, R. C. Adenosine binding to low-molecular-weight purine nucleoside phosphorylase: the structural basis for recognition based on its complex with the enzyme from *Schistosoma mansoni*. **Acta Crystallographica D**, v. 66, n. Pt 1, p. 73-79, Jan. 2010.
- 30 VERJOVSKI-ALMEIDA, S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature Genetics**, v. 35, n. 2, p. 148-157, Oct. 2003.
- 31 PROTASIO, A. V. et al. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1455, Jan. 2012.
- 32 BERRIMAN, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352-358, July 2009.
- 33 PEREIRA, H. M.; CLEASBY, A.; PENA, S. S.; FRANCO, G. G.; GARRATT, R. C. Cloning, expression and preliminary crystallographic studies of the potential drug target purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni*. **Acta Crystallographica D**, v. 59, n. Pt 6, p. 1096-1099, June 2003.
- 34 PEREIRA, H. M.; BERDINI, V.; FERRI, M. R.; CLEASBY, A.; GARRATT, R. C. Crystal structure of *Schistosoma* purine nucleoside phosphorylase complexed with a novel monocyclic inhibitor. **Acta Tropica**, v. 114, n. 2, p. 97-102, May 2010.
- 35 MARQUES IDE, A.; ROMANELLO, L.; DEMARCO, R.; PEREIRA, H. D. Structural and kinetic studies of *Schistosoma mansoni* adenylate kinases. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 185, n. 2, p. 157-160, Oct. 2012.
- 36 ROMANELLO, L.; BACHEGA, J. F.; CASSAGO, A.; BRANDAO-NETO, J.; DEMARCO, R.; GARRATT, R. C.; PEREIRA, H. D. Adenosine kinase from *Schistosoma mansoni*: structural basis for the differential incorporation of nucleoside analogues. **Acta Crystallographica D**, v. 69, n. Pt 1, p. 126-36, Jan. 2013.

- 37 FOULK, B. W.; PAPPAS, G.; HIRAI, Y.; HIRAI, H.; WILLIAMS, D. L. Adenylosuccinate lyase of *Schistosoma mansoni*: gene structure, mRNA expression, and analysis of the predicted peptide structure of a potential chemotherapeutic target. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 12, p. 1487-1495, Nov. 2002.
- 38 HOFFMANN, K. F. An historical and genomic view of schistosome conjugal biology with emphasis on sex-specific gene expression. **Parasitology**, v. 128, p. S11-S22, 2004. Supplement 1.
- 39 WAGNER, G. P.; KIN, K.; LYNCH, V. J. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. **Theory in Biosciences**, v. 131, n. 4, p. 281-285, Dec. 2012.
- 40 ZHANG, Y.; EL KOUNI, M. H.; EALICK, S. E. Structure of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase in complex with an ATP analog at 1.1 angstroms resolution. **Acta Crystallographica D**, v. 62, n. Pt 2, p. 140-145, Feb. 2006.
- 41 BAUGH, E. H.; LYSKOV, S.; WEITZNER, B. D.; GRAY, J. J. Real-time PyMOL visualization for Rosetta and PyRosetta. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e21931, 2011.
- 42 LESCH, M.; NYHAN, W. L. A Familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. **American Journal of Medicine**, v. 36, n. 4, p. 561-570, Apr. 1964.
- 43 TORRES, R. J.; PUIG, J. G. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 2, p. 48, Dec. 2007. doi: 10.1186/1750-1172-2-48.
- 44 SAIGAL, R.; CHAKRABORTY, A.; YADAV, R. N.; PRASHANT, R. K. Partial HPRT deficiency (Kelley-Seegmiller syndrome). **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 54, p. 49-52, Jan. 2006. Disponível em: < <http://www.japi.org/january2006/CR-49.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2015.
- 45 KELLEY, W. N.; ROSENBLOOM, F. M.; HENDERSON, J. F.; SEEGMILLER, J. E. A specific enzyme defect in gout associated with overproduction of uric acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 57, n. 6, p. 1735-1739, June 1967.
- 46 PALELLA, T. D.; KELLEY, W. N. An approach to hyperuricemia and gout. **Geriatrics**, v. 39, n. 11, p. 89-92, 95-6, 101-2, Nov. 1984.
- 47 YUAN, L.; WU, C. S.; CRAIG, S. P., 3RD; LIU, A. F.; WANG, C. C. Comparing the human and schistosomal hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1162, n. 1-2, p. 10-16, Mar. 1993.
- 48 YUAN, L.; CRAIG, S. P., 3RD; MCKERROW, J. H.; WANG, C. C. Steady-state kinetics of the schistosomal hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. **Biochemistry**, v. 31, n. 3, p. 806-810, Jan. 1992.

- 49 CRAIG, S. P., 3RD; MCKERROW, J. H.; NEWPORT, G. R.; WANG, C. C. Analysis of cDNA encoding the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRTase) of *Schistosoma mansoni*; a putative target for chemotherapy. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 14B, p. 7087-7101, July 1988.
- 50 DOVEY, H. F.; MCKERROW, J. H.; ALDRITT, S. M.; WANG, C. C. Purification and characterization of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Schistosoma mansoni*. A potential target for chemotherapy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 2, p. 944-948, Jan. 1986.
- 51 PEREIRA, T. C.; PASCOAL, V. D.; MARCHESINI, R. B.; MAIA, I. G.; MAGALHAES, L. A.; ZANOTTI-MAGALHAES, E. M.; LOPES-CENDES, I. *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 619-623, Apr. 2008.
- 52 VAN DER WEYDEN, M. B.; KELLY, W. N. Human adenylosuccinate synthetase. Partial purification, kinetic and regulatory properties of the enzyme from placenta. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7282-7289, Nov. 1974.
- 53 POLAND, B. W.; LEE, S. F.; SUBRAMANIAN, M. V.; SIEHL, D. L.; ANDERSON, R. J.; FROMM, H. J.; HONZATKO, R. B. Refined crystal structure of adenylosuccinate synthetase from *Escherichia coli* complexed with hydantocidin 5'-phosphate, GDP, HPO₄(2-), Mg²⁺, and hadacidin. **Biochemistry**, v. 35, n. 49, p. 15753-15759, Dec. 1996.
- 54 SHIGEURA, H. T.; GORDON, C. N. Hadacidin, a new inhibitor of purine biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 6, p. 1932-1936, June 1962.
- 55 ROSSOMANDO, E. F.; MALDONADO, B.; CREAN, E. V. Effect of hadacidin on growth and adenylosuccinate synthetase activity of *Dictyostelium discoideum*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 14, n. 3, p. 476-482, Sept. 1978.
- 56 KACZKA, E. A.; GITTERMAN, C. O.; DULANEY, E. L.; FOLKERS, K. Hadacidin, a new growth-inhibitory substance in human tumor systems. **Biochemistry**, v. 1, n. 2, p. 340-343, Mar. 1962.
- 57 SHIGEURA, H. T.; GORDON, C. N. The mechanism of action of hadacidin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 6, p. 1937-1940, June. 1962.
- 58 POLAND, B. W.; FROMM, H. J.; HONZATKO, R. B. Crystal structures of adenylosuccinate synthetase from *Escherichia coli* complexed with GDP, IMP hadacidin, NO₃⁻, and Mg²⁺. **Journal of Molecular Biology**, v. 264, n. 5, p. 1013-1027, Dec. 1996.
- 59 MILLER-PATRICK, K.; VINCENT, D. L.; EARLY, R. J.; WEEMS, Y. S.; TANAKA, Y.; ASHIMINE, D. T.; NUSSER, K. D.; LEE, C. N.; LEDGERWOOD, K. S.; WEEMS, C. W. Effects of the purine biosynthesis pathway inhibitors azaserine, hadacidin, and mycophenolic acid on the developing ovine corpus luteum. **Chinese Journal Physiology**, v. 36, n. 4, p. 245-252, 1993.

- 60 JAHNGEN, E. G.; ROSSOMANDO, E. F. Adenylosuccinate synthetase from *Dictyostelium discoideum*: effects of hadacidin analogs and binding of [¹⁴C]hadacidin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 229, n. 1, p. 145-154, Feb. 1984.
- 61 GALE, G. R.; SMITH, A. B. Alanosine and hadacidin--comparison of effects on adenylosuccinate synthetase. **Biochemical Pharmacology**, v. 17, n. 12, p. 2495-2498, Dec. 1968.
- 62 SHIGEURA, H. T. Structural Modifications of Hadacidin and Their Effects on the Activity of Adenylosuccinate Synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 238, p. 3999-4001, Dec. 1963.
- 63 CASTRO, M.; PEREZ-CERDA, C.; MERINERO, B.; GARCIA, M. J.; BERNAR, J.; GIL NAGEL, A.; TORRES, J.; BERMUDEZ, M.; GARAVITO, P.; MARIE, S.; VINCENT, F.; VAN DEN BERGHE, G.; UGARTE, M. Screening for adenylosuccinate lyase deficiency: clinical, biochemical and molecular findings in four patients. **Neuropediatrics**, v. 33, n. 4, p. 186-189, Aug. 2002.
- 64 TOTH, E. A.; YEATES, T. O. The structure of adenylosuccinate lyase, an enzyme with dual activity in the de novo purine biosynthetic pathway. **Structure**, v. 8, n. 2, p. 163-174, Feb. 2000.
- 65 STONE, R. L.; ZALKIN, H.; DIXON, J. E. Expression, purification, and kinetic characterization of recombinant human adenylosuccinate lyase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 26, p. 19710-19716, Sept. 1993.
- 66 SPIEGEL, E. K.; COLMAN, R. F.; PATTERSON, D. Adenylosuccinate lyase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 89, n. 1-2, p. 19-31, Sept-Oct. 2006.
- 67 MARIE, S.; RACE, V.; VINCENT, M. F.; VAN DEN BERGHE, G. Adenylosuccinate lyase deficiency: from the clinics to molecular biology. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 486, n. 4, p. 79-82, 2000.
- 68 RACE, V.; MARIE, S.; VINCENT, M. F.; VAN DEN BERGHE, G. Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in adenylosuccinate lyase deficiency. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 14, p. 2159-2165, Sept. 2000.
- 69 BERROW, N. S.; ALDERTON, D.; SAINSBURY, S.; NETTLESHIP, J.; ASSENBERG, R.; RAHMAN, N.; STUART, D. I.; OWENS, R. J. A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 6, p. e45, 2007.
- 70 GORREC, F. The MORPHEUS protein crystallization screen. **Journal of Applied Crystallography**, v. 42, n. Pt 6, p. 1035-1042, Dec. 2009.
- 71 KUETTEL, S.; GREENWALD, J.; KOSTREWA, D.; AHMED, S.; SCAPOZZA, L.; PEROZZO, R. Crystal Structures of T. b. rhodesiense Adenosine Kinase Complexed with Inhibitor and Activator: Implications for Catalysis and Hyperactivation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, p. e1164, May. 2011.

- 72 ENGH, R. A.; HUBER, R. Accurate bond and angle parameters for x-ray protein-structure refinement. **Acta Crystallographica A**, v. 47, n. 6, p. 392-400, July. 1991.
- 73 MCCOY, A. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, Aug. 2007.
- 74 LANGER, G.; COHEN, S. X.; LAMZIN, V. S.; PERRAKIS, A. Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1171-1179, 2008.
- 75 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica D**, v. 60, Pt 12 Pt 1, p. 2126-2132, Dec. 2004.
- 76 ADAMS, P. D.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; HUNG, L. W.; IOERGER, T. R.; MCCOY, A. J.; MORIARTY, N. W.; READ, R. J.; SACCHETTINI, J. C.; SAUTER, N. K.; TERWILLIGER, T. C. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. **Acta Crystallographica D**, v. 58, n. Pt 11, p. 1948-1954, Nov. 2002.
- 77 KLEYWEGT, G. J.; JONES, T. A. Homo crystallographicus--quo vadis? **Structure**, v. 10, n. 4, p. 465-472, Apr. 2002.
- 78 CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B., 3RD; HEADD, J. J.; KEEDY, D. A.; IMMORMINO, R. M.; KAPRAL, G. J.; MURRAY, L. W.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica D**, v. 66, n. Pt 1, p. 12-21, Jan. 2010.
- 79 LASKOWSKI, R. A.; RULLMANN, J. A.; MACARTHUR, M. W.; KAPTEIN, R.; THORNTON, J. M. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 8, n. 4, p. 477-486, Dec. 1996.
- 80 ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. W320-W324, July 2014. doi: 10.1093/nar/gku316.
- 81 TOTH, E. A.; WORBY, C.; DIXON, J. E.; GOEDKEN, E. R.; MARQUSEE, S.; YEATES, T. O. The crystal structure of adenylosuccinate lyase from *Pyrobaculum aerophilum* reveals an intracellular protein with three disulfide bonds. **Journal of Molecular Biology**, v. 301, n. 2, p. 433-450, Aug. 2000.
- 82 VEDADI, M. et al. Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related Apicomplexan organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 151, n. 1, p. 100-110, Jan. 2007.
- 83 RAY, S. P.; DEATON, M. K.; CAPODAGLI, G. C.; CALKINS, L. A.; SAWLE, L.; GHOSH, K.; PATTERSON, D.; PEGAN, S. D. Structural and biochemical characterization of human adenylosuccinate lyase (ADSL) and the R303C ADSL deficiency-associated mutation. **Biochemistry**, v. 51, n. 33, p. 6701-6713, Aug. 2012.

- 84 TSAI, M.; KOO, J.; YIP, P.; COLMAN, R. F.; SEGALL, M. L.; HOWELL, P. L. Substrate and product complexes of *Escherichia coli* adenylosuccinate lyase provide new insights into the enzymatic mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 370, n. 3, p. 541-554, July. 2007.
- 85 FYFE, P. K.; DAWSON, A.; HUTCHISON, M. T.; CAMERON, S.; HUNTER, W. N. Structure of *Staphylococcus aureus* adenylosuccinate lyase (PurB) and assessment of its potential as a target for structure-based inhibitor discovery. **Acta Crystallographica D**, v. 66, n. Pt 8, p. 881-888, Aug. 2010.
- 86 BANERJEE, S.; AGRAWAL, M. J.; MISHRA, D.; SHARAN, S.; BALARAM, H.; SAVITHRI, H. S.; MURTHY, M. R. Structural and kinetic studies on adenylosuccinate lyase from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis* provide new insights on the catalytic residues of the enzyme. **FEBS Journal**, v. 281, n. 6, p. 1642-1658, Mar. 2014.
- 87 PALENCHAR, J. B.; COLMAN, R. F. Characterization of a mutant *Bacillus subtilis* adenylosuccinate lyase equivalent to a mutant enzyme found in human adenylosuccinate lyase deficiency: asparagine 276 plays an important structural role. **Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 1831-1841, Feb. 2003.
- 88 BULUSU, V.; SRINIVASAN, B.; BOPANNA, M. P.; BALARAM, H. Elucidation of the substrate specificity, kinetic and catalytic mechanism of adenylosuccinate lyase from *Plasmodium falciparum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, n. 4, p. 642-654, Apr. 2009.
- 89 MILLER, R. W.; BUCHANAN, J. M. Biosynthesis of the purines. 28. mechanism of action of adenylosuccinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 6, p. 491-496, Feb. 1962.
- 90 LEE, T. T.; WORBY, C.; BAO, Z. Q.; DIXON, J. E.; COLMAN, R. F. His68 and His141 are critical contributors to the intersubunit catalytic site of adenylosuccinate lyase of *Bacillus subtilis*. **Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 22-32, Jan. 1999.
- 91 BROSIUS, J. L.; COLMAN, R. F. Three subunits contribute amino acids to the active site of tetrameric adenylosuccinate lyase: Lys268 and Glu275 are required. **Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 2217-26, Feb. 2002.
- 92 ARIYANANDA LDE, Z.; LEE, P.; ANTONOPOULOS, C.; COLMAN, R. F. Biochemical and biophysical analysis of five disease-associated human adenylosuccinate lyase mutants. **Biochemistry**, v. 48, n. 23, p. 5291-5302, June 2009.
- 93 PALENCHAR, J. B.; CROCCO, J. M.; COLMAN, R. F. The characterization of mutant *Bacillus subtilis* adenylosuccinate lyases corresponding to severe human adenylosuccinate lyase deficiencies. **Protein Science**, v. 12, n. 8, p. 1694-1705, Aug. 2003.
- 94 YIN, H.; HAMILTON, A. D. Strategies for targeting protein-protein interactions with synthetic agents. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 44, n. 27, p. 4130-4163, July. 2005.

- 95 TODD, M. J.; GOMEZ, J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? **Analytical Biochemistry**, v. 296, n. 2, p. 179-187, Sept. 2001.
- 96 WISEMAN, T.; WILLISTON, S.; BRANDTS, J. F.; LIN, L. N. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Analytical Biochemistry**, v. 179, n. 1, p. 131-137, May. 1989.
- 97 CHEN, Q.; LIANG, Y.; SU, X.; GU, X.; ZHENG, X.; LUO, M. Alternative IMP binding in feedback inhibition of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 348, n. 5, p. 1199-1210, May. 2005.
- 98 RICHARDSON, J. S. The anatomy and taxonomy of protein structure. **Advances in Protein Chemistry**, v. 34, n. 2, p. 167-339, 1981.
- 99 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, n. 2, p. 325-34, July 1994.
- 100 GAYATHRI, P.; SUJAY SUBBAYYA, I. N.; ASHOK, C. S.; SELVI, T. S.; BALARAM, H.; MURTHY, M. R. Crystal structure of a chimera of human and *Plasmodium falciparum* hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferases provides insights into oligomerization. **Proteins**, v. 73, n. 4, p. 1010-1020, Dec. 2008.
- 101 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 phosphoribosyltransferase in complex with a transition-state analog inhibitor. **Nature Structure Biology**, v. 6, n. 6, p. 588-593, June. 1999.
- 102 BALENDIRAN, G. K.; MOLINA, J. A.; XU, Y.; TORRES-MARTINEZ, J.; STEVENS, R.; FOCIA, P. J.; EAKIN, A. E.; SACCHETTINI, J. C.; CRAIG, S. P., 3RD. Ternary complex structure of human HGPRTase, PRPP, Mg²⁺, and the inhibitor HPP reveals the involvement of the flexible loop in substrate binding. **Protein Science**, v. 8, n. 5, p. 1023-1031, May 1999.
- 103 KEOUGH, D. T.; BRERETON, I. M.; DE JERSEY, J.; GUDDAT, L. W. The crystal structure of free human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase reveals extensive conformational plasticity throughout the catalytic cycle. **Journal of Molecular Biology**, v. 351, n. 1, p. 170-181, Aug. 2005.
- 104 KEOUGH, D. T.; HOCKOVA, D.; HOLY, A.; NAESENS, L. M.; SKINNER-ADAMS, T. S.; JERSEY, J.; GUDDAT, L. W. Inhibition of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase by acyclic nucleoside phosphonates: a new class of antimalarial therapeutics. **Journal of Medical Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4391-4399, July. 2009.

- 105 KEOUGH, D. T.; SPACEK, P.; HOCKOVA, D.; TICHY, T.; VRBKOVA, S.; SLAVETINSKA, L.; JANEBA, Z.; NAESENS, L.; EDSTEIN, M. D.; CHAVCHICH, M.; WANG, T. H.; DE JERSEY, J.; GUDDAT, L. W. Acyclic nucleoside phosphonates containing a second phosphonate group are potent inhibitors of 6-oxopurine phosphoribosyltransferases and have antimalarial activity. **Journal of Medical Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 2513-2526, Mar. 2013.
- 106 NAESENS, L.; GUDDAT, L. W.; KEOUGH, D. T.; VAN KUILENBURG, A. B.; MEIJER, J.; VANDE VOORDE, J.; BALZARINI, J. Role of human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase in activation of the antiviral agent T-705 (favipiravir). **Molecular Pharmacology**, v. 84, n. 4, p. 615-629, Oct. 2013.
- 107 KEOUGH, D. T.; HOCKOVA, D.; JANEBA, Z.; WANG, T. H.; NAESENS, L.; EDSTEIN, M. D.; CHAVCHICH, M.; GUDDAT, L. W. Aza-acyclic nucleoside phosphonates containing a second phosphonate group as inhibitors of the human, *Plasmodium falciparum* and *vivax* 6-oxopurine phosphoribosyltransferases and their prodrugs as antimalarial agents. **Journal of Medical Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 827-846, Jan. 2015.
- 108 FOCIA, P. J.; CRAIG, S. P., 3RD; NIEVES-ALICEA, R.; FLETTERICK, R. J.; EAKIN, A. E. A 1.4 Å crystal structure for the hypoxanthine phosphoribosyltransferase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemistry**, v. 37, n. 43, p. 15066-15075, Oct. 1998.
- 109 NIEVES-ALICEA, R.; FOCIA, P. J.; CRAIG, S. P., 3RD; EAKIN, A. E. Limited proteolysis of a trypanosomal hypoxanthine phosphoribosyltransferase yields crystals that diffract X-rays to near atomic resolution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1388, n. 2, p. 500-5, Nov. 1998.
- 110 FREYMAN, D. M.; WENCK, M. A.; ENGEL, J. C.; FENG, J.; FOCIA, P. J.; EAKIN, A. E.; CRAIG, S. P. Efficient identification of inhibitors targeting the closed active site conformation of the HPRT from *Trypanosoma cruzi*. **Chemical Biology**, v. 7, n. 12, p. 957-68, Dec. 2000.
- 111 FOCIA, P. J.; CRAIG, S. P., 3RD; EAKIN, A. E. Approaching the transition state in the crystal structure of a phosphoribosyltransferase. **Biochemistry**, v. 37, n. 49, p. 17120-17127, Dec. 1998.
- 112 CANYUK, B.; FOCIA, P. J.; EAKIN, A. E. The role for an invariant aspartic acid in hypoxanthine phosphoribosyltransferases is examined using saturation mutagenesis, functional analysis, and X-ray crystallography. **Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2754-65, Mar. 2001.
- 113 CANYUK, B.; MEDRANO, F. J.; WENCK, M. A.; FOCIA, P. J.; EAKIN, A. E.; CRAIG, S. P., 3RD. Interactions at the dimer interface influence the relative efficiencies for purine nucleotide synthesis and pyrophosphorolysis in a phosphoribosyltransferase. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 4, p. 905-921, Jan. 2004.

- 114 ENG, W. S.; HOCKOVA, D.; SPACEK, P.; JANEBA, Z.; WEST, N. P.; WOODS, K.; NAESENS, L. M.; KEOUGH, D. T.; GUDDAT, L. W. First Crystal Structures of mycobacterium tuberculosis 6-oxopurine phosphoribosyltransferase: complexes with GMP and pyrophosphate and with acyclic nucleoside phosphonates whose prodrugs have antituberculosis activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 4822-4838, June 2015.
- 115 HEROUX, A.; WHITE, E. L.; ROSS, L. J.; DAVIS, R. L.; BORHANI, D. W. Crystal structure of *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase with XMP, pyrophosphate, and two Mg(2+) ions bound: insights into the catalytic mechanism. **Biochemistry**, v. 38, n. 44, p. 14495-506, Nov 2 1999.
- 116 GUDDAT, L. W.; VOS, S.; MARTIN, J. L.; KEOUGH, D. T.; DE JERSEY, J. Crystal structures of free, IMP-, and GMP-bound *Escherichia coli* hypoxanthine phosphoribosyltransferase. **Protein Science**, v. 11, n. 7, p. 1626-1638, July 2002.
- 117 KANAGAWA, M.; BABA, S.; EBIHARA, A.; SHINKAI, A.; HIROTSU, K.; MEGA, R.; KIM, K.; KURAMITSU, S.; SAMPEI, G.; KAWAI, G. Structures of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (TTHA0220) from *Thermus thermophilus* HB8. **Acta Crystallographica F**, v. 66, n. Pt 8, p. 893-898, Aug. 2010.
- 118 CHEN, Q.; YOU, D.; LIANG, Y.; SU, X.; GU, X.; LUO, M.; ZHENG, X. Crystal structure of *Thermoanaerobacter tengcongensis* hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase L160I mutant--insights into inhibitor design. **FEBS Journal**, v. 274, n. 17, p. 4408-4415, Sept. 2007.
- 119 MOYNIE, L.; GIRAUD, M. F.; BRETON, A.; BOISSIER, F.; DAIGNAN-FORNIER, B.; DAUTANT, A. Functional significance of four successive glycine residues in the pyrophosphate binding loop of fungal 6-oxopurine phosphoribosyltransferases. **Protein Science**, v. 21, n. 8, p. 1185-1196, Aug. 2012.
- 120 MONZANI, P. S.; TRAPANI, S.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G. Crystal structure of *Leishmania tarentolae* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. **BMC Structural Biology**, v. 7, n. 1, p. 59, Sept. 2007. doi: 10.1186/1472-6807-7-59
- 121 SOMOZA, J. R.; CHIN, M. S.; FOCIA, P. J.; WANG, C. C.; FLETTERICK, R. J. Crystal structure of the hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase from the protozoan parasite *Tritrichomonas foetus*. **Biochemistry**, v. 35, n. 22, p. 7032-7040, June 1996.
- 122 JOHNSON, G. G.; EISENBERG, L. R.; MIGEON, B. R. Human and mouse hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: dimers and tetramers. **Science**, v. 203, n. 4376, p. 174-176, Jan. 1979.
- 123 ALLEN, T. E.; ULLMAN, B. Molecular characterization and overexpression of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 65, n. 2, p. 233-245, June 1994.

124 SCHUMACHER, M. A.; BASHOR, C. J.; SONG, M. H.; OTSU, K.; ZHU, S.; PARRY, R. J.; ULLMAN, B.; BRENNAN, R. G. The structural mechanism of GTP stabilized oligomerization and catalytic activation of the *Toxoplasma gondii* uracil phosphoribosyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 1, p. 78-83, Jan. 2002.

125 HEROUX, A.; WHITE, E. L.; ROSS, L. J.; 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, n. 44, p. 14485-14494, Nov. 1999.

126 SCHUMACHER, M. A.; CARTER, D.; ROOS, D. S.; ULLMAN, B.; BRENNAN, R. G. Crystal structures of *Toxoplasma gondii* HGXPRTase reveal the catalytic role of a long flexible loop. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 10, p. 881-887, Oct. 1996.

127 HEROUX, A.; WHITE, E. L.; ROSS, L. J.; KUZIN, A. P.; BORHANI, D. W. Substrate deformation in a hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase ternary complex: the structural basis for catalysis. **Structure**, v. 8, n. 12, p. 1309-1318, Dec. 2000.

128 XU, Y.; EADS, J.; SACCHETTINI, J. C.; GRUBMEYER, C. Kinetic mechanism of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: rapid phosphoribosyl transfer chemistry. **Biochemistry**, v. 36, n. 12, p. 3700-3712, Mar. 1997.

129 MONZANI, P. S. **Estrutura Cristalográfica da enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT) de Leishmania tarentolae complexada com GMP**. 2003. 162 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

130 SUBBAYYA, I. N.; BALARAM, H. A point mutation at the subunit interface of hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase impairs activity: role of oligomerization in catalysis. **FEBS Letters**, v. 521, n. 1-3, p. 72-76, June 2002.

131 CDC. CENTERS for disease control and Prevention. **Schistosomiasis**. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2016.