

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ALÉCIO ANTONIO PIMENTA JUNIOR

**“Estudos estruturais e correlação com a síndrome urolitíase de mutantes da adenina
fosforribosiltransferase humana”**

São Carlos
2011

ALÉCIO ANTONIO PIMENTA JUNIOR

**“Estudos estruturais e correlação com a síndrome urolitíase de mutantes da adenina
fosforribosiltransferase humana”**

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

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann

Versão Original

São Carlos
2011

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

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

Pimenta Junior, Alécio Antonio

Estudos estruturais e correlação com a síndrome urolitíase de mutantes da adenina fosforribosiltransferase humana./Alécio Antonio Pimenta Junior ; orientador Otavio Henrique Thiemann.-- São Carlos, 2011.

135p..

Tese (Doutorado—Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Física Aplicada - opção: Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

1.APRT. 2.Fosforribosiltransferase. 3.Urolitíase. I.Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alécio Antonio Pimenta Junior

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

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular.

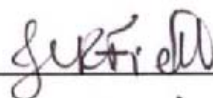
Aprovado(a) em: 19.04.2011

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Juliana Lopes Rangel Fietto

Instituição: UFV

Assinatura



Prof(a). Dr(a). Shaker Chuck Farah

Instituição: IQ/USP

Assinatura



Prof(a). Dr(a). Richard John Ward

Instituição: FFCLRP/USP


Assinatura



Prof(a). Dr(a). Carlos Alberto Montanari

Instituição: IQSC/USP

Assinatura



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

Instituição: IFSC/USP

Assinatura



AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo) pelas bolsas concedidas.

Ao prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann, por todos os ensinamentos, orientação e confiança demonstrada em todos estes anos de trabalho.

Ao Dr. Humberto Muniz, Dr. Márcio Silva e à Dra. Elisandra Rodrigues pelas valiosas contribuições e suporte no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos meus amigos do grupo de Cristalografia pelo agradável período de convívio e amizade.

Aos meus pais, Sônia e Alécio Pimenta, e meus irmãos, Maria Eduarda e Danilo, por todo amor, carinho, esforço e apoio imprescindíveis para minha formação profissional e pessoal.

Às minhas avós, Maria e Lurdes, minha tia Fátima, pelo amor incondicional que recebi por toda minha vida.

Aos “branquelos” (tio Airton, tia Ângela, Carol e Vinícius) que me proporcionaram e ainda proporcionam muitos momentos de alegria.

À minha família São-carlense: meus sogros Roberto e Néia, e meus cunhados(as) Patrícia, Mateus, Guilherme e Vanessa que me acolheram e que me ajudaram em diversos momentos.

E finalmente, à Carol, o meu amor, que esteve sempre presente, me apoiando e dando carinho nos últimos dez anos de minha vida.

RESUMO

PIMENTA JR., A. A. **Estudos estruturais e correlação com a síndrome urolitíase de mutantes da adenina fosforribosiltransferase humana.** 2011. 135 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

A 2,8-DHA Urolitíase é uma doença resultante de uma desordem hereditária que leva a deficiência de atividade da enzima APRT do grupo das PRTases. Até o momento, foram encontradas 18 mutações em pacientes, das quais 7 são *missense*. O presente trabalho dedica-se ao estudo funcional e estrutural dessas 7 mutações e da deleção $\Delta F173$. Construções dos mutantes D65V, L110P, M136T, R67Q, R89Q, I112F e F173G foram obtidas no vetor pET-29a(+) e clonados em *E. coli*. Os protocolos de expressão e purificação foram estabelecidos, onde as enzimas foram obtidas após uma etapa cromatográfica na coluna CHTTM Hidroxiapatita Cerâmica no grau de pureza necessário. A única exceção foi o mutante I112F que se mostrou insolúvel durante a expressão. Um ensaio cinético acoplado através de kit para detecção de PPI foi padronizado e permitiu a caracterização cinética da hAPRT nativa e de seu mutantes. Os mutantes apresentaram perdas de eficiência de uma ordem de magnitude, com exceção do F173G, cujos valores foram comparáveis aos da hAPRT nativa. Ensaio de cristalização foram realizados para todos os mutantes e resultaram em cristais para os mutantes F173G, R67Q e R89Q. Esses cristais foram coletados na linha de Cristalografia de Macromoléculas 2 no LNLS. Os conjuntos de dados estão sendo analisados e as estruturas estão em fase final de refinamento.

Palavras-chave: APRT. Fosforribosiltransferase. Urolitíase.

ABSTRACT

PIMENTA JR., A. A. **Structural studies and correlation with urolithiasis syndrome of mutants from human adenine phosphoribosyltransferase.** 2011. 135 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

2,8-DHA Urolithiasis is a disease resulting from an inherited disorder that leads to deficiency of APRT, an enzyme of the PRTases group. So far, 18 mutations were found in patients, 7 of which are missense. This work is dedicated to the functional and structural study of these 7 mutations and the deletion Δ F173. Mutants constructions D65V, L110P, M136T, R67Q, R89Q, I112F and F173G were obtained in the vector pET-29a (+) and cloned in *E. coli*. The expression and purification protocols were established and the enzymes were obtained after 1 chromatographic step using the CHTTM Hydroxyapatite Ceramics column in the required purity. The only exception was the mutant I112F that resulted insoluble during expression. A coupled kinetic assay using P_{Pi} detection kit was standardized and allowed the kinetic characterization of native hAPRT and its mutants. The mutants had an efficiency loss of an order of magnitude, with the exception of F173G, whose values were comparable to those of native hAPRT. Crystallization trials were performed for all mutants and resulted in crystals for mutants F173G, R67Q and R89Q. These crystals were collected on Macromolecules Crystallography 2 line at LNLS. The datasets are being analyzed and the structures are in the final stages of refinement.

Keywords: APRT. Phosphoribosyltransferase. Urolithiasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Compostos parentais das bases purínicas e pirimidínicas.	25
Figura 2 – Componentes dos nucleotídeos.	26
Figura 3 – Estrutura do nucleotídeo.	26
Figura 4 – Visão geral do metabolismo de purino nucleotídeos em humanos.	28
Figura 5 – Origem dos átomos do anel purínico.	28
Figura 6 – Via de síntese <i>de novo</i> dos nucleotídeos purínicos: construção do anel purínico do IMP.	30
Figura 7 – Síntese de AMP e GMP a partir de IMP.	31
Figura 8 – Vias metabólicas associadas à reciclagem de purinas.	33
Figura 9 – Exemplos de reações de reutilização de purinas catalisadas por PRTases.	34
Figura 10 – Estrutura tridimensional do monômero da APRT de <i>Leishmania tarentolae</i> representada na forma de fitas.	35
Figura 11 – Alinhamento das sequências primárias de representantes das PRTases com estrutura tridimensional elucidada.	37
Figura 12 – Estrutura quaternária da APRT de <i>Homo sapiens</i> representada na forma de fitas.	38
Figura 13 – Via metabólica da adenina em humanos.	40
Figura 14 – Mapa das mutações da hAPRT estudadas.	43
Figura 15 – Estratégia utilizada na mutagênese sítio-dirigida no gene da hAPRT.	51
Figura 16 – Oligonucleotídeos utilizados nas mutações sítio-dirigidas realizadas com a hAPRT. Cada retângulo representa uma mutação.	52
Figura 17 – Esquema de interação entre proteína e hidroxapatita.	56
Figura 18 – Procedimento de precipitação com LaCl ₃	60

Figura 19 – Procedimento para o ensaio enzimático da hAPRT e posterior precipitação com LaCl_3	61
Figura 20 – Procedimento de precipitação com LaCl_3 para verificar sua eficiência.	63
Figura 21 – Procedimento para o ensaio enzimático da hAPRT e posterior precipitação com LaCl_3 com menor fator de diluição.	64
Figura 22 – Esquema do método de cristalização usando a técnica da gota suspensa.	68
Figura 23 – Alinhamento da sequência do gene nativo da hAPRT com a sequência nucleotídica do mutante R67Q.	73
Figura 24 – Alinhamento da sequência do gene nativo da hAPRT com a sequência nucleotídica do mutante R89Q.	74
Figura 25 – Alinhamento da sequência do gene nativo da hAPRT com a sequência nucleotídica do mutante I112F.	74
Figura 26 – Alinhamento da sequência do gene nativo da hAPRT com a sequência nucleotídica do mutante F173G.	74
Figura 27 – Cromatografia das enzimas em Hidroxiapatita.	75
Figura 28 – SDS-PAGE 15% da purificação do mutante I112F mostrada na figura 27.	76
Figura 29 – Região da mutação I112F.	76
Figura 30 – Cromatografia das enzimas em coluna de Desalting.	77
Figura 31 – SDS-PAGE 15% representativo da purificação e preparação da hAPRT e seus mutantes.	78
Figura 32 – Absorbância a 259 nm da reação enzimática da hAPRT.	79
Figura 33 – Espectro de absorção na região do ultravioleta dos analítos presentes na reação enzimática da hAPRT.	80
Figura 34 – Estrutura dos compostos adenina e AMP.	80

Figura 35 – Espectro de absorção na região do ultravioleta das misturas testes contendo adenina, PRPP e AMP e seus respectivos espectros padrões.....	82
Figura 36 – Absorbância no comprimento de onda máximo de absorção da adenina ($\lambda = 260,5$ nm) em função do tempo de reação.....	83
Figura 37 – Absorbância no comprimento de onda máximo de absorção da adenina ($\lambda = 260,5$ nm) em função do tempo de reação.....	84
Figura 38 – Absorbância no comprimento de onda máximo de absorção da adenina ($\lambda = 260,5$ nm) em função do tempo de reação.....	84
Figura 39 – Espectro de absorção na região do ultravioleta das misturas a baixas concentrações em diluições diferentes.	85
Figura 40 – Espectro de absorção na região do ultravioleta das misturas a $100 \mu\text{M}$ em diluições diferentes já corrigidos frente as mesmas.....	86
Figura 41 – Consumo de adenina pela hAPRT nativa em função de sua concentração inicial.....	87
Figura 42 – Consumo de adenina pela hAPRT nativa em função de sua concentração inicial.....	88
Figura 43 – Quantificação de Pirofosfato a partir de concentrações conhecidas.	89
Figura 44 – Verificação da especificidade do kit comercial por PPi.....	90
Figura 45 – Curvas dose-resposta para a hAPRT nativa.....	91
Figura 46 – Curvas dose-resposta para o mutante R89Q.....	92
Figura 47 – Curvas dose-resposta para o mutante L110P.....	92
Figura 48 – Curvas dose-resposta para o mutante F173G.	92
Figura 49 – Curvas dose-resposta para o mutante D65V.....	93
Figura 50 – Curvas dose-resposta para o mutante M136T.....	93
Figura 51 – Curvas dose-resposta para o mutante R67Q.....	93

Figura 52 – Resíduos mutados em pacientes com DHA-urolitíase..	95
Figura 53 – Região da mutação F173G.....	96
Figura 54 – Histograma representativo do Raio hidrodinâmico (Rh) da enzima hAPRT.	97
Figura 55 – Cristais dos mutantes F173G, R67Q e R89Q representativos do resultado do fatorial realizado.	98
Figura 56 – Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc para as mutações nas estruturas dos mutantes da hAPRT..	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estruturas de fosforribosiltransferases (PRTases) disponíveis no Protein data bank (PDB) ³⁵	36
Tabela 2 – Mutações no <i>locus APRT</i> em pacientes japoneses e não japoneses ³⁷	42
Tabela 3 – Concentrações de PPi obtidas utilizando o kit comercial a partir de amostras conhecidas.	90
Tabela 4 – Caracterização cinéticas da hAPRT e seus mutantes baseado no modelo de Michaelis-Menten.	94
Tabela 5 – Grau de conservação normalizado para cada resíduo estudado.	96
Tabela 6 – Estatística da coleta e processamento de dados e valores correntes de R e R_{Free} para os três mutantes da hAPRT.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS (E SIGLAS)

2,8-DHA	2,8-Dihidroxiadenina
8-HA	8-Hidroxiadenina
AMP	Adenosina 5'-Monofosfato ou Adenilato
APRT	Adenina fosforribosiltransferase
ATP	Adenosina 5'-Trifosfato
BSA	Albumina de Soro Bovino
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleosídeos trifosfatados
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GMP	Guanosina 5'-Monofosfato ou Guanilato
GPRT	Guanina fosforribosiltransferase
GTP	Guanosina 5'-Trifosfato
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase
HGXprt	Hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferase
HPRT	Hipoxantina fosforribosiltransferase
IMP	Inosina 5'-Monofosfato ou Inosinato
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
k	Quilo
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – forma oxidada
OPRT	Orotato fosforribosiltransferase
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PDB	<i>Protein data bank</i>
PP _i	Pirofosfato
PRPP	5-Fosforribosil-1-Pirofosfato
PRTase	Fosforribosiltransferase
QPRT	Quinolinato fosforribosiltransferase
q.s.p.	Quantidade suficiente para
Rh	Raio hidrodinâmico
RNA	Ácido Ribonucléico
SDS	Detergente dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SN1	Substituição Nucleofílica Tipo 1
SN2	Substituição Nucleofílica Tipo 2
TEA	Trietanolamina
UPRT	Uracil fosforribosiltransferase
XDH	Xantina desidrogenase
XMP	Xantosina 5'-Monofosfato ou Xantonilato
XPRT	Xantina fosforribosiltransferase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Os Nucleotídeos	25
1.2 Vias de Obtenção de Purino Nucleotídeos	27
1.2.1 Via de Síntese <i>de novo</i>	28
1.2.2 Via de Recuperação	32
1.3 Fosforribosiltransferases (PRTase)	34
1.4 Adenina Fosforribosiltransferase (APRT).....	37
1.5 Deficiências na APRT – A 2,8-Dihidroxiadenina Urolitíase	39
2 OBJETIVOS	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1 Mutagênese Sítio-dirigida.....	51
3.2 Expressão da Enzima hAPRT	54
3.3 Purificação da Enzima hAPRT	55
3.3.1 Troca do Tampão da hAPRT para Realização dos Ensaio Cinéticos	57
3.4 Caracterização Cinética da hAPRT.....	58
3.4.1 Ensaio Enzimático Espectrofotométrico da hAPRT	58
3.4.2 Testes de Precipitação com LaCl_3	58
3.4.3 Ensaio Enzimático da hAPRT Através da Precipitação com LaCl_3	61
3.4.4 Testes de Eficiência da Precipitação com LaCl_3 para Diminuir a Diluição da Reação	62
3.4.5 Ensaio Enzimático da hAPRT Através da Precipitação com LaCl_3 (Menor Diluição)	63
3.4.6 Ensaio Enzimático Acoplado para Caracterização Cinética da hAPRT.....	65
3.5 Análise da Conservação Evolutiva dos Resíduos Mutados na hAPRT.....	66
3.6 Ensaio de espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	67
3.7 Cristalização, Coleta de Dados de Difração de Raios X, Elucidação e Refinamento da Enzima hAPRT	67
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
4.1 Mutagênese Sítio-dirigida.....	73
4.2 Expressão e Purificação da hAPRT	75

4.3 Caracterização Cinética da hAPRT	78
4.3.1 Ensaio Enzimático Espectrofotométrico da hAPRT	78
4.3.2 Testes de Precipitação com LaCl_3	81
4.3.3 Ensaio Enzimático da hAPRT Através da Precipitação com LaCl_3	82
4.3.4 Testes de Eficiência da Precipitação com LaCl_3 para Diminuir a Diluição da Reação	85
4.3.5 Ensaio Enzimático da hAPRT Através da Precipitação com LaCl_3 (Menor Diluição)	87
4.3.6 Ensaio Enzimático Acoplado para Caracterização Cinética da hAPRT	89
4.4 Análise da Conservação Evolutiva dos Resíduos Mutados na hAPRT	95
4.5 Ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS)	97
4.6 Cristalização, Coleta de Dados de Difração de Raios X, Elucidação e Refinamento da Enzima hAPRT	97
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	103
REFERÊNCIAS	109
APÊNDICE A – Outras atividades desenvolvidas no período	121

Capítulo 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os Nucleotídeos

Os nucleotídeos são moléculas que desempenham um conjunto diverso de funções importantes nas células. Eles estão diretamente envolvidos com o metabolismo celular, por serem os transportadores primários de energia química na célula, atuam como componentes estruturais de co-fatores enzimáticos e intermediários metabólicos e estão envolvidos na sinalização celular¹. Além disso, os nucleotídeos são os constituintes dos ácidos nucléicos (DNA e RNA), sendo responsáveis pelo transporte da informação genética¹⁻⁶.

Essas moléculas possuem três componentes característicos: uma base nitrogenada, uma pentose (molécula de açúcar de 5 carbonos) e um grupo fosfato. As bases nitrogenadas

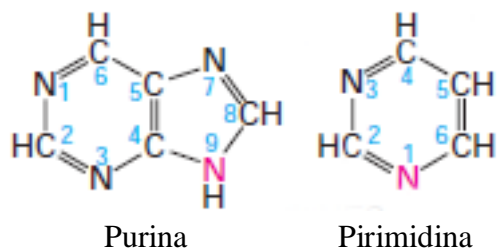


Figura 1 – Compostos parentais das bases purínicas e pirimidínicas. Em azul está mostrada a convenção de numeração e em rosa, o nitrogênio da ligação glicosídica¹.

provêm de dois compostos parentais diferentes, purina e pirimidina (Figura 1). Assim, tem-se a formação de nucleotídeos de purina (ou purino nucleotídeos) e de pirimidinas (ou pirimidino nucleotídeos).

As duas bases purínicas principais, adenina (A) e guanina (G) são encontradas tanto no DNA quanto no RNA. Porém, apenas a base pirimidínica citosina (C) é compartilhada entre os dois ácidos nucléicos, uma vez que a segunda pirimidina principal do DNA é a timina (T) e a do RNA é a uracila (U) (Figura 2A). Além disso, os ácidos nucléicos possuem duas espécies de pentoses. No DNA está presente a 2'-desoxi-D-ribose e no RNA está presente a D-ribose, ambas em sua forma β -furanosídica (Figura 2B).

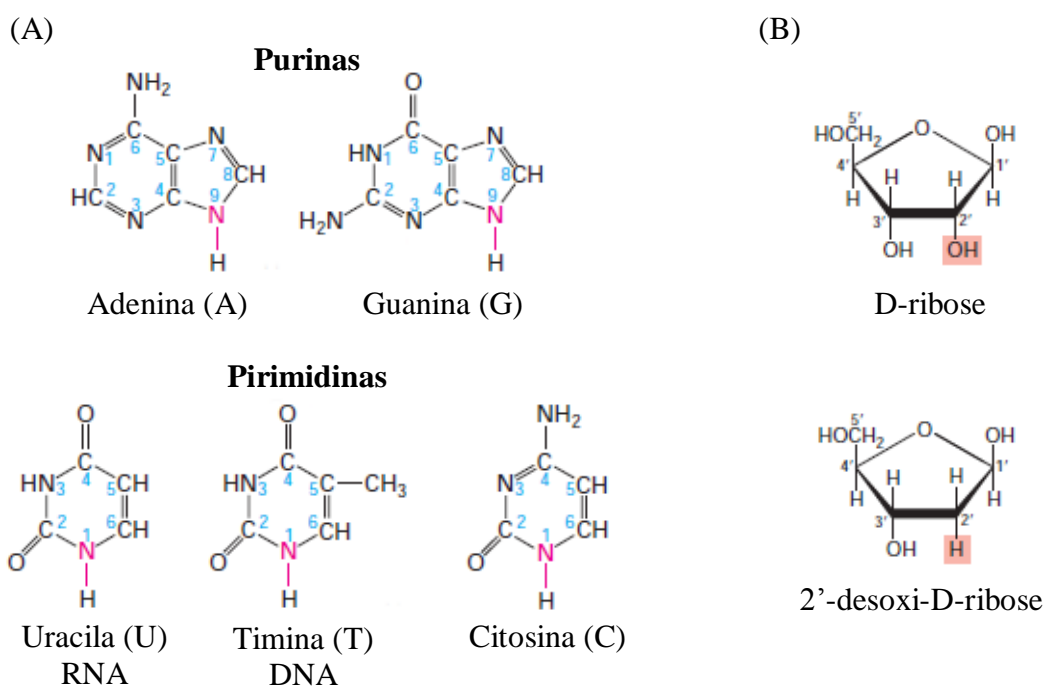


Figura 2 – Componentes dos nucleotídeos. (A) Principais bases purínicas e pirimidínicas dos ácidos nucleicos. (B) Ribose e desoxirribose, as pentoses presentes no RNA e no DNA, respectivamente².

A união da base à pentose é feita covalentemente por meio de uma ligação N - β -glicosídica. Essa ligação ocorre entre o nitrogênio N-1 das pirimidinas ou o nitrogênio N-9 das purinas com o carbono C-1' da pentose. Já o grupo fosfato encontra-se esterificado ao carbono C-5' da mesma¹⁻³ (Figura 3).

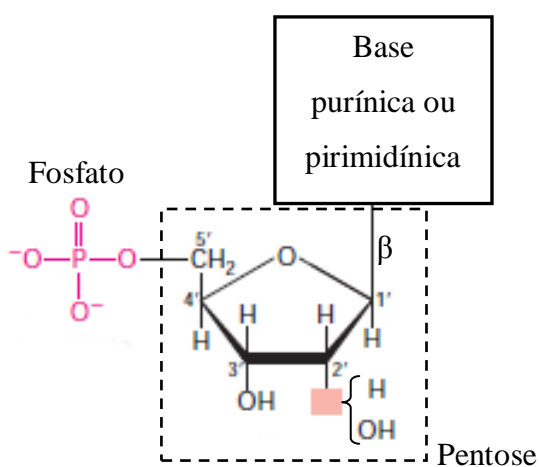


Figura 3 – Estrutura do nucleotídeo. Representação geral mostrando a convenção da numeração para o anel da pentose¹.

As moléculas de DNA e RNA são, então, compostas de nucleotídeos sucessivos ligados por uma ligação fosfodiéster, entre o grupo 5'-fosfato de uma unidade nucleotídica e o grupo 3'-hidroxila do nucleotídeo seguinte. Assim, o esqueleto covalente dos ácidos nucleicos é composto de resíduos

fosfato e pentose que se repetem

alternadamente, enquanto que as bases nitrogenadas estendem-se da cadeia como grupos laterais^{1-3, 6, 7}.

Os nucleotídeos possuem um caráter ácido devido ao grupo fosfato que, sob condições intracelulares normais, liberam um próton (H^+) ficando negativamente carregados. Suas cargas negativas estão geralmente neutralizadas por interações iônicas com cargas positivas nas proteínas, íons metálicos e poliaminas. Já os grupos hidroxila dos resíduos do açúcar formam ligações de hidrogênio com a água, fazendo com que o esqueleto dos ácidos nucléicos seja hidrofílico.

1.2 Vias de Obtenção de Purino Nucleotídeos

Os dois nucleotídeos purínicos presentes nos ácidos nucléicos são: AMP e GMP. Em células de mamíferos, eles podem ser obtidos a partir de caminhos bioquímicos diferentes. Eles podem ser sintetizados endogenamente a partir de precursores não purínicos, via de síntese *de novo*, ou através da reutilização de nucleosídeos e do aproveitamento de purinas livres provenientes da dieta alimentar e degradação de ácidos nucléicos, via de recuperação⁸⁻¹⁰ (Figura 4).

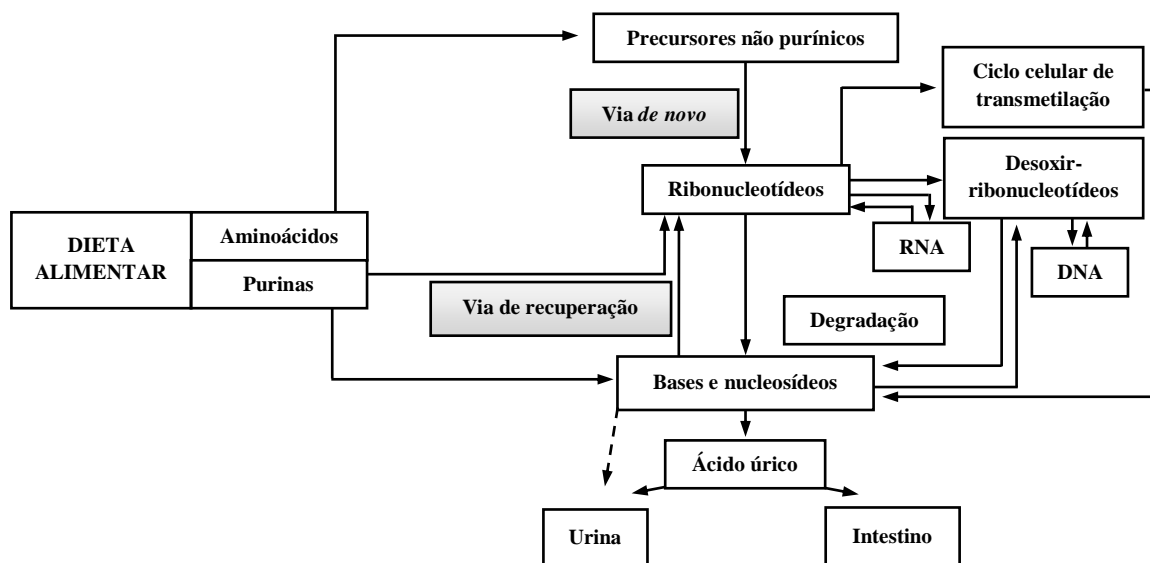


Figura 4 – Visão geral do metabolismo de purino nucleotídeos em humanos. Há dois caminhos para a obtenção de purino ribonucleotídeos em mamíferos: *Via de novo*, onde são utilizados precursores não purínicos; *Via de recuperação*, onde bases purínicas (incluindo as purinas provenientes da alimentação) e nucleosídeos são reutilizados para a formação de ribonucleotídeos. Os ribonucleotídeos formados podem ser convertidos em desoxirribonucleotídeos, utilizados em processos metabólicos ou sofrer degradação e serem eliminados⁸.

1.2.1 Via de Síntese *de novo*

A via de síntese purínica *de novo* envolve onze reações enzimáticas em série^{1, 3, 8}. O anel purínico é construído sequencialmente pela adição de átomos provenientes de moléculas doadoras ao esqueleto de sustentação de D-ribose-5-fosfato presente na molécula de 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP). A figura 5 mostra a origem dos átomos do anel purínico.

O PRPP é um substrato chave na regulação da via de síntese *de novo*^{8, 9, 11, 12}. Ele é produzido pela PRPP sintetase a partir de MgATP e D-ribose-5-fosfato. Sua

formação pode ser considerada o passo inicial da via de síntese, mesmo que o PRPP também

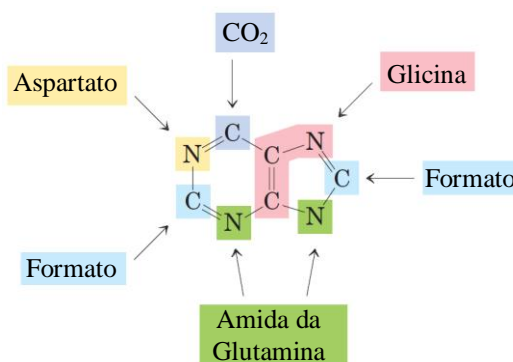


Figura 5 – Origem dos átomos do anel purínico. Em destaque encontram-se os átomos e seus respectivos compostos de origem¹.

seja utilizado na síntese de nucleotídeos de pirimidina e piridina e na via de recuperação de purinas^{11, 13, 14}. Já na primeira reação específica da via, o PRPP sofre uma condensação irreversível com L-glutamina formando a 5-fosforribosilamina, reação essa catalisada pela amido fosforribosiltransferase (AmidoPRT)^{1, 8, 9}.

As reações subsequentes da via são conduzidas passo a passo para a construção e fechamento do anel purínico, até a formação de Inosina 5'-monofosfato (IMP) (Figura 6). Assim, no passo seguinte, três grupos de uma glicina são adicionados através de outra reação de condensação, onde uma molécula de ATP é consumida. A seguir, o grupo amino adicionado anteriormente é formilado (Passo 4) e um nitrogênio é doado por uma glutamina, com o consumo de mais uma molécula de ATP (Passo 5). O fechamento do anel imidazólico de cinco membros ocorre através de uma reação de desidratação e consumo de outra molécula de ATP (Passo 6).

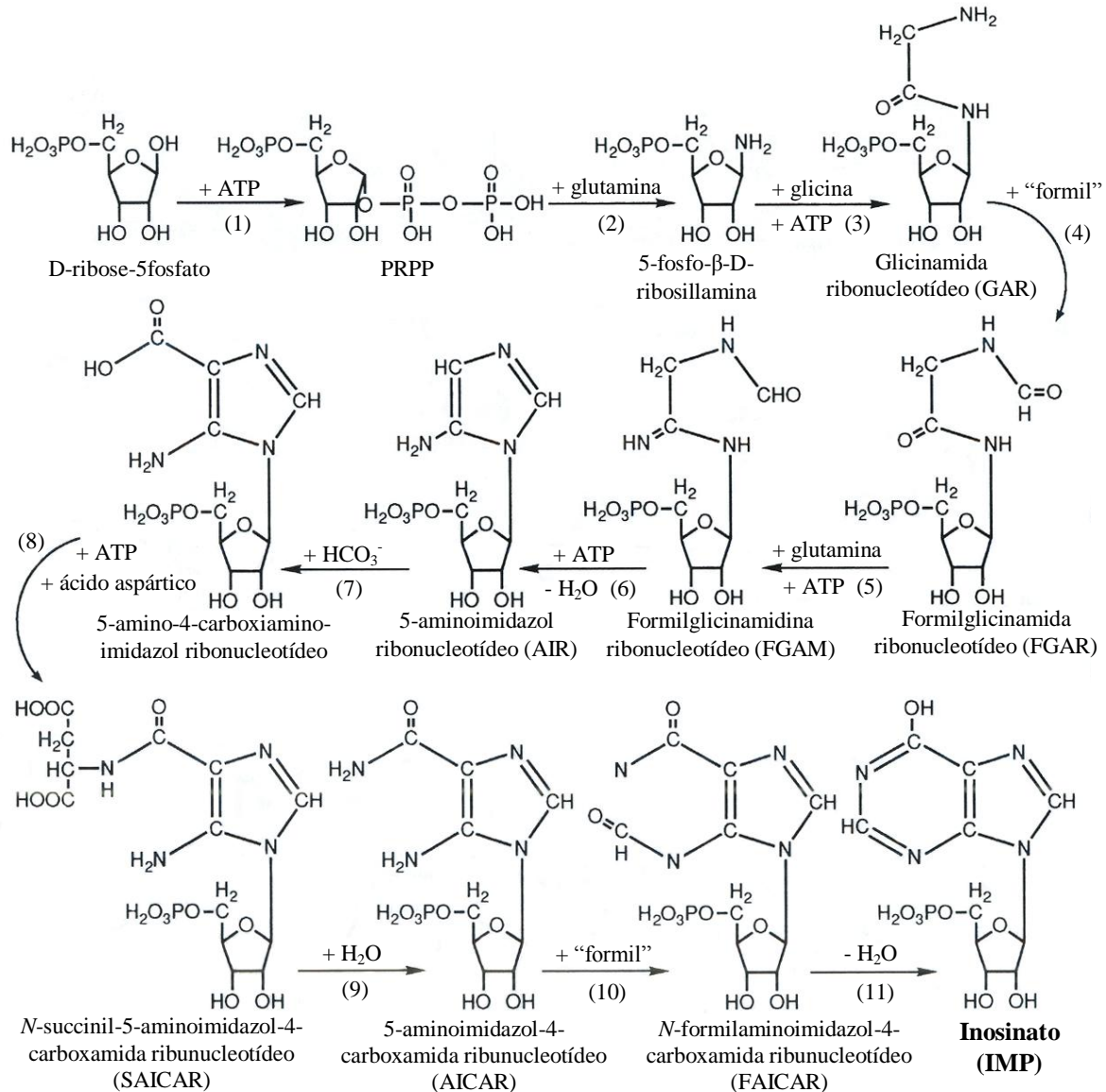


Figura 6 – Via de síntese de novo dos nucleotídeos purínicos: construção do anel purínico do IMP. A formação de 5-fosforribosilamina (passo (2)) é o primeiro passo comprometido com a síntese de nucleotídeos purínicos. As enzimas são: (1) PRPP sintetase, (2) AmidoPRT, (3) GAR sintetase, (4) GAR transformilase, (5) FGAR amidotransferase, (6) FGAM ciclase (AIR sintetase), (7) N⁵-CAIR sintetase e N⁵-CAIR mutase, (8) SAICAR sintetase, (9) SAICAR liase, (10) AICAR transformilase e (11) IMP sintetase⁸.

Neste ponto, três dos seis átomos necessários para o segundo anel na estrutura purínica já estão corretamente posicionados. Para completar o processo, um grupo carboxila é adicionado primeiro por uma carboxilação incomum, utilizando bicarbonato ao invés de biotina, seguido de um rearranjo que transfere o carboxilato do grupo amino exocíclico para a posição 4 do anel do imidazol (Passo 7). Um aspartato entrega então seu grupo amino para o anel de imidazol através da formação de uma ligação amida (Passo 8), seguida pela

eliminação de seu esqueleto carbônico (Passo 9). O carbono final é cedido por um grupo formil (Passo 10), e o fechamento do segundo anel ocorre para concluir os dois anéis fundidos do núcleo purínico (Passo 11). Com isso, a formação do IMP está completa^{1, 8, 9, 15}.

A conversão do IMP em AMP (Figura 7) requer a inserção de um grupo amino derivado do aspartato, que ocorre de maneira análoga aos passos 8 e 9 da produção do IMP. A grande diferença está no consumo de uma molécula de GTP ao invés de ATP como fonte de fosfato de alta energia na síntese do adenilsuccinato. Já o GMP é formado pela oxidação do IMP em C-2 usando NAD^+ , seguido pela adição de um grupo amino de uma glutamina e consumo de uma molécula de ATP (Figura 7)¹⁻³. No total, 6 mols de moléculas energéticas são consumidos nessa via para cada mol de purino nucleotídeo produzido (5 mols de ATP e 1 de GTP para a obtenção de AMP e 6 mols de ATP para a obtenção de GMP)⁸.

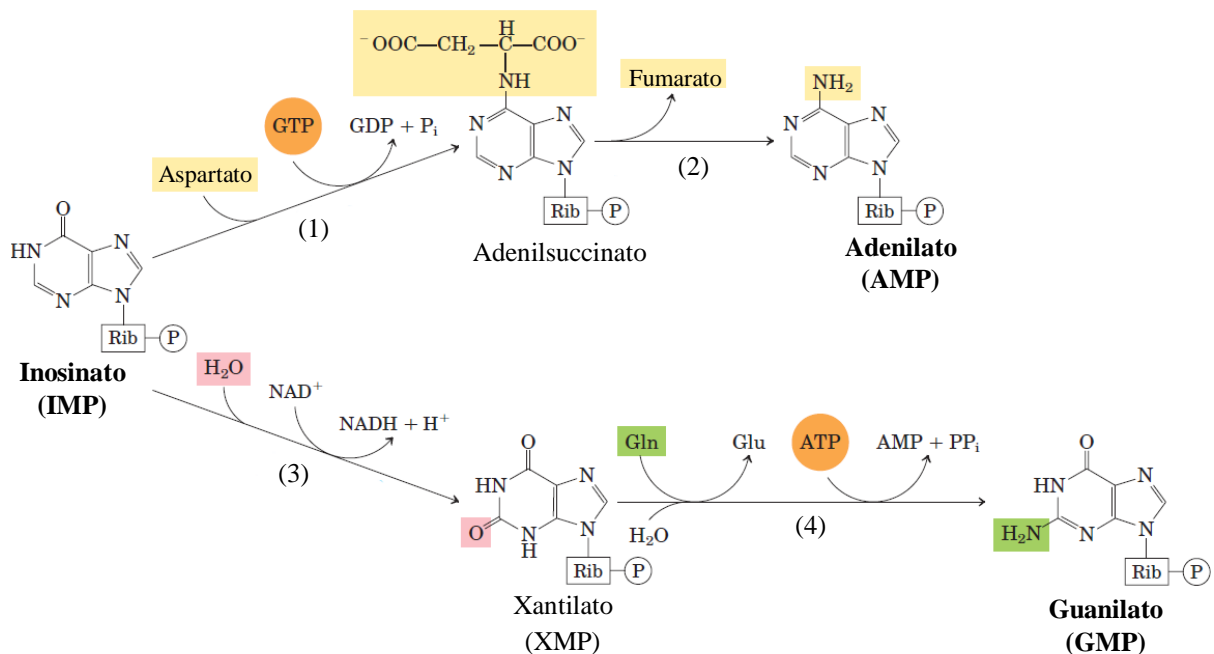


Figura 7 – Síntese de AMP e GMP a partir de IMP. As enzimas são: (1) Adenilsuccinato sintetase, (2) Adenilsuccinato liase, (3) IMP desidrogenase e (4) XMP-glutamina amidotransferase¹.

O controle da via de síntese *de novo* de purino nucleotídeos é efetuado por um processo regulatório de retroalimentação. Três mecanismos principais de retroalimentação

cooperam na regulação da velocidade global da síntese¹⁻³. O primeiro deles envolve as duas reações iniciais, onde os produtos finais da via (IMP, AMP e GMP) e o PRPP são responsáveis pela regulação alostérica do passo 2 através de uma relação antagônica^{8, 9, 16, 17}.

O aumento do nível celular de PRPP pela PRPP sintetase favorece a ligação do mesmo a AmidoPRT, que induz uma mudança conformacional nessa enzima, favorecendo sua ativação. Já os purino nucleotídeos inibem a AmidoPRT, ligando-se aparentemente a sítios diferentes dos sítios de ligação dos substratos^{18, 19}. O aumento excessivo da concentração desses mesmos nucleotídeos também é capaz de inibir parcialmente a síntese de PRPP, o que também reflete numa diminuição na velocidade global da via.

No segundo mecanismo de controle, um excesso de GMP inibe a formação de XMP a partir de IMP por ação da IMP desidrogenase, sem afetar a formação de AMP. Além disso, um acúmulo de AMP resulta na inibição da formação de adenilsuccinato pela Adenilsuccinato sintetase, também sem afetar a biossíntese de GMP.

1.2.2 Via de Recuperação

Os caminhos bioquímicos pelos quais bases purínicas pré-formadas e nucleosídeos são transformados em nucleotídeos constituem a via de recuperação de purinas^{1, 8, 14, 20, 21} (Figura 8). Várias enzimas associadas a essa via são responsáveis pela disponibilização dos fragmentos purínicos a partir da degradação dos ácidos nucleicos, como as 5'-nucleotidases, aminohidrolases e purino nucleosídeo fosforilases²¹.

Já as enzimas capazes de produzir nucleotídeos a partir de nucleosídeos ou bases purínicas livres são chamadas de enzimas recicladoras²⁰ e constituem o ponto principal da via.

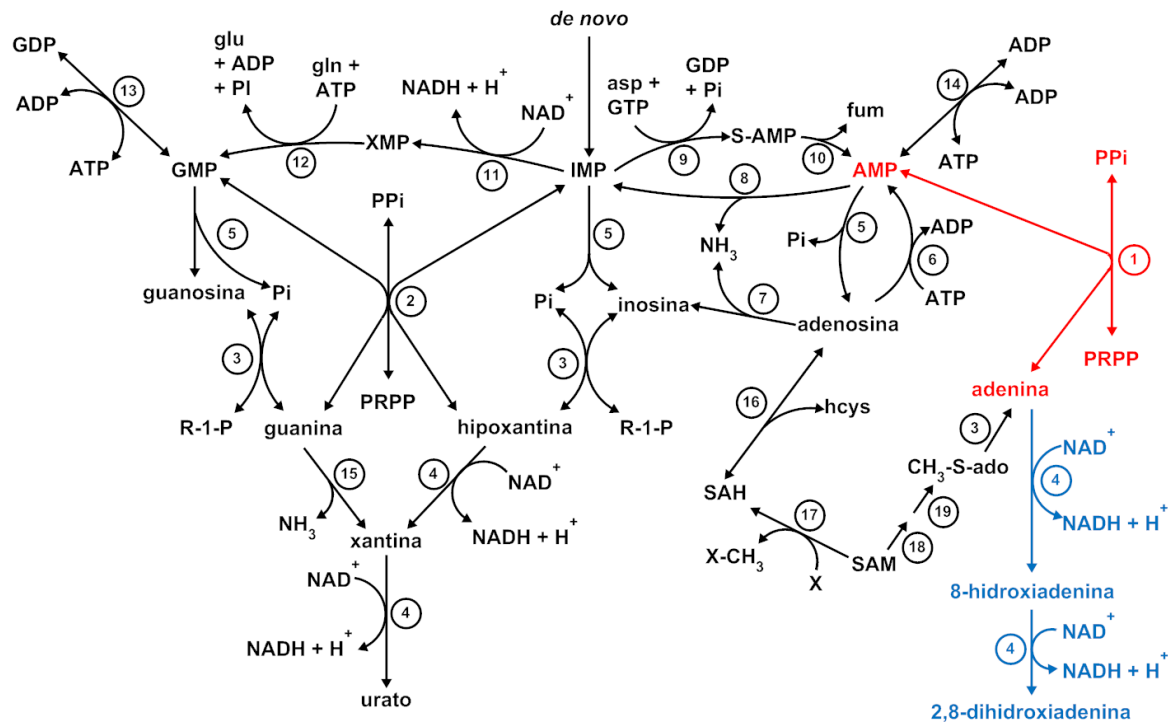


Figura 8 – Vias metabólicas associadas à reciclagem de purinas. As reações (1), (2) e (6) são catalisadas pelas enzimas recicladoras. As enzimas são: (1) adenina fosforribosiltransferase (APRT), (2) hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT), (3) purino nucleosídeo fosforilase, (4) xantina desidrogenase, (5) 5'-nucleotidase, (6) adenosina quinase, (7) adenosina desaminase, (8) AMP desaminase, (9) S-AMP sintetase, (10) S-AMP liase, (11) IMP desidrogenase, (12) GMP sintetase, (13) gualinato quinase, (14) adenilato quinase, (15) guanina desaminase, (16) SAH hidrolase, (17) homocisteína metiltransferase, (18) SAM descarboxilase e (19) aminopropiltransferase. X é um aceitador de grupo metil. Em vermelho destaca-se a reação da enzima APRT e em azul destaca-se a formação do metabólito insolúvel 2,8-dihidroxiadenina (2,8-DHA)²⁰.

Existem dois tipos principais de enzimas recicladoras de purinas, as nucleosídeo quinases e as fosforribosiltransferases (PRTases)^{20, 21}. As nucleosídeo quinases são responsáveis pela fosforilação direta de nucleosídeos à nucleotídeos:



A principal nucleosídeo quinase encontrada em tecidos animais é a adenosina quinase. Essa enzima citosólica dependente de Mg^{2+} catalisa a fosforilação da adenosina à AMP, consumindo uma molécula de ATP²⁰⁻²³.

Já as PRTases (ver item a seguir) convertem bases purínicas em seus respectivos nucleotídeos em uma única etapa:



1.3 Fosforribosiltransferases (PRTase)

O grupo das PRTases é responsável por catalisar reações enzimáticas envolvendo purinas livres, íons magnésio e PRPP. Obtém-se dessas reações, um ribonucleotídeo e um pirofosfato livre²⁴⁻³³. Na figura 9 estão representados alguns exemplos de reações catalisadas por PRTases.

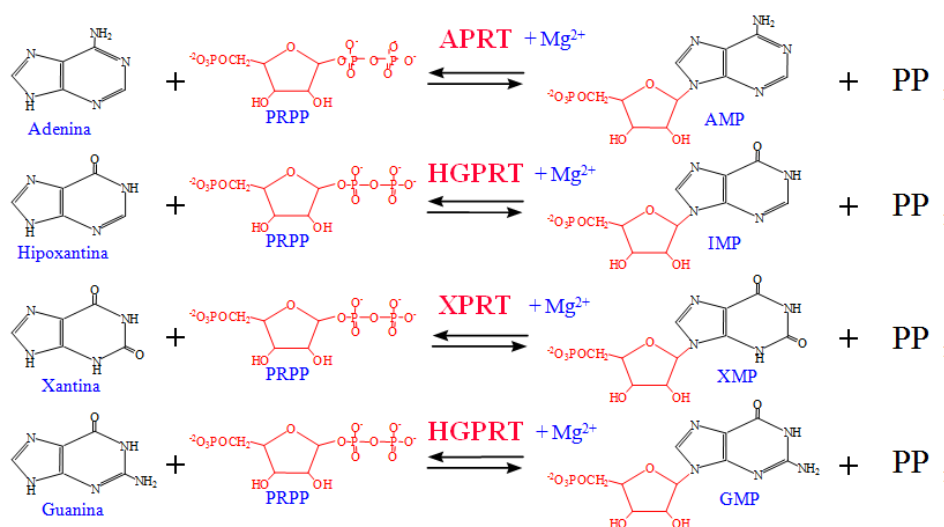


Figura 9 – Exemplos de reações de reutilização de purinas catalisadas por PRTases.

Nota-se que a partir de bases nitrogenadas livres, PRPP e íon magnésio, as PRTases catalisam a formação de: adenilato (AMP), inosinato (IMP), xantonilato (XMP) e guanilato (GMP). O pirofosfato (PP_i) é o produto secundário das reações²⁵.

Na catálise ocorre o deslocamento do α -1'-pirofosfato do PRPP por um ataque nucleofílico, onde um radical contendo nitrogênio é o agente nucleofílico. Os produtos da reação são as riboses-5'-fosfato substituídas em β -1 e o pirofosfato. O nucleófilo para a maioria das PRTases é a base nitrogenada do nucleotídeo, enquanto que o produto é o nucleosídeo-5-monofosfato^{28, 31, 32}.

O processo de ataque nucleofílico pela purina no átomo C-1' do PRPP compreende um processo sequencial onde o pirofosfato é liberado primeiro, seguido pela liberação do

nucleotídeo, tanto por um mecanismo de deslocamento tipo SN1 ou SN2. Caso a reação ocorra via um deslocamento nucleofílico do tipo SN1, supõem-se que o estado de transição seja um intermediário carregado positivamente – o *oxycarbonium*^{24, 29, 34}. Por outro lado, em uma reação via deslocamento nucleofílico do tipo SN2, a enzima irá promover um ataque nucleofílico simultâneo a formação de produto onde ocorre a rápida transferência do PRPP e a formação do complexo ternário^{26, 28}.

Baseado em suas características estruturais, as PRTases são classificadas em dois grupos, tipo I e tipo II. As do tipo I são identificadas por um motivo estrutural conservado de ligação ao PRPP, um enovelamento comum tipo α/β ²⁹⁻³³. Essas PRTases apresentam também um *loop* flexível, além da região central constituída de pelo menos cinco fitas β paralelas, rodeadas por três ou mais hélices α (Figura 10). As PRTases do tipo I, mostradas na Tabela 1³⁵ e figura 11³⁶, apresentam também uma região estruturalmente variável, denominada de subdomínio *hood*, que está relacionada com a especificidade pela base nitrogenada^{28, 31, 32}.

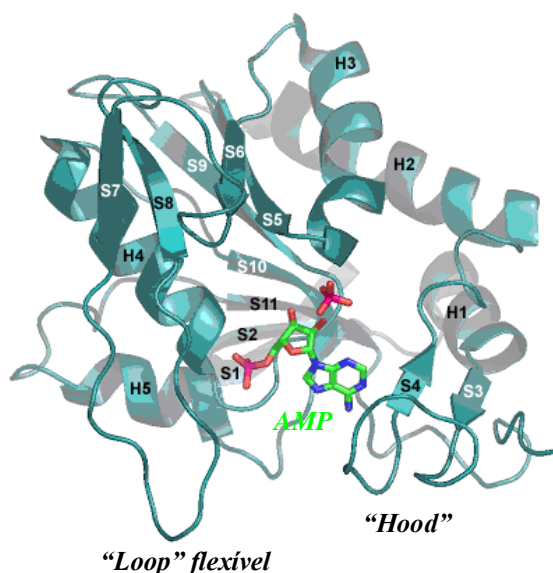


Figura 10 – Estrutura tridimensional do monômero da APRT de *Leishmania tarentolae* representada na forma de fitas. As fitas β estão identificadas com a letra S e as α hélices com a letra H. O *loop* flexível (S7 e S8), responsável por proteger os substratos do solvente, está na conformação aberta. É possível notar que o subdomínio *hood*, responsável pela especificidade pela purina, não está interagindo com o *loop* flexível²⁵.

Tabela 1 – Estruturas de fosforribosiltransferases (PRTases) disponíveis no Protein data bank (PDB)³⁵.

PRTase *	Organismo	Códigos de depósito no PDB
APRT	<i>Leishmania donovani</i>	1QB7, 1QCC, 1QB8 e 1QCD
	<i>Leishmania tarentolae</i>	1MZV
	<i>Giardia lamblia</i>	1L1Q e 1L1R
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1G2Q e 1G2P
	<i>Homo sapiens</i>	1ZN7, 1ZN8, 1ZN9 e 1ORE
XPRT	<i>Escherichia coli</i>	1NUL, 1A95, 1A96, 1A97 e 1A98
	<i>T. tengcongensis</i>	1YFZ
	<i>Bacillus subtilis</i>	1Y0B e 2FXV
HGXPRT	<i>Trichomonas foetus</i>	1HGX
	<i>Toxoplasma gondii</i>	1FSG, 1QK3, 1QK4, 1QK5 e 1DBR
	<i>Leishmania tarentolae</i>	1PZM
GPRT	<i>Giardia lamblia</i>	1DQN e 1DQP
HGPRT	<i>Homo sapiens</i>	1Z7G, 1BZY, 1HMP e 1D6N
	<i>Plasmodium falciparum</i>	1CJB
	<i>T. tengcongensis</i>	1R3U
HPRT	<i>Trypanosoma cruzi</i>	1TC1, 1TC2, 1I01, 1I13, 1I14, 1I0I, 1P17, 1P18 e 1P19
	<i>Escherichia coli</i>	1G9S, 1G9T e 1GRV
	<i>Salmonella typhimurium</i>	1J7J
OPRT	<i>Salmonella typhimurium</i>	1LH0, 1OPR e 1STO
	<i>Escherichia coli</i>	1ORO
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2AEE
UPRT	<i>Bacillus caldolyticus</i>	1I5E
	<i>Thermotoga maritima</i>	1O5O
	<i>Toxoplasma gondii</i>	1BD3, 1JLR, 1BD4, 1UPF, 1JLS e 1UPU
	<i>Thermus thermophilus</i>	1V9S
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	1XTT, 1XTV e 1XTU

* Adenina PRTase (APRT), Xantina PRTase (XPRT), Hipoxantina-guanina-xantina PRTase (HGXPRT), Guanina PRTase (GPRT), Hipoxantina-guanina PRTase (HGPRT), Hipoxantina PRTase (HPRT), Orotato PRTase (OPRT) e Uracil PRTase (UPRT).

Quanto as PRTases do tipo II, a Quinolinato fosforribosiltransferase (QPRT) de *Salmonella typhimurium* é a única representante do grupo com estrutura tridimensional conhecida. Esta enzima não apresenta um enovelamento de ligação ao PRPP característico e é

composta por uma mistura de domínios α/β na região N-terminal e um barril tipo α/β no domínio C-terminal^{31, 32}.

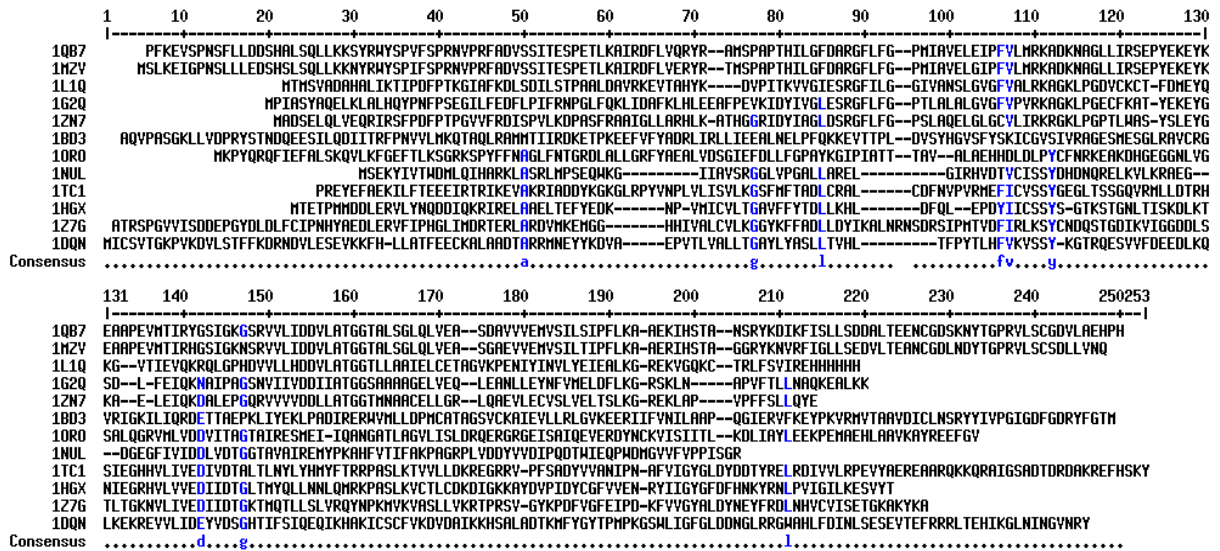


Figura 11 – Alinhamento das sequências primárias de representantes das PRTases com estrutura tridimensional elucidada. 1QB7 (APRT de *L. donovani*); 1M2V (APRT de *L. tarentolae*); 1L1Q (APRT de *G. lamblia*); 1G2Q (APRT de *S. cerevisiae*); 1Z7N (APRT de *H. sapiens*); 1BD3 (UPRT de *T. gondii*); 1OR0 (OPRT de *E. coli*); 1NUL (XPRT de *E. coli*); 1TC1 (HPRT de *T. cruzi*); 1HGX (HGXPRT de *T. foetus*); 1Z7G (HGPRT de *H. sapiens*); 1DQN (GPRT de *G. lamblia*). Alinhamento obtido com o programa MultAlin³⁶.

1.4 Adenina Fosforribosiltransferase (APRT)

A APRT (EC 2.4.2.7) de *Homo sapiens* (Figura 12), alvo de estudo deste trabalho, é uma PRTase do tipo I e catalisa a conversão de adenina e PRPP em AMP, através de uma reação dependente de um íon magnésio.

O gene para a APRT humana (hAPRT) foi identificado pertencendo ao cromossomo 16 lócus q24 (16q24.3), apresentando 2,8 kpb e contendo cinco éxons e quatro íntrons^{37, 38}. A massa molecular calculada da hAPRT é de 19,5 kDa por subunidade constituída por 180 resíduos e apresenta-se com oligomerização monodimérica. Essa enzima está amplamente

distribuída nos tecidos humanos e constitui o único mecanismo de recuperação de adenina livre resultante da via de biosíntese de poliaminas ou da dieta alimentar^{31, 32, 37}.



Figura 12 – Estrutura quaternária da APRT de *Homo sapiens* representada na forma de fitas.

O mecanismo da reação catalisada pela APRT não é totalmente conhecido, mas estudos cinéticos sugerem um mecanismo tipo pingue-pongue. A ligação do PRPP promoveria a formação de um intermediário enzima-ribosilfosfato e a posterior adição da adenina levaria a liberação do PP_i seguida pela liberação do AMP^{27, 39, 40}.

Para isso, foi proposto que o átomo de oxigênio da ribose do PRPP deve atacar o próton do nitrogênio (N9) da adenina levando a sua desprotonação. Posteriormente, este átomo do anel transfere diretamente o seu próton para o oxigênio do pirofosfato do PRPP que está ligado diretamente ao carbono C-1' da ribose. Esse ataque nucleofílico feito pela purina ao PRPP leva a liberação do PP_i e posterior liberação do AMP^{28, 29, 32}.

A estrutura tridimensional da hAPRT foi previamente descrita^{31, 32} com três diferentes situações de ocupação dos sítios ativos do homodímero: ambas subunidades ocupadas pelo

produto AMP (10RE e 1ZN8), uma subunidade ocupada por AMP e a outra vazia – hemi-apo (1ZN9) e com as duas subunidades ocupadas pelos substratos PRPP e adenina (1ZN7).

Quando comparadas com APRT de outros organismos de estruturas conhecidas, a hAPRT apresenta uma certa identidade de sequência e estrutura. A sequência da mesma possui 44,7% de identidade frente à APRT de *S. cerevisiae* (1G2P), 36,6% frente à de *G. lamblia* (1L1Q) e 27,5% frente à de *Leishmania* (1MZV e 1QB7)^{31,32}.

A descrição da estrutura da hAPRT mostra que a enzima é composta por nove fitas β e seis hélices α , podendo ser dividida em 3 regiões principais: domínio central (resíduos 33-169), *hood* (resíduos 5-34) e *loop* flexível (resíduos 95-113)^{31,32}.

O domínio central forma uma folha β com cinco fitas β paralelas (S3, resíduos 59-65; S4, resíduos 82-88; S7, resíduos 122-128; S8, resíduos 141-156 e S9, resíduos 171-176). Esse domínio, conservado em todas as PRTases do tipo I^{29, 33} é cercado por quatro hélices α identificadas como H3, H4, H5 e H6. As hélices H3 e H4 (resíduos 36-53 e 68-79, respectivamente) localizam-se em um dos lados da folha β enquanto as hélices H5 e H6 (resíduos 134-146 e 163-169, respectivamente) localizam-se do lado oposto. A região do *hood* contém duas hélices α (H1, resíduos 12-18 e H2, resíduos 30-35) e duas fitas β (S1, resíduos 13-17 e S2, resíduos 24-29). O *loop* flexível formado por duas fitas β antiparalelas (S5, resíduos 95-103 e S6, resíduos 106-113), está na conformação aberta em todas as estruturas da hAPRT elucidadas.

1.5 Deficiências na APRT – A 2,8-Dihidroxiadenina Urolitíase

A 2,8-Dihidroxiadenina Urolitíase (2,8-DHA Urolitíase) é uma doença resultante de uma desordem hereditária autossômica recessiva, que leva a deficiência de atividade da APRT. Com isso, a rota normal de reciclagem da adenina é impedida levando a seu acúmulo.

Esse excesso de adenina é então oxidado pela enzima xantina desidrogenase (XDH), formando a 2,8-DHA, via produção do intermediário 8-Hidroxiadenina (8-HA) (Figura 13). O composto 2,8-DHA possui baixa solubilidade, levando a formação de cristais e pedras nos rins e trato urinário e, conseqüentemente, a sérias deficiências renais^{37, 41}.

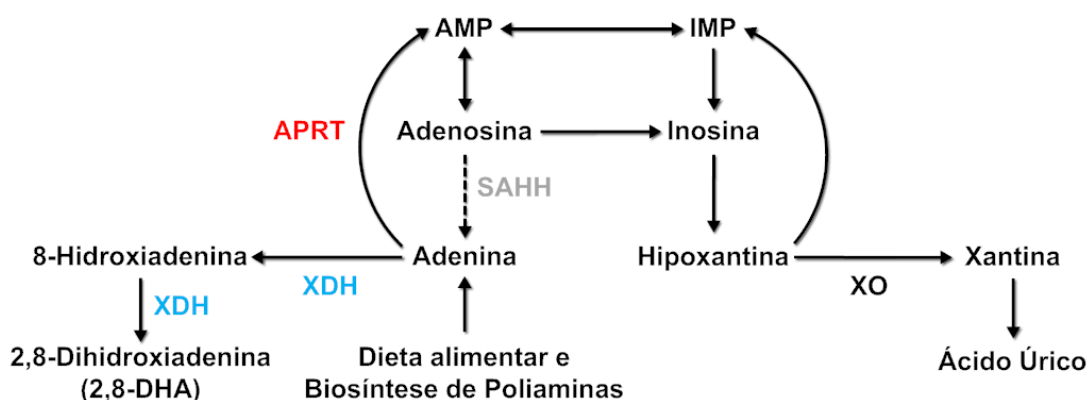


Figura 13 – Via metabólica da adenina em humanos. Na ausência de deficiência na atividade da APRT (em vermelho), a adenina é convertida pela mesma à AMP. Porém, quando há um acúmulo de adenina por insuficiência catalítica da APRT, seu excesso é convertido à 2,8-DHA pela enzima xantina desidrogenase (XDH, em azul) através do intermediário 8-Hidroxiadenina. XO – Xantina oxidase³⁷.

A 2,8-DHA Urolitíase foi inicialmente diagnosticada em crianças. Atualmente encontram-se descritos casos em indivíduos com faixa etária entre cinco meses a setenta e quatro anos, sendo 25,1 anos a idade média dos pacientes. Os sintomas clínicos são: cólicas renais, infecções no trato urinário e perda de sangue na urina. Essas manifestações clínicas são provenientes da formação de pedras e cristais de 2,8-DHA. Alguns indivíduos permanecem assintomáticos, enquanto outros desenvolvem a doença na forma mais grave chegando à falência renal.

Foram identificados dois tipos de deficiência na APRT relacionados à formação de 2,8-DHA, segundo o nível residual de atividade da enzima em lisados de eritrócitos. Nos pacientes pertencentes ao *tipo I*, não há atividade detectável da enzima. Esse grupo é

composto por pacientes de 19 países, sendo predominantes em caucasianos e com pequena ocorrência em japoneses⁴²⁻⁶⁴. O alelo mutante para esse tipo de deficiência é denominado APRT*Q0, sendo seus pacientes homocigotos ou heterocigotos para alelos inativos.

Já o *tipo II* da doença caracteriza-se por apresentar significativa atividade da APRT em lisados celulares, entre 10 a 25% da enzima normal em hemolisados, e aparenta ser exclusivo da população japonesa⁶⁵⁻⁷³. O alelo mutante que codifica esse tipo da doença é denominado APRT*J e caracterizado pela mutação M136T, sendo seus pacientes também homocigotos para o alelo M136T ou compõem heterocigose para M136T/alelo inativo. Em ambos os tipos da doença, a atividade da APRT não é detectável em células intactas ou funcionais *in vivo*.

As mutações responsáveis pela deficiência da APRT são devidas a substituições de base na sequência codificante do tipo *missense*⁷⁴ e *nonsense*⁷⁵, inserções⁷⁶ e deleções⁷⁷. Até o momento, foram encontradas dezoito diferentes mutações em pacientes, sendo quatro em japoneses e quatorze de outras nacionalidades. Dessas 18 mutações, apenas sete são do tipo *missense*, levando a produção de variantes da hAPRT com atividades catalíticas alteradas. A tabela 2 mostra a distribuição das mutações conforme a nacionalidade dos pacientes identificados³⁷.

O tratamento da 2,8-DHA Urolitíase inclui uma dieta com restrição de purinas e alta ingestão de líquidos. Além disso, a formação de 2,8-DHA pode ser controlada com a utilização de allopurinol, porém quantidades de 8-HA podem continuar sendo secretadas. A terapia com allopurinol não reduz o nível total de compostos de adenina excretados pelos pacientes, mas promove um rearranjo em suas proporções, aumentando a quantidade de adenina na urina. Como a adenina tem maior solubilidade frente a 8-HA e 2,8-DHA, o allopurinol previne a formação de cristais e pedras^{44, 50, 51, 60, 63}.

Tabela 2 – Mutações no *locus APRT* em pacientes japoneses e não japoneses³⁷.

País de origem	Mudança de base	Mudança de aminoácido	Localização	No. Alelo	Mutação
Hungria	A→G	M1V	Éxon 1	1	Códon de iniciação
	Deleção GGCCCCA		Éxon 3	2	<i>Frameshift</i> a partir de P93
Grécia	Inserção T		Éxon 2	Ambos	<i>Frameshift</i> a partir de I61
EUA	Inserção T		Éxon 2	1	<i>Frameshift</i> a partir de I61
	G→A	R67Q	Éxon 3	2	<i>Missense</i>
	Inserção T		Íntron 4	1	<i>Splice donor</i>
Islândia	A→T	D65V	Éxon 3	Ambos	<i>Missense</i>
Inglaterra	A→T	D65V	Éxon 3	Ambos	<i>Missense</i>
Paquistão	C→T	R87X	Éxon 3	Ambos	<i>Nonsense</i>
França	Deleção AC		Éxon 3	Ambos	<i>Frameshift</i> a partir de P95
Canadá	T→C	L110P	Éxon 4	Ambos	<i>Missense</i>
Bermuda	A→T	I112F	Éxon 4	1	<i>Missense</i>
	T→C	C153R	Éxon 5	2	<i>Missense</i>
Iraque	G→T		Íntron 4	Ambos	<i>Splice donor</i>
Bélgica	Deleção TTC	ΔF173	Éxon 5	1	Deleção tripla
	Inserção T		Íntron 4	2	<i>Splice donor</i>
Alemanha	Inserção T		Íntron 4	Ambos	<i>Splice donor</i>
Áustria	Inserção T		Íntron 4	Ambos	<i>Splice donor</i>
Austrália	G→A	R89Q	Éxon 3	1	<i>Missense</i>
	G→A	W98X	Éxon 3	Ambos	<i>Nonsense</i>
	C→T	A99A	Éxon 3	Ambos	Silenciosa
	G→A	W98X	Éxon 3	1	<i>Nonsense</i>
	C→T	A99A	Éxon 3	1	Silenciosa
	T→C	M136T	Éxon 5	2	<i>Missense</i>
	T→C	M136T	Éxon 5	Ambos	<i>Missense</i>
	Inserção CCGA		Éxon 3	1	<i>Frameshift</i> a partir de I86

Com isso, o presente trabalho dedica-se ao estudo de oito das dezoito mutações apresentadas: as sete mutações do tipo *missense* (R67Q, D65V, L110P, I112F, C153R, R89Q e M136T) e a deleção Δ F173 utilizando uma estratégia de inserir um resíduo de glicina como espaçador (F173G), uma vez que a proteína resultante desse gene deletado é insolúvel²⁵. A figura 14 mostra a distribuição dessas oito mutações na estrutura tridimensional da hAPRT.

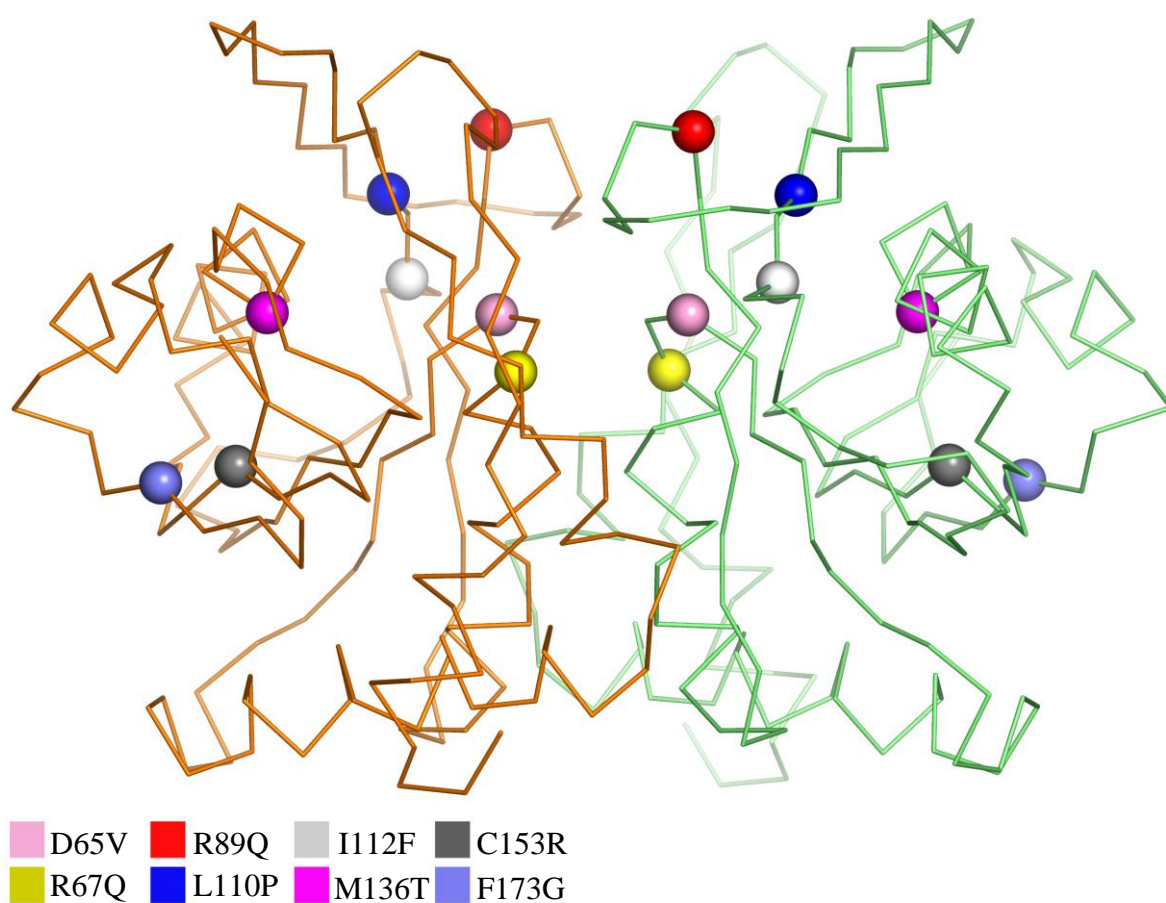


Figura 14 – Mapa das mutações da hAPRT estudadas.

Capítulo 2

Objetivos

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo o uso da hAPRT como modelo na caracterização funcional e estrutural de seus mutantes, para desvendar seu mecanismo catalítico e correlacionar os mutantes encontrados em pacientes com manifestações clínicas de urolitíase a essa deficiência.

Com isso, pretende-se complementar o quadro das mutagêneses sítio-dirigidas da hAPRT iniciadas e caracterizar os parâmetros cinéticos desses mutantes. Pretende-se também realizar ensaios de cristalização e análise estrutural dos mutantes a fim de identificar as alterações causadas pelas trocas de resíduos na enzima e correlacioná-las ao efeito sobre os parâmetros cinéticos e aspectos clínicos identificados para cada mutante.

Assim, os objetivos específicos do trabalho são:

- A. Mutagênese sítio-dirigida da hAPRT;
- B. Expressão e purificação de cada mutante;
- C. Determinação dos parâmetros cinéticos dos mutantes frente aos substratos adenina e PRPP;
- D. Desenvolvimento de ensaios de cristalização dos mutantes da enzima hAPRT;
- E. Coleta de dados cristalográficos e determinação da estrutura tridimensional dos mutantes.

Capítulo 3

Materiais *e* *Métodos*

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Mutagênese Sítio-dirigida

A mutagênese sítio-dirigida *in vitro* é uma técnica de grande valor para o estudo da relação estrutura-função de proteínas, expressão gênica e para realizar modificações em vetores. Existem várias metodologias descritas para a execução de mutações⁷⁸⁻⁸¹. Porém, esses métodos geralmente requerem DNA moldes fita simples e possuem execução complexa.

Assim, para a realização das mutações pontuais na hAPRT, utilizou-se da metodologia comercial “QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit” (Stratagene, #200518). Na figura 15 encontra-se esquematizado o procedimento utilizado.

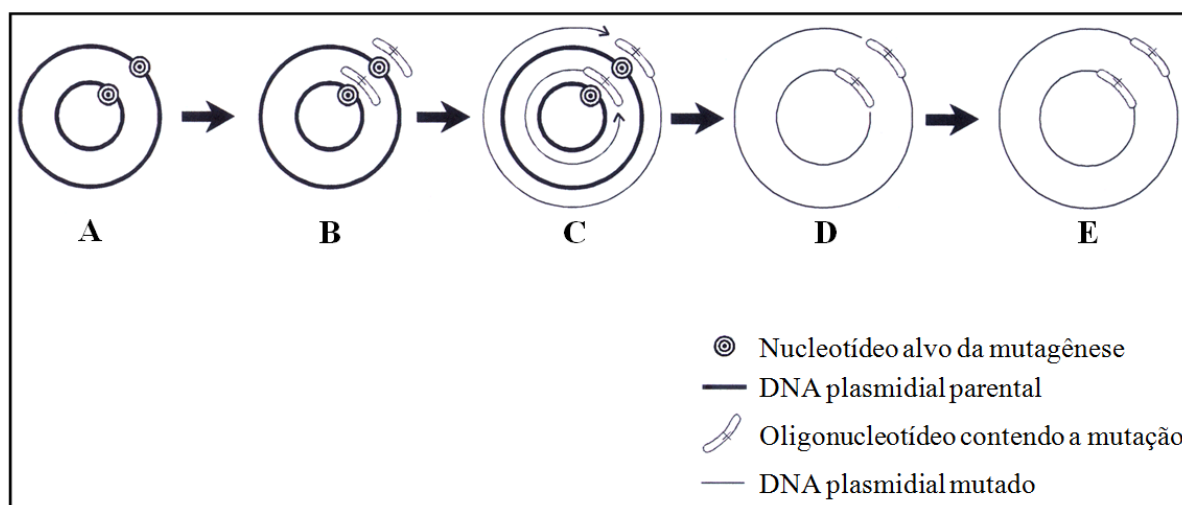


Figura 15 – Estratégia utilizada na mutagênese sítio-dirigida no gene da hAPRT. A sequência dos passos está indicada pelas setas. A – Construção do gene da hAPRT em pET-29a(+). B – PCR, desnaturação do vetor e anelamento com o oligonucleotídeo contendo a mutação. C – Amplificação do gene incorporando a mutação. D – Digestão do DNA parental. E – Transformação em células supercompetentes XL1-Blue para fechar o vetor.

Além disso, são necessários oligonucleotídeos contendo cada uma das mutações desejadas. Por isso, 8 pares de oligonucleotídeos foram desenhados e sintetizados (Figura 16).

<p>5'-catcgcaggcctag<u>tct</u>ccccgaggc-3' D65V-1 ctacatcgcaggcctag<u>act</u>ccccgaggcctt Bases do gatgtagcgtccggat<u>ctg</u>aggggctccgaa gene nativo 3'-gtagcgtccggat<u>cag</u>aggggctccg-5' D65V-2 Y I A G L <u>D</u> S R G F L 60 <u>V</u> 70</p>
<p>5'-gcaggcctagactccc<u>aagg</u>cttctctttgg-3' R67Q-1 atcgcaggcctagactccc<u>gagg</u>cttctctttggcc Bases do tagcgtccggatctgaggg<u>gct</u>ccgaaggagaaaccgg gene nativo 3'-cgtccggatctgaggg<u>ttc</u>gaaggagaaacc-5' R67Q-2 I A G L D S <u>R</u> G F L F G P <u>Q</u> 70</p>
<p>5'-gtgctcatccgaaagc<u>aagg</u>gaagctgccaggcc-3' R89Q-1 tgcgtgctcatccgaaagc<u>gggg</u>gaagctgccaggcccc Bases do acgcacgagtaggctttt<u>ccc</u>cccttcgacgggtccgggg gene nativo 3'-cacgagtaggctttt<u>ctt</u>cccttcgacgggtccgg-5' R89Q-2 C V L I R K <u>R</u> G K L P G P 85 <u>Q</u> 90 95</p>
<p>5'-gggaaggctgagc<u>ggg</u>agattcag-3' L110P-1 tacgggaaggctgagc<u>tgg</u>agattcagaa Bases do atgcccttcgactc<u>gac</u>ctctaagtctt gene nativo 3'-cccttcgactc<u>ggc</u>ctctaagtc-5' L110P-2 Y G K A E <u>L</u> E I Q K 105 <u>P</u></p>
<p>5'-gaaggctgagctggag<u>ttt</u>cagaaagacgccct-3' I112F-1 Cgggaaggctgagctggag<u>att</u>cagaaagacgccctgg Bases do Gcccttcgactcgacctc<u>taag</u>tctttctgctgggacc gene nativo 5'-cttcgactcgacctc<u>aaag</u>tctttctgctggga-5' I112F-2 G K A E L E <u>I</u> Q K D A L E <u>F</u> 115</p>
<p>5'-actggtggaaccac<u>gaa</u>cgcctgcc-3' M136T-1 gccactggtggaaccat<u>gaa</u>cgcctgcctg Bases do cggtgaccaccttgg<u>tac</u>ttgcgacggac gene nativo 3'-tgaccaccttgg<u>tg</u>cttgcgacgg-5' M136T-2 A T G G T <u>M</u> N A A C 135 <u>T</u> 140</p>
<p>5'-ggctgaggtcctggag<u>agg</u>gtgagcctggtggagc-3' C153R-1 gcaggctgaggtcctggag<u>tgc</u>gtgagcctggtggagctg Bases do cgtccgactccaggacctc<u>acg</u>cactcggaccacctcgac gene nativo 3'-ccgactccaggacctc<u>ccc</u>actcggaccacctcg-5' C153R-2 Q A E V L E <u>C</u> V S L V E L 150 <u>R</u> 155</p>
<p>5'-agctggcacctgtacc<u>gg</u>attctctctctcagta-3' F173G-1 agaagctggcacctgtacc<u>ttc</u>ttctctctcagtatg Bases do tcttcgaccgtggacatggg<u>aaq</u>aagagagaggacgtcatc gene nativo 3'-tcgaccgtggacatggg<u>cct</u>aagagagaggacgtcat-5' F173G-2 K L A P V P <u>F</u> F S L L Q Y E 170 <u>G</u> 175 180</p>

Figura 16 – Oligonucleotídeos utilizados nas mutações sítio-dirigidas realizadas com a hAPRT. Cada retângulo representa uma mutação. Em maiúsculo encontram-se as sequências de aminoácidos na região e em minúsculo, as de nucleotídeos. Em azul estão marcados os oligonucleotídeos utilizados. As mutações estão marcadas em vermelho. As sequências originais estão em preto. As trinças de bases alteradas estão sublinhadas. Os resíduos substituídos estão em rosa e os novos em verde.

Estes oligonucleotídeos foram previamente purificados em gel de poliacrilamida. Foram realizadas então as reações de mutagênese da seguinte maneira: cada reação continha 150 ng de ambos os oligonucleotídeos complementares, 50 ng de DNA pET-29a(+)/gene hAPRT, 2,5 U/ μ L de Pfu-turbo DNA polimerase (Stratagene), 5 nM de dNTPs e água q.s.p. 50 μ L. As mutações foram feitas em termociclador “GeneAMP 2400” (Perkin-Elmer CETUS) ajustado para 1 minuto de desnaturação a 95°C, seguido por 12 ciclos de desnaturações a 95°C por 0,5 minutos, intercalados por períodos de anelamentos a 55°C por 1 minuto e períodos de extensão de 6 minutos a 68°C. Ao final do décimo segundo ciclo a reação foi mantida por 10 minutos a 68°C e posteriormente resfriada a 4°C.

O produto da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi digerido com a enzima *Dpn I* (Stratagene) para eliminação do DNA parental. Na digestão foram utilizados 10 μ L do produto da PCR e 1 μ L de enzima a 10 U/ μ L, cautelosamente homogeneizados, e mantidos em repouso a 37°C por 1 hora. O DNA linear foi introduzido em bactéria competente XL1-Blue (Stratagene). Foram utilizados 50 μ L de células competentes descongeladas cuidadosamente em banho de gelo e 5 μ L do DNA produzido pela PCR. A mistura foi cautelosamente homogeneizada com pipetador e deixada em repouso por 30 minutos no gelo. Após esse tempo foi realizado choque térmico (75 segundos a 42°C e 3 minutos no gelo) seguido do acréscimo de 450 μ L de meio de cultura SOC (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glicose, pH 7,0), previamente aquecido a 37°C. As células cresceram por 1 hora sob agitação de 225 rpm. Parte da cultura (50 μ L) foi transferida para placa de Petri contendo 25 mL de meio de cultura LB sólido (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 200 mM NaCl, 1,5% agar, pH 7,0), suplementado com tetraciclina (5 μ g/mL) e canamicina (30 μ g/mL). A placa assim preparada foi mantida a 37°C por 24 horas. Clones de cada uma das mutações foram analisados em sequenciador tipo ABI377 DNA. Na amplificação do gene hAPRT foram utilizados os oligonucleotídeos T7

“forward” e T7 “reverse”, indicados para o sequenciamento de genes clonados em vetor pET. As sequências obtidas foram analisadas com o programa Generun, e comparadas à sequência parental com o programa Multalin³⁶.

Os mutantes selecionados pelo sequenciamento foram introduzidos, por choque térmico, em bactérias competentes *Escherichia coli* BL21 (DE3) (*ompT*⁸*lon*⁹ *dcm*⁻¹⁷). A designação DE3 significa que a linhagem contém o lisogênio lambda DE3 que carrega o gene para a T7 RNA Polimerase sob o controle do promotor *lacUV5*. O IPTG (Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo – Invitrogen) torna-se necessário para induzir a expressão da T7 RNA Polimerase.

Para tanto, foram incubados 5 μL do plasmídeo pET-29a(+)/gene hAPRT-mutado em 50 μL de célula. A seleção dos clones foi feita em placas de Petri com 20 mL de meio LB sólido suplementado com canamicina a 30 μg/mL (concentração final).

3.2 Expressão da Enzima hAPRT

Para a expressão da hAPRT recombinante e de seus mutantes, uma única colônia de *E. coli* BL21(DE3), contendo a respectiva construção gênica, foi cultivada em 5 mL de meio LB líquido (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 200 mM NaCl, pH 7,0 – pré-inóculo) a 37°C, acrescido de 30 μg/mL de canamicina e mantido sob agitação constante de 250 rpm por aproximadamente 16 horas. O pré-inóculo foi utilizado para inocular 500 mL de meio 2xYT (1,6% triptona, 1% extrato de levedura, 100 mM NaCl, pH 7,0) contendo canamicina em concentração final de 30 μg/mL. As condições de crescimento bacteriano foram às mesmas utilizadas no pré-inóculo. Ao atingir a densidade ótica de 0,6 (D.O._{600 nm} = 0,6), a cultura foi induzida a produzir a proteína alvo pela adição de 50 μM, concentração final, de IPTG. O crescimento da cultura induzida foi mantido por aproximadamente 20 horas nas condições

previamente descritas. Após esse tempo, centrifugou-se o inóculo a 6.000 rpm, por 15 minutos a 4°C e, em seguida, descartou-se o sobrenadante.

O precipitado (“*pellet*”) resultante da indução foi ressuspenso em 10 mL de tampão A (20 mM fosfato de sódio, pH 7,4). As células foram rompidas através de oito ciclos de congelamento em N₂ líquido e descongelamento a 42 °C. Adicionou-se ao extrato 16 µL de MgCl₂ 5M e 3 µL de Deoxyribonuclease I (Invitrogen) e incubou-se a temperatura ambiente por 30 minutos. O lisado foi clarificado por centrifugação a 18.000 rpm por 60 minutos a 4°C. A fração solúvel teve seu volume completado para 50 mL com tampão A.

3.3 Purificação da Enzima hAPRT

Para a purificação da hAPRT, adotou-se a utilização de um método cromatográfico em meio líquido de alta performance utilizando uma coluna de CHTTM Hidroxiapatita Cerâmica (Bio-Rad) de fórmula Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂⁸². Os grupos funcionais são: pares de íons de cálcio cristalinos positivamente carregados (sítio C), e conjuntos de seis átomos de oxigênio negativamente carregados associado com trincas de fosfatos cristalinos (sítios P). Estes grupos são distribuídos em padrões fixos na superfície do cristal⁸².

O mecanismo de interação hidroxiapatita-proteína é bastante complexo. Interações eletrostáticas ocorrem entre os íons positivamente carregados de cálcio e negativamente carregados dos grupos fosfato com a superfície de biomoléculas. Os grupos amino de proteínas são atraídos pelo sítio P mas repelidos pelo sítio C, já para grupos carboxílicos as interações se invertem (Figura 17)⁸³.

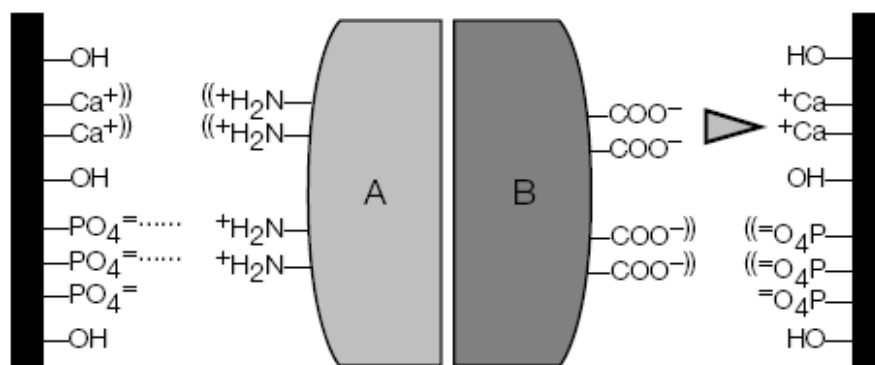


Figura 17 – Esquema de interação entre proteína e hidróxiapatita. A é uma proteína básica e B, ácida. Os parênteses duplos indicam repulsão, as linhas pontilhadas ligações iônicas e o triângulo ligação por coordenação⁸³.

Efeitos repulsivos e a distribuição geométrica de cargas da Hidróxiapatita conferem seletividade única. Tipicamente, proteínas ácidas, básicas e neutras ligam-se a hidróxiapatita usando um tampão fosfato de baixa força iônica. A eluição ocorre em um gradiente de tampão fosfato onde a força iônica é aumentada. Em geral, a hidróxiapatita apresenta grande afinidade por proteínas de pI alto e baixa afinidade por proteínas de pI baixo. Assim, as proteínas tendem a separarem-se de acordo com seu ponto isoelétrico, proteínas mais ácidas eluem mais cedo ou não se ligam completamente e proteínas básicas e neutras eluem mais tarde.

Com base nestes critérios, a fração solúvel foi aplicada em alíquotas de 25 mL em coluna de 25 mL de hidróxiapatita, previamente equilibrada com tampão A, acoplada ao sistema automatizado de cromatografia líquida de alta performance ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Sciences).

A coluna foi inicialmente lavada com 150 mL de tampão A mantendo-se o fluxo de 2,0 mL/min a temperatura ambiente. A hAPRT não se liga a coluna, eluindo já na lavagem. Assim, a retirada das outras proteínas que permaneceram ligadas à coluna foi realizada em outro passo de lavagem feito com tampão B (200 mM fosfato de sódio, pH 7,4). Frações de 2 mL foram coletadas durante a purificação e as frações correspondentes à proteína foram acompanhadas em gel de eletroforese (15% SDS-PAGE).

3.3.1 Troca do Tampão da hAPRT para Realização dos Ensaios Cinéticos

Uma vez que a hAPRT possui regiões de interação ao PRPP, composto que possui 3 grupos fosfato, resolveu-se realizar uma troca de tampão para eliminar a possibilidade de interferência do tampão fosfato. Para isso, a proteína purificada foi submetida à cromatografia de filtração em gel em coluna de *Desalting*, composta pela matriz SephadexTM G-25 (GE Healthcare Life Sciences).

Esta técnica separa moléculas baseada em tamanho. Em um passo único, a amostra tem seu tampão trocado e materiais de baixo peso molecular, como sais indesejados, são removidos. Volumes de amostra de até 30% do volume da coluna podem ser aplicados para separação com máxima resolução e mínima diluição.

Para isto, a proteína purificada foi aplicada em alíquotas de 15 mL em coluna de *Desalting* de 50 mL, previamente equilibrada com tampão TEA (100 mM Trietanolamina, pH 7,4), acoplada ao sistema automatizado de cromatografia líquida de alta performance ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Sciences).

Realizou-se uma eluição isocrática com 80 mL de tampão TEA mantendo-se o fluxo de 2,0 mL/min a temperatura ambiente. Frações de 5 mL foram coletadas durante a purificação e as frações correspondentes à proteína foram acompanhadas em gel de eletroforese (15% SDS-PAGE).

As frações que continham a enzima foram reunidas e sua concentração foi determinada pelo método de Bradford⁸⁴. Assim, após a concentração ser ajustada para o valor desejado para o experimento, a hAPRT pôde ser submetida aos ensaios cinéticos.

3.4 Caracterização Cinética da hAPRT

3.4.1 Ensaio Enzimático Espectrofotométrico da hAPRT

Este ensaio baseia-se em adaptações do protocolo descrito por Tuttle & Krenitsky⁸⁵, onde a taxa de mudança na absorbância resultante da conversão da adenina e PRPP em AMP foi monitorada espectrofotometricamente em cubeta de quartzo a 25°C. O volume final de reação utilizado foi 500 µL. Os experimentos foram iniciados pela adição de 20 nM e 50 nM de hAPRT e monitorado a 259 nm por 60 segundos. Para estes testes iniciais a concentração de adenina foi mantida em 100 µM e a concentração de PRPP em 25 µM. Utilizou-se também 5 mM de MgCl₂ e 100 mM TEA.

3.4.2 Testes de Precipitação com LaCl₃

Com o objetivo de eliminar a interferência resultante da sobreposição dos espectros de absorção molecular dos reagentes e produtos, resolveu-se buscar novas possibilidades para o ensaio enzimático da hAPRT. Alguns ensaios baseados em metodologias radioativas encontram-se descritos na literatura^{40, 86-88}, mas nenhum deles mostrou a agilidade de execução necessária para a caracterização da cinética enzimática de todos os mutantes.

Entretanto, uma modificação de um destes ensaios descrita por Johnson *et al.*⁸⁹, mostrou-se bastante conveniente para o tipo de análise que se deseja realizar com a hAPRT e seus mutantes. Este método baseia-se na precipitação do PRPP restante e AMP formado através de sua complexação com um sal de metal pesado, no caso, o cloreto de lantânio (LaCl₃) e a medida da taxa de mudança na absorbância resultante do consumo de adenina.

Baseado nestas informações, foi proposta a adaptação deste método para atender as necessidades apresentadas para os ensaios deste projeto. Assim, o primeiro passo realizado no estabelecimento desta nova metodologia, foi testar sua viabilidade com ensaios de precipitação dos compostos frente ao LaCl_3 .

Para isso, as seguintes misturas teste com volume final de 50 μL foram realizadas:

- Teste do AMP:
 - 100 mM tampão TEA;
 - 0,5 mg/mL Albumina de soro bovino (BSA);
 - 5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM AMP.

- Teste do PRPP:
 - 100 mM tampão TEA;
 - 0,5 mg/mL Albumina de soro bovino (BSA);
 - 5 μM , 250 μM e 500 μM PRPP.

- Teste do AMP + Adenina:
 - 100 mM tampão TEA;
 - 0,5 mg/mL Albumina de soro bovino (BSA);
 - 5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM AMP;
 - 5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM Adenina.

- Teste do AMP + Adenina + PRPP:
 - 100 mM tampão TEA;
 - 0,5 mg/mL Albumina de soro bovino (BSA);
 - 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M e 500 μ M AMP;
 - 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M e 500 μ M Adenina;
 - 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M e 500 μ M PRPP.
- Branco para os testes:
 - 100 mM tampão TEA;
 - 0,5 mg/mL Albumina de soro bovino (BSA).

Na figura 18, encontra-se esquematizado o procedimento para a precipitação das misturas teste.

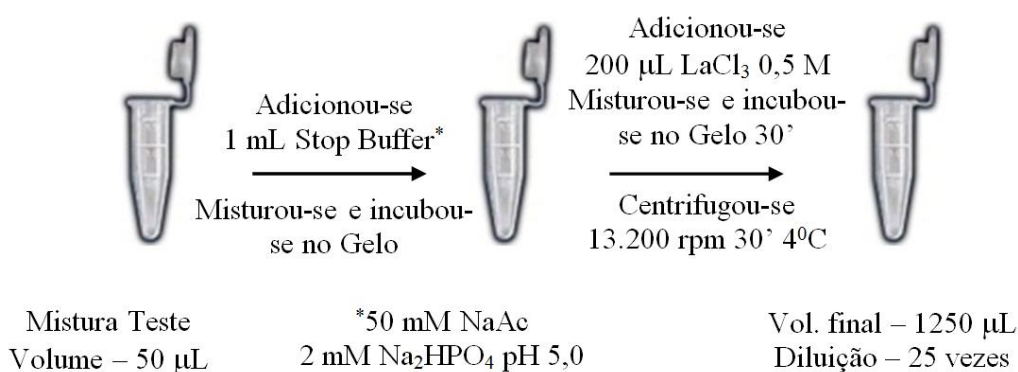


Figura 18 – Procedimento de precipitação com LaCl_3 . Cada uma das misturas teste foi precipitada. O branco também foi submetido ao processo de precipitação.

Após a precipitação e centrifugação, o sobrenadante resultante foi analisado por espectrometria de absorção molecular na faixa de 230 a 290 nm. Espectros dos 3 compostos (adenina, AMP e PRPP) na concentração de 200 μ M e na presença de tampão TEA 100 mM também foram obtidos para comparação.

3.4.3 Ensaio Enzimático da hAPRT Através da Precipitação com LaCl_3

Uma vez verificada a eficiência da precipitação do AMP e PRPP com LaCl_3 e a não interferência na determinação da adenina em solução, realizou-se uma primeira varredura com a enzima hAPRT nativa para validar a metodologia. Assim, ensaios para determinação das constantes de afinidade frente à adenina e ao PRPP foram realizados da seguinte maneira.

Para a caracterização da afinidade frente à adenina, a concentração de PRPP foi mantida constante em $50 \mu\text{M}$; variando-se a concentração de adenina entre $0,78 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$ e vice-versa. O volume final de reação utilizado foi $500 \mu\text{L}$. A reação foi iniciada pela adição de 20 nM de hAPRT e mantida a 37°C por um minuto. Alíquotas de $50 \mu\text{L}$ foram retiradas a cada 15 segundos e submetidas ao processo de precipitação com LaCl_3 . Na figura 19, encontra-se esquematizado o procedimento para o ensaio.

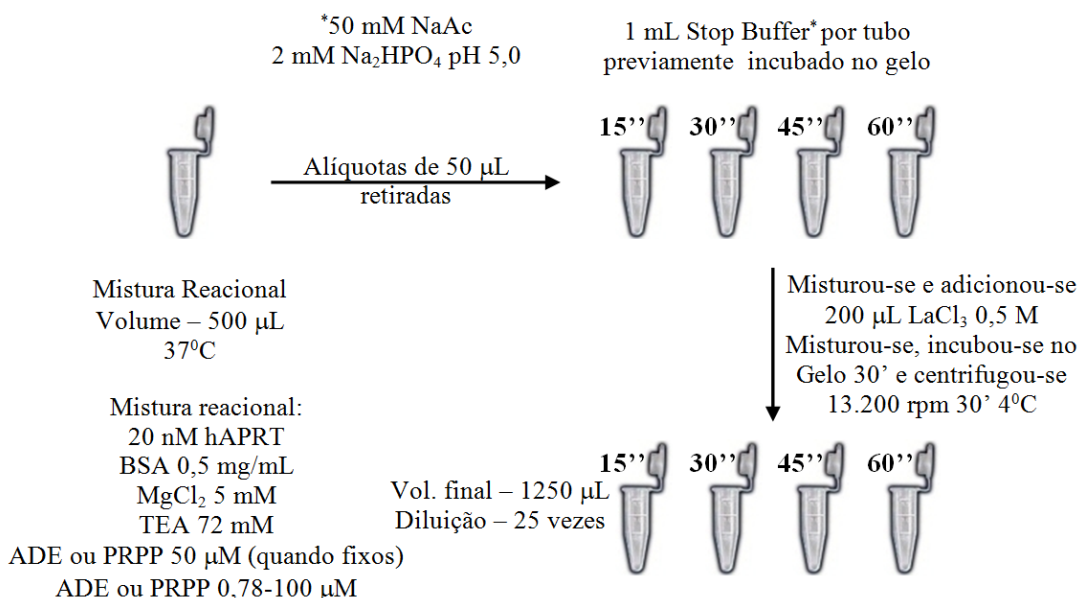


Figura 19 – Procedimento para o ensaio enzimático da hAPRT e posterior precipitação com LaCl_3 . Cada uma das alíquotas foi precipitada. O branco também foi submetido ao processo de precipitação.

Após a precipitação e centrifugação, o sobrenadante resultante foi analisado por espectrometria de absorção molecular na faixa de 230 a 290 nm. O branco para o ensaio teve a mesma composição da mistura reacional, trocando-se apenas a adenina e o PRPP por água, enquanto que o ponto inicial também teve a mesma composição da mistura, trocando-se apenas a enzima por água.

Assim, gráficos utilizando a absorbância no comprimento de onda máximo de absorção da adenina ($\lambda = 260,5$ nm) em função do tempo de reação foram confeccionados para obter a taxa de conversão de adenina a AMP pela enzima.

3.4.4 Testes de Eficiência da Precipitação com LaCl_3 para Diminuir a Diluição da Reação

Para tentar melhorar a relação sinal-ruído das medidas a baixas concentrações, resolveu-se testar a eficiência da precipitação comparando as condições inicialmente estabelecidas com testes reduzindo pela metade o volume de *stop buffer* e LaCl_3

Para isso, a seguinte mistura teste, em duplicata, com volume final de 50 μL foi realizada:

- Mistura Teste:
 - 60 mM tampão TEA;
 - 0,5 mg/mL Albumina de soro bovino (BSA);
 - 5 mM MgCl_2 ;
 - 0,78 μM , 1,56 μM , 3,13 μM , 6,25 μM , e 100 μM AMP;
 - 0,78 μM , 1,56 μM , 3,13 μM , 6,25 μM , e 100 μM Adenina;
 - 0,78 μM , 1,56 μM , 3,13 μM , 6,25 μM , e 100 μM PRPP.

- Branco para os testes:
 - 90 mM tampão TEA;
 - 5 mM $MgCl_2$;
 - 0,5 mg/mL Albumina de soro bovino (BSA).

Na figura 20, encontra-se esquematizado o procedimento para a precipitação das misturas teste.

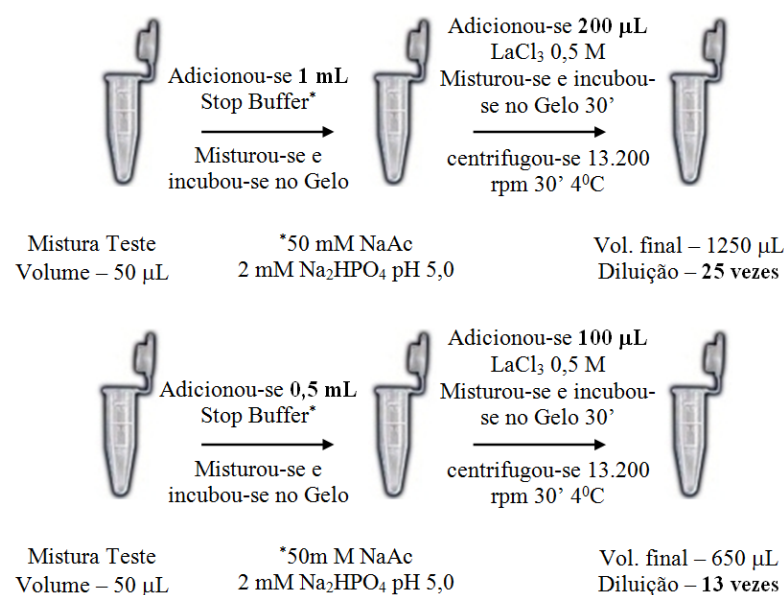


Figura 20 – Procedimento de precipitação com $LaCl_3$ para verificar sua eficiência. Cada uma das misturas teste foram precipitadas nas condições inicialmente estabelecidas e reduzindo a metade o volume das soluções de precipitação. O branco também foi submetido ao processo de precipitação.

Após a precipitação e centrifugação, o sobrenadante resultante foi analisado por espectrometria de absorção molecular na faixa de 230 a 290 nm.

3.4.5 Ensaio Enzimático da hAPRT Através da Precipitação com $LaCl_3$ (Menor Diluição)

Após a obtenção de uma nova condição de precipitação utilizando uma menor diluição, realizaram-se ensaios para determinação das constantes de afinidade da enzima.

Para a caracterização da afinidade frente à adenina, a concentração de PRPP foi mantida constante em 50 μM ; variando-se a concentração de adenina entre 0,78 μM a 50 μM e vice-versa. O volume final de reação utilizado foi 500 μL . A reação foi iniciada sempre pela adição do PRPP e mantida a 37°C por um minuto. Alíquotas de 50 μL foram retiradas a cada 15 segundos e submetidas ao processo de precipitação com LaCl_3 . Na figura 21, encontra-se esquematizado o procedimento para o ensaio.

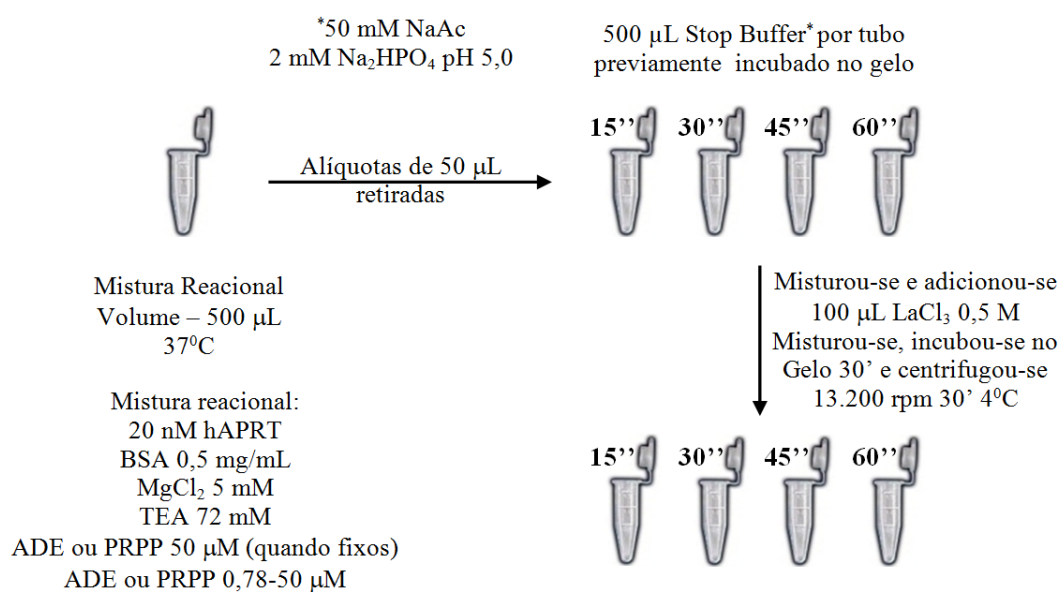


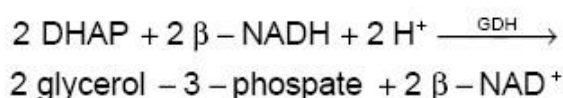
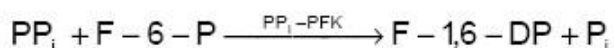
Figura 21 – Procedimento para o ensaio enzimático da hAPRT e posterior precipitação com LaCl_3 com menor fator de diluição. Cada uma das alíquotas foi precipitada. O branco também foi submetido ao processo de precipitação.

Após a precipitação e centrifugação, o sobrenadante resultante foi analisado por espectrometria de absorção molecular na faixa de 230 a 290 nm. O branco para o ensaio teve a mesma composição da mistura reacional, trocando-se apenas a adenina e o PRPP por água, enquanto que o ponto inicial também teve a mesma composição da mistura, trocando-se apenas a enzima por água.

Assim, gráficos utilizando a absorvância no comprimento de onda máximo de absorção da adenina ($\lambda = 260,5 \text{ nm}$) em função do tempo de reação foram confeccionados para obter a taxa de conversão de adenina a AMP pela enzima.

3.4.6 Ensaio Enzimático Acoplado para Caracterização Cinética da hAPRT

Uma vez que não foi possível utilizar um ensaio enzimático direto para a caracterização cinética da hAPRT e de seu mutantes, utilizou-se um ensaio acoplado comercial para detectar a formação de PPI (Enzymatic Determination of Pyrophosphate – Sigma #P7275). Este reagente é composto pelas seguintes reações enzimáticas:



onde:

PPi = Pirofosfato;

F-6-P = D-Frutose-6-fosfato;

PPi-PFK = Frutose-6-fosfato quinase, pirofosfato dependente;

F-1,6-DP = D-Frutose-1,6-difosfato;

Pi = Fosfato inorgânico;

GAP = D-Gliceraldeído-3-fosfato;

TPI = Triosefosfato isomerase;

DHAP = Dihidroxiacetona fosfato;

GDH = Glicerofosfato dehidrogenase;

β -NADH = β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida);

β -NAD⁺ = β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada).

Assim, o consumo de β -NADH é monitorado espectrofotometricamente a 340 nm ao longo do tempo. A cada 2 mols de β -NADH consumidos, 1 mol de PPI é consumido.

Para a caracterização da afinidade frente à adenina, a concentração de PRPP foi mantida constante em 250 μM ; variando-se a concentração de adenina entre 0,39 μM e 50 μM . Para a caracterização da afinidade frente ao PRPP, a concentração de adenina foi mantida constante em 50 μM ; variando-se a concentração de PRPP entre 0,39 μM e 250 μM . Além disso, utilizou-se 20 nM de enzima purificada, 100 mM de TEA, 0,5 mg/mL de BSA e 5 mM de MgCl_2 . O volume de reagente utilizado foi de 167 μL e o volume final de reação utilizado foi 500 μL . A reação foi iniciada sempre pela adição do PRPP e mantida a 25°C. A absorbância foi monitorada a 340 nM por 60 segundos. A medida do “branco” foi realizada da mesma maneira que a reação, porém na ausência de adenina e PRPP.

Assim, os dados experimentais coletados foram analisados graficamente com o módulo de cinética enzimática disponível no programa SIGMAPLOT versão 11.0. De posse destes gráficos, pode-se obter as constantes cinéticas para a hAPRT utilizando o modelo descrito por Michaelis-Menten.

3.5 Análise da Conservação Evolutiva dos Resíduos Mutados na hAPRT

O grau com que cada posição de aminoácidos na estrutura de uma proteína é conservada evolutivamente é fortemente relacionado com sua importância estrutural e funcional. Com isso, análise da conservação de um certo resíduo entre membros de uma mesma família pode oferecer informações sobre a importância do mesmo.

Assim, cada uma das oito mutações estudadas foram analisadas utilizando o servidor CONSURF⁹⁰. O grau de conservação obtido para cada posição é o inverso de sua taxa evolucionária. Os resultados foram analisados utilizando o programa PYMOL⁹¹.

3.6 Ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS)

DLS é considerada uma das técnicas mais úteis no ensaio de condições de cristalização de proteínas. O DLS mede a intensidade da luz espalhada por moléculas em solução, ou seja, mede o coeficiente de difusão translacional dessas moléculas, relacionado ao raio hidrodinâmico da mesma. O fenômeno do espalhamento de luz é interessante no processo de investigação da massa molecular e da homogeneidade das macromoléculas. Perfis de DLS podem prever a “cristabilidade” de uma preparação de proteínas, indicando a homogeneidade da amostra e a presença ou ausência de agregados.

As preparações de proteína são analisadas com o objetivo de estimar sua massa molecular e verificar a presença de agregados e contaminantes antes de realizar os ensaios de cristalização. Para tanto, a amostra foi centrifugada a 4°C a 13.000 rpm por 15 minutos e aplicada no equipamento “ProteinSolutions DynaPro dp-801” (Protein Solutions).

3.7 Cristalização, Coleta de Dados de Difração de Raios X, Elucidação e Refinamento da Enzima hAPRT

A cristalografia de proteínas tem oferecido uma poderosa ferramenta para elucidação detalhada da estrutura das proteínas e vem assumindo um papel importante no estudo de vários problemas biológicos. A cristalografia permite o estudo da estrutura tridimensional de moléculas através da realização de experimentos de difração de raios X. A difração de raios X é a técnica mais utilizada para se estudar a estrutura atômica de uma proteína.

A determinação da estrutura tridimensional de uma proteína por difração de raios X constitui-se de um processo trabalhoso, que tem como etapa crítica à obtenção de um mono cristal de proteína.

Para obtenção de um cristal de proteína existem vários métodos, entre eles o método de Difusão de Vapor, no qual duas soluções tendem ao equilíbrio pela difusão do vapor de água. Neste método a técnica mais utilizada é a da Gota Suspensa⁹² (Figura 22) no qual a gota da solução de proteína mais agente precipitante é exposta gradualmente à saturação pela perda de água da gota para o largo reservatório que contém a solução precipitante, dessa maneira possibilitando o arranjo das moléculas de forma ordenada originando o cristal.

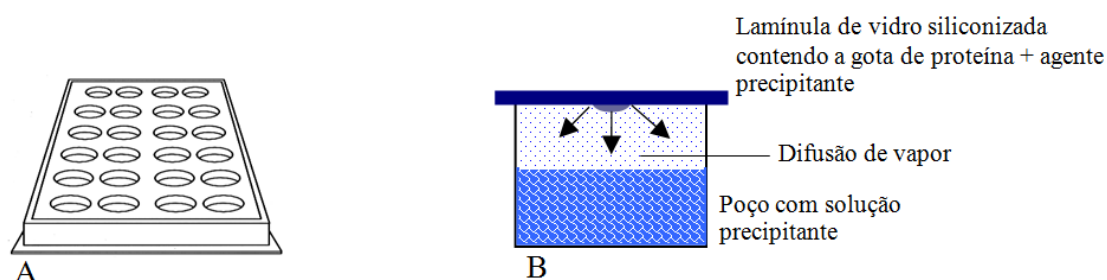


Figura 22 – Esquema do método de cristalização usando a técnica da gota suspensa. A – Modelo da caixa de cristalização. B – Modelo de um poço de cristalização.

As condições de cristalização da hAPRT foram estabelecida anteriormente por Silva *et al*³². Eles determinaram que a hAPRT cristaliza nas condições 22 (25,5% PEG 4000, 0,085 M Tris HCl pH 8,5, 0,17 M de acetato de sódio e 15% glicerol), 28 (25,5% PEG 8000, 0,085 M cacodilato de sódio pH 6,5, 0,17 M de acetato de sódio e 15% glicerol) e 35 (0,6 M fosfato de sódio, 0,6 M fosfato de potássio, 0,075 M HEPES-Na pH 7,5, e 25% glicerol) do fatorial Cryo (Hampton Research).

Desta forma, foram executados ensaios de cristalização com os mutantes a 18°C realizando uma varredura nas proximidades da condição 22 do fatorial Cryo (Hampton

Research), variando a concentração do agente precipitante e do sal. As concentrações de enzima utilizadas foram: 8 mg/mL, 5mg/mL e 3 mg/mL.

Assim, foi montado o seguinte fatorial a 18⁰C para cada um dos mutantes:

- Condição 01: 22,5 % PEG 4000, 0,16 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 02: 23,5 % PEG 4000, 0,16 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 03: 24,5 % PEG 4000, 0,16 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 04: 25,5 % PEG 4000, 0,16 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 05: 26,5 % PEG 4000, 0,16 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 06: 27,5 % PEG 4000, 0,16 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 07: 28,5 % PEG 4000, 0,16 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 08: 22,5 % PEG 4000, 0,17 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 09: 23,5 % PEG 4000, 0,17 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 10: 24,5 % PEG 4000, 0,17 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 11: 25,5 % PEG 4000, 0,17 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 12: 26,5 % PEG 4000, 0,17 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 13: 27,5 % PEG 4000, 0,17M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 14: 28,5 % PEG 4000, 0,17 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 15: 22,5 % PEG 4000, 0,18 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 16: 23,5 % PEG 4000, 0,18 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 17: 24,5 % PEG 4000, 0,18 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 18: 25,5 % PEG 4000, 0,18 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 19: 26,5 % PEG 4000, 0,18 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 20: 27,5 % PEG 4000, 0,18 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 21: 28,5 % PEG 4000, 0,18 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;

- Condição 22: 22,5 % PEG 4000, 0,19 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 23: 23,5 % PEG 4000, 0,19 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 24: 24,5 % PEG 4000, 0,19 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 25: 25,5 % PEG 4000, 0,19 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 26: 26,5 % PEG 4000, 0,19 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 27: 27,5 % PEG 4000, 0,19 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5;
- Condição 28: 28,5 % PEG 4000, 0,19 M NaAc, 0,085 M Tris-HCl pH 8,5.

A coleta de dados de difração de raios X dos cristais obtidos foram realizadas na linha de Cristalografia de Macromoléculas 2 (MX-2) no Laboratório Nacional de Luz de Síncrotron (LNLS). O detector utilizado foi do tipo CCD, modelo MarMosaic 225 (MAR Research). Um cristal obtido foi retirado da gota com uma alça de nylon (Hampton Research) e rapidamente congelado em nitrogênio a 100 K (Oxford Cryosystems). O método utilizado para as coletas de dados foi de rotação-oscilação, onde o cristal sofre pequenas e sucessivas oscilações em torno do eixo perpendicular à direção do feixe de raios X incidentes.

Para a redução dos dados foram utilizados os programas MOSFLM⁹³ e SCALA⁹⁴. A resolução das estruturas foi feita através do método de substituição molecular utilizando o programa PHASER⁹⁵. Após a obtenção das fases iniciais, os modelos foram refinados através do programa PHENIX⁹⁶. Após cada ciclo do refinamento o modelo foi inspecionado visualmente com o programa gráfico COOT⁹⁷. Ajustes manuais no modelo foram feitos com base em mapas de densidade eletrônica tipo Fo-Fc e 2 Fo-Fc (α_c) calculados segundo formalismo de Fourier. As moléculas de água foram incorporadas ao modelo com o programa COOT. Os modelos estruturais obtidos foram interpretados utilizando o programa PYMOL⁹¹.

Capítulo 4

Resultados *e* *Discussões*

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Mutagênese Sítio-dirigida

As construções dos mutantes D65V, L110P e M136T em vetor pET-29a(+) transformadas em *Escherichia coli* BL21 (DE3) foram obtidas pelo Dr. Márcio Silva^{25, 32} e gentilmente cedidas para realização deste trabalho. Além disso, clones das construções R67Q, R89Q, I112F e F173G foram obtidos conforme protocolo descrito no item 3.1. Já a mutação C153R não foi obtida com sucesso, mesmo após inúmeras tentativas de obtenção do clone. Os resultados dos sequenciamentos dos clones que efetivamente incorporaram as mutações estão representados nas figuras 23-26. Nos casos em que houve ambiguidade na interpretação do alinhamento, fora realizadas inspeções nos eletroferogramas.

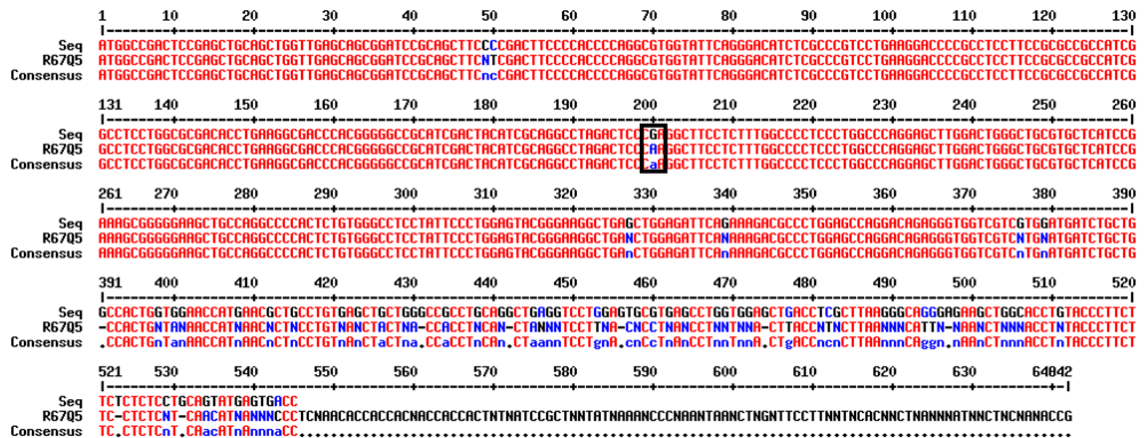


Figura 23 – Alinhamento da sequência do gene nativo da hAPRT com a sequência nucleotídica do mutante R67Q. A sigla Seq representa o gene nativo e R67Q5, o mutante. O retângulo preto indica a região de incorporação da mutação. Com esta mutação, a proteína mutante terá um resíduo de Glutamina na posição correspondente a uma Arginina na sequência nativa.

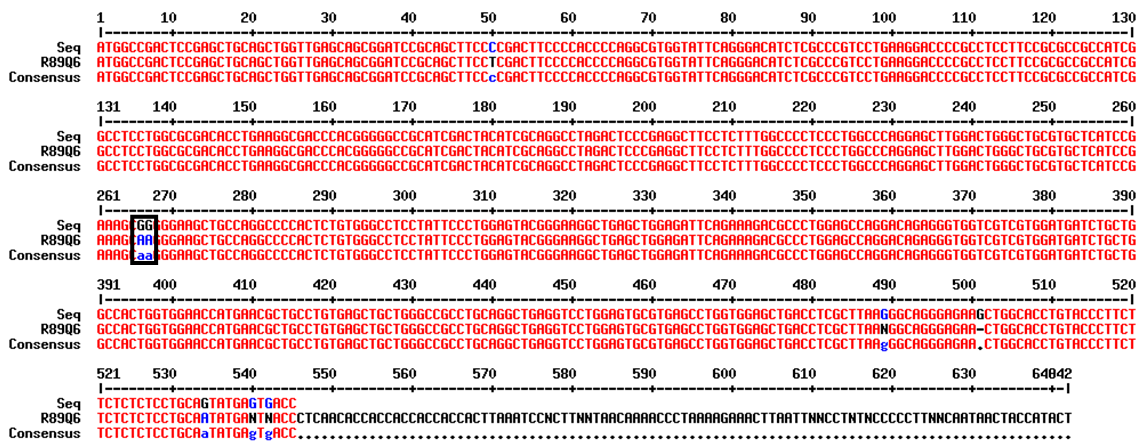


Figura 24 – Alinhamento da sequência do gene nativo da hAPRT com a sequência nucleotídica do mutante R89Q. A sigla Seq representa o gene nativo e R89Q6, o mutante. O retângulo preto indica a região de incorporação da mutação. Com esta mutação, a proteína mutante terá um resíduo de Glutamina na posição correspondente a uma Arginina na sequência nativa.

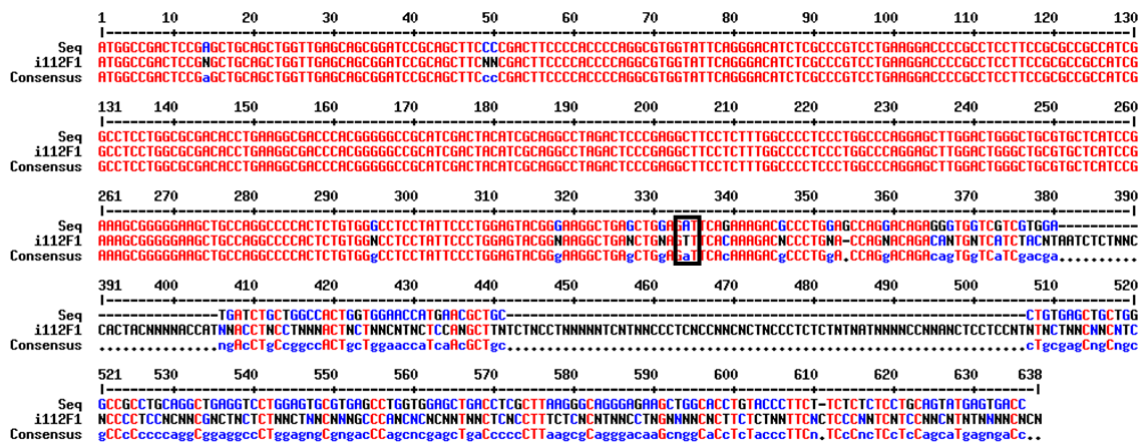


Figura 25 – Alinhamento da sequência do gene nativo da hAPRT com a sequência nucleotídica do mutante I12F. A sigla Seq representa o gene nativo e i112F1, o mutante. O retângulo preto indica a região de incorporação da mutação. Com esta mutação, a proteína mutante terá um resíduo de Fenilalanina na posição correspondente a uma Isoleucina na sequência nativa.

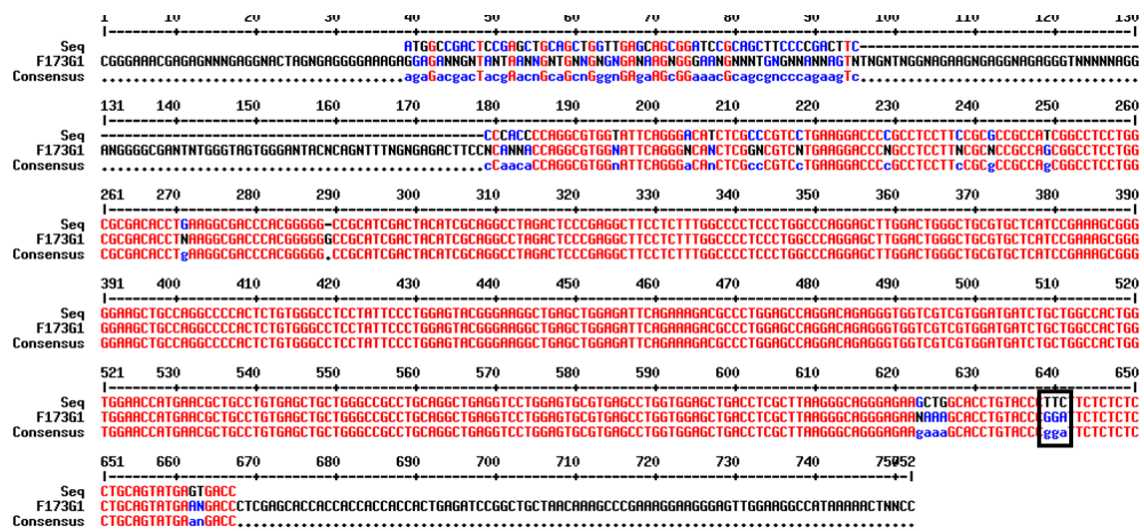


Figura 26 – Alinhamento da sequência do gene nativo da hAPRT com a sequência nucleotídica do mutante F173G. A sigla Seq representa o gene nativo e F173G1, o mutante. O retângulo preto indica a região de incorporação da mutação. Com esta mutação, a proteína mutante terá um resíduo de GLICINA na posição correspondente a uma Fenilalanina na sequência nativa.

4.2 Expressão e Purificação da hAPRT

Os sobrenadantes contendo as proteínas recombinantes hAPRT nativa, I112F, D65V, M136T, L110P, R67Q, R89Q e F173G obtidos pelo protocolo descrito no item 3.2 foram aplicados à coluna CHTTM Hidroxiapatita Cerâmica (Bio-Rad) conforme protocolo do item 3.3. Os cromatogramas resultantes das corridas cromatográficas estão mostrados na figura 27.

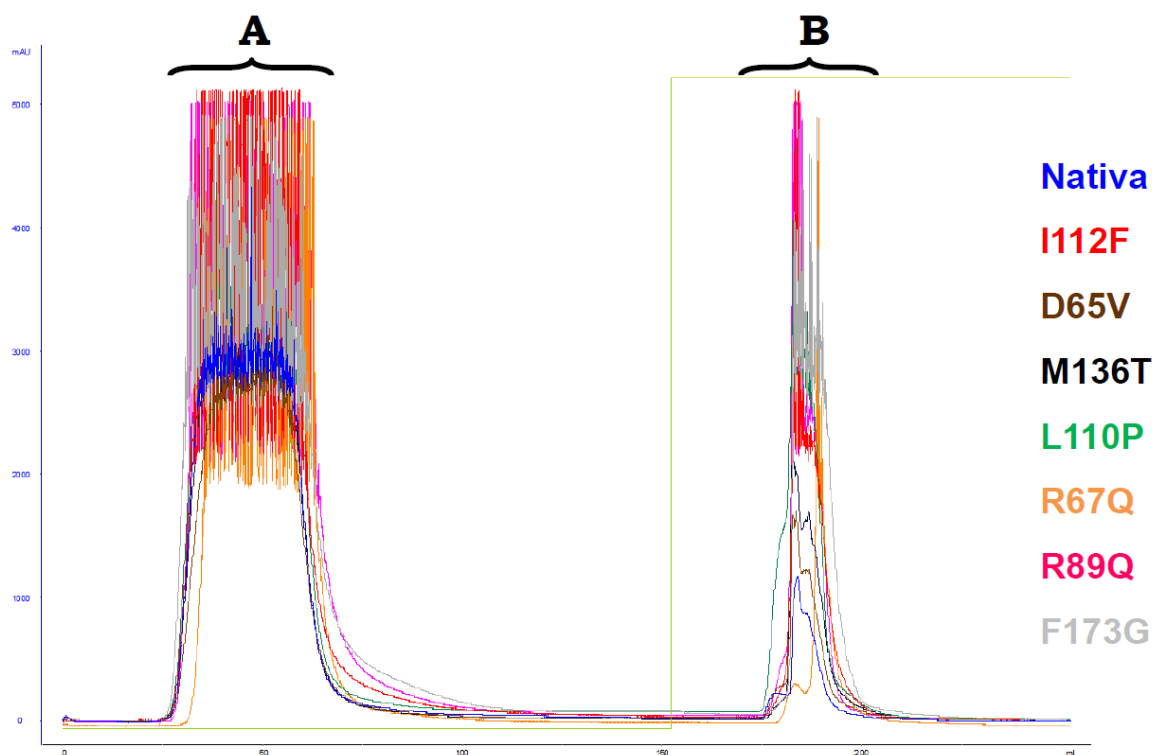


Figura 27 – Cromatografia das enzimas em Hidroxiapatita. Os cromatogramas foram sobrepostos de acordo com o código de cores para cada enzima mostrado ao lado da figura. A linha em verde claro mostra transição do tampão de eluição A para o B. A – Região de eluição das enzimas. B – Região de eluição dos contaminantes.

O padrão de eluição da purificação foi semelhante para todas as amostras. Com exceção do mutante I112F, todas as enzimas produzidas heterologicamente no sistema bacteriano escolhido foram obtidas solúveis e em grande quantidade.

Já para o mutante I112F, não se obteve o mesmo desempenho de expressão de proteína solúvel. O que se observa, é uma grande quantidade de proteína sendo expressa de maneira insolúvel comprovada pela presença de uma banda referente ao mutante bem maior na canaleta do *pellet* do que na canaleta do sobrenadante na figura 28.

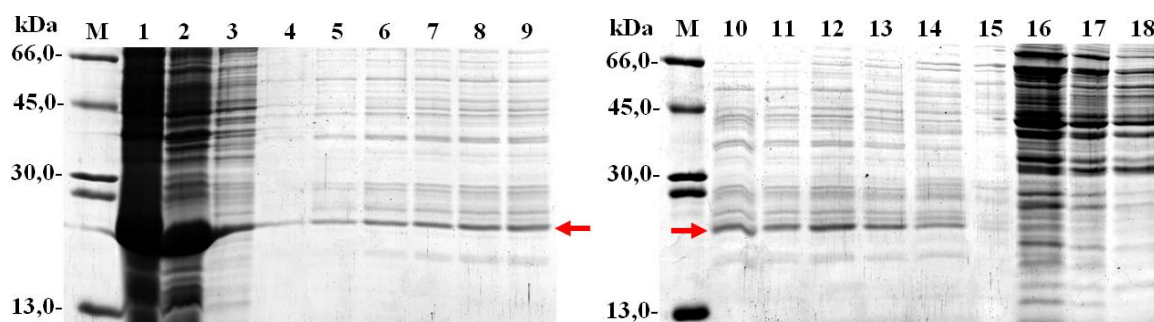


Figura 28 – SDS-PAGE 15% da purificação do mutante I112F mostrada na figura 27. M – Marcador de massa molecular, em kDa. 1 – Lisado, 2 – Pellet, 3 – Sobrenadante (pré-coluna), 4-15 – Região A de eluição da figura 27, 16-18 – Região B de eluição da figura 27. A seta vermelha indica a posição de migração da proteína mutante.

Essa insolubilidade do mutante pode ser resultante da própria mutação. A troca do resíduo de Isoleucina (apolar, alifático) por uma fenilalanina (aromático) na posição 112 pode levar a desestruturação da folha β que compõe o “*cap*” responsável pela proteção dos substratos frente ao solvente no sítio ativo (figura 29).

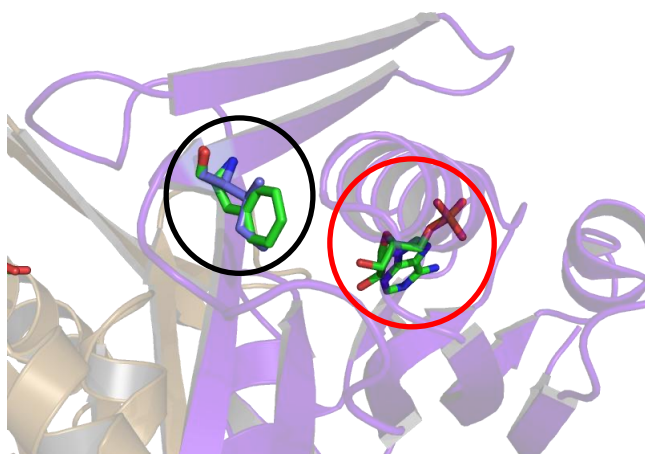


Figura 29 – Região da mutação I112F. A troca de um resíduo alifático por um aromático nesta posição pode ser crucial para a estabilidade da proteína. Essa posição é importante na formação da folha β que compõe o “*cap*” do sítio ativo. O círculo preto destaca a posição da mutação e o vermelho, a posição do produto AMP.

Assim, as frações de eluição das enzimas obtidas de forma solúvel foram reunidas. Uma fração de cada produto da purificação foi concentrada para a realização dos

experimentos de cristalização. A fração restante de cada uma das amostras foram submetidas à troca de tampão.

Como descrito anteriormente, a hAPRT purificada deve sempre ser submetida à cromatografia de filtração em gel em coluna de *Desalting*. A troca do tampão fosfato por tampão TEA é importante para eliminar a possibilidade de interferência nos ensaios cinéticos. Os cromatogramas resultantes estão mostrados na figura 30.

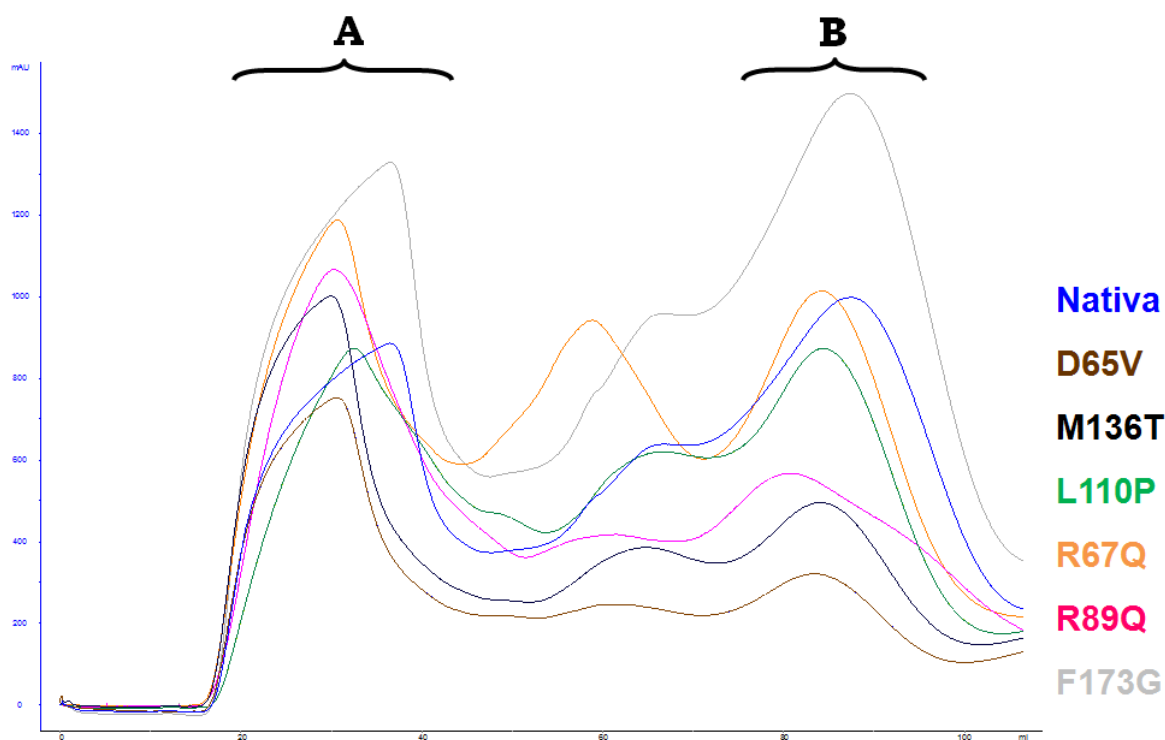


Figura 30 – Cromatografia das enzimas em coluna de Desalting. Os cromatogramas foram sobrepostos de acordo com o código de cores para cada enzima mostrado ao lado da figura. A – Região de eluição das enzimas. B – Região de eluição dos materiais de baixo peso molecular, como sais indesejados.

As frações de eluição de cada enzima foram novamente reunidas. O resultado de ambas as cromatografias, as amostras preparadas para os experimentos de cinética e para os experimentos de cristalização analisadas em 15 % SDS-PAGE (Figura 31).

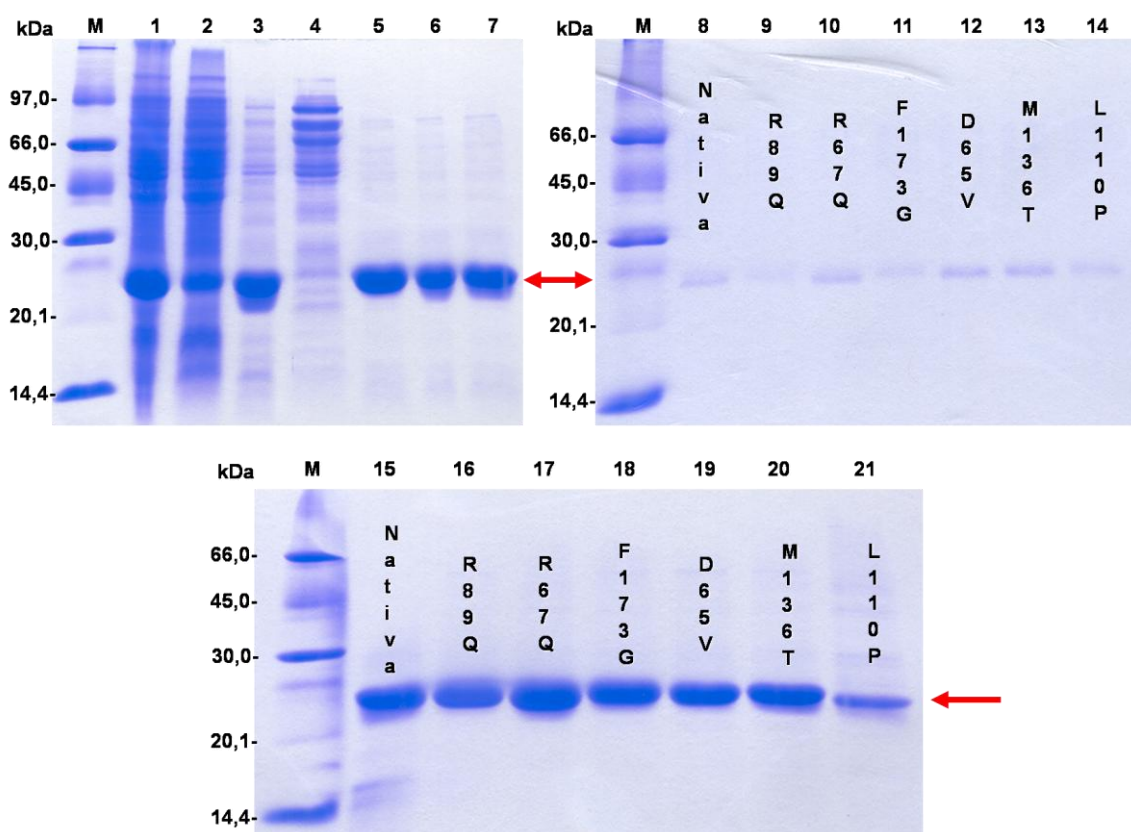


Figura 31 – SDS-PAGE 15% representativo da purificação e preparação da hAPRT e seus mutantes. M – Marcador de massa molecular, em kDa. 1 – Lisado, 2 – Pellet, 3 – Sobrenadante (pré-hidroxiapatita), 4 – Eluição dos contaminantes (Região B da figura 27), 5 – Eluição da hAPRT (Região A da figura 27), 6 – Pré-desalting, 7 – Pós-desalting (Região A da figura 30), 8-14 – Amostras utilizadas para os ensaios de cinética, 15-21 – Amostras utilizadas para os ensaios de cristalização. As setas vermelhas indicam a posição de migração da enzima.

4.3 Caracterização Cinética da hAPRT

4.3.1 Ensaio Enzimático Espectrofotométrico da hAPRT

Uma vez que a enzima encontrava-se no tampão ideal, deu-se início aos ensaios de caracterização cinética da mesma. Para tanto, montou-se a reação conforme descrito no item 3.4.1. A figura 32 mostra a conversão de adenina a AMP pela enzima hAPRT nativa ao longo do tempo, onde a absorbância foi acompanhada a 259 nm.

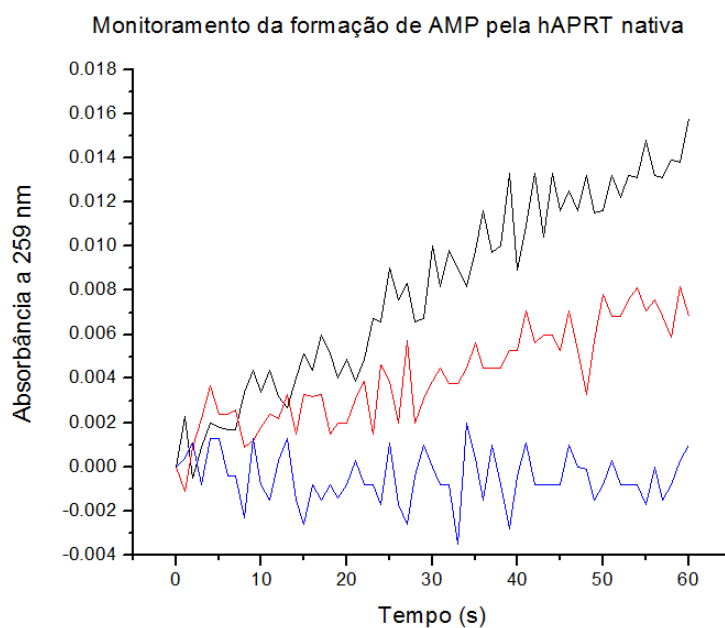


Figura 32 – Absorbância a 259 nm da reação enzimática da hAPRT. Em azul encontra-se a absorção do branco (todos os componentes da reação menos a enzima); em vermelho, a reação na presença de 20 nM de enzima; e em preto, na presença de 50 nM de enzima.

Pode-se observar na figura 32 a presença de uma grande interferência no monitoramento da reação. Isso deve-se a baixa intensidade de sinal obtida, fazendo com que a relação sinal ruído seja muito pequena e o monitoramento da reação ocorra muito próximo do limite de detecção do equipamento. Esse tipo de interferência inviabilizaria qualquer tipo de análise quantitativa das taxas de conversão de adenina a AMP obtidas.

Com o objetivo de tentar descobrir a fonte da interferência, resolveu-se obter espectros dos principais analitos presentes em solução, no caso, adenina, PRPP e AMP, em concentrações equivalentes (Figura 33).

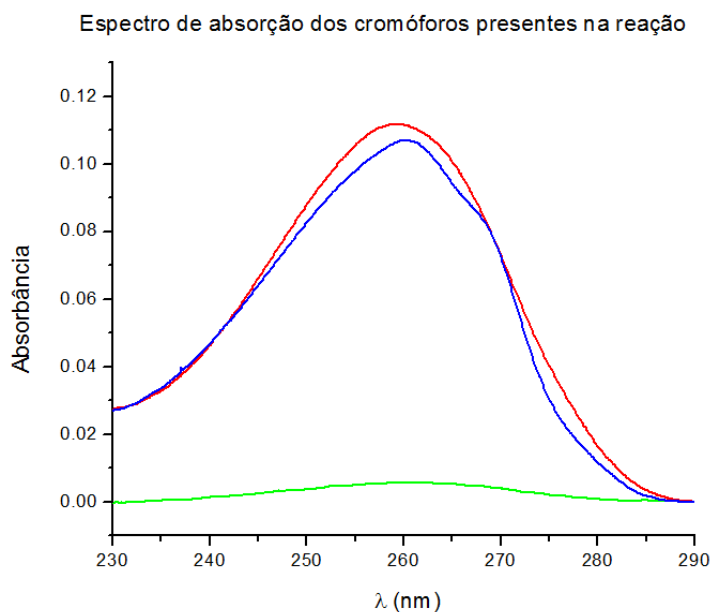


Figura 33 – Espectro de absorção na região do ultravioleta dos analítos presentes na reação enzimática da hAPRT. Em azul encontra-se o espectro da **adenina**, em vermelho do **AMP** e em verde do **PRPP**. Todos estão a 200 μ M em tampão TEA 100 mM.

A figura 33 mostra uma sobreposição das bandas de absorção dos três analítos, com maior absorvidade para adenina e AMP no comprimento de onda escolhido para monitorar a reação. Isto se deve a semelhança estrutural entre os dois compostos uma vez que a adenina é precursor do AMP e ambos possuem o mesmo grupo cromóforo responsável pela absorção (Figura 34).

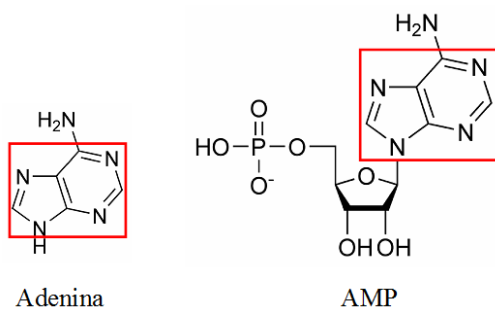


Figura 34 – Estrutura dos compostos adenina e AMP. Em destaque encontram-se as regiões responsáveis pela absorção molecular na região do ultravioleta – cromóforos.

Assim, torna-se impossível ter seletividade a qualquer um dos compostos uma vez que todos estão presentes em solução e com suas concentrações variando ao longo do tempo. Isso inviabiliza obter a taxa de conversão entre reagentes e produtos proporcionada pela enzima o que é crucial para a caracterização de sua cinética.

Para resolver esse problema, uma nova abordagem fez-se necessária. Uma modificação de ensaios radioativos descrita por Johnson *et al.*⁸⁹, mostrou-se bastante conveniente para o tipo de análise que se deseja realizar com a hAPRT e seus mutantes. Este método baseia-se na precipitação do PRPP restante e AMP formado através de sua complexação com um sal de metal pesado, no caso, o cloreto de lantânio (LaCl_3). Isso tornaria possível a medida da taxa de mudança na absorbância resultante do consumo de adenina.

Com isso, a interferência causada pela sobreposição das bandas de absorção dos compostos poderia ser evitada.

4.3.2 Testes de Precipitação com LaCl_3

A primeira etapa para a validação de uma adaptação deste método para atender as necessidades do projeto foi testar sua viabilidade com ensaios de precipitação dos compostos frente ao LaCl_3 .

Assim, passo a passo, a precipitação dos compostos foi testada conforme descrito no item 3.4.2. Para todas as misturas teste observou-se a precipitação dos interferentes AMP e/ou PRPP e a não precipitação da adenina. A análise foi feita por comparação dos espectros obtidos da mistura após centrifugação com os espectros dos compostos isolados; e com a determinação da concentração no máximo de absorção da banda utilizando a Lei de Beer, que relaciona absorbância à concentração. A forma dos espectros e a concentração estimada aproximaram-se sempre ao da adenina, como esperado. Na figura 35 encontram-se

sobrepostos os espectros de absorção das misturas testes onde estavam presentes os três compostos (adenina, PRPP e AMP) e seus respectivos espectros padrões.

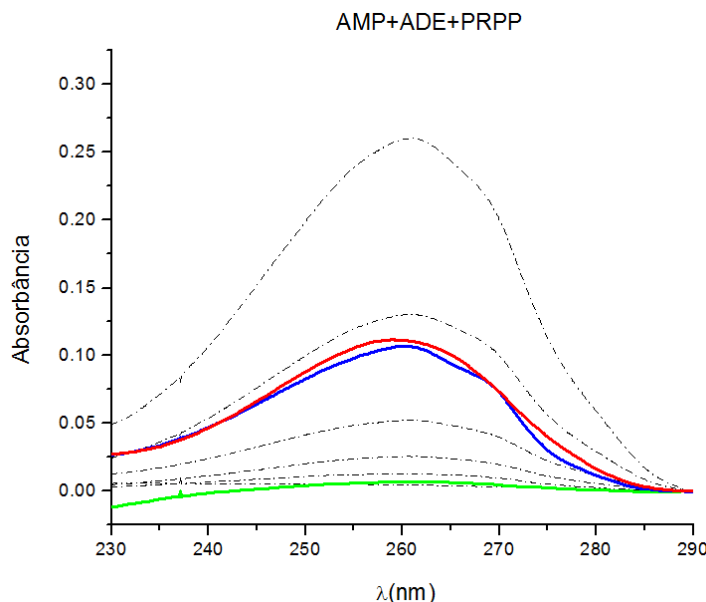


Figura 35 – Espectro de absorção na região do ultravioleta das misturas testes contendo adenina, PRPP e AMP e seus respectivos espectros padrões. Em azul encontra-se o espectro da **adenina**, em vermelho do **AMP** e em verde do **PRPP**. Todos estão a 200 μM em tampão TEA 100 mM. Já as linhas tracejadas representam as misturas teste na seguinte ordem: de baixo para cima, 5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM e 500 μM de cada um dos compostos.

Uma vez comprovada a eficiência de precipitação obtida com o uso do LaCl_3 , pode-se dar início a busca de um ensaio de caracterização da cinética enzimática hAPRT baseado nessa metodologia.

4.3.3 Ensaio Enzimático da hAPRT Através da Precipitação com LaCl_3

Realizou-se, então, uma primeira varredura com a enzima hAPRT nativa para validar a metodologia. Assim, ensaios para determinação das constantes de afinidade foram realizados conforme descrito no item 3.4.3.

A faixa de concentração dos substratos escolhida para a realização dos ensaios foi baseada em valores previamente descritos na literatura^{40, 86-88}, com algumas extrapolações nos limites inferiores e superiores para melhor caracterização.

Para os pontos a mais alta concentração do substrato analisado, 50 e 100 μM , não foi possível detectar o consumo de adenina pois estes valores foram suficientes para saturar o meio, fazendo com que a enzima chegasse a seu estado estacionário (figura 36).

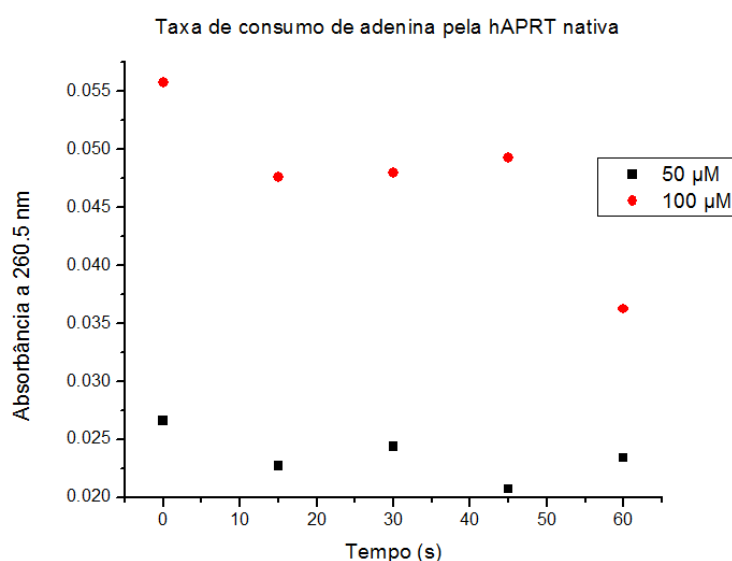


Figura 36 – Absorbância no comprimento de onda máximo de absorção da adenina ($\lambda = 260,5 \text{ nm}$) em função do tempo de reação. Em preto encontra-se a reação realizada na presença de 50 μM de adenina e em vermelho na presença de 100 μM . A concentração de PRPP foi mantida constante em 50 μM .

Já para os pontos na faixa de 6,25 a 25 μM , pode-se observar com clareza o consumo de adenina como visto na figura 37.

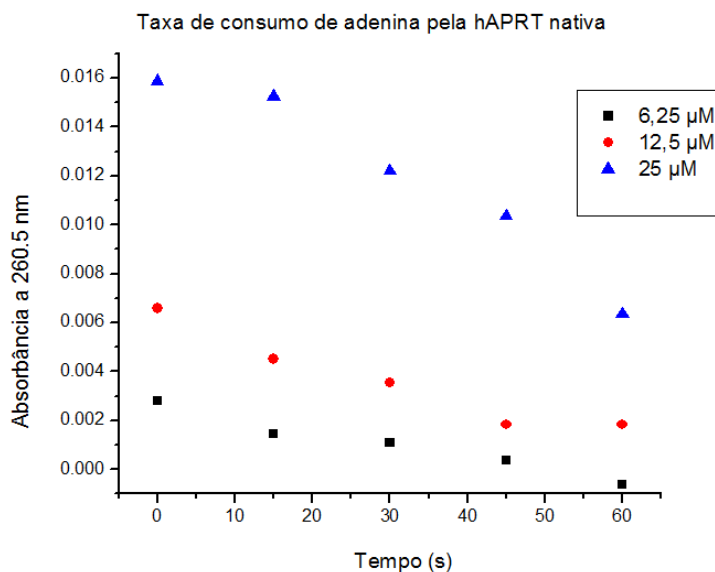


Figura 37 – Absorbância no comprimento de onda máximo de absorção da adenina ($\lambda = 260,5$ nm) em função do tempo de reação. Em preto encontra-se a reação realizada na presença de $6,25$ μM de adenina, em vermelho na presença de $12,5$ μM e em azul na presença de 25 μM . A concentração de PRPP foi mantida constante em 50 μM .

Porém, para os pontos a mais baixa concentração ($0,78$ a $3,13$ μM), o sinal de absorção obtido foi muito baixo, apresentando-se no limite de detecção do aparelho e inferindo muito ruído a análise. A figura 38 ilustra o padrão de consumo de adenina obtido.

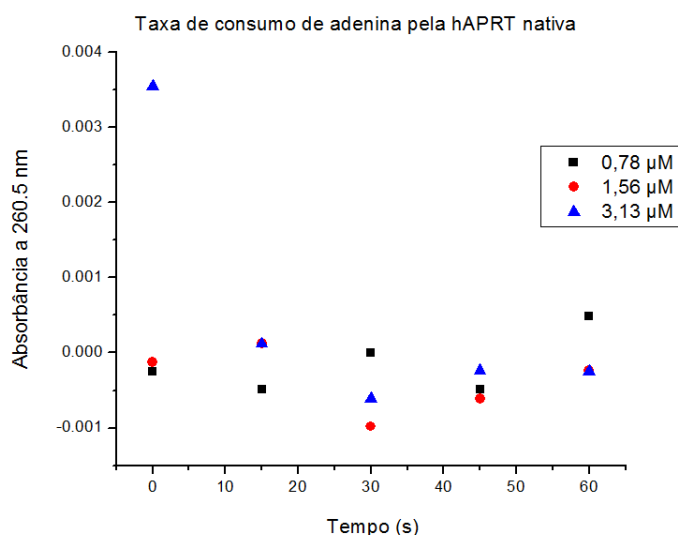


Figura 38 – Absorbância no comprimento de onda máximo de absorção da adenina ($\lambda = 260,5$ nm) em função do tempo de reação. Em preto encontra-se a reação realizada na presença de $0,78$ μM de adenina, em vermelho na presença de $1,56$ μM e em azul na presença de $3,13$ μM . A concentração de PRPP foi mantida constante em 50 μM .

Como os pontos a mais baixa concentração são cruciais para a caracterização do efeito da concentração do substrato na velocidade inicial da reação enzimática e para a obtenção das constantes que determinam a cinética enzimática da hAPRT, alterações no ensaio fizeram-se necessárias para a ampliação do sinal e melhora na relação sinal ruído.

4.3.4 Testes de Eficiência da Precipitação com LaCl_3 para Diminuir a Diluição da Reação

Na tentativa de aumentar o sinal para os pontos a mais baixas concentrações, uma primeira abordagem realizada foi a diminuição do volume das soluções de precipitação para diminuir a diluição da amostra.

Para isso, a precipitação dos compostos foi testada conforme descrito no item 3.4.4. Observou-se, novamente, a precipitação dos interferentes AMP e/ou PRPP e a não precipitação da adenina tanto para as misturas controle (mesmos volumes de soluções de precipitação) quanto para aquelas onde se reduziu a diluição. Na figura 39 observa-se um ganho no sinal obtido das amostras menos diluídas e a diminuição da interferência do ruído.

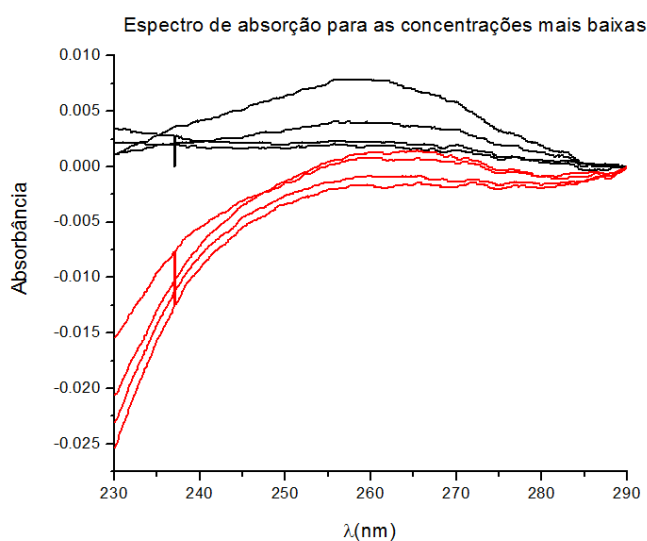


Figura 39 – Espectro de absorção na região do ultravioleta das misturas a baixas concentrações em diluições diferentes. Em preto encontra-se o grupo diluído 13 vezes e em vermelho o grupo diluído 25 vezes. As linhas dentro de cada grupo representam as misturas testes na seguinte ordem: de baixo para cima, 0,78 μM , 1,56 μM , 3,13 μM e 6,25 μM de cada um dos compostos.

Porém, como a quantidade de agente precipitante foi diminuída, resolveu-se fazer o mesmo teste para verificar se esta quantidade também era suficiente para precipitar os interferentes nas concentrações mais altas. Para isto, foi realizado o mesmo procedimento utilizando 100 μM de cada um dos analítos. Os espectros obtidos para a maior e menor diluição encontram-se sobrepostos na figura 40.

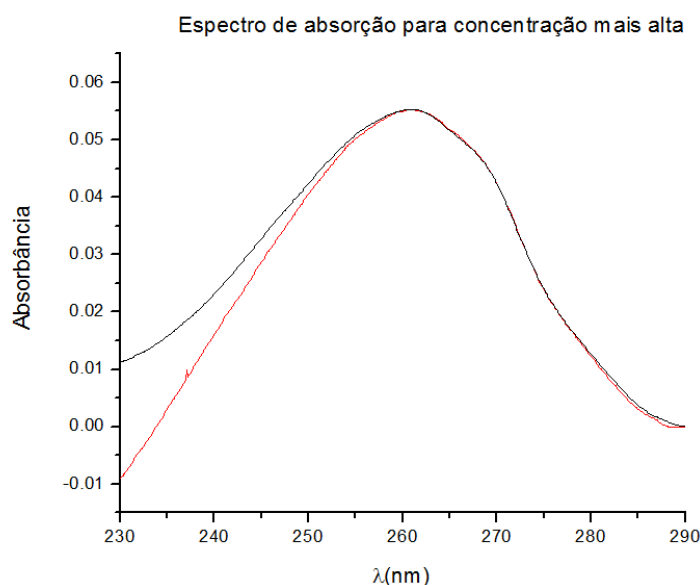


Figura 40 – Espectro de absorção na região do ultravioleta das misturas a 100 μM em diluições diferentes já corrigidos frente as mesmas. Em preto encontra-se a amostra diluída **13** vezes e em vermelho a amostra diluída **25** vezes.

A precipitação com menor quantidade de agente precipitante foi tão eficiente quanto à precipitação com maior quantidade, uma vez que a mesma concentração estimada de compostos presentes em solução foi obtida e era condizente com a concentração de adenina no meio. Observa-se também que o espectro obtido foi o espectro característico da adenina, ou seja, não havia interferentes no meio em nenhum dos casos.

Assim, a condição onde a diluição pela adição do *stop buffer* e do LaCl_3 foi diminuída mostrou ser eficiente e mais vantajosa que a anterior. Fez-se então necessário repetir o ensaio para verificar se esta diminuição na diluição foi suficiente para eliminar a interferência nos pontos a concentrações baixas ou se outras diminuições ou novas medidas seriam necessárias.

4.3.5 Ensaio Enzimático da hAPRT Através da Precipitação com LaCl_3 (Menor Diluição)

Visando verificar a nova condição de precipitação estabelecida, foram realizados vários ensaios enzimáticos da hAPRT nativa variando a concentração do substrato adenina, conforme item 3.4.5. Os melhores gráficos obtidos para o consumo de adenina em suas diferentes concentrações iniciais estão mostrados nas figuras 41 e 42.

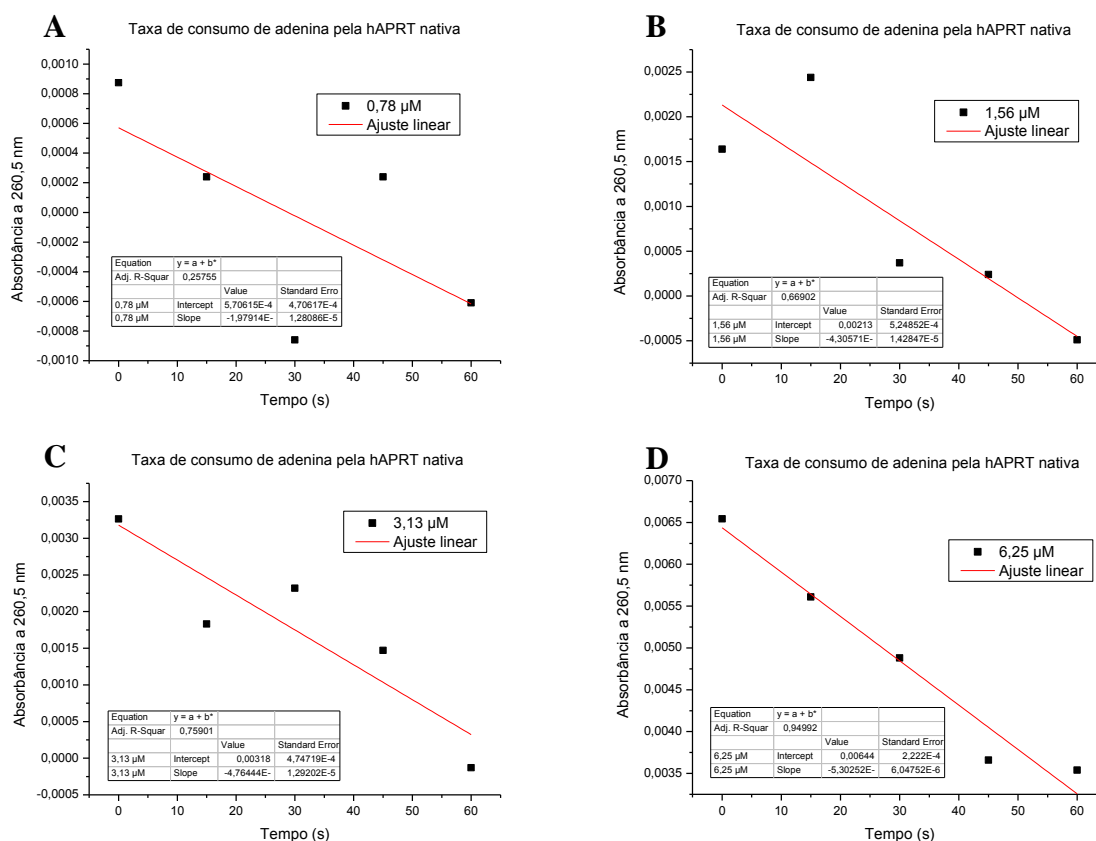


Figura 41 – Consumo de adenina pela hAPRT nativa em função de sua concentração inicial. As concentrações iniciais de adenina são: A – 0,78 μM , B – 1,56 μM , C – 3,13 μM e D – 6,25 μM . A concentração de PRPP foi mantida constante em 50 μM . Os pontos pretos mostram a absorbância no comprimento de onda máximo de absorção da adenina ($\lambda = 260,5 \text{ nm}$) em função do tempo de reação. Em vermelho está representado o ajuste linear realizado para calcular a taxa de consumo de adenina para cada concentração inicial utilizada.

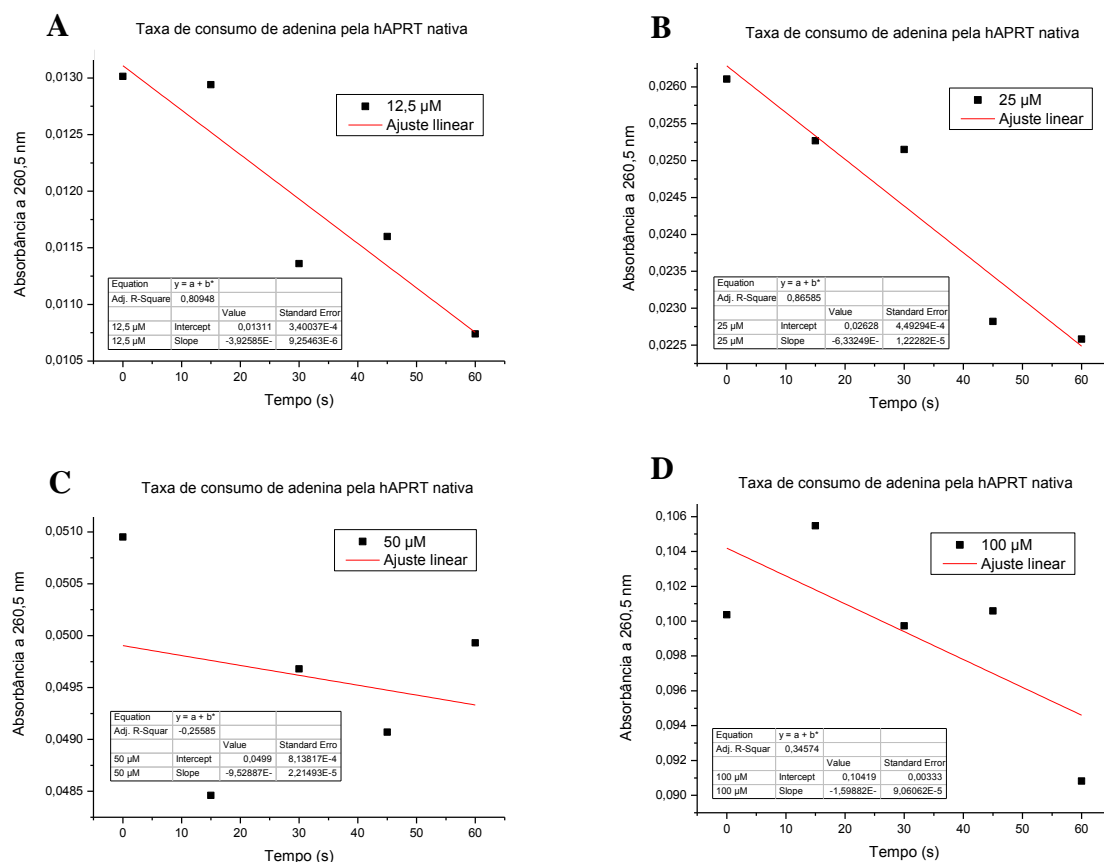


Figura 42 – Consumo de adenina pela hAPRT nativa em função de sua concentração inicial. As concentrações iniciais de adenina são: A – 12,5 µM, B – 25 µM, C – 50 µM e D – 100 µM. A concentração de PRPP foi mantida constante em 50 µM. Os pontos pretos mostram a absorbância no comprimento de onda máximo de absorção da adenina ($\lambda = 260,5$ nm) em função do tempo de reação. Em vermelho está representado o ajuste linear realizado para calcular a taxa de consumo de adenina para cada concentração inicial utilizada.

Mais uma vez, como visto pelo ajuste linear dos gráficos nas figuras 41 e 42, os resultados obtidos não apresentaram resolução, linearidade e robustez necessárias para a caracterização cinética da enzima nativa e de seus mutantes.

Portanto, não houve sucesso na padronização de um ensaio enzimático medido diretamente por espectroscopia devido a ausência de cromóforos diferentes entre os substratos e produtos. Como alternativa aos problemas encontrados, foi testado um ensaio enzimático acoplado através da utilização de um kit comercial para a detecção de pirofosfato (produto secundário da reação catalisada pela hAPRT).

4.3.6 Ensaio Enzimático Acoplado para Caracterização Cinética da hAPRT

A primeira etapa realizada para a padronização do ensaio acoplado foi verificar se o kit a ser utilizado possuía capacidade de detecção de pirofosfato na faixa de trabalho desejada. Para isso, realizaram-se reações com concentrações conhecidas de PPI, variando-as 0 a 250 μM . A mistura reacional foi composta de 167 μL do reagente do kit e 333 μL de PPI diluído em água de forma a alcançar a concentração desejada no volume final da reação (500 μL). Cada reação foi monitorado por 60 segundos a 340 nm a 25°C. A figura 43 mostra o resultado obtido para todas as concentrações.

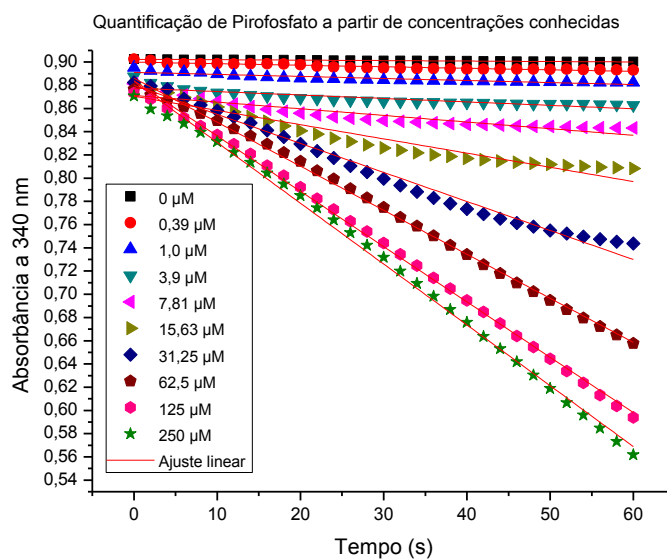


Figura 43 – Quantificação de Pirofosfato a partir de concentrações conhecidas. Utilizou-se o kit comercial para determinar a concentração de amostras conhecidas de PPI, visando verificar se o mesmo se aplica a faixa de trabalho desejada. A concentração de PPI foi variada de 0 a 250 μM e a reação foi monitorada a 340 nm por 60 segundos.

De posse das taxas de consumos de $\beta\text{-NADH}$, de sua absorvidade molar a 340 nm ($6,22 \times 10^{-3}$) e sabendo que a cada 2 mols de $\beta\text{-NADH}$ consumidos, 1 mol de PPI é

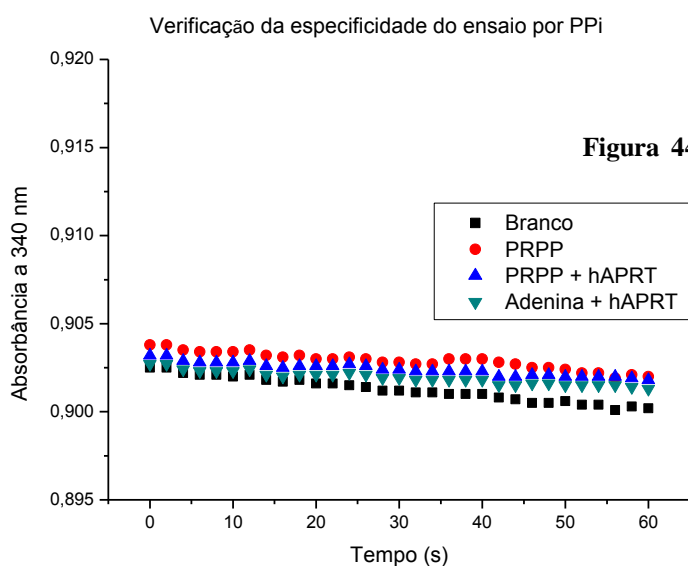
consumido, pode-se recalcular a concentração de cada ponto. A tabela 3 mostra as concentrações recalculadas para cada ponto.

Tabela 3 – Concentrações de PPI obtidas utilizando o kit comercial a partir de amostras conhecidas.

Concentração Esperada (μM)	0	0,39	1,0	3,9	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250
Concentração Obtida (μM)	0	0,44	0,97	3,4	7,7	16,6	33,1	60,9	126,1	248,5

A linearidade e as concentrações de PPI obtidas utilizando o kit foram bastante satisfatórias, permitindo dar continuidade a padronização do ensaio acoplado.

O próximo teste realizado foi verificar a especificidade do kit pelo PPI, garantindo que as reações não sejam iniciadas por outros componentes do meio reacional. Realizaram-se então quatro reações conforme descrito no item 3.4.6, mas com as seguintes alterações: Branco – todo o meio reacional, inclusive a hAPRT nativa, com exceção dos substratos PRPP e adenina; PRPP – todo o meio reacional, com exceção da hAPRT e da adenina; PRPP + hAPRT – todo o meio reacional, com exceção da adenina; Adenina + hAPRT – todo o meio reacional, com exceção do PRPP. Os resultados estão mostrados na figura 44.



Pode-se observar que em nenhum dos casos houve variação da absorbância a 340 nm, o que indica que não houve consumo de β -NADH. Portanto, a cascata de reações da qual o kit é composto não se iniciou na presença de nenhum componente do meio reacional.

Como cada mol de PPI produzido é proveniente do consumo de 1 mol de cada substrato, pode-se observar a faixa de trabalho desejada para as concentrações dos substratos está dentro do limite de detecção do kit. Além disso, observou-se que nenhum outro componente do meio reacional, além do PPI produzido, dispara a cascata de reações da qual o kit é composto.

Assim, deu-se início a caracterização cinética da hAPRT nativa e de seus mutantes através do ensaio acoplado conforme descrito no item 3.4.6. As figuras de 45 a 51 mostram as curvas dose-resposta para cada uma das enzimas estudadas. Esses gráficos foram gerados utilizando o módulo de cinética enzimática do programa SIGMAPLOT versão 11.0.

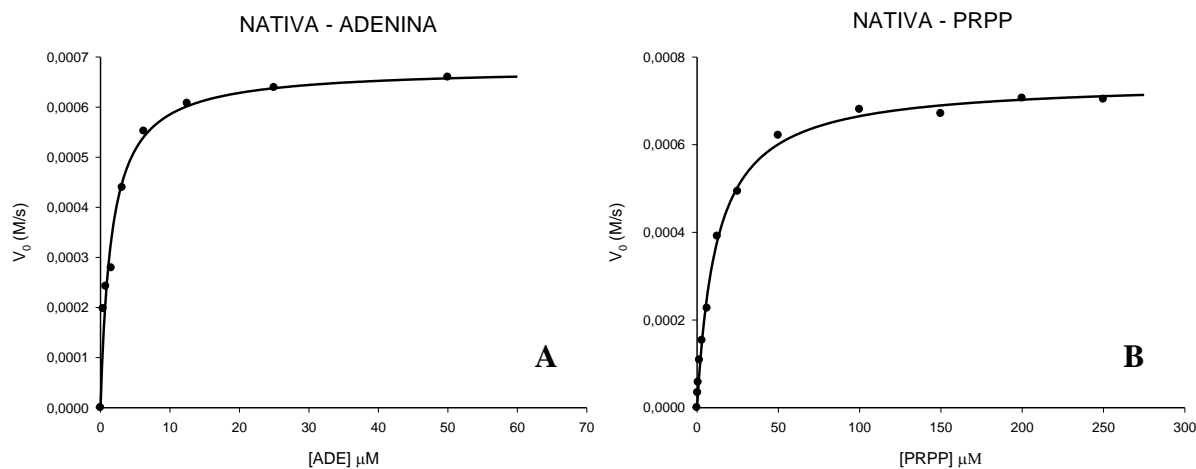


Figura 45 – Curvas dose-resposta para a hAPRT nativa. A – Caracterização da enzima variando a concentração de Adenina. B – Caracterização da enzima variando a concentração de PRPP.

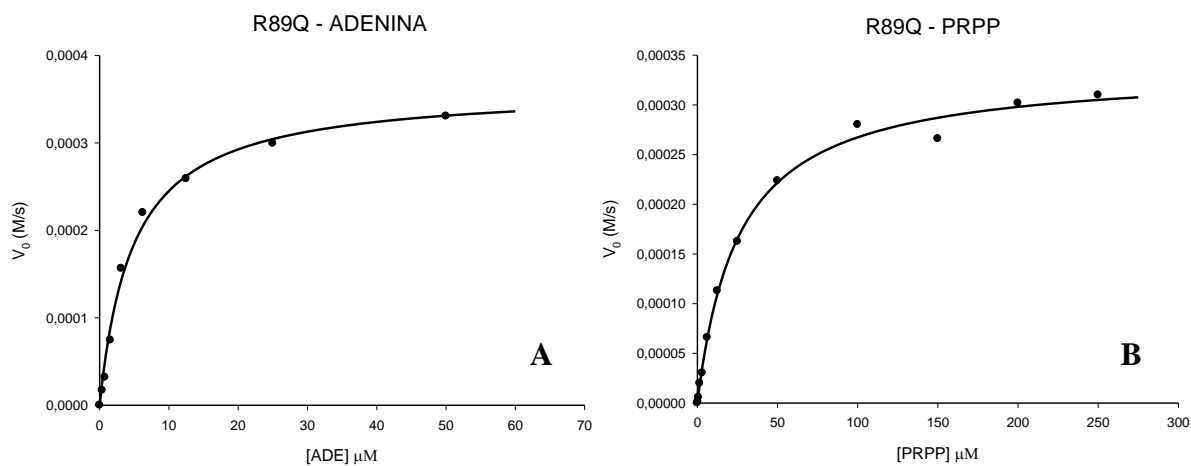


Figura 46 – Curvas dose-resposta para o mutante **R89Q**. A – Caracterização da enzima variando a concentração de Adenina. B – Caracterização da enzima variando a concentração de PRPP.

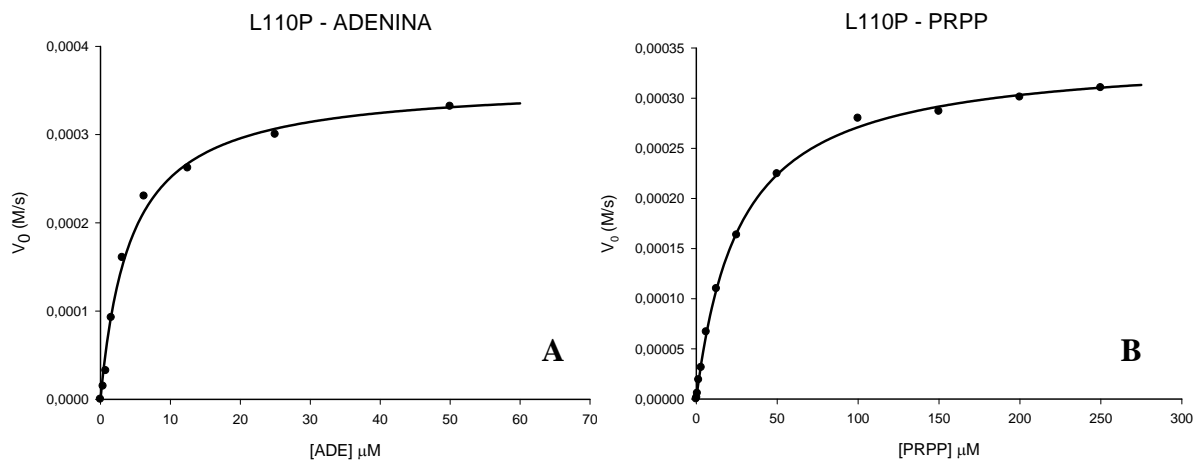


Figura 47 – Curvas dose-resposta para o mutante **L110P**. A – Caracterização da enzima variando a concentração de Adenina. B – Caracterização da enzima variando a concentração de PRPP.

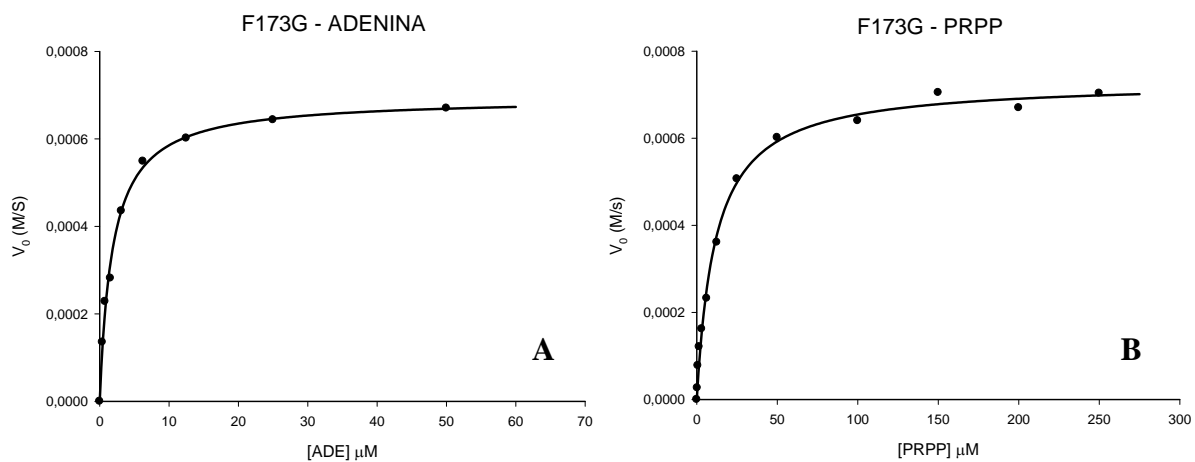


Figura 48 – Curvas dose-resposta para o mutante **F173G**. A – Caracterização da enzima variando a concentração de Adenina. B – Caracterização da enzima variando a concentração de PRPP.

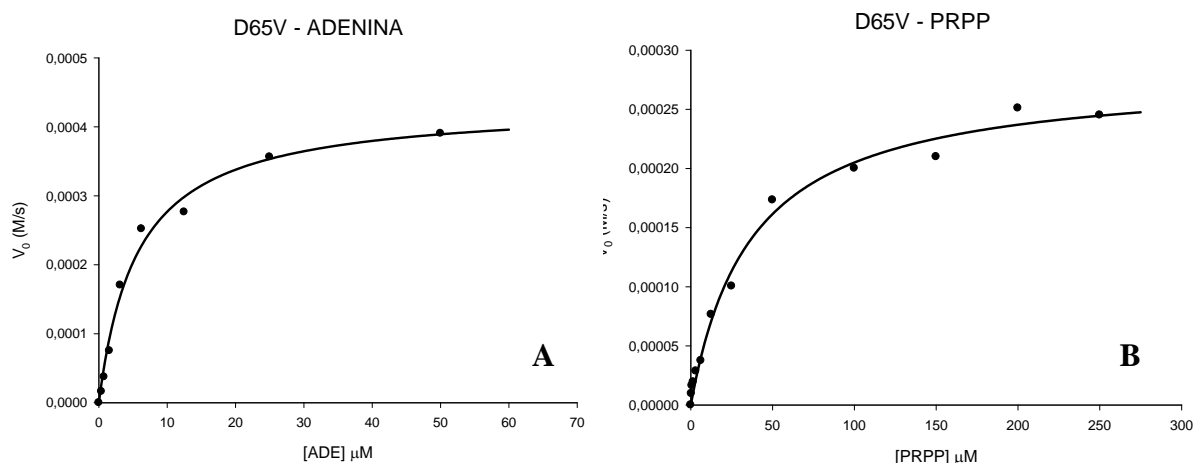


Figura 49 – Curvas dose-resposta para o mutante D65V. A – Caracterização da enzima variando a concentração de Adenina. B – Caracterização da enzima variando a concentração de PRPP.

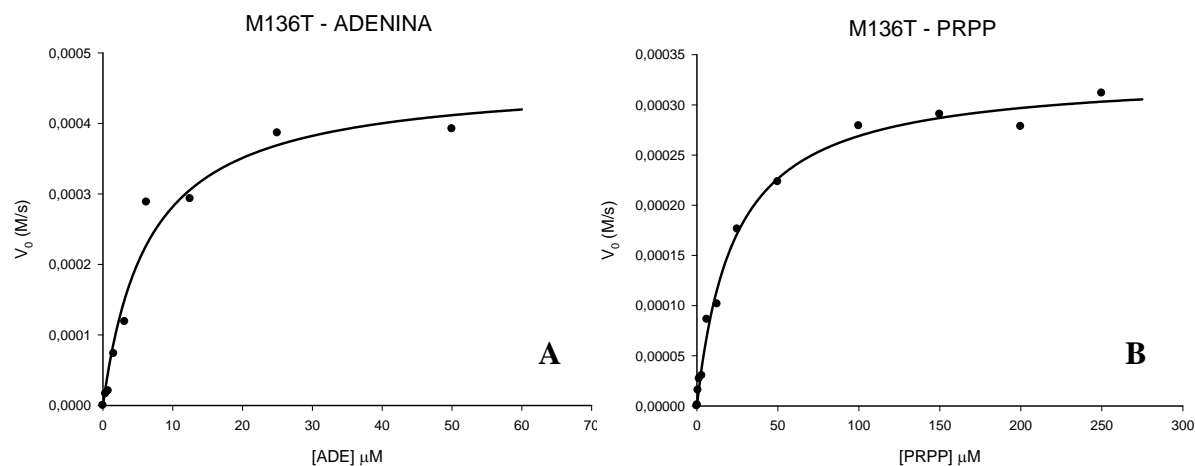


Figura 50 – Curvas dose-resposta para o mutante M136T. A – Caracterização da enzima variando a concentração de Adenina. B – Caracterização da enzima variando a concentração de PRPP.

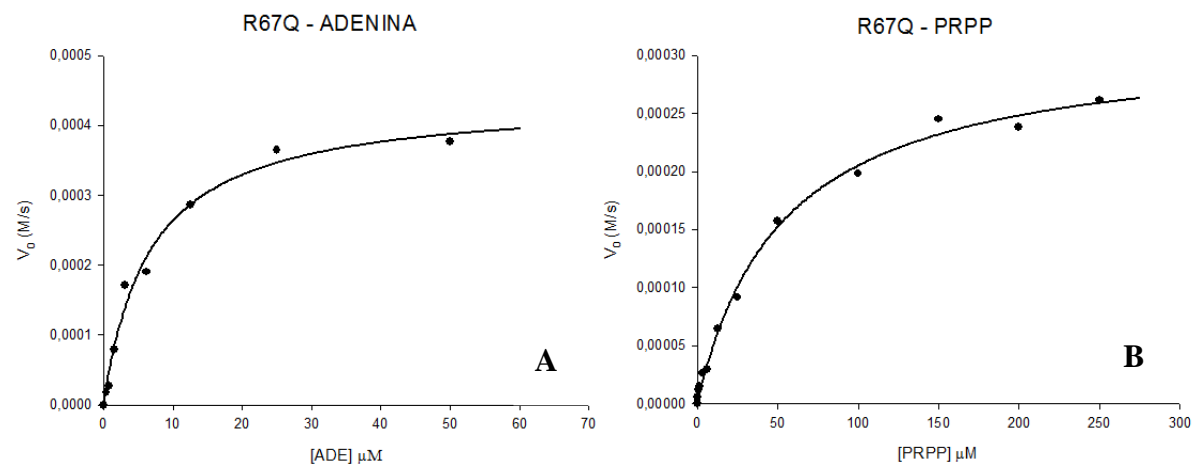


Figura 51 – Curvas dose-resposta para o mutante R67Q. A – Caracterização da enzima variando a concentração de Adenina. B – Caracterização da enzima variando a concentração de PRPP.

O modelo de cinética enzimática utilizado para ajustar as curvas dose-resposta de cada enzima foi o descrito por Michaelis-Menten, que obedece a seguinte equação:

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

onde:

V_0 é a velocidade inicial de reação,

$V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima de reação,

[S] é a concentração do substrato e

K_m é a constante de Michaelis-Menten.

Portanto, para cada gráfico traçado, foram obtidas as constantes K_m e $V_{m\acute{a}x}$ baseado no ajuste do gráfico pela equação acima. Além disso, calculou-se o número de renovação (k_{cat}) e k_{cat}/K_m para possibilitar a comparação entre a eficiência cinética das enzimas. Os resultados encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização cinéticas da hAPRT e seus mutantes baseado no modelo de Michaelis-Menten.

Enzima	Substrato	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{M/s}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	r^2
Nativa	PRPP	$(7,45 \pm 0,10) \times 10^2$	$11,96 \pm 0,73$	$3,72 \times 10^4$	$3,11 \times 10^3$	0,9970
	Adenina	$(6,78 \pm 0,24) \times 10^2$	$1,59 \pm 0,23$	$3,39 \times 10^4$	$2,14 \times 10^4$	0,9816
R89Q	PRPP	$(3,37 \pm 0,07) \times 10^2$	$25,90 \pm 2,05$	$1,68 \times 10^4$	$6,50 \times 10^2$	0,9961
	Adenina	$(3,63 \pm 0,13) \times 10^2$	$4,82 \pm 0,58$	$1,82 \times 10^4$	$3,77 \times 10^3$	0,9916
L110P	PRPP	$(3,44 \pm 0,03) \times 10^2$	$26,82 \pm 1,00$	$1,72 \times 10^4$	$6,41 \times 10^2$	0,9991
	Adenina	$(3,59 \pm 0,13) \times 10^2$	$4,31 \pm 0,53$	$1,80 \times 10^4$	$4,17 \times 10^3$	0,9908
F173G	PRPP	$(7,31 \pm 0,13) \times 10^2$	$11,67 \pm 0,91$	$3,66 \times 10^4$	$3,13 \times 10^3$	0,9950
	Adenina	$(6,94 \pm 0,13) \times 10^2$	$1,86 \pm 0,14$	$3,47 \times 10^4$	$1,87 \times 10^4$	0,9953
D65V	PRPP	$(2,81 \pm 0,10) \times 10^2$	$36,92 \pm 4,69$	$1,40 \times 10^4$	$3,80 \times 10^2$	0,9905
	Adenina	$(4,33 \pm 0,19) \times 10^2$	$5,64 \pm 0,80$	$2,17 \times 10^4$	$3,84 \times 10^3$	0,9886
M136T	PRPP	$(3,31 \pm 0,08) \times 10^2$	$23,14 \pm 2,30$	$1,66 \times 10^4$	$7,16 \times 10^2$	0,9935
	Adenina	$(4,65 \pm 0,38) \times 10^2$	$6,51 \pm 1,63$	$2,33 \times 10^4$	$3,57 \times 10^3$	0,9681
R67Q	PRPP	$(3,14 \pm 0,10) \times 10^2$	$52,91 \pm 5,37$	$1,57 \times 10^4$	$2,97 \times 10^2$	0,9948
	Adenina	$(4,39 \pm 0,22) \times 10^2$	$6,64 \pm 1,04$	$2,19 \times 10^4$	$3,31 \times 10^3$	0,9867

As constantes cinéticas para hAPRT estão descritas na literatura na faixa de 1,1 a 2,7 μM para o K_m da adenina⁹⁸⁻¹⁰¹ e de 6 a 29 μM para o K_m do PRPP⁹⁹⁻¹⁰², baseados em experimentos a partir de lisado de eritrócito humano. Assim, os resultados obtidos para a enzima nativa estão de acordo com o esperado. Além disso, os valores também são comparáveis aos descritos para a APRT de outros organismos.

Comparando os resultados obtidos de k_{cat}/K_m para os mutantes com a enzima nativa, observa-se perdas de eficiência de uma ordem de magnitude para quase todos os mutantes. A exceção foi o mutante F173G, cujos valores foram comparáveis a hAPRT nativa.

O mutante que mais sofreu alterações frente a enzima nativa foi o R67Q, que apresentou valores de K_m muito maiores que da enzima nativa tanto para a adenina quanto para o PRPP.

4.4 Análise da Conservação Evolutiva dos Resíduos Mutados na hAPRT

Com o auxílio do servidor CONSURF⁹⁰, o grau de conservação dos resíduos nativos nas posições de cada mutação foram obtidos. Esse programa baseia-se no alinhamento da sequência da molécula em estudo com sequências homólogas. A estrutura utilizada foi a depositada sob código 1ore no PDB. O resultado está mostrado na figura 52 e na tabela 5.

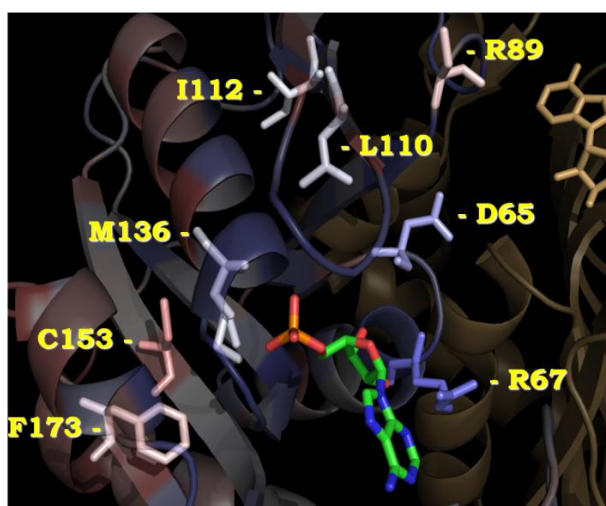


Figura 52 – Resíduos mutados em pacientes com DHA-urolitíase. A subunidade da hAPRT está detalhada com o grau de conservação do resíduo calculado com o programa CONSURF. A escala de cor indica: azul – resíduos mais conservados; vermelho – resíduos menos conservados.

Tabela 5 – Grau de conservação normalizado para cada resíduo estudado. Quanto maior o valor da pontuação, menor é a conservação do resíduo.

Resíduo	R67	D65	L110	I112	M136	R89	F173	C153
Pontuação	-1,257	-0,966	-0,270	-0,188	0,064	0,145	0,163	0,480

Ao comparar o grau de conservação de cada resíduo com os resultados da caracterização cinética dos mutantes, observa-se que há uma correlação entre os mesmos.

O resíduo R67 é o mais conservado e seu respectivo mutante R67Q foi o que apresentou maior alteração na cinética de reação frente a enzima nativa. Essa Arginina na posição 67 compõe o sítio ativo e interage diretamente com a adenina. Logo em seguida tem-se o resíduo D65, cujo mutante D65V apresentou o segundo valor de K_m para o PRPP mais discrepante quando comparado ao da hAPRT nativa.

Além disso, o grau de conservação do resíduo I112 corrobora a justificativa de precipitação do mutante I112F. Já no caso do resíduo F173, o grau de conservação obtido fortalece a hipótese de que a deleção F173 (mutação encontrada nos pacientes) está associada à desestruturação da fita β no C-terminal da enzima (Figura 53). Uma vez que a deleção é instável quando expressa e que ao utilizar a glicina como espaçador, a enzima mostra-se solúvel e quase sem perda de atividade.

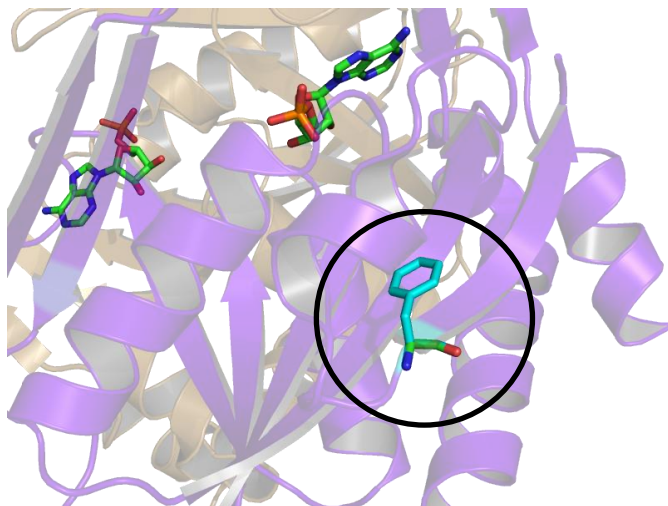


Figura 53 – Região da mutação F173G. A presença da glicina como espaçador na posição 173 parece prevenir a desestruturação da fita β no C-terminal da enzima.

4.5 Ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Visando verificar a qualidade das amostras para a realização dos ensaios de cristalização, as frações de 15 a 21 da figura 31 foram submetidas a análises de DLS conforme protocolo descrito no item 3.6. Todas apresentaram perfis similares no padrão de espalhamento de luz. A figura 54 mostra o padrão de espalhamento obtido para a hAPRT nativa.

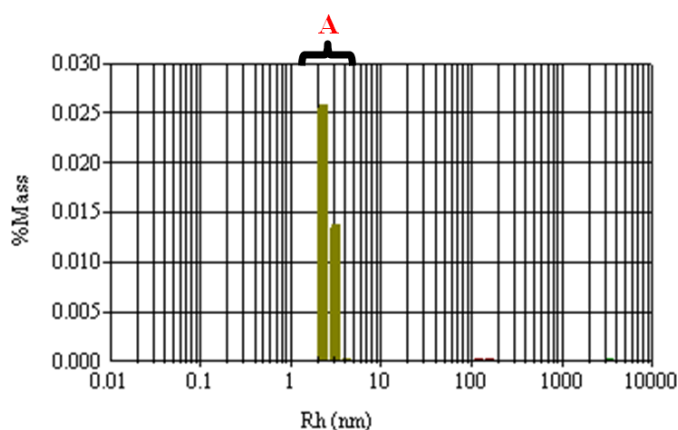


Figura 54 – Histograma representativo do Raio hidrodinâmico (Rh) da enzima hAPRT. Δ – População presente na preparação de proteína com raio médio de 2,59 nm.

Observa-se na figura 54 a presença de apenas uma população estrutural de raio hidrodinâmico médio de 2,59 nm. Assim, as amostras apresentam-se aptas para a realização dos ensaios de cristalização.

4.6 Cristalização, Coleta de Dados de Difração de Raios X, Elucidação e Refinamento da Enzima hAPRT

Para a realização dos experimentos de cristalização, cada amostra foi dividida em três frações de concentração 8 mg/mL, 5mg/mL e 3 mg/mL. O fatorial foi montado conforme o item 3.7.

Com isso, analisou-se, variando o agente precipitante e o sal, as redondezas da condição 22 (25,5% PEG 4000, 0,085 M Tris HCl pH 8,5, 0,17 M de acetato de sódio e 15% glicerol) do fatorial Cryo (Hampton Research), pois essa condição foi a que apresentou melhores resultados para a enzima nativa.

Foram obtidos cristais apenas para os mutantes F173G, R67Q e R89Q (Figura 55) nas condições 11 e 12 com a enzima a 8 mg/mL e na condição 20 com a enzima a 5 mg/mL, respectivamente.

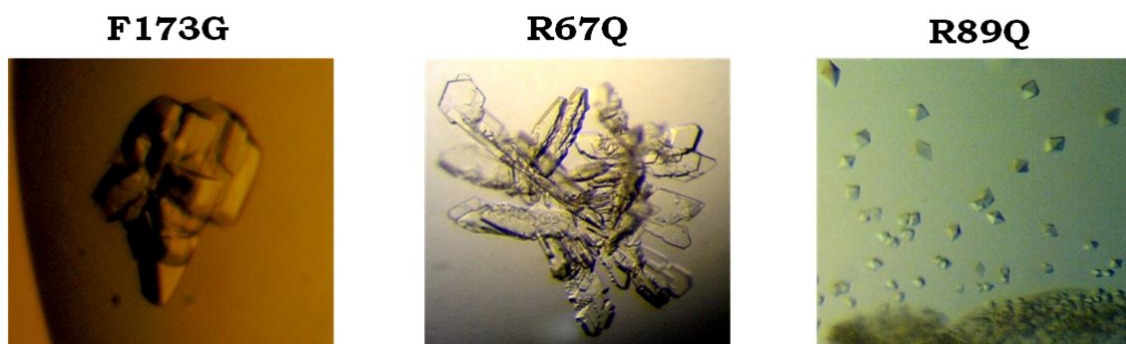


Figura 55 – Cristais dos mutantes F173G, R67Q e R89Q representativos do resultado do fatorial realizado.

Alguns cristais de cada mutante foram submetidos à coleta de dados de difração de raios X na linha de Cristalografia de Macromoléculas 2 (MX-2) no LNLS em colaboração com o Dr. Humberto Muniz. O Dr. Humberto Muniz foi responsável por toda a coleta e processamento dos dados e refinamento das estruturas.

Assim, as estruturas para os mutantes F173G, R89Q e R67Q foram resolvidas por substituição molecular e estão sendo refinadas. A estrutura da hAPRT complexada com AMP – depositada no PDB sob código 1ORE – foi utilizada como modelo de substituição molecular. As estatísticas de coleta de dados e processamento, bem como os valores correntes de R e R_{Free} para os três mutantes estão mostrados na tabela 6.

Tabela 6 – Estatística da coleta e processamento de dados e valores correntes de R e R_{Free} para os três mutantes da hAPRT.

Parâmetros da coleta de dados	R89Q	R67Q	F173G
Detector	marmosaic 225	marmosaic 225	marmosaic 225
Parâmetros da cela (Å) a, b, c	59,39, 59,39, 109,45	47,61, 47,54, 47,72	48,00, 142,20, 49,52
Resolução (Å)*	54,72-2,05 (2,16-2,05)	20,7-1,60 (1,69-1,60)	142,86-17,5 (1,84-1,75)
Grupo espacial	P4 ₃ 2 ₁ 2	P1	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Fontes de raios-X	W01B-MX2	W01B-MX2	W01B-MX2
λ (Å)	1,42	1,42	1,42
Total de imagens ($\Delta\phi$)	90	220	100
Multiplicidade	6,6 (6,6)	2,4 (2,4)	3,6 (3,3)
R_{meas} (%)	14,9 (51,9)	6,4 (22,5)	9,3 (57,1)
R_{sym} (%)	13,7 (47,8)	4,8 (17,2)	8,0 (48,3)
Completeza (%)	100,0 (100,0)	90,1 (90,1)	98,0 (98,0)
Número de reflexões	85146 (11962)	98965 (13773)	124507 (16023)
Número de reflexões únicas	12943 (1807)	40965 (5703)	34302 (4860)
$I/\sigma I$	12,9 (3,7)	15,8 (4,2)	11,2 (2,5)
R	16,94	28,13	19,01
R_{Free}	22,90	23,47	22,25

Na figura 56 podem ser observadas as mutações na estrutura da hAPRT na fase atual de refinamento. Uma vez finalizado o refinamento, será possível buscar correlações entre as alterações estruturais provocadas pelas mutações na enzima e a diminuição da eficiência catalítica demonstrada pelos dados cinéticos.

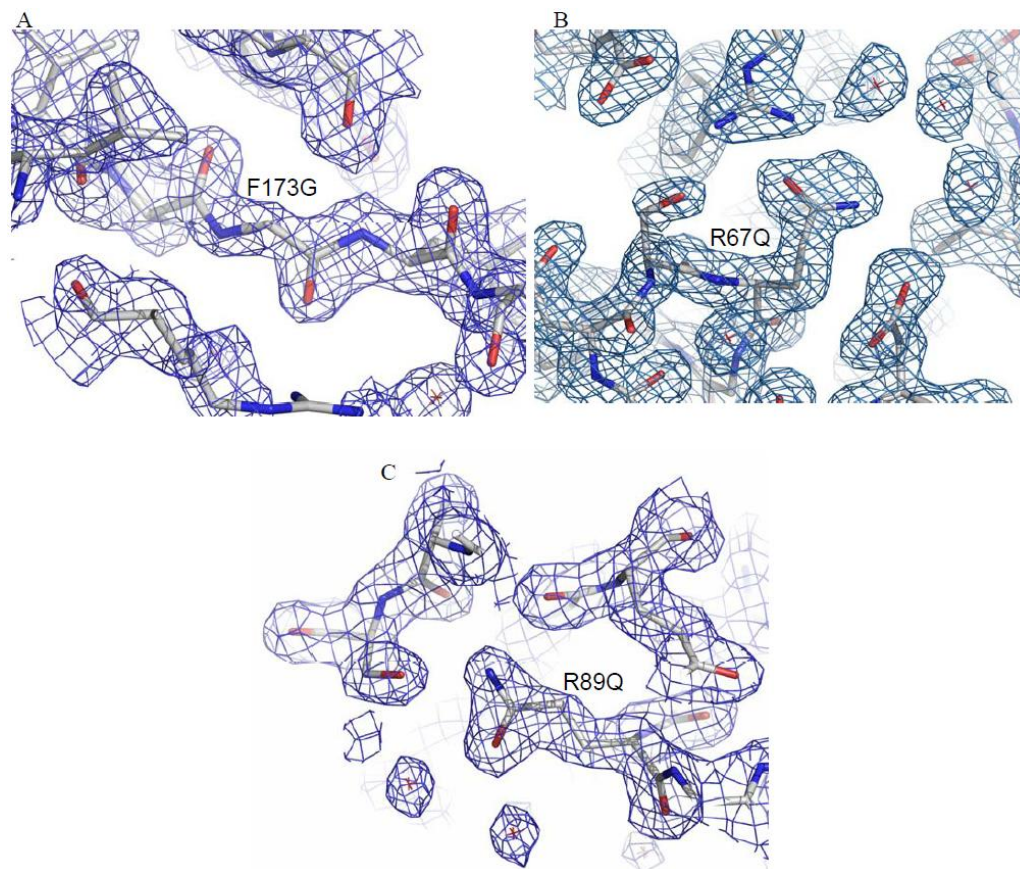


Figura 56 – Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc para as mutações nas estruturas dos mutantes da hAPRT. A – Mutante F173G, B – Mutante R67Q e C – R89Q.

Capítulo 5

Conclusões *e* *Perspectivas*

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho propôs-se a caracterizar funcionalmente mutantes da enzima hAPRT relacionados com a síndrome 2,8-DHA Urolitíase. A correlação entre a eficiência catalítica e as alterações provocadas na estrutura do mutante, quando comparado a nativa, auxilia a conhecer seu mecanismo catalítico e obter mais informações sobre a forma de atuação da doença.

Assim, a partir do gene para a APRT humana, as construções para os mutantes R67Q, R89Q, I112F e F173G foram obtidas através de mutagênese sítio-dirigida. Os mutantes D65V, L110P e M136T foram gentilmente cedidos pelo Dr. Márcio Silva. O vetor de expressão utilizado foi o pET-29a(+) e as construções foram transformadas em bactérias *Escherichia coli* BL21 (DE3). Já a mutação C153R não foi obtida com sucesso, mesmo após inúmeras tentativas de obtenção do clone.

Protocolos de expressão e purificação previamente descritos para a APRT foram testados e refinados. Após uma etapa cromatográfica na coluna CHTTM Hidroxiapatita Cerâmica obtiveram-se as enzimas em grau de pureza suficiente para andamento do trabalho. A única exceção foi o mutante I112F que se mostrou insolúvel durante a expressão. Essa insolubilidade do mutante pode ser inerente da mutação devido a troca de um resíduo alifático por um aromático em uma posição importante para a formação da folha β que compõe o “cap” responsável pela proteção dos substratos do solvente no sítio ativo.

Após a purificação, o tampão fosfato das amostras foi substituído por TEA utilizando uma etapa cromatográfica em coluna de *Desalting*. Essa troca foi realizada para evitar possíveis interferências do fosfato presente no tampão nos experimentos de cinéticas, uma vez que a enzima possui um sítio de interação com o fosfato do PRPP.

Com as amostras no tampão TEA, realizaram-se vários testes para padronizar um ensaio cinético que permitisse caracterizar de forma eficiente a hAPRT nativa e seus mutantes.

No primeiro ensaio testado a reação foi monitorada a 259 nm para verificar a taxa de formação de AMP pela enzima. Porém, os resultados obtidos possuíam grande interferência e muito ruído devido à análise não ser seletiva ao AMP. Como a adenina e o AMP possuem o mesmo grupo cromóforo, estavam presentes juntos em solução e com suas concentrações variando ao mesmo tempo, o sinal obtido era composto pela soma dos dois reagentes, inviabilizando a caracterização cinética.

Após análises de diversos ensaios descritos na literatura, observou-se que uma modificação em ensaios radioativos poderia ser conveniente para o estudo. Assim, foi proposto o monitoramento da taxa de consumo de adenina em seu comprimento de onda máximo de absorção (260,5 nm) após a precipitação do AMP e PRPP presentes em solução utilizando um sal de metal pesado.

A viabilidade deste método foi testada analisando a precipitação dos interferentes utilizando uma solução de LaCl_3 . Através da comparação de espectros de absorção molecular e estimativa da concentração do sobrenadante da precipitação, pode-se observar que o AMP e o PRPP são completamente retirados do meio enquanto que a concentração de adenina é inalterada.

Em seguida, uma varredura inicial frente aos substratos foi realizada variando a concentração na faixa de 0,78 a 100 μM . Observou-se que para concentrações altas, a saturação do meio foi atingida enquanto que o sinal das concentrações mais baixas estavam no limite de detecção do aparelho inferindo ruído a análise.

A eficiência de precipitação do LaCl_3 foi então testada e mostrou que a redução a metade do volume de solução utilizado é suficiente para precipitar os interferentes em sua totalidade e que houve um ganho significativo no sinal obtido.

Assim, os experimentos foram repetidos utilizando a nova condição de precipitação. Porém, essa metodologia também mostrou-se ineficiente para eliminar a interferência nos pontos a concentrações baixas.

Na falta de um ensaio enzimático medido diretamente por espectroscopia devido a ausência de cromóforos diferentes entre os substratos e produtos, foi testado um ensaio enzimático acoplado através da utilização de um kit comercial para a detecção de pirofosfato.

Esse ensaio acoplado foi padronizado e permitiu a caracterização cinética da hAPRT nativa e de seu mutantes. Os mutantes apresentaram perdas de eficiência de uma ordem de magnitude, com exceção do F173G, cujos valores foram comparáveis aos da hAPRT nativa.

Já os ensaios de cristalização resultaram em cristais para os mutantes F173G, R67Q e R89Q. Os cristais desses mutante foram coletados na linha de Cristalografia de Macromoléculas 2 (MX-2) no Laboratório Nacional de Luz de Síncrotron (LNLS) em colaboração com o Dr. Humberto Muniz. Estes conjuntos de dados estão sendo analisados e as estruturas estão em fase final de refinamento.

Assim, espera-se finalizar o refinamento das estruturas para averiguar as correlações entre a perda de atividade enzimática e as alterações provocadas pelas mutações nas estruturas das enzimas.

Para a continuidade do trabalho, fazem-se necessários novos ensaios de cristalização com os 4 mutantes restantes. A obtenção de cristais e posterior resolução da estrutura tridimensional de outros mutantes contribuirão para um maior entendimento do mecanismo de atuação da síndrome 2,8-DHA Urolitíase.

Referências

REFERÊNCIAS

1 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4 ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2005.

2 LODISH, H.; BERK, A.; SCOTT, M. P.; ZIPURSKY, L.; KAISER, C. A.; DARNELL, J.; MATSUDAIRA, P.; KRIEGER, M. **Molecular cell biology**. 5 ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2004.

3 BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5 ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2002.

4 CHARGAFF, E.; LIPSHITZ, R.; GREEN, C. Composition of the desoxyribose nucleic acids of four genera of sea-urchin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 155-160, 1952.

5 CHARGAFF, E.; LIPSHITZ, R.; GREEN, C.; HODES, M. E. The composition of the deoxyribonucleic acid of salmon sperm. **Journal of Biological Chemistry**, v. 192, n. 1, p. 223-230, 1951.

6 KORNBERG, A. Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. **Science**, v. 131, p. 1503-1508, 1960.

7 BANSAL, M. DNA structure: revisiting the watson-crick double helix. **Current Science**, v. 85, n. 11, p. 1556-1563, 2003.

8 BECKER, M. A.; ROESSLER, B. J. Hyperuricemia and gout. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 7 ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division, 1995. cap. 49, p. 1655-1678.

9 ROSSITER, B. J. F.; CASKEY, C. T. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency: Lesh-nyhan syndrome and gout. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 7 ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division, 1995. cap. 50, p. 1679-1706.

- 10 REICHARD, P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, p. 349-374, 1988.
- 11 BECKER, M. A.; RAIVIO, K. O.; SEEGMILLER, J. E. Synthesis of phosphoribosylpyrophosphate in mammalian cells. **Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology**, v. 49, p. 281-306, 1979.
- 12 BECKER, M. A.; KIM, M. Regulation of purine synthesis de novo in human fibroblasts by purine nucleotides and phosphoribosylpyrophosphate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 30, p. 14531-14537, 1987.
- 13 TOZZI, M. G.; CAMICI, M.; MASCIA, L.; SGARRELLA, F.; IPATA, P. L. Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism. **Febs Journal**, v. 273, n. 6, p. 1089-1101, 2006.
- 14 MURRAY, A. W. The biological significance of purine salvage. **Annual Review of Biochemistry**, v. 40, p. 811-826, 1971.
- 15 DAUBNER, S. C.; SCHRIMSHER, J. L.; SCHENDEL, F. J.; YOUNG, M.; HENIKOFF, S.; PATTERSON, D.; STUBBE, J.; BENKOVIC, S. J. A multifunctional protein possessing glycinamide ribonucleotide synthetase, glycinamide ribonucleotide transformylase, and aminoimidazole ribonucleotide synthetase activities in de novo purine biosynthesis. **Biochemistry**, v. 24, n. 25, p. 7059-7062, 1985.
- 16 HOLMES, E. W.; WYNGAARDEN, J. B.; KELLEY, W. N. Human glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. Two molecular forms interconvertible by purine ribonucleotides and phosphoribosylpyrophosphate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 17, p. 6035-6040, 1973.
- 17 HOLMES, E. W.; KING, G. L.; LEYVA, A.; SINGER, S. C. A purine auxotroph deficient in phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase and phosphoribosylpyrophosphate aminotransferase activities with normal activity of ribose-5-phosphate aminotransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 7, p. 2458-2461, 1976.
- 18 AVERILL, B. A.; DWIVEDI, A.; DEBRUNNER, P.; VOLLMER, S. J.; WONG, J. Y.; SWITZER, R. L. Evidence for a tetranuclear iron-sulfur center in glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from bacillus-subtilis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 13, p. 6007-6010, 1980.

- 19 HOLMES, E. W. Kinetic, physical, and regulatory properties of amidophosphoribosyltransferase. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 19, p. 215-231, 1980.
- 20 MANFREDI, J. P.; HOLMES, E. W. Purine salvage pathways in myocardium. **Annual Review of Physiology**, v. 47, p. 691-705, 1985.
- 21 MURRAY, A. W.; ELLIOTT, D. C.; ATKINSON, M. R. Nucleotide biosynthesis from preformed purines in mammalian cells: Regulatory mechanisms and biological significance. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 10, p. 87-119, 1970.
- 22 DEJONG, J. W.; KALKMAN, C. Myocardial adenosine kinase - activity and localization determined with rapid, radiometric assay. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 320, n. 2, p. 388-396, 1973.
- 23 SCHUTZ, W.; SCHRADER, J.; GERLACH, E. Different sites of adenosine formation in the heart. **American Journal of Physiology**, v. 240, n. 6, p. H963-H970, 1981.
- 24 SHI, W. X.; SARVER, A. E.; WANG, C. C.; TANAKA, K. S. E.; ALMO, S. C.; SCHRAMM, V. L. Closed site complexes of adenine phosphoribosyltransferase from giardia lamblia reveal a mechanism of ribosyl migration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39981-39988, 2002.
- 25 SILVA, M. **Aspectos de biologia molecular, estrutural e funcional da adenina fosforribosiltransferase de *homo sapiens* e seu envolvimento na síndrome urolitíase**. 2005. 70p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- 26 FOCIA, P. J.; CRAIG, S. P.; EAKIN, A. E. Approaching the transition state in the crystal structure of a phosphoribosyltransferase. **Biochemistry**, v. 37, n. 49, p. 17120-17127, 1998.
- 27 MUSICK, W. D. L. Structural features of the phosphoribosyltransferases and their relationship to the human deficiency disorders of purine and pyrimidine metabolism. **Crc Critical Reviews in Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 1-34, 1981.
- 28 PHILLIPS, C. L.; ULLMAN, B.; BRENNAN, R. G.; HILL, C. P. Crystal structures of adenine phosphoribosyltransferase from leishmania donovani. **Embo Journal**, v. 18, n. 13, p. 3533-3545, 1999.
- 29 SHI, W. X.; LI, C. M.; TYLER, P. C.; FURNEAUX, R. H.; GRUBMEYER, C.; SCHRAMM, V. L.; ALMO, S. C. The 2.0 angstrom structure of human hypoxanthineguanine

phosphoribosyltransferase in complex with a transition-state analog inhibitor. **Nature Structural Biology**, v. 6, n. 6, p. 588-593, 1999.

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

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

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

33 VOS, S.; PARRY, R. J.; BURNS, M. R.; DE JERSEY, J.; MARTIN, J. L. Structures of free and complexed forms of *escherichia coli* xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. **Journal of Molecular Biology**, v. 282, n. 4, p. 875-889, 1998.

34 SCAPIN, G.; OZTURK, D. H.; GRUBMEYER, C.; SACCHETTINI, J. C. The crystal-structure of the orotate phosphoribosyltransferase complexed with orotate and alpha-d-5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate. **Biochemistry**, v. 34, n. 34, p. 10744-10754, 1995.

35 MURZIN, A. G.; BRENNER, S. E.; HUBBARD, T.; CHOTHIA, C. Scop - a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, n. 4, p. 536-540, 1995.

36 CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical-clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

37 SIMMONDS, H. A.; SAHOTA, A. S.; ACKER, K. J. V. Adenine phosphoribosyltransferase deficiency and 2,8-dihydroxyadenine lithiasis. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 7 ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division, 1995. cap. 51, p. 1707-1725.

38 BRODERICK, T. P.; SCHAFF, D. A.; BERTINO, A. M.; DUSH, M. K.; TISCHFIELD, J. A.; STAMBROOK, P. J. Comparative anatomy of the human aprt gene and enzyme - nucleotide-sequence divergence and conservation of a nonrandom cpg dinucleotide arrangement. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 10, p. 3349-3353, 1987.

- 39 SRIVASTA.SK; BEUTLER, E. Purification and kinetic studies of adenine phosphoribosyltransferase from human erythrocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 142, n. 2, p. 426-&, 1971.
- 40 THOMAS, C. B.; ARNOLD, W. J.; KELLEY, W. N. Human adenine phosphoribosyltransferase - purification, subunit structure, and substrate-specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 7, p. 2529-2535, 1973.
- 41 DI PIETRO, V.; PERRUZZA, I.; AMORINI, A. M.; BALDUCCI, A.; CECCARELLI, L.; LAZZARINO, G.; BARSOTTI, P.; GIARDINA, B.; TAVAZZI, B. Clinical, biochemical and molecular diagnosis of a compound homozygote for the 254 bp deletion-8 bp insertion of the aprt gene suffering from severe renal failure. **Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 1-2, p. 73-80, 2007.
- 42 BARRATT, T. M.; SIMMONDS, H. A.; CAMERON, J. S.; POTTER, C. F.; ROSE, G. A.; ARKELL, D. G.; WILLIAMS, D. I. Complete deficiency of adenine phosphoribosyltransferase - 3rd case presenting as renal stones in a young-child. **Archives of Disease in Childhood**, v. 54, n. 1, p. 25-31, 1979.
- 43 CEBALLOSPICOT, I.; PERIGNON, J. L.; HAMET, M.; DAUDON, M.; KAMOUN, P. 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis, an underdiagnosed disease. **Lancet**, v. 339, n. 8800, p. 1050-1051, 1992.
- 44 CHEVET, D.; LEPOGAMP, P.; GIE, S.; GARY, J.; DAUDON, M.; HAMET, M. 2.8 dihydroxyadenine (2.8 oha) urolithiasis in an adult - complete adenine phosphoribosyl transferase (aprt) deficiency - family study. **Kidney International**, v. 26, n. 2, p. 226-227, 1984.
- 45 CHIBA, P.; ZWIAUER, K.; MULLER, M. M. Characterization of an adenine phosphoribosyltransferase deficiency. **Clinica Chimica Acta**, v. 172, n. 2-3, p. 141-147, 1988.
- 46 DEBRAY, H.; CARTIER, P.; TEMSTET, A.; CENDRON, J. Childs urinary lithiasis revealing a complete deficit in adenine phosphoribosyl transferase. **Pediatric Research**, v. 10, n. 8, p. 762-766, 1976.
- 47 FRICK, J.; SARICA, K.; KOHLE, R.; KUNIT, G. Long-term follow-up after extracorporeal shock-wave lithotripsy in children. **European Urology**, v. 19, n. 3, p. 225-229, 1991.

48 GAULT, M. H.; SIMMONDS, H. A.; SNEDDEN, W.; DOW, D.; CHURCHILL, D. N.; PENNEY, H. Urolithiasis due to 2,8-dihydroxyadenine in an adult. **New England Journal of Medicine**, v. 305, n. 26, p. 1570-1572, 1981.

49 GLEESON, M. J.; GRIFFITH, D. P. Distribution of patients with 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis and adenine phosphoribosyltransferase deficiency in japan. **Journal of Urology**, v. 142, n. 3, p. 834-834, 1989.

50 GREENWOOD, M. C.; DILLON, M. J.; SIMMONDS, H. A.; BARRATT, T. M.; PINCOTT, J. R.; METREWELI, C. Renal-failure due to 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis. **European Journal of Pediatrics**, v. 138, n. 4, p. 346-349, 1982.

51 HAMET, M.; CARTIER, P.; VINCENS, A. Complete adenine phosphoribosyltransferase (aprt) deficiency in 2 sibling - report of a new case. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 17, n. 6, p. 412-412, 1979.

52 HESSE, A.; MIERSCH, W. D.; CLASSEN, A.; THON, A.; DOPPLER, W. 2,8-dihydroxyadeninuria - laboratory diagnosis and therapy control. **Urologia Internationalis**, v. 43, n. 3, p. 174-178, 1988.

53 JOOST, J.; DOPPLER, W. 2,8-dihydroxyadenine stone in children. **Urology**, v. 20, n. 1, p. 67-70, 1982.

54 JUNG, P.; BECHT, E.; ZIEGLER, M.; BOMMERT, R.; BACH, K.; HAAS, H. J. New diagnostic and therapeutic aspects of 2,8-dihydroxyadenine lithiasis - another case of complete adenine phosphoribosyltransferase deficiency. **European Urology**, v. 14, n. 6, p. 493-497, 1988.

55 KISHI, T. et al. Complete deficiency of adenine phosphoribosyltransferase - a report of 3 cases and immunological and phagocytic investigations. **Pediatric Research**, v. 18, n. 1, p. 30-34, 1984.

56 LAMONTAGNE, A. E. 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis - report of a case in a woman in the united-states. **Journal of Urology**, v. 142, n. 2, p. 369-370, 1989.

57 LAXDAL, T.; JONASSON, T. A. Adenine phosphoribosyltransferase deficiency in iceland. **Acta Medica Scandinavica**, v. 224, n. 6, p. 621-626, 1988.

58 MANYAK, M. J.; FRENSELLI, F. J.; MILLER, H. C. 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis - report of an adult case in the united-states. **Journal of Urology**, v. 137, n. 2, p. 312-314, 1987.

59 SCHABEL, F.; DOPPLER, W.; HIRSCHKAUFFMANN, M.; GLATZL, J.; SCHWEIGER, M.; BERGER, H.; HEINZERIAN, P. Hereditary-deficiency of adenine phosphoribosyl transferase. **Padiatrie Und Padologie**, v. 15, n. 3, p. 233-238, 1980.

60 SIMMONDS, H. A. 2,8-dihydroxyadenine lithiasis. **Clinica Chimica Acta**, v. 160, n. 2, p. 103-108, 1986.

61 SIMMONDS, H. A.; VANACKER, K. J.; CAMERON, J. S.; SNEDDEN, W. Identification of 2,8-dihydroxyadenine, a new component of urinary stones. **Biochemical Journal**, v. 157, n. 2, p. 485-487, 1976.

62 USENIUS, J. P.; RUOPURO, M. L.; USENIUS, R. Adenine phosphoribosyltransferase deficiency - 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis in a 48-year-old woman. **British Journal of Urology**, v. 62, n. 6, p. 521-524, 1988.

63 VANACKER, K. J.; SIMMONDS, H. A.; POTTER, C.; CAMERON, J. S. Complete deficiency of adenine phosphoribosyltransferase - report of a family. **New England Journal of Medicine**, v. 297, n. 3, p. 127-132, 1977.

64 WITTEN, F. R.; MORGAN, J. W.; FOSTER, J. G.; GLENN, J. F. 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis - review of the literature and report of a case in the united-states. **Journal of Urology**, v. 130, n. 5, p. 938-942, 1983.

65 FUJIMORI, S.; AKAOKA, I.; SAKAMOTO, K.; YAMANAKA, H.; NISHIOKA, K.; KAMATANI, N. Common characteristics of mutant adenine phosphoribosyltransferases from 4 separate japanese families with 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis associated with partial enzyme deficiencies. **Human Genetics**, v. 71, n. 2, p. 171-176, 1985.

66 KAMATANI, N.; HAKODA, M.; OTSUKA, S.; YOSHIKAWA, H.; KASHIWAZAKI, S. Only 3 mutations account for almost all defective alleles causing adenine phosphoribosyltransferase deficiency in japanese patients. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 1, p. 130-135, 1992.

67 KAMATANI, N.; KUROSHIMA, S.; TERAJ, C.; KAWAI, K.; MIKANAGI, K.; NISHIOKA, K. Selection of human-cells having 2 different types of mutations in individual cells (genetic artificial mutants) - application to the diagnosis of the heterozygous state for a

type of adenine phosphoribosyltransferase deficiency. **Human Genetics**, v. 76, n. 2, p. 148-152, 1987.

68 KAMATANI, N.; KUROSHIMA, S.; YAMANAKA, H.; NAKASHE, S.; TAKE, H.; HAKODA, M. Identification of a compound heterozygote for adenine phosphoribosyltransferase deficiency (aprt-star-j aprt-star-q0) leading to 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis. **Human Genetics**, v. 85, n. 5, p. 500-504, 1990.

69 KAMATANI, N.; SONODA, T.; NISHIOKA, K. Distribution of patients with 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis and adenine phosphoribosyltransferase deficiency in Japan. **Journal of Urology**, v. 140, n. 6, p. 1470-1472, 1988.

70 KAMATANI, N.; TAKEUCHI, F.; NISHIDA, Y.; YAMANAKA, H.; NISHIOKA, K.; TATARA, K.; FUJIMORI, S.; KANEKO, K.; AKAOKA, I.; TOFUKU, Y. Severe impairment in adenine metabolism with a partial deficiency of adenine phosphoribosyltransferase. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 34, n. 2, p. 164-168, 1985.

71 KAMATANI, N.; TERAJ, C.; KUROSHIMA, S.; NISHIOKA, K.; MIKANAGI, K. Genetic and clinical-studies on 19 families with adenine phosphoribosyltransferase deficiencies. **Human Genetics**, v. 75, n. 2, p. 163-168, 1987.

72 SAHOTA, A.; CHEN, J.; BEHZADIAN, M. A.; RAVINDRA, R.; TAKEUCHI, H.; STAMBROOK, P. J.; TISCHFIELD, I. A. 2,8-dihydroxyadenine lithiasis in a japanese patient heterozygous at the adenine phosphoribosyltransferase locus. **American Journal of Human Genetics**, v. 48, n. 5, p. 983-989, 1991.

73 TAKEUCHI, F.; MATSUTA, K.; MIYAMOTO, T.; ENOMOTO, S.; FUJIMORI, S.; AKAOKA, I.; KAMATANI, N.; NISHIOKA, K. Rapid method for the diagnosis of partial adenine phosphoribosyltransferase deficiencies causing 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis. **Human Genetics**, v. 71, n. 2, p. 167-170, 1985.

74 CHEN, J.; SAHOTA, A.; LAXDAL, T.; SCRINE, M.; BOWMAN, S.; CUI, C.; STAMBROOK, P. J.; TISCHFIELD, J. A. Identification of a single missense mutation in the adenine phosphoribosyltransferase (aprt) gene from 5 icelandic patients and a british patient. **American Journal of Human Genetics**, v. 49, n. 6, p. 1306-1311, 1991.

75 CHEN, J.; SAHOTA, A.; MARTIN, G. F.; HAKODA, M.; KAMATANI, N.; STAMBROOK, P. J.; TISCHFIELD, J. A. Analysis of germline and invivo somatic mutations in the human adenine phosphoribosyltransferase gene - mutational hot-spots at the intron-4 splice donor site and at codon-87. **Mutation Research**, v. 287, n. 2, p. 217-225, 1993.

76 HIDAKA, Y.; PALELLA, T. D.; OTOOLE, T. E.; TARLE, S. A.; KELLEY, W. N. Human adenine phosphoribosyltransferase - identification of allelic mutations at the nucleotide level as a cause of complete deficiency of the enzyme. **Journal of Clinical Investigation**, v. 80, n. 5, p. 1409-1415, 1987.

77 SAHOTA, A.; CHEN, J.; BYE, S.; JAING, J.; BERENYI, M.; FEKETE, G.; TISCHFIELD, J. A. Occurrence of a missense mutation in one allele and a 7-basepair deletion in the other allele in a patient with adenine phosphoribosyltransferase deficiency. **Human Mutation**, v. 3, n. 3, p. 315-317, 1994.

78 KUNKEL, T. A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 2, p. 488-492, 1985.

79 SUGIMOTO, M.; ESAKI, N.; TANAKA, H.; SODA, K. A simple and efficient method for the oligonucleotide-directed mutagenesis using plasmid DNA-template and phosphorothioate-modified nucleotide. **Analytical Biochemistry**, v. 179, n. 2, p. 309-311, 1989.

80 TAYLOR, J. W.; OTT, J.; ECKSTEIN, F. The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high-frequency using phosphorothioate-modified DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 24, p. 8765-8785, 1985.

81 VANDEYAR, M. A.; WEINER, M. P.; HUTTON, C. J.; BATT, C. A. A simple and rapid method for the selection of oligodeoxynucleotide-directed mutants. **Gene**, v. 65, n. 1, p. 129-133, 1988.

82 KAWASAKI, T.; TAKAHASHI, S.; IKEDA, K. Hydroxyapatite high-performance liquid-chromatography - column performance for proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 152, n. 2, p. 361-371, 1985.

83 GAGNON, P.; FROST, R.; TUNÓN, P.; OGAWA, T. Chttm ceramic hydroxyapatite – a new dimension in chromatography of biological molecules. **Bio-Rad Tech Note**, v. 2156, p. 1-4, 1996.

84 BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

- 85 TUTTLE, J. V.; KRENITSKY, T. A. Purine phosphoribosyltransferases from leishmania-donovani. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 3, p. 909-916, 1980.
- 86 BAKAY, B.; TELFER, M. A.; NYHAN, W. L. Assay of hypoxanthine-guanine and adenine phosphoribosyl transferases. A simple screening test for lesch-nyhan syndrome and related disorders of purine metabolism. **Biochemical Medicine**, v. 3, n. 3, p. 230-&, 1969.
- 87 HOLDEN, J. A.; MEREDITH, G. S.; KELLEY, W. N. Human adenine phosphoribosyltransferase - affinity purification, subunit structure, amino-acid composition, and peptide-mapping. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 15, p. 6951-6955, 1979.
- 88 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-&, 1967.
- 89 JOHNSON, L. A.; GORDON, R. B.; EMMERSON, B. T. Adenine phosphoribosyltransferase - simple spectrophotometric assay and incidence of mutation in normal population. **Biochemical Genetics**, v. 15, n. 3-4, p. 265-272, 1977.
- 90 ASHKENAZY, H.; EREZ, E.; MARTZ, E.; PUPKO, T.; BEN-TAL, N. Consurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Ressearch**, v. 38, n. Web Server issue, p. W529-W533, 2010.
- 91 SCHRODINGER, L. L. C., **The Pymol molecular graphics system**: version 0.99rc6. DeLano Scientific, USA, 2006.
- 92 BLUNDELL, T. L.; JOHNSON, L. N. **Protein crystallography**. London: Academic Press, 1976. 66p.
- 93 LESLIE, A. G. W. Recent changes to the mosflm package for processing film and image plate data **Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography**, v. 26, 1992.
- 94 EVANS, P. Scaling and assessment of data quality. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 62, p. 72-82, 2006.
- 95 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, p. 658-674, 2007.

- 96 ADAMS, P. D. et al. Phenix: A comprehensive python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 66, p. 213-221, 2010.
- 97 EMSLEY, P.; LOHKAMP, B.; SCOTT, W. G.; COWTAN, K. Features and development of coot. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 66, p. 486-501, 2010.
- 98 DELBARRE, F.; AUSCHER, C.; AMOR, B.; GERY, A. D.; CARTIER, P.; HAMET, M. Gout with adenine phosphoribosyl transferase deficiency. **Biomedicine Express**, v. 21, n. 2, p. 82-85, 1974.
- 99 HENDERSON, J. F.; MILLER, H. R.; KELLEY, W. N.; ROSENBLOOM, F. M.; SEEGMILLER, J. E. Kinetic studies of mutant human erythrocyte adenine phosphoribosyltransferases. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 46, n. 7, p. 703-&, 1968.
- 100 KELLEY, W. N.; LEVY, R. I.; ROSENBLOOM, F. M.; HENDERSON, J. F.; SEEGMILLER, J. E. Adenine phosphoribosyltransferase deficiency - a previously undescribed genetic defect in man. **Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 10, p. 2281-&, 1968.
- 101 DEAN, B. M.; WATTS, R. W. E.; WESTWICK, W. J. Human erythrocyte amp: Pyrophosphate phosphoribosyltransferase (ec 2.4.2.7). **Febs Letters**, v. 1, n. 3, p. 179-182, 1968.
- 102 FOX, I. H.; MEADE, J. C.; KELLEY, W. N. Adenine phosphoribosyltransferase deficiency in man - report of a second family. **American Journal of Medicine**, v. 55, n. 5, p. 614-620, 1973.

APÊNDICE A

Outras atividades desenvolvidas no período

A pentacyclic triterpene from *Maytenus imbricata*: structure elucidation by X-ray crystallography

Alécio Antonio Pimenta Jr. ·
Sílvia Ribeiro de Souza e Silva ·
Grácia Divina de Fátima Silva ·
Luiz Cláudio de Almeida Barbosa · Javier Ellena ·
Antonio Carlos Doriguetto

Received: 13 December 2005 / Accepted: 3 March 2006 / Published online: 12 May 2006
© Springer Science+Business Media, Inc. 2006

Abstract A pentacyclic triterpene, $3\beta,30$ -dihydroxy-lup-20(29)-ene, was isolated from the powder extract of *Maytenus imbricata*. The structure and stereochemistry of the compound were established by spectroscopic techniques and unambiguously determined by single crystal X-ray crystallography. The crystal structure shows one molecule in the asymmetric unit. The crystal packing is stabilized by O–H...O intermolecular hydrogen bonds, which give rise to infinite helical chains along the *c* unit cell axis. The intramolecular geometry was analyzed using MOGUL, a knowledge base of molecular geometry derived from the Cambridge Structural Database (CSD).

Keywords Pentacyclic triterpene · *Maytenus imbricata* · Crystal structure · Intermolecular geometry

Introduction

Maytenus is the better-known genus of the Celastraceae family because many specimens are used in medicine folk in

different Brazilian regions shown a diversity of secondary metabolites, like as flavonoids, glycosides, maitansinoids, alkaloidic and non alkaloidic sesquiterpenes, friedelanes, oleananes, lupanes, quinonoids triterpenes and others pentacyclic triterpenes (PCTT) [1]. PCTT are commonly isolated from plants of the Celastraceae family and to them are attributed pharmacological properties, such as antiseptic, anti-asthmatic and antimicrobial action [2, 3], antispermato-genic [4], antispasmodic [5], analgesic and anti-ulcer effect [6, 7], insecticide [8, 9], antitumoral [10], moluscicide, allelopathic and anti-inflammatory effects [11]. *Maytenus imbricata* Mart. Ex Reissek is encountered in Cerrado regions of Minas Gerais and Bahia states of Brazil.

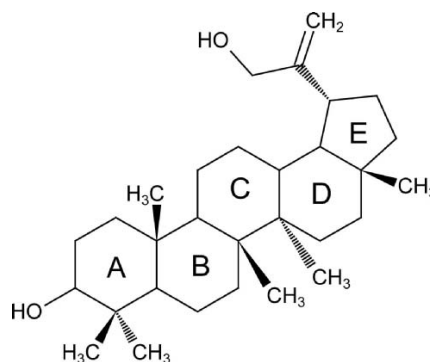
This paper reports the crystal structure of a PCTT (1) that was isolated during the phytochemical investigation of *Maytenus imbricata* (Celastraceae). Its molecular structure and its relative stereochemistry have been previous established by us with one-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) NMR techniques (DEPT, HSQC, HMBC and NOESY) [12]. The goal of the present work is to determine unambiguously the molecular configuration of (1) and to

A. A. Pimenta Jr. · J. Ellena
Instituto de Física de São Carlos – USP,
Cx. postal 369, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

S. R. de Souza e Silva · G. D. de Fátima Silva
NEPLAM-Departamento de Química,
Universidade Federal de Minas Gerais,
Cx. postal 702, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

L. C. de Almeida Barbosa
Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa,
36571-000 Viçosa, MG, Brazil

A. C. Doriguetto (✉)
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG,
37130-000 Alfenas, MG, Brazil
e-mail: doriguetto@unifal-mg.edu.br



(1)

describe its intra and inter-molecular geometry by X-ray crystallography.

Materials and methods

Material and physical measurements

All chemicals were of analytical or chromatography grade. The melting point was obtained on a MQAPF-301/MicroQuímica; IR spectra were obtained with a KBr disc, using a Perkin Elmer 1000 spectrophotometer. CI-MS was carried out with a Finningan MAT CGQ spectrometer. For TLC were used plates of silica gel G-60/ F_{254} nm (0.25 mm, Merck) previously activated in a stove at 100°C. Plates were viewed with ultraviolet light, acid solution of vanillin (0.1 g/100 mL of phosphoric acid (50% aqueous solution) or phosphomolibdic acid [13].

Plant material, extraction and compound isolation

The compound was isolated from stems and branches of *M. imbricata* Mart. Ex Reissek (Celastraceae) by powder extraction in a Soxhlet apparatus. The plant material was collected in the “Morro de Santana” region, Ouro Preto city, Minas Gerais, Brazil. A voucher specimen was deposited at Herbarium of the Botany Department of Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brazil (Collection No. 27780).

During hexane evaporation a white solid formation occurred. This solid gives Liebermann-Burchard test positive for PCTT. A sample of 500 mg of this solid was submitted to a column chromatography (Merck SiO₂, 70–230 Mesh, 15 g) and eluted with benzene, hexane-ethyl acetate and methanol. Fractions 1–23 (150 mL each) were collected using benzene as eluent. Fractions 26 and 27 (210 mg) eluted with hexane-ethyl acetate (7:3, v/v) were dissolved in chloroform and after 24 h a formation of a white solid (25 mg) was observed. This solid was submitted to column chromatography using hexane-ethyl acetate (4:1, v/v) as eluent and 35 fractions of 10 mL each were collected, resulting in the compound isolation (21 mg).

NMR spectra

NMR spectra were recorded on a Bruker DRX 400 AVANCE spectrometer operating at 400 or 100 MHz, respectively. CDCl₃ was used as solvent (5–10 mg of sample/0.5 mL of solvent) and TMS as internal standard were used. ¹H and ¹³C NMR spectra were obtained in standard conditions. To obtain 2D of ¹H, ¹H-NOESY was used a standard pulse sequence of the spectrometer with 350 ms of mixture time. The two-dimensional heteronuclear correlation spectra (HSQC)-

Edit was obtained using 5 mm probe of inverse detection equipped with field gradient coil. The long distance two-dimensional heteronuclear correlation spectra (HMBC)-field gradient were obtained using a standard pulse sequence. The data obtained were processing using a work station with a XWIN-NMR version 3.1 program for Windows XP®.

X-ray crystallography

Colorless prismatic single crystals were obtained by recrystallization in a 2:1 hexane and ethyl acetate mixture. Room temperature X-ray diffraction data collection was performed on an Enraf-Nonius Kappa-CCD diffractometer using graphite-monochromated Mo K α radiation (0.71073 Å). Data were collected up to 52° in 2θ , with a redundancy of 4. The final unit cell parameters were based on all reflections. Data collections were made using the COLLECT program [14]; integration and scaling of the reflections were performed with the HKL Denzo-Scalepack system of programs [15].

The structure was solved by direct methods with SHELXS-97 [16]. The model was refined by full-matrix least squares on F^2 with SHELXL-97 [17]. All hydrogen atoms were stereochemically positioned and refined with the riding model [17]. Hydrogen atoms of the CH and CH₂ groups were set isotropic with a thermal parameter 20% greater than the equivalent isotropic displacement parameter of the atom

Table 1 Crystal data, data collection details and structure refinement results

Molecular formula	C ₃₀ H ₅₀ O ₂
Formula weight	442.70
Crystal system	Tetragonal
Space group	$P4_1$
Unit cell dimensions	
<i>a</i> (Å)	19.038(1)
<i>c</i> (Å)	7.2290(4)
Volume (Å ³)	2620.1(3)
<i>Z</i>	4
Density (calculated) (Mg m ⁻³)	1.122
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.067
<i>F</i> (0 0 0)	984
Crystal size (mm ³)	0.18 × 0.06 × 0.04
θ range for data collection (°)	2.910–26.0
Index ranges	– 22 ≤ <i>h</i> ≤ 22, – 22 ≤ <i>k</i> ≤ 21, – 8 ≤ <i>l</i> ≤ 7
Reflection collected	15782
Completeness to $\theta = 26.0^\circ$ (%)	99.6
Absorption correction	None
Data/restraints/parameters	4279/1/298
Goodness-of-fit on F^2	1.000
Final <i>R</i> indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0538$, $\omega R_2 = 0.1109$
<i>R</i> indices (all data)	$R_1 = 0.1144$, $\omega R_2 = 0.1379$
Extinction coefficient	0.013(2)
Largest diff. peak and hole (eÅ ⁻³)	0.143 and – 0.156

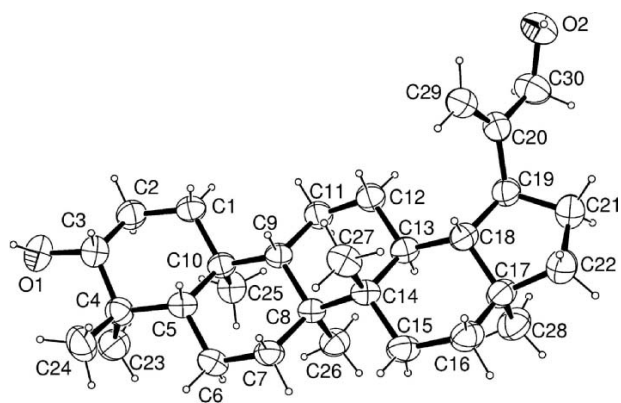
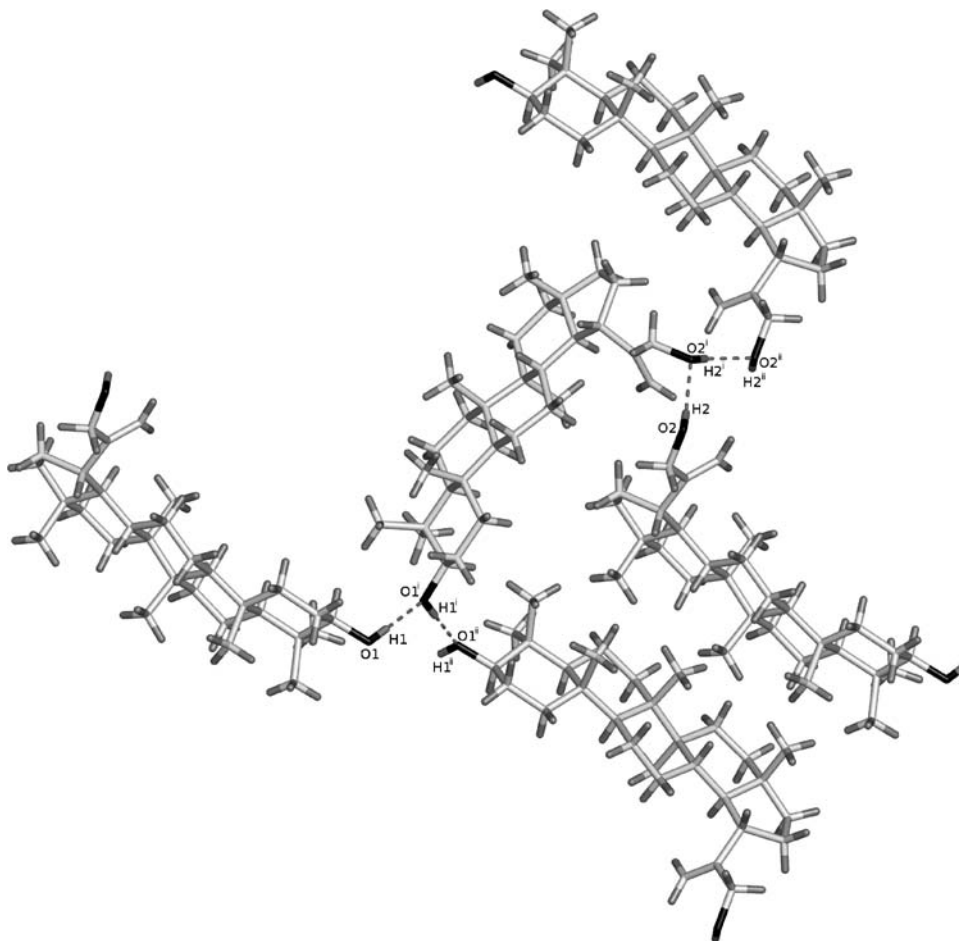


Fig. 1 ORTEP-3 [18] view of the molecular structure of (1), showing the atom-labeling scheme. Displacement ellipsoids are drawn at the 50% probability level and H atoms are shown as spheres of arbitrary radii

to which each one was bonded. This percentage was set to 50% for the hydrogen atoms of the CH₃ and OH groups. Data collections and experimental details for (1) are summarized in Table 1. The programs SHELXL-97 [17] and ORTEP-3 [18] were used within WinGX [19] to prepare materials for publication. The program Mercury [20] was

Fig. 2 View of the network of hydrogen bonds parallel to [0 0 1]. Symmetry codes: (i) $1-y, x, \frac{1}{4} + z$; (ii) $-y, x, \frac{1}{4} + z$



used to prepare the molecular graphics. The Flack parameter was not refined during X-ray crystallographic analysis: The most electron-rich atom is oxygen, which does not have an anomalous scattering large enough (using Mo K α radiation) to permit determination of the enantiomer present by X-ray diffraction.

Results and discussion

Spectra characteristics

From the mass spectrometry (MS), ¹H and ¹³C NMR and X-ray data it was possible to determine the molecular formula C₃₀H₅₀O₂. The MS showed the molecular ion at *m/z* 442 and fragments at *m/z* 424 (4, [M-H₂O]), 384 (5, [M-C₃H₂O]), 220 (18, [M-C₁₅H₂₄O]⁺) and 205 (14, [M-C₁₆H₂₉O]). Absorption bands at 3500–3100, 3000–2700 and 1470–1350 cm⁻¹ in the IR spectrum showed the presence of hydroxyl groups and the hydrocarbon nature of the compound.

The analysis of ¹H NMR spectral data [12] indicated the presence of two hydroxyl groups and double bond in the

structure of the compound (1). It was observed two doublets, one at δ_{H} 4.16 and the other at δ_{H} 4.11 relates to a primary alcoholic group (CH_2OH); a double doublet at δ_{H} 3.19 characteristic of methinic hydrogen; a singlet at δ_{H} 4.99 and other double doublet at δ_{H} 5.00 related to olefinic hydrogen. The ^{13}C NMR and DEPT-135 spectra show 29 signals establishing the presence of five methyl, 12 methylene and six methane groups and also six quaternary carbons. The ^1H NMR spectrum shows a signal at δ_{H} 0.78 with high intensity indicating a superposition of the hydrogen signals of two methyl groups. This fact was confirmed also by correlations observed through the analysis of the HMBC spectrum. We detected correlations between the hydrogen signal at δ_{H} 0.78 and the carbon signal at δ_{C} 28.08 (C-23), δ_{C} 55.38 (C-5), δ_{C} 39.89 (C-22) and at δ_{C} 43.03 (C-17). Based on these data we established that the signal at δ_{H} 0.78 corresponds to the hydrogen of the methyl groups C-24 and C-28.

The locations and the configurations of the hydroxyl groups were established through signal correlation analysis of HSQC, HMBC and NOESY spectra. The chemical shifts of carbon and hydrogen atoms encountered by this analysis are in accordance with literature data for the triterpene $3\beta,30$ -dihydroxy-lup-20(29)-ene isolated from *Maerua ob-*

longifolia (Capparaceae) [21]. For that compound a singlet (δ_{H} 4.88) and a doublet (δ_{H} 4.95) for the olefinic hydrogen were reported, while we observed these signals at δ_{H} 4.99 and δ_{H} 5.00, respectively.

Crystal structure

The proposed structure for (1) was now unambiguously confirmed by X-ray crystallographic analysis. Figure 1 shows an ORTEP view of the molecular structure. The crystal structure shows that there is just one independent molecule in the asymmetric unit. Rings A, B, C and D (see Drawing) adopt a chair conformation, while ring E is in an envelope conformation with hydroxyl groups at C-3 and C-30 in equatorial positions (see Fig. 1).

The intra-molecular geometry was analyzed using MOGUL [22], a knowledge base of molecular geometry derived from the Cambridge Structural Database (CSD) [23] that provides rapid access to information on the preferred values of bond lengths, valence angles and acyclic torsion angles. This study showed that all bond lengths and bond angles are in agreement with the expected values (Tables 2 and 3).

Fig. 3 The crystal structure of (1) projected onto *ab* plane

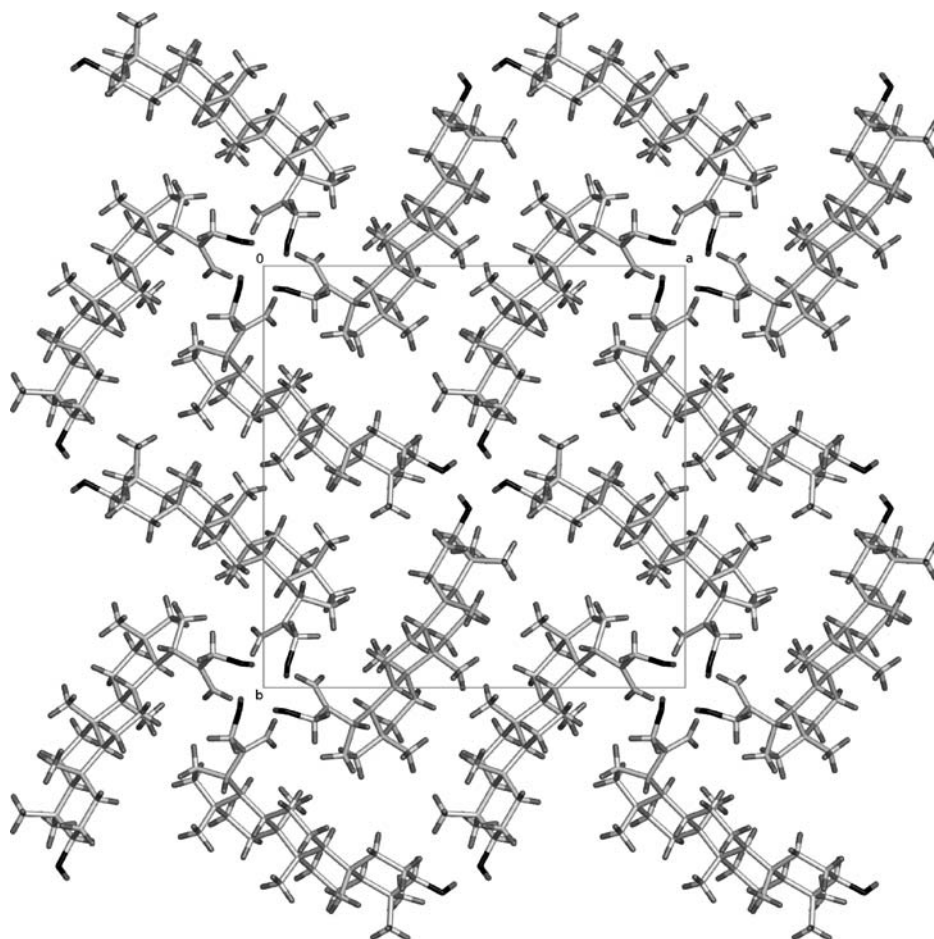


Table 2 MOGUL [22] bond analyses

Type of bond	Average query value (Å)	Average result bond length (Å)
C–C	1.538	1.54(2)
C–O	1.427	1.42(2)
C=C	1.316	1.32(3)

Table 3 MOGUL [22] angle analyses

Type of angle	Average query value (°)	Average result angle (°)
C–C–C	110.8	111(2)
C–C–O	112.3	112(3)
C–C=C	123.3	124(5)

Table 4 Hydrogen bonding

<i>D</i> –H... <i>A</i>	<i>D</i> –H (Å)	H... <i>A</i> (Å)	<i>D</i> ... <i>A</i> (Å)	<i>D</i> –H... <i>A</i> (°)
O1–H1...O1 ^a	0.820(4)	1.940(5)	2.754(3)	173.2(3)
O2–H2...O2 ^b	0.820(4)	1.960(5)	2.743(3)	158.7(3)

^aSymmetry codes: $1-y, x, \frac{1}{4} + z$

^bSymmetry codes: $-y, x, \frac{1}{4} + z$

Figure 2 show the crystal packing of (1). The arrangement of the molecular units suggests that the three-dimensional structure is stabilized by two intermolecular hydrogen bonds. The first one is between the hydroxyl group at C-3 and the same hydroxyl group of the molecule at $1-y, x, \frac{1}{4} + z$, and the second one is between the hydroxyl group at C-30 and the same hydroxyl group of the molecule at $-y, x, \frac{1}{4} + z$ (Table 4). These intermolecular interactions form infinite helical chains along the *c*-axis. In Fig. 3, which gives the crystal structure of (1) projected onto the *ab* plane, five of these chains (one at the centre and four at the corners) are shown.

Supplementary material

Crystallographic data been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication number CCDC 284041. Copies of the data can be obtained, free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html (or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44-1223-336033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

Acknowledgements This work was supported by grants from CNPq, CAPES, FAPEMIG (Minas Gerais), and FAPESP (São Paulo), Brazil.

References

- Brünning R, Wagner H (1978) *Phytochemistry* 17(11):1821
- Orabi KY, Al-Qasoumi SI, El-Olemy MM, Mossa JS, Muhammad I (2001) *Phytochemistry* 58(3):475
- Corsino J, Bolzani VS, Pereira AMS, França SC, Furlan M (1998) *Phytochemistry* 48(1):137
- Vieira Filho SA, Duarte LP, Paes HCS, Silva GDF, de Sousa JR, Lanna MCS (1999) *Acta Horticulturae* 501:199
- Tahir AE, Satti GMH, Khalid SA (1999) *J Ethnopharm* 64(3):227
- Gonzalez FG, Portela TY, Stipp EJ, Di Stasi LC (2001) *J Ethnopharm* 77(1):41
- Queiroga CL, Silva GF, Dias PC, Possenti A, Carvalho JE (2000) *J Ethnopharm* 72(3):465
- Avilla J, Teixidó A, Velasquèz C, Alvarenga N, Ferro E, Canela R (2000) *J Agric Food Chem* 48(1):88
- Shirota O, Morita H, Takeya K, Itokawa H, Iitaka Y (1994) *J Nat Prod* 57(12):1675
- Gonzalez AG, Tincusi BM, Bazzochi IL, Tokuda H, Nishimo H, Konoshima T, Jimenez IA, Ravelo AG (2000) *Bioorg Med Chem* 8(7):1773
- Silva M, Bittner M, Hoeneisen M, Becerra J, Campos V, Gonzalez F, Cespedes C, Marambio O (1992) *Química de los Triterpenos*, Secretaria General da Organizacion de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Monografía no. 34, Washington, DC
- de Souza e Silva SR, Silva GDF, Barbosa LCA, Duarte LP, Vieira Filho SA (2005) *Helv Chim Acta* 88:1102
- Casey M, Leonard J, Lygo B, Procter G (1990) *Advanced practical organic chemistry*. Chapman and Hall, New York
- Enraf-Nonius COLLECT (1997–2000) Nonius BV, Delft, The Netherlands
- Otwinowski Z, Minor W (1997) In: Carter CW Jr, Sweet RM (eds) *Methods in enzymology*, vol. 276. Academic, New York, p. 307
- Sheldrick GM (1997) SHELXS-97. Program for crystal structure resolution. University of Göttingen, Göttingen, Germany
- Sheldrick GM (1997) SHELXL-97. Program for crystal structures analysis. University of Göttingen, Göttingen, Germany
- Farrugia LJ (1997) *J Appl Cryst* 30:565
- Farrugia LJ (1999) *J Appl Cryst* 32:837
- Bruno IJ, Cole JC, Edgington PR, Kessler MK, Macrae CF, McCabe P, Pearson J, Taylor R (2002) *Acta Crystallogr B* 58:389
- Abdel-Mogib M (1999) *Phytochemistry* 51(3):445
- Bruno IJ, Cole JC, Kessler M, Luo J, Motherwell WDS, Purkis LH, Smith BR, Taylor R, Cooper RI, Harris SE, Orpen AG (2004) *J Chem Inf Comput Sci* 44:2133
- Allen FH (2002) *Acta Crystallogr B* 58:380

Comparison of Humanized IgG and FvFc Anti-CD3 Monoclonal Antibodies Expressed in CHO Cells

Flavia Serpieri · Andre Inocencio · Jose Marcelino de Oliveira ·
Alécio A. Pimenta Jr. · Angélica Garbuio · Jorge Kalil ·
Marcelo M. Brigido · Ana Maria Moro

© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract Two humanized monoclonal antibody constructs bearing the same variable regions of an anti-CD3 monoclonal antibody, whole IgG and FvFc, were expressed in CHO cells. Random and site-specific integration were used resulting in similar expression levels. The transfectants were selected with appropriate selection agent, and the surviving cells were plated in semi-solid medium for capture with FITC-conjugated anti-human IG antibody and picked with the robotic ClonePix FL. Conditioned media from selected clones were purified by affinity chromatography and characterized by SDS-PAGE, Western-blot, SEC-HPLC, and isoelectric focusing. Binding to the target present in healthy human mononuclear cells was assessed by flow cytometry, as well as by competition between the two constructs and the original murine monoclonal antibody. The humanized constructs were not able to dislodge the murine antibody while the murine anti-CD3 antibody could dislodge around 20% of the FvFc or IgG humanized versions. Further in vitro and in vivo pre-clinical analyses

will be carried out to verify the ability of the humanized versions to demonstrate the immunoregulatory profile required for a humanized anti-CD3 monoclonal antibody.

Keywords Antibody humanization · Anti-CD3 · FvFc · CHO cells · Flow cytometry

Introduction

Immunosuppression is one of the strategies used to counteract the central role played by T cells in the recognition of allo- and auto-antigens. In 1986, the FDA approved the first mAb for clinical use in transplantation rejection control. The initial clinical studies with OKT-3 demonstrated a higher rate of clinical improvement 1 year after kidney transplant [1]. OKT-3 mAb demonstrates a low incidence of rejection incidence in the treated group, validating its use even in the era of improved baseline immunosuppression. It is considered as a safe and an effective treatment choice for steroid-resistant acute rejection episodes in kidney transplantation [2, 3]. A retrospective study conducted in Brazil after 10 years of anti-CD3-Butantan's demonstrated efficacy both in prophylaxis and treatment of acute rejections in renal transplanted patients [4]. OKT-3 was tried in other organ transplantation and results with OKT-3 therapy in liver transplantation were comparable with those reported for kidney transplant patients [5]. After evaluation of the therapeutic efficacy and adverse effects of OKT3, mainly cytokine release syndrome, suggestions of new clinical applications were proposed for anti-CD3 mAbs [6].

The therapeutic effect of OKT-3 in modulating transplant rejection is due to mechanisms such as antigenic modulation of the CD3/TCR complex at the cell surface

F. Serpieri · A. Inocencio · J. M. de Oliveira ·
A. A. Pimenta Jr. · A. Garbuio · A. M. Moro (✉)
Laboratorio de Biofarmacos em Celulas Animais, Instituto
Butantan, Brasilia, SP 05503-900, Brazil
e-mail: anamoro@butantan.gov.br

M. M. Brigido
Laboratorio de Biologia Molecular, Universidade de Brasilia,
Brasilia, DF 70910-900, Brazil

J. Kalil
Laboratorio De Imunologia, InCor, Universidade de Sao Paulo,
Sao Paulo, SP 05403-000, Brazil

J. Kalil · M. M. Brigido · A. M. Moro
Institute for Immunology Investigation, Science and Technology
National Institutes, INCT, Brasilia, Brazil

and/or apoptosis of activated T cells. These same effects are sought for the control of autoimmune diseases generated by the failure of central and/or peripheral tolerance to self antigens, which are currently treated with anti-inflammatory or general immunosuppressive agents, thereby exposing patients to opportunistic infections and tumour occurrence. A more specific treatment leading to operational tolerance by the use of anti-CD3 antibodies would be of importance in the control of several auto-immune diseases.

However, new uses of current anti-CD3 mAb for autoimmune diseases or prolonged use in transplantation are hampered due to its murine origin which is prone to trigger immunogenic reactions *in vivo*. CDR transplantation to humanize antibodies opened a new era for immunotherapy [7–9]. In this work, two versions of humanized anti-CD3 were obtained by the transfecting CHO cells with vectors containing either FvFc (lacking CH₁ and C_κ domains) or IgG₁ (containing the complete heavy and light chain genes) of humanized anti-CD3. Both constructs, FvFc and IgG, were previously assembled by our partners [10, 11]. Initial studies with the product from FvFc transiently transfected cells [11] demonstrated a favorable immunoregulatory profile, suggesting that the antibody making the humanized construct is a promising candidate for the treatment of transplant or auto-immune disease patients in need of achieving an operational tolerance status.

A stable cell line synthesizing the FvFc is described and characterized in this work. The natural IgG antibody gene structure was also used to generate a stable cell line for characterization and to compare with both the FvFc construct and the original murine antibody. It is the first time a FvFc protein has been compared to the complete IgG.

Materials and Methods

Cell Culture and Transfection

The vector pMIREs harboring the humanized FvFc contained an IRES sequence element allowing a dicistronic expression with the Neo gene [11]. Recombinant DNA was transfected into CHO cells (ATCC 9096) with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA). For the expression of the whole antibody molecule, the heavy and light chain genes of humanized anti-CD3 were cloned into the pMacIA HIL expression vector containing an IRES element between the heavy and light sequences [10]. The site-specific integration system Flp-In (Invitrogen) was used for expression. The bi-cistronic sequence was inserted into the Multiple Cloning Site of the pcDNA5/FRT vector. The vector containing humanized anti-CD3 was co-transfected with pOG44 (Invitrogen) into CHO Flp-In cells according to

manufacturers' instructions. Before transfections, the cells were cultured in DME/HAM-F12 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 2 mM L-Glutamine (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml Zeocin (Invitrogen), and 10% FCS (Cultilab).

Detection and Selection of Clones

For the FvFc expression, 500 µg/ml G-418 (Invitrogen) was used as the selection agent 48 h after transfection. The IgG transfectants were selected with 500 µg/ml Hygromycin (Invitrogen) 48 h after transfection. In both the cases, the cells surviving the selection after 10 days were cloned using ClonePix FL (Genetix, UK). The cells were plated in semi-solid medium (Clone Matrix, Genetix) supplemented with FITC-anti-human IgG antibody (Clone Detect, Genetix) for the capture of the secreted protein. Clones were analyzed using parameters of brightness, size, shape and distance between colonies using ClonePix FL. Selected colonies were plated into individual wells in a 96-well culture plate in liquid medium, DME/HAM-F12 supplemented with 2 mM Glutamine, 500 µg/ml of Geneticin or Hygromycin, and 10% of FCS. Antibody production was monitored in the supernatant of growing colonies.

Immunodetection

The FvFc protein was detected by ELISA using an anti-human IgG antibody (whole molecule—UNLB, Southern Biotech) for the capture step and an anti-human IgG-HRP (γ chain specific, Southern Biotech) for detection. The humanized IgG antibody supernatants were analyzed in duplicate using the anti-human IgG antibody for the capture step. For the detection step, two HRP-conjugated antibodies were used, an anti-IgG (γ chain specific, Southern Biotech) and an anti-human IgG (κ chain specific, Southern Biotech) aimed to heavy and light chain detection respectively. For Western-blot analyses, SDS-PAGE gels containing separated proteins were prepared in duplicate. Samples were diluted 1:2 in β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) containing buffer and loaded on 10% SDS-PAGE gels. Gel casting and running were done on Bio-rad Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) apparatus. The protein bands were resolved under voltage between 80 and 120 V. The separated proteins in one gel were stained by either Coomassie blue or silver nitrate methods following conventional protocols. Separated proteins from the other gel were transferred to a nitrocellulose membrane (Mini Trans Blot Module, Bio-Rad). Detection was performed with the same HRP-conjugated antibodies used in ELISA. The nitrocellulose membrane was incubated for 1 h with an anti-IgG (κ chain specific, Southern Biotech) diluted in 5% skim-milk in PBS. After incubation, the membrane was washed in PBS/Tween 20 and

incubated for 1 h with an IgG antibody (γ chain specific, Southern Biotech). A diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich) solution was used for color development.

Purification and Physicochemical Characterization

Protein A (Hytrap, GE Lifescience) was used for the purification of both FvFc and IgG proteins. A volume of 180 ml of the FvFc culture supernatant was diluted 1:2 in 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 before loading onto the 6 ml resin bed already equilibrated with the same buffer. After loading and washing, the antibodies were eluted with 100 mM sodium citrate buffer pH 3.2. Eluted antibody was neutralized with 1 M Tris-base and dialyzed against cold PBS pH 7.2. A volume of 620 ml of culture supernatant expressing humanized IgG was diluted 1:2 with 1.5 M glycine/3 M NaCl pH 9.0 buffer and loaded onto the same protein A column. After loading was complete, the column was washed with the same buffer. The antibody was eluted with 50 mM sodium citrate/150 mM NaCl pH 3.7 buffer. The eluted material was neutralized with 1 M Tris-base and dialyzed against cold PBS pH 7.2. The purified antibody solutions were sterile filtered through 0.22 μ m membranes (Millipore) and stored in sterile conditions. The purification process was monitored by SDS-PAGE as previously described under reduced and non-reduced conditions. For the molecular mass determination of the FvFc antibody, samples from different clones were submitted to SEC-HPLC methodology with a TSKgel G3000SWx1 column (TOSOH Bioscience) installed in the Akta Purifier equipment (GE Lifescience). The isoelectric point of each version was determined by isoelectric focusing on the Phast System (GE Lifescience) apparatus. Samples were loaded on ready-made polyacrylamide gels with 3–9 pH range (PhastGel IEF pH 3–9, GE Healthcare). Acid and basic solutions (0.5 M H_3PO_4 in the anode and 0.5 M NaOH in the cathode) were used for the isoelectric focusing of the antibodies. The gel was stained manually with Coomassie blue (Sigma-Aldrich). The antibody pI samples were determined by the migration distance in relation to known pI standards loaded on the same gel.

Binding Analyses

For flow cytometry analyses, human PBMCs (2.5×10^5 cells/assay) from healthy donors were isolated by Ficoll-Paque (GE Lifescience) and incubated initially for 1 h with a 1:48 diluted anti-human IgG F(ab')₂-PE (whole molecule, Guava Technologies, Millipore, USA) for adsorption of B lymphocytes bearing membrane antibodies. Cells were washed and incubated with either anti-CD3 humanized FvFc or IgG₁ or the original murine IgG for 1 h at 4°C. Due to molecular mass differences between the proteins,

sample concentrations varied in all assays to guarantee similar quantities of binding variable regions. IgG concentration was set to 5 μ g. Detection was performed with a 1:100 diluted anti-human IgG-FITC (γ specific, Sigma-Aldrich). Readings and analyses were performed with Guava Easy Cyte Mini equipment (Guava Technologies, Millipore). To assess the binding strengths of the different antibodies, competitive assays were performed by the sequential incubation of human PBMCs (already absorbed with anti-human IgG-PE) with either humanized FvFc or complete humanized IgG₁ or original murine anti-CD3 for 1 h at 4°C. After washing, cells were incubated with a different antibody in relation to the previous incubation. At the end, all sequential competitions were tested. For each competition, assays were performed in duplicate, one detected with an FITC-conjugated antibody directed either to humanized (FvFc or IgG) or murine anti-CD3 and the second with the complementary antibody directed either to murine or humanized (FvFc or IgG) anti-CD3. The competition between the two humanized versions, FvFc and IgG, was not measured.

Results

Humanized FvFc Anti-CD3

The humanized FvFc fragment lacks the CH₁ and C κ domains of heavy and light chain respectively (Fig. 1). Ten days after transfection with the humanized FvFc expression vector, cells were plated in semi-solid medium with Clone Matrix in presence of G418. Clones were isolated based on criteria of colony size, distance between colonies, compactness, and expression level of antibody detected by the fluorescent halo around the colonies. ClonePix FL software was used to analyze the clones (Fig. 2). From 96 isolated clones, seven were selected by their growth characteristics for further analysis by ELISA (Fig. 3). All seven clones

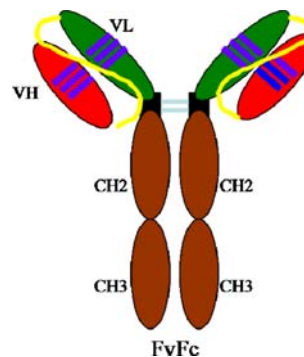


Fig. 1 Structural representation of humanized anti-CD3 FvFc

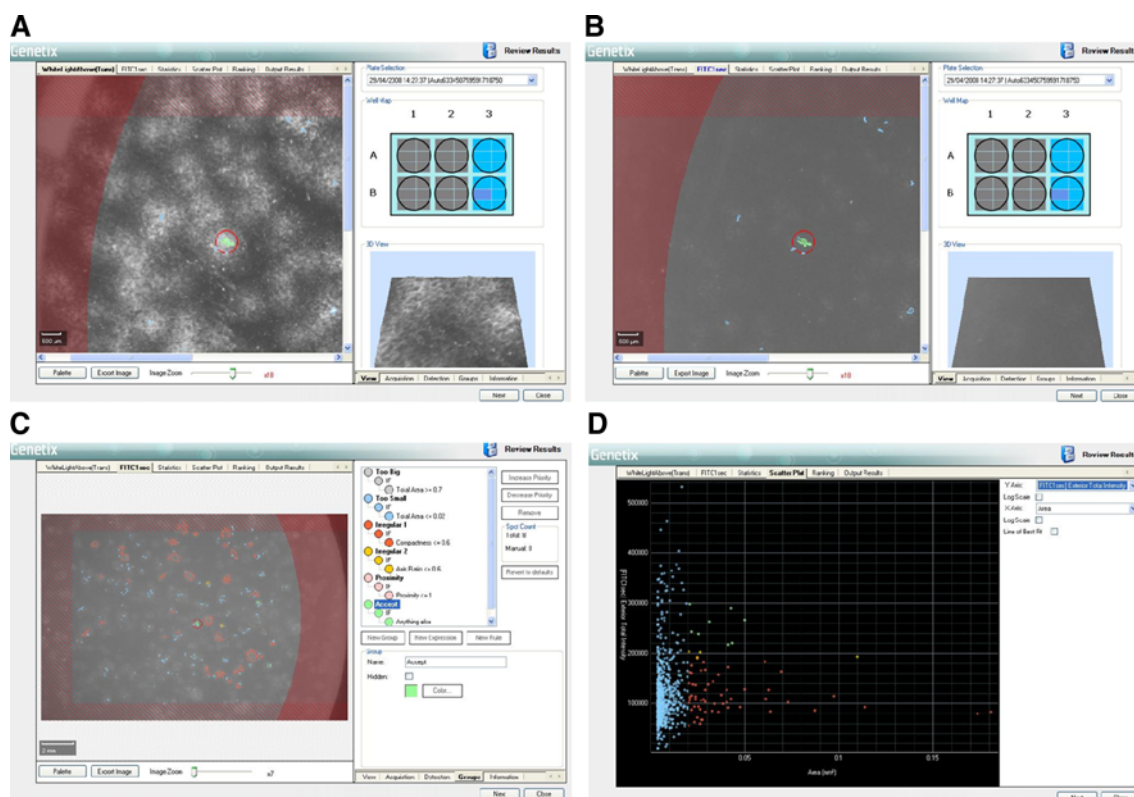


Fig. 2 Cell cloning with ClonePix FL. **a** Analysis of colonies under bright light, superposed with fluorescent light. **b** Colony selected by the software. **c** Criteria for colony selection. **d** Scatter Plot, clone area versus fluorescence intensity

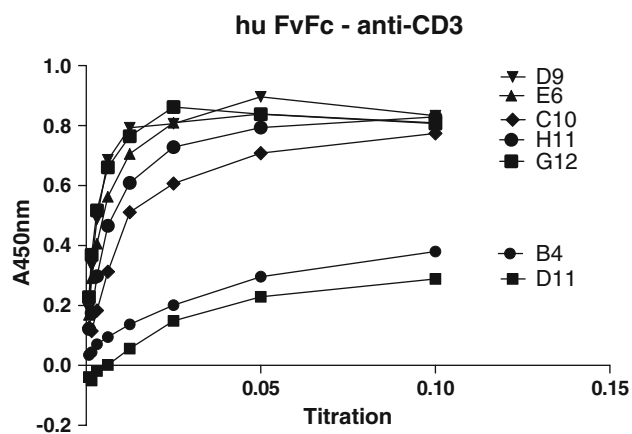


Fig. 3 ELISA of clones isolated by the ClonePix FL. Sandwich ELISA of samples between anti-human IgG antibody and anti-human anti-IgG (γ chain specific) HRP conjugated

were cultivated in roller bottles to generate material for purification. A typical analysis of the purified FvFc fragment by Western-blot is presented in Fig. 4. Due to its structural difference, the molecule size was analyzed by size exclusion chromatography. All seven clones were evaluated (Table 1). The molecular mass for the FvFc

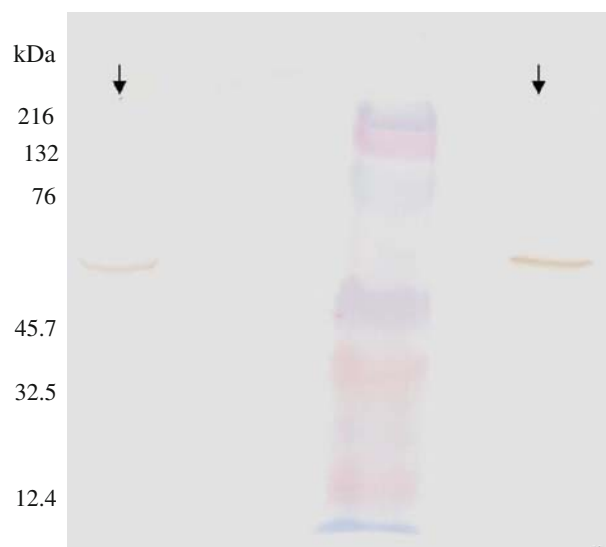


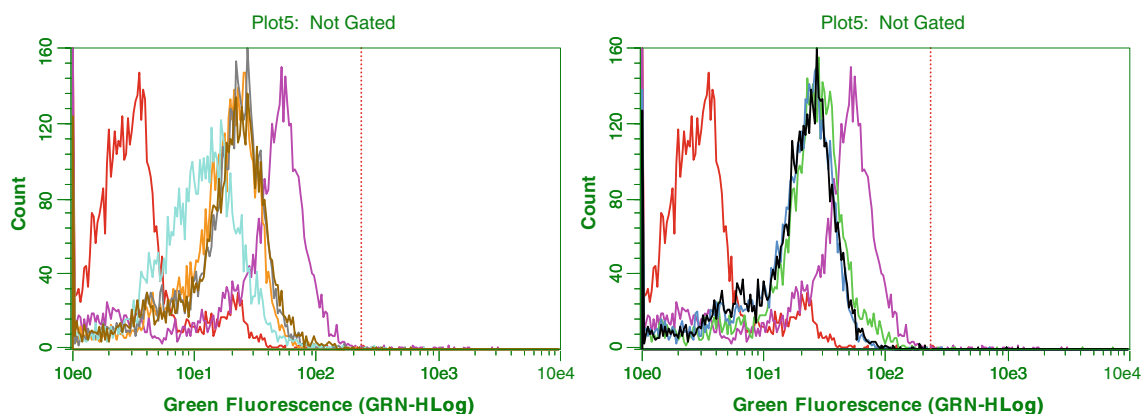
Fig. 4 Western-blot of reduced samples of humanized FvFc anti-CD3. The arrows indicate the approximately 55 kDa blots of supernatant (left) and after purification by affinity chromatography (right)

anti-CD3 was found to be 109.5 ± 4.03 kDa (CV = 3.6%), demonstrating that the humanized fragment was expressed in dimeric structure as expected.

Table 1 Molecular mass determination of humanized FvFc anti-CD3 by size exclusion chromatography

Clone	Molecular mass (kDa)
D9	111.55
D11	115.85
E6	109.94
C10	102.53
B4	107.42
G12	109.62
H11	109.62

The binding characteristics of the FvFc fragment to human T lymphocytes, analyzed by flow cytometry in comparison to the murine version, showed that the humanization process maintained the binding ability to the target (Fig. 5) for most of the clones, although less intensively. Mean fluorescence was 90.59 for the murine antibody while the humanized FvFc and IgG versions varied between 66.51 and 78.58.

**Fig. 5** Flow cytometry of FvFc clones showing the binding to human mononuclear cells. The clones picked by the ClonePix FL are represented in the *left* and *right* panels. In both, the most *left* curve represents the negative control and the most *right* the positive control,

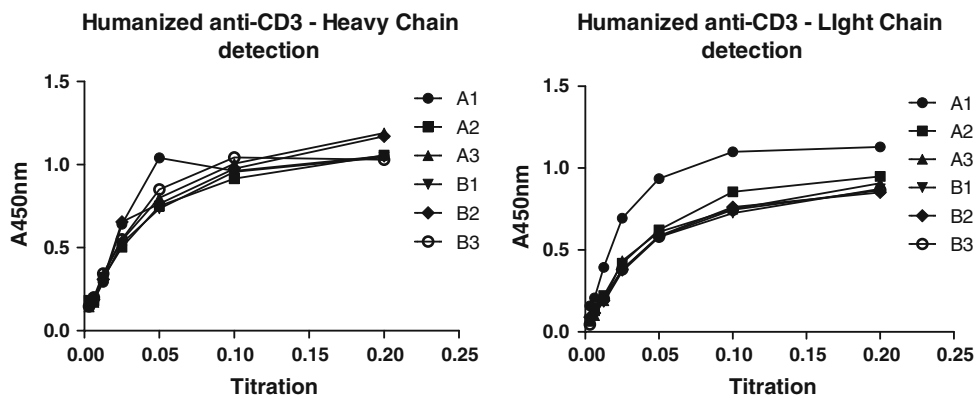
Humanized IgG Anti-CD3

The site-specific integrated cells with the heavy and light chains of complete anti-CD3 humanized genes were selected by the addition of Hygromycin to the medium. Ten days after selection, the cells were plated in semi-solid medium containing Hygromycin. Clones were picked by the ClonePix FL following the procedures previously described. Figure 6 shows the ELISA analyses with purified antibody from stable pool supernatants cultured with low IgG FCS. Figure 7 shows SDS-PAGE and Western-blot patterns of purified clone CP-D4A2 in reduced condition.

Physicochemical Characterization

To characterize and compare the two humanized versions of anti-CD3, the isoelectric point was determined by IEF gel electrophoresis. While the murine anti-CD3 presents several pI isoforms between 7.0 and 8.15, humanized IgG presents a major pI band around 8.65. The FvFc is more

5 μ g of murine anti-CD3, staining 78.3% of the cells. FvFc clones are represented in the intermediate curves, with percent of positive cells ranging from 77.8 to 84.2% (clone CP-D9)

Fig. 6 Sandwich ELISA analyses of humanized anti-CD3 IgG clones for the detection of expression levels. Two detection HRP-conjugated anti-human IgG antibodies were used. *Left panel* γ chain specific; *right panel* κ chain specific

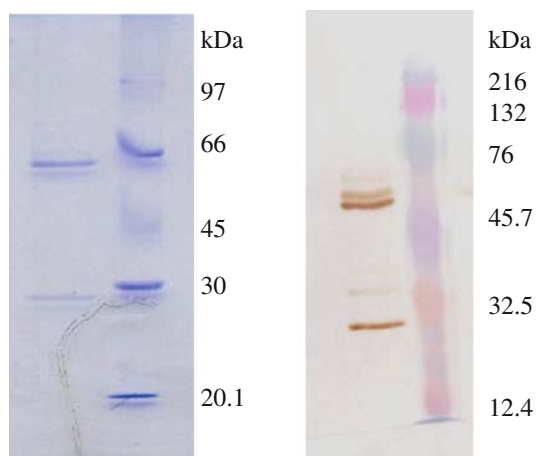


Fig. 7 *Left panel* SDS-PAGE of purified reduced samples of humanized anti-CD3 IgG produced with Low IgG FCS in the medium culture. The typical bands around 50 and 25 kDa can be seen against the MW standard on the *right lane*. *Right panel* Western-blot of the a duplicate SDS-PAGE

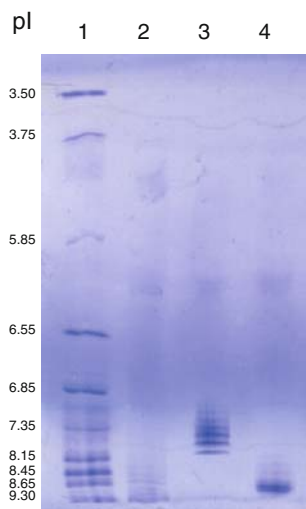


Fig. 8 Isoelectric focusing of anti-CD3 versions. *Lane 1*: pI standard. *Lane 2*: humanized FvFc construct. *Lane 3*: murine IgG. *Lane 4*: humanized IgG

basic, presenting pI around 9.0 (Fig. 8). Monoclonal antibodies usually present basic pIs. Besides contributing to the antibody stability, this characteristic can be used for purification.

Competition Analyses

The competition analysis between humanized FvFc (clone CP-D9) and the murine IgG demonstrated that the murine version is able to dislodge 23% of the humanized FvFc originally bound to the cells (Fig. 9), while the murine version cannot be dislodged by the humanized FvFc construct, retaining 84% of positive cells (data not shown)

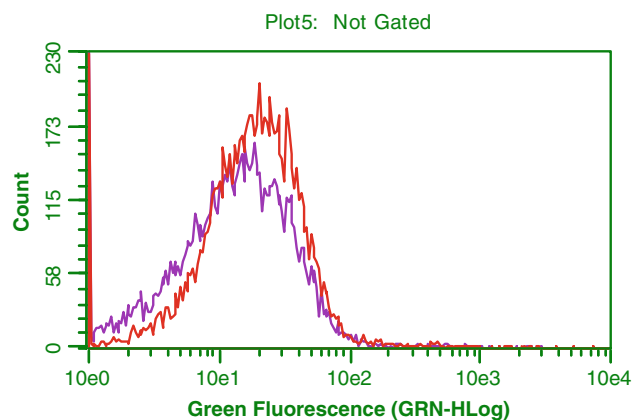


Fig. 9 Competition between humanized FvFc and murine IgG anti-CD3 by flow cytometry analyses. The *right curve* shows the humanized FvFc pattern (76.8% of positive cells), the *left curve* the humanized FvFc detected with anti-human IgG-FITC after incubation of the cells with the murine anti-CD3 (59% of positive cells)

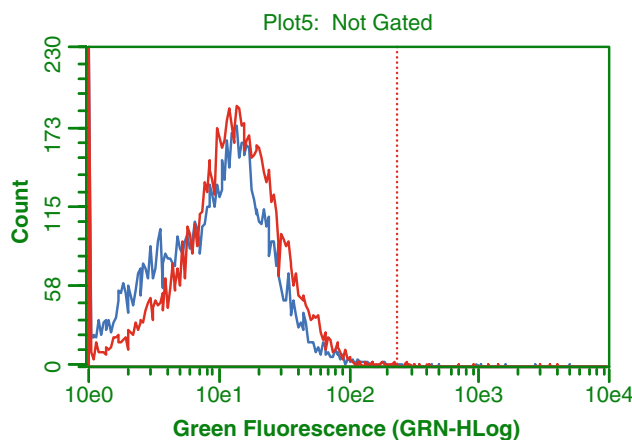


Fig. 10 Competition between humanized and murine IgG anti-CD3 by flow cytometry analyses. The *right curve* shows the humanized IgG pattern (60.4% of positive cells), in the *left* humanized IgG detected with anti-human IgG-FITC after incubation of the cells with the murine anti-CD3 (47.4% of positive cells)

after incubation with humanized FvFc anti-CD3 (83% of positive cells without the incubation with anti-FvFc).

Competition analyses between the humanized IgG clone (CP-D4A2) and murine IgG demonstrated that, similarly to the FvFc construct, the affinity of the humanized antibody is slightly lower than that displayed by the murine IgG anti-CD3, a characteristic that is commonly found for humanized antibodies [12]. The murine anti-CD3 is able to dislodge the humanized antibody in 21% of the cells originally positive for the humanized version (Fig. 10), while the humanized anti-CD3 is not able to dislodge the murine anti-CD3, similar to the humanized FvFc (retention of 82% of positive cells (data not shown) after incubation

with humanized FvFc anti-CD3 against 82.5% of positive cells without the incubation with humanized anti-CD3.

Discussion

Two transfection strategies were used for the FvFc and IgG recombinant proteins. With the site-specific integration system, a homogeneous stable pool was obtained, as the cell line used (Flp-InTM-CHO cell line, Invitrogen) presents a single integration site according to the vendor, based on Southern blot analyses. All the isolated clones showed similarity both in fluorescence levels measured by the ClonePix FL and production levels measured by ELISA. The site-specific integration system did not result in higher productivity though; both random integration (FvFc) and site-specific integration (IgG) strategies produced similar antibody yields.

The binding affinity comparison between the two humanized constructs must take into consideration that there might be structural differences between the two forms. The FvFc showed affinity to T lymphocytes similar to the murine anti-CD3, even using concentrations 36% lower for the FvFc to counterbalance its molecular mass of 110 kDa. Complete IgGs, murine or humanized, have molecular masses around 150 kDa. Even with the same variable region sequences and the presence of a hinge region, it is possible that the dimer scFv present in the FvFc protein are closer to one another than observed in natural IgGs and account for higher binding capability. When compared with the murine anti-CD3, both humanized proteins bind with less intensity to the target. Lower binding affinity is usually found in humanized antibodies [12]. Obtaining higher affinity levels is possible in some cases by selecting frameworks closer to the original antibody or reintroduction of murine residues to maintain the proper structure to hold the variable sequences. Depending on the effector function expected for the antibody, a slightly lower affinity is not negative for clinical use.

Two different humanized anti-CD3 monoclonal antibodies have been used clinically in patients with Type 1 Diabetes. In one study [13], the treatment maintained or improved insulin production after 1 year in nine out of the 12 patients. The second study was a Phase II trial enrolling 80 patients in a placebo controlled study [14] and concluded that short term treatment with anti-CD3 antibody preserved residual beta-cell function for at least 18 months in patients with recent-onset disease. In both studies, the regulatory profile of the antibodies was considered the major role achieved by the administration of the humanized CD3 antibodies.

The humanization process leading to the FvFc anti-CD3 antibody versions has suggested the immunoregulatory

profile required for tolerance induction [11], thus making the complete IgG humanized anti-CD3 an attractive candidate for additional studies. Although the modular design of immunoglobulins is very compatible with protein engineering [15], constructions other than the ones found in nature have not yet been approved by the regulatory agencies. We plan to carry out in vitro and in vivo pre-clinical studies to further verify the ability of both humanized versions to demonstrate the immunoregulatory profile desired for a humanized anti-CD3 monoclonal antibody.

Acknowledgments The authors thank Andrea Maranhao for helpful discussion on the vectors, Claudia T. P. de Moraes and Ana Carolina Pavanelli for technical assistance, CNPq for Flavia Serpieri's PhD studentship and FINEP (Brazilian Ministry for Science and Technology) for financial support.

References

1. Group, O. M. T. (1985). A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. *New England Journal of Medicine*, *313*, 337–342.
2. Henry, M. L., Pelletier, R. P., Elkhmmas, E. A., Bumgardner, G. L., Davies, E. A., & Ferguson, R. M. (2001). A randomized prospective trial of OKT3 induction in the current immunosuppression era. *Clinical Transplantation*, *15*, 410–414.
3. Sevmis, S., Emiroglu, R., Karakayali, M. C., Yagmurdu, A., Dalgin, G., Moray, G., et al. (2005). OKT3 treatment for steroid-resistant acute rejection in kidney transplantation. *Transplantation Proceedings*, *37*, 3016–3018.
4. Lemos, F., Moro, A. M., Rodrigues, M. T. A., Garbuio, A., Monteiro, S. M., Marques, F., et al. (2006). Use of the Butantan's anti-CD3 in renal transplantation. *Brazilian Journal of Transplantation*, *9*, 572–578.
5. Farges, O., Samuel, D., & Bismuth, H. (1992). Orthoclone OKT[®]3 in liver transplantation. *Transplantation Science*, *2*(2), 16–21.
6. Chatenoud, L., & Bach, J.-F. (1992). Selective immunosuppression with anti-T cell monoclonal antibodies. *Clinical Nephrology*, *38*, 535–560.
7. Caldas, C., Coelho, V. P., Rigden, D. J., Neschich, G., Moro, A. M., & Brigido, M. M. (2000). Design and synthesis of germline-based hemi-humanized single-chain Fv against the CD18 surface antigen. *Protein Engineering*, *13*, 353–360.
8. Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., & Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, *321*, 522–525.
9. Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H., & Winter, G. (1988). Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*, *332*, 323–327.
10. Bezerra, M. A. G. (2009). Estratégias para expressão de um anticorpo anti-CD3 humanizado em células de mamíferos. MSc Dissertation presented at the University of Brasília, DF, Brazil.
11. Silva, H. M., Vieira, P. M. M. M., Costa, P. L. N., Pimentel, B. M. S., Moro, A. M., Kalil, J., et al. (2009). Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology Letters*, *125*, 129–136.
12. Clark, M. (2000). Antibody humanization: Case of the 'Emperor's new clothes'? *Immunology Today*, *21*, 397–402.

-
13. Herold, K. C., Hagopian, W. H., Auger, J. A., Poumian-Ruiz, E., Taylor, L., Donaldson, D., et al. (2002). Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, *346*, 1692–1698.
 14. Keymeulen, B., Vandemeulenlebroucke, E., Ziegler, A., Mathieu, C., Kaufman, L., Hale, G., et al. (2005). Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *New England Journal of Medicine*, *352*, 2598–2608.
 15. Filpula, D. (2007). Antibody engineering and modification technologies. *Biomolecular engineering.*, *24*, 201–215.