

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

GUSTAVO FERNANDO MERCALDI

Fosfoglicerato Mutase de *Trypanosoma brucei*: estrutura e mecanismo de reação

São Carlos  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



GUSTAVO FERNANDO MERCALDI

Fosfoglicerato Mutase de *Trypanosoma brucei*: estrutura e mecanismo de reação

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada – opção Física Biomolecular.

Orientador: Otavio Henrique Thiemann

São Carlos  
2010

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

Mercaldi, Gustavo Fernando

Fosfoglicerato mutase de Trypanosoma brucei: estrutura e mecanismo de reação. / Gustavo Fernando Mercaldi; orientador Otavio Henrique Thielmann – São Carlos, 2010.

74 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Física – Área de concentração: Física Aplicada – opção: Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Fosfoglicerato mutase. 2. Isomerase. 3. Tripanossomíase. .4. Doenças negligenciadas. I. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Gustavo Fernando Mercaldi

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

Aprovado(a) em: 03.09.2010

Comissão Julgadora

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

Instituição: IFSC/USP

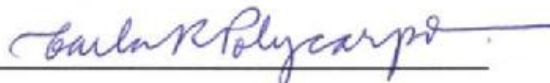
Assinatura



Prof(a). Dr(a). Carla Ribeiro Polycarpo

Instituição: UFRJ

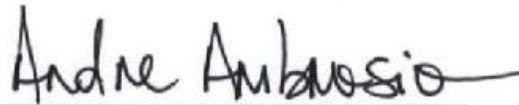
Assinatura



Prof(a). Dr(a). André Luís Berteli Ambrósio

Instituição: LNILS

Assinatura









## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Heraldo e Joceli, irmãos Heitor e Guilherme e namorada Mariana pelo apoio, compreensão e incentivo. Dedico ainda este trabalho a todos meus educadores, reconhecendo que estes foram essenciais para as minhas conquistas.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann, pela oportunidade, orientação, suporte, atenção, confiança e amizade.

Ao Profs. Dr. Adriano D. Andricopulo e Dr. Rafael Guido, pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Paul Michels pelas discussões e colaboração.

Aos grandes amigos Dr. Humberto Pereira, Dr. Arthur Cordeiro e Alécio Pimenta Jr, que no período de convivência muito me ensinaram, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

A Suzana, Bianca, Augusto, Ge, Fernando, Luciana e Maria, pelo suporte.

Aos adoráveis amigos Alessandro, Alexandre, Ana, Bachega, Daiane, Dani Trivela, Fernanda (2), Fran, Heline, Ivo, Jean Jerley, Juliana, Kelven, Larissa, Leonardo (2), Livia (3), Lucas, Marcelo Tavin, Marcos Michel, Maria Amélia, Mariane, Mario, Matheus, Maycou, Rafaela, Renata (2), Simone, Tatiane, Tiago, Vitor (2), Viviane e outros que por ventura a memória tenha me traído, pelo companheirismo, convívio e paciência.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Física de São Carlos.

Ao Instituto de Física de São Carlos e a Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.



## RESUMO

MERCALDI, G. F. **Fosfoglicerato Mutase de *Trypanosoma brucei*: estrutura e mecanismo de reação.** 2010. 74 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

As doenças tropicais têm um grande impacto sobre a saúde em países de baixa renda, estando relacionadas com condições de pobreza e desigualdade. A tripanossomíase africana é uma infecção parasitária negligenciada incluída na agenda da Organização Mundial de Saúde. Esta enfermidade é causada pelo *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, sendo transmitida pela mosca tsé-tsé (*Glossina sp.*) e geralmente fatal se não tratada. Os fármacos usados no seu tratamento são ineficazes, difíceis de administrar e causam severas reações adversas. Portanto, existe a necessidade do desenvolvimento de alternativas quimioterápicas eficazes e seguras. Assim, a enzima fosfoglicerato mutase (PGAM) surge como um importante alvo molecular. Esta enzima está envolvida no metabolismo de glicose, sendo necessária para a viabilidade do parasito. Somado a isso, ela difere da enzima dos hospedeiros permitindo a identificação de inibidores específicos. Não obstante, esforços têm sido realizados para identificar inibidores da PGAM, bem como para elucidar sua estrutura e mecanismo de reação. Nosso propósito é obter o modelo de alta resolução desta macromolécula sem ligantes e conseqüentemente analisar a mudança de conformação que esta sofre ao se ligar ao seu substrato natural. A PGAM de *Trypanosoma brucei* obtida na expressão e purificação mostrou-se cataliticamente ativa nos ensaios cinéticos. Por experimentos de cromatografia de exclusão molecular observamos que a amostra purificada se comportava na forma de monômero. Dados de difração de raios-X foram coletados para cristais da macromolécula obtidos na ausência de ligantes. A estrutura cristalográfica foi resolvida a 2.3 Å, apresentando um dímero na unidade assimétrica. Ambas as moléculas do dímero estavam na forma livre e apresentava grande diferença conformacional se comparadas

com as PGAMs de estruturas conhecidas que estão ligadas ao substrato ou produto natural. Por espalhamento de raios-X a baixos ângulos confirmamos que a enzima é monomérica em condições que mimetizam a fisiológica. A mudança conformacional induzida pelo ligante não afeta a topologia dos dois domínios da PGAM. Entretanto, há mudanças nos ângulos torcionais da cadeia principal dos laços que conectam os domínios da proteína. Além disso, o metal cobalto parece estar envolvido na estabilização da estrutura terciária da PGAM na conformação livre. Finalmente, este novo modelo estrutural pode contribuir para o esforço internacional de desenvolver fármacos tripanocidas.

Palavras-chave: Fosfoglicerato mutase. Isomerase. Tripanossomíase. Doenças Negligenciadas.

## ABSTRACT

MERCALDI, G. F. **Phosphoglycerate Mutase from *Trypanosoma brucei*: structure and reaction mechanism**. 2010. 74p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Tropical diseases represent a major burden on population health in low-income countries, being related to poverty and social disadvantage. African trypanosomiasis is a neglected parasitic infection on the agenda of World Health Organization. This disorder is caused by *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*, transmitted by the tsetse fly (*Glossina sp.*), and usually fatal if untreated. The drugs used in the treatment are ineffective, difficult to administer, and cause severe adverse reactions. Therefore, there is a need to develop effective and safe chemotherapies. Thus, the enzyme phosphoglycerate mutase (PGAM) emerges as an important molecular target. This enzyme is involved in glucose metabolism, and is necessary for viability of the parasite. Moreover, it differs from the host enzyme allowing the identification of specific inhibitors. Nevertheless, efforts have been made in identifying PGAM inhibitors and to elucidate their structure and mechanism of reaction. Our purpose is to obtain the high resolution model of the macromolecule free from ligands and consequently to analyze the change in conformation that undergoes upon binding to its natural substrate. *Trypanosoma brucei* PGAM obtained in the expression and purification was shown to be catalytically active in the kinetics assays. In the size exclusion chromatography we observed that the purified sample behaves as a monomer. X-ray diffraction data were collected for crystals of the macromolecules obtained in the absence of ligands. The crystal structure was solved to 2.3 Å, showing a dimer in the asymmetric unit. Both molecules of the dimer were in free form, and had a large conformational difference compared with those of known PGAM structures that are connected to the natural substrate or product. Small angle X-ray scattering confirms that the enzyme is monomeric under conditions

that mimic the physiological. Ligand-induced conformational change does not affect the topology of the two domains of the PGAM. However, there are changes in torsional angles of the main chain of the loops that connect the protein domains. Additionally, the metal cobalt seems to be involved in stabilizing the tertiary structure of PGAM in the free conformation. Finally, this new structural model may contribute to the international effort to develop trypanocidal drugs.

Keywords: Phosphoglycerate mutase. Isomerase. Trypanosomiasis. Neglected diseases.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Distribuição da doença do sono africana com incidências e riscos para turistas. A linha preta divide as áreas onde predomina a infecção por <i>T. brucei gambiense</i> daquela que prevalece <i>T. brucei rhodesiense</i> . .....	29
<b>Figura 2</b>	Estágios do ciclo de vida da parasita <i>Trypanosoma brucei</i> . .....	31
<b>Figura 3</b>	Estrutura dos fármacos usados contra a tripanossomíase africana. ....	32
<b>Figura 4</b>	Representação esquemática da glicólise na forma sanguínea do <i>T. brucei</i> . Em condições aeróbicas, a glicose é convertida em duas moléculas de piruvato, enquanto em condições anaeróbicas quantidades equimolares de glicerol e piruvato são produzidas. <sup>12</sup> Enzimas: 1, hexokinase; 2, glicose-6-fosfato isomerase; 3, fosfofrutokinase; 4, aldolase; 5, triosefosfato isomerase; 6, glicerol-3-fosfato desidrogenase; 7, glicerol kinase; 8, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 9, fosfoglicerato kinase glicosomal; 10, fosfoglicerato mutase; 11, enolase; 12, piruvate kinase; 13, glicerol-3-fosfato desidrogenase FAD-dependente; 14, oxidase alternativa. Abreviações: 1,3BPGA, 1,3-bifosfoglicerato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; F6P, frutose 6-fosfato; FBP, frutose 1,6-bifosfato; G3P, gliceraldeído 3-fosfato; G6P, glicose 6-fosfato; Gli-3P, glicerol 3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; 3PGA, 3-fosfoglicerato; Pi, fosfato inorgânico; UQ, ubiquinona. ....	35
<b>Figura 5</b>	Distribuição das classes de fosfoglicerato mutases nos diferentes organismos. ....	36
<b>Figura 6</b>	Esquema ilustrando a cromatografia de afinidade por metal. ....	42
<b>Figura 7</b>	Esquema mostrando o ensaio cinético da <i>Tb</i> iPGAM. Neste experimento a formação de 2-fosfoglicerato é acoplada ao consumo de NADH usando as enzimas auxiliares enolase, piruvato kinase e lactato desidrogenase. O decréscimo na absorbância relativo ao consumo de NADH é monitorado espectrofotômetricamente a 340 nm. Abreviações: nicotinamida adenina dinucleotídeo, NADH; adenosina difosfato, ADP; adenosina trifosfato, ATP. ....	44
<b>Figura 8</b>	Técnica de difusão de vapor usada na cristalização de macromoléculas. ...	45
<b>Figura 9</b>	Cristais da <i>Tb</i> iPGAM formados na triagem com robô. A condição que estes cristais se formaram veio do poço G7 do fatorial Index HT (Hampton). ....	46

<b>Figura 10</b>	Cristais da <i>Tb</i> iPGAM formados após otimizações da condição inicial. Este grupo de cristais foi separado e os melhores fragmentos foram congelados e usados nos experimentos de difração de raios-X. ....	47
<b>Figura 11</b>	Géis de poliacrilamida mostrando as etapas de purificação da <i>Tb</i> iPGAM por cromatografia de afinidade. Destaca-se a alta taxa de produção da proteína recombinante contra as proteínas constitutivas da bactéria na fração solúvel do lisado (sob). Abreviações: marcadores de massa molecular, MM; sobrenadante do lisado após remoção dos ácidos nucleicos, Sob; lavagem com tampão de lise, Lav; eluição com tampão de lise contendo 10, 20, 30 e 50 mM de imidazol, E1, E2, E3 e E5, respectivamente. ....	51
<b>Figura 12</b>	Gráfico de Michaelis-Menten do substrato 3PGA para a <i>Tb</i> iPGAM. ....	52
<b>Figura 13</b>	Determinação da massa molecular da <i>Tb</i> iPGAM por cromatografia de exclusão por tamanho. ....	54
<b>Figura 14</b>	Estrutura cristalográfica da <i>Tb</i> iPGAM. A unidade assimétrica é formada por um homo-dímero e os monômeros estão coloridos em azul e verde. O íon cobalto está destacado em magenta. Removendo o monômero colorido em verde, rotacionando a molécula que estava inicialmente em azul (conforme ilustrado) e adicionando a superfície eletrostática, podemos observar as regiões com carga positiva (azul), negativa (vermelho) e neutra (cinza). Nota-se que a área de contato é predominantemente polar. ....	56
<b>Figura 15</b>	Monômero da <i>Tb</i> iPGAM mostrando os domínios e como eles se conectam. Em destaque na parte inferior da figura está a sequência da <i>Tb</i> iPGAM, mostrando a que domínio pertence cada região. ....	57
<b>Figura 16</b>	Sítios metálicos M1 e M2, mostrando os resíduos que coordenam os íons cobalto. ....	57
<b>Figura 17</b>	Curvas de espalhamento experimental para a <i>Tb</i> iPGAM. Observa-se que havia pouca interferência inter-partículas. ....	58
<b>Figura 18</b>	Gráficos de Guinier. ....	59
<b>Figura 19</b>	Comparação da curva de espalhamento experimental da <i>Tb</i> iPGAM com curvas teóricas geradas a partir de modelos de alta resolução. Fica claro que a forma funcional da <i>Tb</i> iPGAM é monomérica. Além disso, a curva para estrutura em conformações livre da <i>Tb</i> iPGAM é a que mais se assemelha com a curva experimental coletada na ausência de ligantes. ....	60

<b>Figura 20</b>	Movimento dos domínios na mudança de conformação induzida pelo ligante. ....	62
<b>Figura 21</b>	Disposição dos sítios ativos da enzima na conformação livre. ....	63
<b>Figura 22</b>	Alinhamento estrutural dos domínios transferase da iPGAM de diversos organismos. ....	64



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Investimentos em P&D por doenças. ....	28
<b>Tabela 2</b>	Fármacos usados no tratamento da tripanossomíase africana. ....	32
<b>Tabela 3</b>	Atividade enzimática da <i>Tb</i> iPGAM para diferentes concentrações de 3PGA. ....	52
<b>Tabela 4</b>	Coefficientes de partição determinados na cromatografia de exclusão por tamanho. ....	53
<b>Tabela 5</b>	Estatística da coleta de dados e refinamento. ....	55



## LISTA DE ABREVIATURAS

2PGA	2-fosfoglicerato
3PGA	3-fosfoglicerato
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
<i>Ba</i> iPGAM	Fosfoglicerato mutase de <i>Bacillus anthracis</i> independente do cofator 2,3-bifosfoglicerato
Bis-Tris	2-Bis(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
<i>Bs</i> iPGAM	Fosfoglicerato mutase de <i>Bacillus stearothermophilus</i> independente do cofator 2,3-bifosfoglicerato
DALYs	Anos de vida perdidos ajustados por incapacidade
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNT	Doença tropical negligenciada
dPGAM	Fosfoglicerato mutase dependente do cofator 2,3-bifosfoglicerato
ENO	Enolase
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPDH	Glicero-3-fosfato desidrogenase
GPO	Sistema glicerol-3-fosfato oxidase
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	Cromatógrafo líquido de alta eficiência
HTD	Docagem em larga escala

HXK	Hexoquinase
iPGAM	Fosfoglicerato mutase independente do cofator 2,3-bifosfoglicerato
IPTG	Isopropil tio- $\beta$ -D-galactosídeo
LDH	Lactato desidrogenase
<i>Lm</i> iPGAM	Fosfoglicerato mutase de <i>Leishmania mexicana</i> independente do cofator 2,3-bifosfoglicerato
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MPD	Metil-pentanodiol
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NCBI	Centro nacional de informações sobre biotecnologia
OMS	Organização mundial de saúde
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
PDB	Banco de dados de proteínas
PEG	Polietilenoglicol
PFK	Fosfofruto quinase
PGAM	Fosfoglicerato mutases
PGK	Fosfoglicerato quinase
PMSF	Fluoreto de fenil metano sulfonil
PYK	Piruvato quinase
RAM	Reação adversa medicamentosa
RMSD	Raiz do desvio médio quadrado
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SDS-PAGE	Eletroforese com gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio
TAO	Oxidase alternativa de tripanosomas



<i>Tb</i> iPGAM	Fosfoglicerato Mutase de <i>Trypanosoma brucei</i> independente do cofator 2,3-bifosfoglicerato
TCEP	Tris-[2-carboxietil]-fosfano
TEA	Trietanolamina



## LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom ( $10^{-10}$ m)
kDa	Quilodaltons ( $10^3$ g/mol)
L	Litros
M	Molar
nm	nanômetros
°C	Graus Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>1.1</b>	<b>O Panorama das Doenças Negligenciadas .....</b>	<b>27</b>
<b>1.2</b>	<b>Tripanosomíase Africana .....</b>	<b>29</b>
<b>1.3</b>	<b>Alvos Moleculares para o Desenvolvimento de Fármacos Tripanocidas ....</b>	<b>33</b>
<b>1.4</b>	<b>Enzima Fosfoglicerato Mutase .....</b>	<b>36</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Expressão e Purificação da Proteína .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2</b>	<b>Cromatografia de Exclusão por Tamanho .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3</b>	<b>Cinética Enzimática .....</b>	<b>43</b>
<b>3.4</b>	<b>Cristalização e Coleta de Dados .....</b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b>Determinação da Estrutura e Refinamento .....</b>	<b>47</b>
<b>3.6</b>	<b>Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos .....</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Expressão, Purificação e Cinética Enzimática .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2</b>	<b>Cromatografia de Exclusão por Tamanho .....</b>	<b>53</b>
<b>4.3</b>	<b>Estrutura Cristalográfica .....</b>	<b>55</b>
<b>4.4</b>	<b>Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS) .....</b>	<b>58</b>
<b>4.5</b>	<b>Movimento dos Domínios Induzidos pelo Ligante .....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O Panorama das Doenças Negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) representam as enfermidades mais comuns para bilhões de pessoas que vivem em países em desenvolvimento. Seu surgimento e propagação estão diretamente relacionados a condições ambientais e socioeconômicas, afetando principalmente as classes sociais menos favorecidas. Assim, causam um impacto substancial sobre a saúde em populações dos continentes africano, asiático e americano, em particular da América Latina.<sup>1-4</sup>

Das infecções parasitárias ou bacterianas atualmente cobertas pelo departamento de DTNs da Organização Mundial de Saúde<sup>5</sup> (OMS), sete são causadas por helmintos (ascaridíase, ancilostomose, tricuriase, dracunculíase, elefantíase, oncocercose e esquistossomose), três por protozoários (doença de Chagas, doença do sono africana e leishmaniose) e quatro por bactérias (úlceras de Buruli, hanseníase, tracoma e boubas). Juntas, essas moléstias causam cerca de 534.000 mortes por ano e este número é quase tão alto quanto o observado para as chamadas três grandes doenças (HIV/AIDS, tuberculose e malária). Além disso, estima-se uma perda anual de 60 milhões de DALY's (*Disability-Adjusted Life Years*, Anos de Vida Ajustados por Incapacidade), o que dificulta o desenvolvimento econômico em comunidades pobres e marginalizadas.<sup>3</sup>

Os gastos com as DTNs são uma pequena proporção da assistência oficial para o desenvolvimento da saúde. Devido ao baixo investimento em medidas de controle e prevenção, esses males continuam a apresentar uma alta taxa de morbidade, mesmo que seja comprovado que várias dessas possam ser controladas, ou até mesmo erradicadas, por estratégias seguras e de baixo custo.<sup>6-8</sup> Além disso, chama a atenção os gastos com programas para pesquisa e desenvolvimento (P&D). Um estudo realizado em 2009<sup>9</sup> mostra que no ano de 2007, para doenças que: a) afetam desproporcionalmente pessoas em países subdesenvolvidos; b) necessitam de novos ou melhores produtos; e c) apresentam um mercado pouco atraente para indústrias privadas; o investimento em P&D de novos produtos foi estimado em torno de dois bilhões e meio de dólares (tabela 1). Embora a distribuição dos investimentos tenha um razoável acordo com o impacto das afecções para a saúde, podemos

tomar como exemplo as doenças diarréicas e as helmintíases, causadores de sérios problemas de saúde em países de média e baixa renda, podem receber maiores investimentos. Do mesmo modo, as doenças causadas por kinetoplastidas merecem uma maior cota dos gastos com P&D. Isso poderia mudar o quadro dessas parasitoses, onde as opções de tratamento são na maioria dos casos inadequadas.

**Tabela 1 - Investimentos em P&D por doenças.**

<b>DOENÇA</b>	<b>INVESTIMENTOS (US\$)</b>	<b>% do TOTAL</b>	<b>DALYs † (milhares)</b>
HIV/AIDS	1.083.018.183	42,30	58.513
Malaria	468.449.438	18,30	33.976
Tuberculose	410.428.697	16,03	34.217
Kinetoplastidas	125.122.839	4,89	4.077
Doenças diarréicas	113.889.118	4,45	72.777
Dengue	82.013.895	3,20	670
Helmintíases	51.591.838	2,02	11.992
Meningite e pneumonia bacteriana	32.517.311	1,27	11.426 (apenas meningite)
Febre tifóide e paratifóide	9.117.212	0,36	-
Hanseníase	5.619.475	0,22	194
Úlcera de Buruli	2.412.950	0,09	-
Tracoma	1.679.711	0,07	1.334
Febre reumática	1.670.089	0,07	-
Outros	293.456.844	11,46	-
<b>TOTAL</b>	<b>2.560.068.749</b>	<b>100</b>	

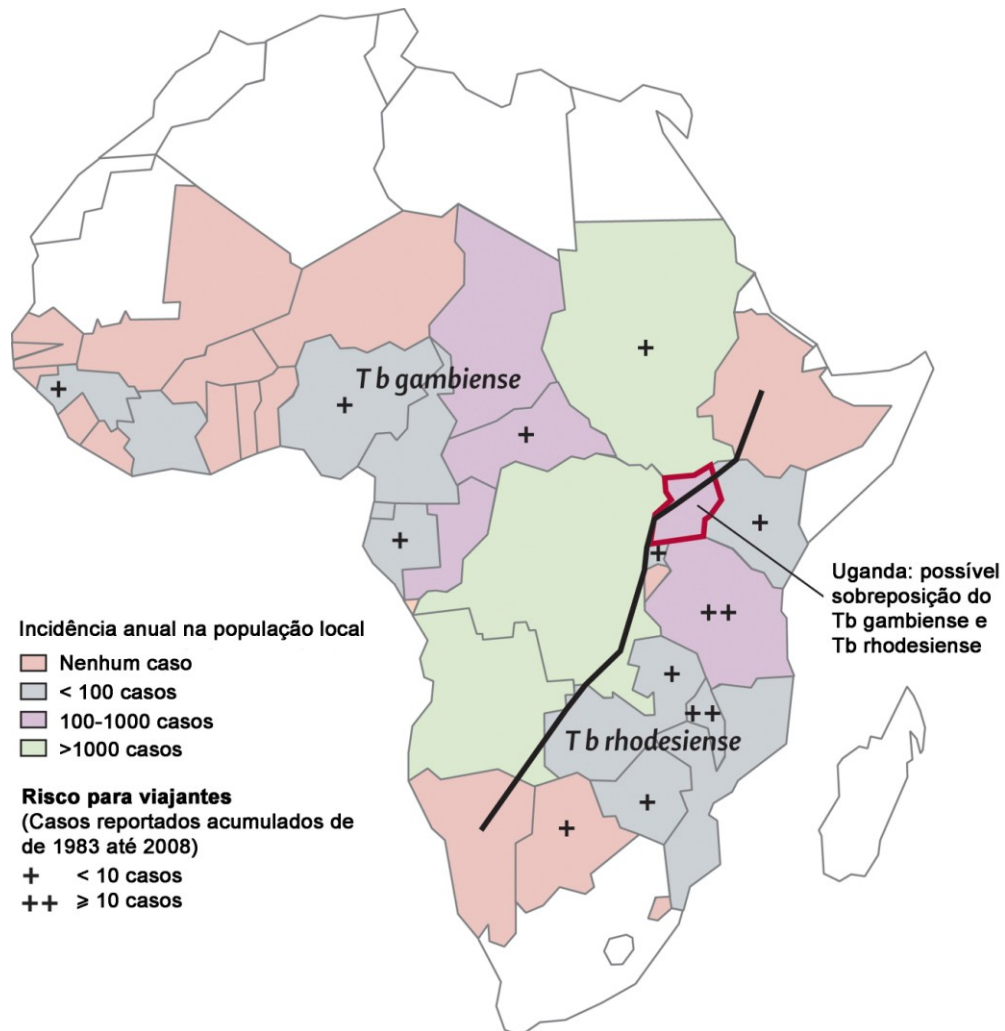
† Dados da OMS obtidos no *Global Burden of Diseases* publicado em 2008, referente ao ano de 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/healthinfo>>. Acesso em: 14 jul. 2010.

Fica evidente que há uma necessidade urgente por mais pesquisas básicas e operacionais, bem como o desenvolvimento de fármacos e vacinas. Além disso, é necessária uma atenção maior por parte dos governos e agências internacionais; assim como é importante estabelecer novas parcerias entre indústria e academia para melhorar os métodos de prevenção, detecção e tratamento. Engajado neste contexto, nosso grupo tem a tradição de focalizar suas atividades para o estudo de doenças negligenciadas. Não obstante, nesta dissertação os estudos estão relacionados com a enzima fosfoglicerato mutase de *Trypanosoma brucei*, agente causador de Nagana em gado e doença do sono africana em humanos.



## 1.2 Tripanossomíase Africana

A doença do sono, também conhecida como tripanossomíase africana, é causada por dois protozoários parasitas unicelulares da família Trypanosomatidae. A forma crônica é causada pelo *Trypanosoma brucei gambiense* no oeste da África, enquanto o *T. b. rhodesiense*, causa uma forma mais aguda e severa no sul e no leste da África (figura 1). Ambos são transmitidos pela mosca tsé-tsé (*Glossina sp.*) e assim a distribuição geográfica da doença é restrita a África Subsaariana, onde há habitats adequados para o vetor.



**Figura 1** - Distribuição da doença do sono africana com incidências e riscos para turistas. A linha preta divide as áreas onde predomina a infecção por *T. brucei gambiense* daquela que prevalece *T. brucei rhodesiense*.<sup>10</sup>

Embora atualmente a ocorrência de 50.000 a 70.000 casos anuais pareça insignificante em uma escala mundial, existem zonas endêmicas em vários países africanos colocando milhões de pessoas em risco. Vale lembrar ainda que, apesar de existirem casos de infecções em regiões urbanas, são as regiões rurais pobres e remotas as principais afetadas. Assim, por afetar regiões com pouca infra-estrutura, muitos casos não são reportados ou diagnosticados, dificultando uma real estimativa da abrangência desta enfermidade.<sup>8,10-11</sup> Somando a isso, a doença do sono e a Nagana, forma animal da tripanossomíase africana causada pelo *T. b. brucei*, causam grande impacto econômico nas regiões afetadas por dificultar o desenvolvimento rural e limitar a produção agrícola.<sup>10-11</sup>

O *Trypanosoma brucei* têm um complicado ciclo de vida, onde quatro formas distintas do parasita podem ser encontradas: sanguínea no hospedeiro mamífero; tripomastigota procíclica no intestino da mosca tsé-tsé; epimastigota e tripomastigota metacíclica na glândula salivária do vetor tsé-tsé (figura 2). A forma tripomastigota sanguínea encontra um ambiente rico em glicose no hospedeiro, produzindo toda energia através da glicólise. Nessa fase do ciclo de vida alguma vias metabólicas mitocondriais, tais como o ciclo do ácido tricarbóxico, a cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa, se encontram reprimidas. Por outro lado, a forma tripomastigota procíclica tem um sistema mitocondrial elaborado.<sup>12</sup>

Alem dos humanos, animais domésticos e selvagens também podem ser infectados pelo *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense*, atuando como reservatórios animais onde a tsé-tsé pode adquirir a infecção.<sup>10</sup> No estágio inicial de infecção em humanos, quando os tripanossomos são encontrados no sistema linfático e sanguíneo, observa-se febre, dor de cabeça e inchaço dos gânglios linfáticos. No estágio avançado da doença o parasito é também encontrado no cérebro e fluído cérebro-espinhal. Nessa fase surge o distúrbio do sono que dá nome a doença, além dos sintomas neurológicos (tremores, fraqueza motora, paralisia de membros, movimentos anormais, distúrbios de movimento parkinsonianos e distúrbio de fala) e desordens psiquiátricas (mudanças comportamentais, deterioração das funções mentais, comportamento agressivo e psicótico, apatia e inatividade). O declínio neurológico progressivo culmina em coma e então morte.<sup>8,10</sup>

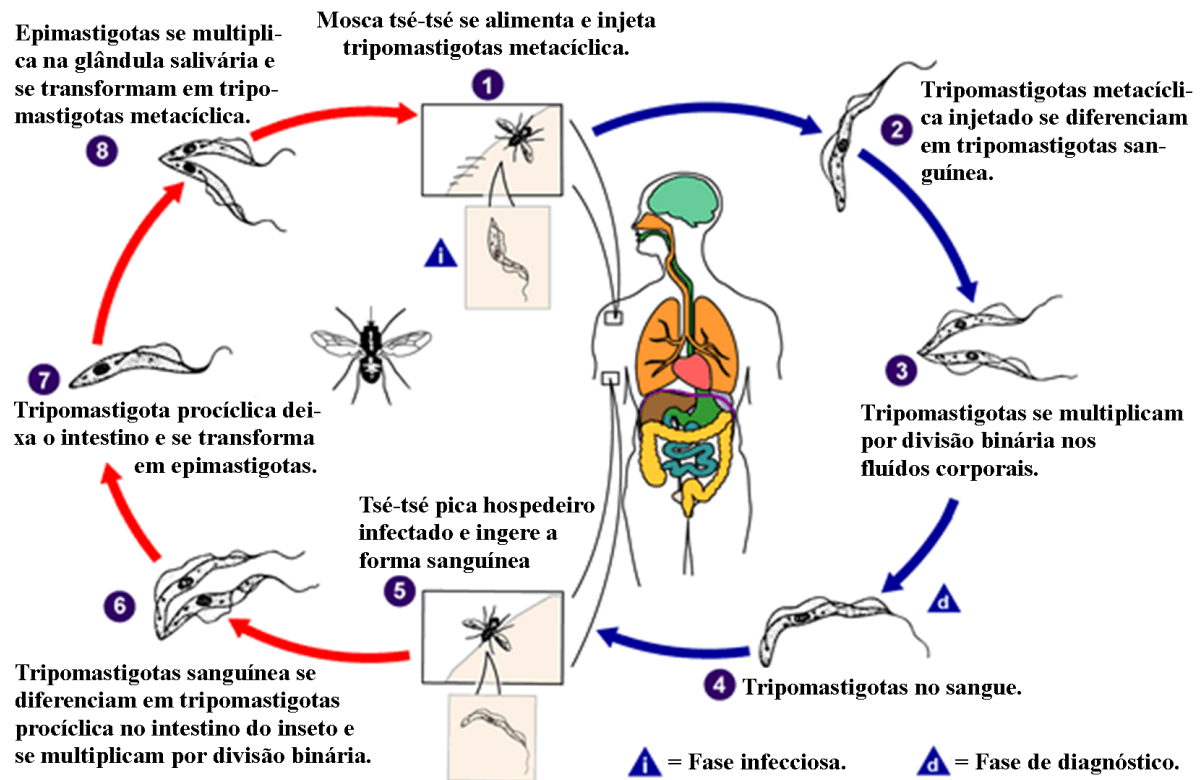
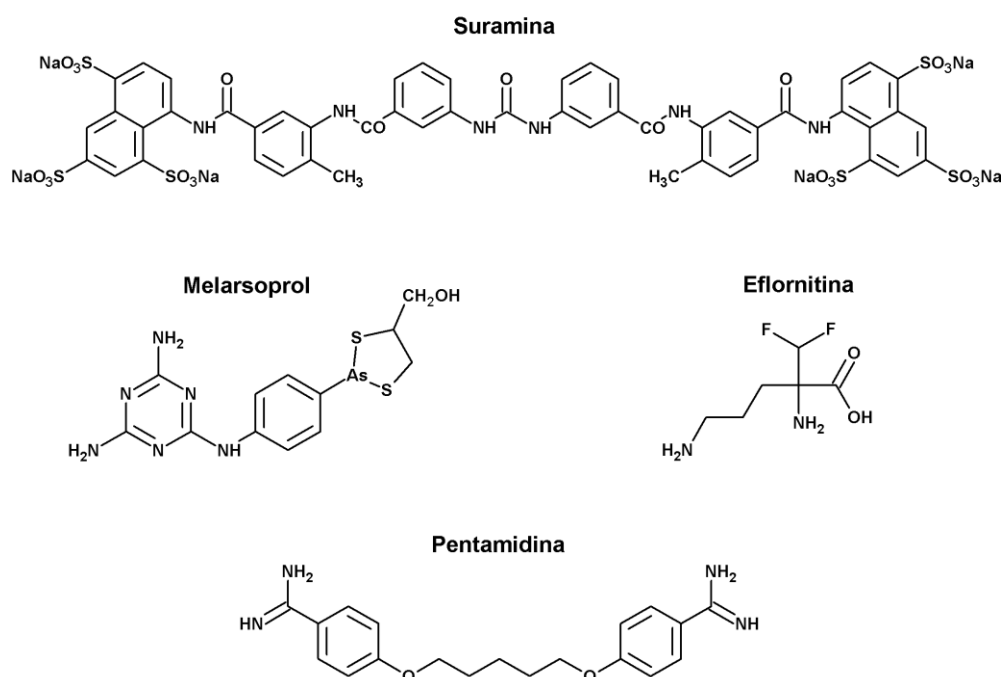


Figura 2 - Estágios do ciclo de vida da parasita *Trypanosoma brucei* (adaptado de: <http://www.dpd.cdc.gov>; acessado em 27 de abril de 2010).

O diagnóstico da tripanossomíase africana depende de exames laboratoriais, pois o exame clínico não é suficiente para confirmação da doença. Geralmente utiliza-se um teste sorológico para detectar anticorpos contra *T. b. gambiense* nas triagens em áreas endêmicas. Entretanto, a confirmação do diagnóstico sempre é realizada através de exames microscópicos usando aspirado de tecidos (por ex. linfonodos), amostras de sangue, fluido cérebro-espinhal ou medula óssea.<sup>8,10</sup>

Em um quadro comum as doenças negligenciadas, o tratamento quimioterápico da tripanossomíase africana não é eficaz. Isso porque na maioria dos casos esta doença é identificada nos estágios avançados onde os fármacos são menos eficientes. Somado a isso, os fármacos disponíveis são difíceis de administrar, causam graves reações adversas medicamentosas (RAMs) (figura 3) e o parasita tem desenvolvido resistência contra a maioria deles.<sup>6,8,10</sup> Conforme observado na tabela 2, a escolha do medicamento é baseada no estágio da doença e no agente causador.



**Figura 3** - Estrutura dos fármacos usados contra a tripanossomíase africana.

**Tabela 2** - Fármacos usados no tratamento da tripanossomíase africana.<sup>10</sup>

	<b>Estágio da doença</b>	<b>Via de administração</b>	<b>Principais RAMs</b>
<b><i>Trypanosoma brucei gambiense</i></b>			
Pentamidina	Inicial	Intramuscular	Hipoglicemia, dor no local da injeção, diarreia, náuseas e vômitos
Eflornitina	Avançado	Intravenosa	Diarreia, náusea, vômitos, convulsões, anemia, leucopenia e trombocitopenia
Melarsoprol	Avançado	Intravenosa	Encefalopatia, neuropatia motora periférica ou sensorial, reações cutâneas e tromboflebite
<b><i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i></b>			
Suramina	Inicial	Intravenosa	Reações de hipersensibilidade, neuropatia periférica, albuminúria, hematúria e cilindrúria
Melarsoprol	Avançado	Intravenosa	Encefalopatia, neuropatia motora periférica ou sensorial, reações cutâneas e tromboflebite

### 1.3 Alvos Moleculares para o Desenvolvimento de Fármacos Tripanocidas

Graças ao seqüenciamento completo do genoma do *Trypanosoma brucei* uma vasta quantidade de informações a cerca destes organismos facilitaram as pesquisas em descoberta de fármacos tripanocidas. Várias vias bioquímicas, comuns aos tripanosomatídeos e ausentes nos hospedeiros mamíferos passaram a ser alvos moleculares atrativos.<sup>13-16</sup>

Podemos citar vários potenciais alvos para o desenho racional de tripanocidas, como: metabolismo de glicose e glicossomo; via das pentoses-fostato; metabolismo de tiois e poliaminas; metabolismo de purinas e pirimidinas; metabolismo de lipídeos e esteróis; proteases e kinases; proteínas transportadoras e estruturais; além de outros como sinalização e diferenciação celular.<sup>6,17-18</sup> Com esta variedade, não é de se estranhar que nos últimos anos uma parte substancial das pesquisas com tripanossomos estão relacionados com a identificação e validação de novos alvos, assim como caracterização e desenvolvimento de compostos líderes que possam modular a atividade de um alvo em particular e induzir uma resposta terapêutica benéfica.<sup>16-17,19-20</sup>

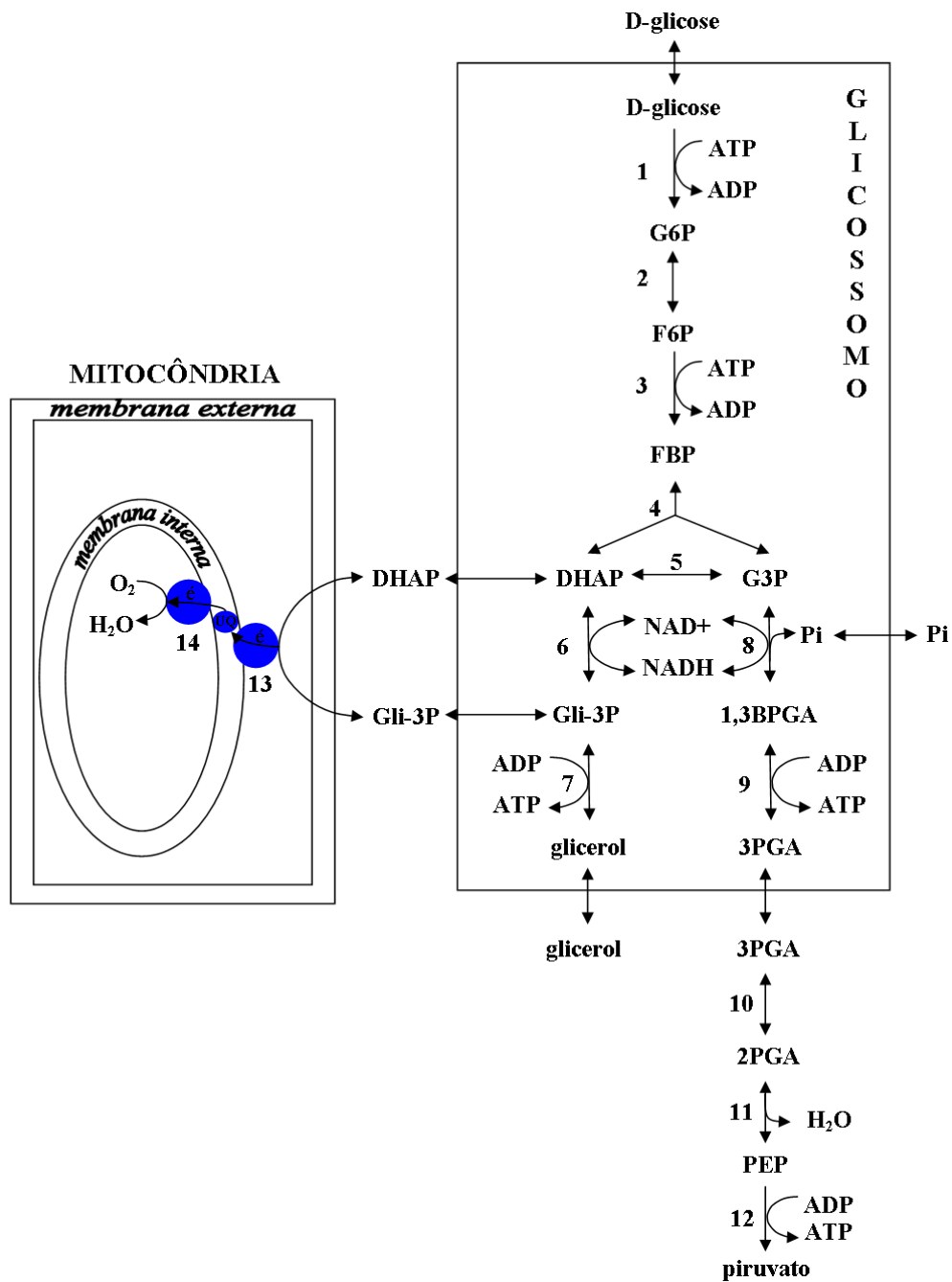
A via glicolítica aparece como um atraente alvo em tripanosomatídeos, pois a forma sanguínea do *T. brucei* é totalmente dependente do metabolismo de glicose para obtenção de energia. Além disso, a longa distância evolutiva entre tripanosomatídeos e hospedeiros mamíferos somada à organização pouco usual da via glicolítica nos parasitas (figura 4), faz com que as enzimas desta via tenham características únicas que permite o desenvolvimento de inibidores seletivos que afetam os tripanossomos sem afetar os hospedeiros.<sup>21</sup>

Das enzimas responsáveis pela catalise da glicose, sete estão seqüestradas em uma organela semelhante ao peroxissomo (glicossomo) e outras três, encarregadas de transformar o 3-PGA até piruvato, estão livres no citosol. Dentro do glicossomo o NADH formado pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH – 8 da figura 4) é reoxidado pela glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH) glicossomal (6 da figura 4), seguido pela transferência dos elétrons para O<sub>2</sub> via sistema glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) mitocondrial. Esse processo envolve um transportador presente na membrana do glicossomo, que faz a troca de glicerol-3-fosfato por dihidroxiacetona fosfato. A GPO é na verdade um sistema que contém uma GPDH mitocondrial (13 da figura 4) ligada a flavina adenina dinucleotídeo (FAD; geralmente associado com a membrana mitocondrial), ubiquinona e uma oxidase terminal (TAO, *Trypanosoma Alternative Oxydase*, Oxidase Alternativa de Trypanosoma – 14 da figura 4).

Contudo, esse processo respiratório não está envolvido na transdução de energia em tripanosomatídeos.<sup>12,21</sup>

Ainda no glicosomo, o consumo de ATP pela hexoquinase (HXK – 1 da figura 4) e fosfofruto quinase (PFK – 3 da figura 4) é balanceado pela produção via fosfoglicerato quinase (PGK – 9 da figura 4). Portanto, a produção líquida de ATP ocorre no citosol na reação catalisada pela enzima piruvato quinase (PYK – 12 da figura 4), em etapa posterior a reação catalisada pela enzima fosfoglicerato mutase (PGAM - 10 figura 4).<sup>12,21</sup>

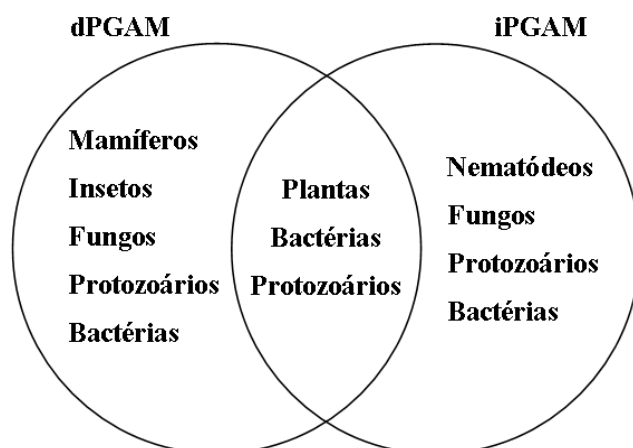
Na ausência de oxigênio, a forma sanguínea do *T. brucei* tem o metabolismo de carboidratos modificado. Nestas condições o  $\text{NAD}^+$  é regenerado pela GPDH glicossomal (6 da figura 4), seguido pela formação de glicerol e ATP através da reação reversa da enzima glicerol quinase (7 da figura 4). Para cada molécula de glicose catalisada são formadas agora uma molécula de 3-fosfoglicerato e uma de glicerol, diferente do que ocorria na presença de oxigênio onde se formam duas moléculas de 3-fosfoglicerato. O balanço de ATP no glicossomo é mantido, pois a glicerol quinase compensa a perda de uma molécula de ATP na reação da PGK (9 da figura 4). A produção líquida de ATP em condições anaeróbicas é reduzida pela metade do que se observa no metabolismo aeróbico, já que a PYK (12 da figura 4) vai ter apenas uma molécula de fosfoenol piruvato disponível para a reação. Vale destacar que a reação reversa da glicerol quinase (7 da figura 4) é termodinamicamente desfavorável, ocorrendo apenas quando se tem altas concentrações de glicerol-3-fosfato e uma elevada taxa de ADP/ATP. Essas condições só podem ser alcançadas graças ao glicossomo.<sup>12,21</sup>



**Figura 4** - Representação esquemática da glicólise na forma sanguínea do *T. brucei*. Em condições aeróbicas, a glicose é convertida em duas moléculas de piruvato, enquanto em condições anaeróbicas quantidades equimolares de glicerol e piruvato são produzidas.<sup>12</sup> **Enzimas:** 1, hexokinase; 2, glicose-6-fosfato isomerase; 3, fosfofrutokinase; 4, aldolase; 5, triosefosfato isomerase; 6, glicerol-3-fosfato desidrogenase; 7, glicerol kinase; 8, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 9, fosfoglicerato kinase glicosomal; 10, fosfoglicerato mutase; 11, enolase; 12, piruvate kinase; 13, glicerol-3-fosfato desidrogenase FAD-dependente; 14, oxidase alternativa. **Abreviações:** 1,3BPGA, 1,3-bifosfoglicerato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; F6P, frutose 6-fosfato; FBP, frutose 1,6-bifosfato; G3P, gliceraldeído 3-fosfato; G6P, glicose 6-fosfato; Gli-3P, glicerol 3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; 3PGA, 3-fosfoglicerato; Pi, fosfato inorgânico; UQ, ubiquinona.

## 1.4 Enzima Fosfoglicerato Mutase

As fosfoglicerato mutases (PGAMs, EC 5.4.2.1) estão envolvidas no metabolismo de glicose em virtualmente todos os organismos.<sup>22-24</sup> Esta enzima é responsável por catalisar a isomerização do 3-fosfoglicerato (3PGA) a 2-fosfoglicerato (2PGA), sendo distinguidas em duas classes evolucionárias distintas, as independentes do cofator 2,3-bifosfoglicerato (iPGAM) e as dependentes do cofator (dPGAM). Como pode ser observado na figura 5, dependendo do organismo podemos encontrar a iPGAM, a dPGAM ou ambas as classes da enzima.<sup>23,25-30</sup>



**Figura 5** - Distribuição das classes de fosfoglicerato mutases nos diferentes organismos.

As iPGAMs pertencem a superfamília das fosfatases alcalinas, catalisando a transferência do fosfato através de uma fosfoserina intermediária. Esta enzima tem dois domínios, um estruturalmente semelhante à fosfatase alcalina e outro a sulfatase.<sup>26,31-32</sup> Por sua vez, as dPGAMs fazem parte da superfamília das fosfatases ácidas e transferem o fosfato do substrato para o produto através de um resíduo de histidina.<sup>33-34</sup> Como estas duas classes de enzima são estrutural e cataliticamente diferentes, a iPGAM se mostra um promissor alvo para o desenvolvimento de fármacos contra doenças infecciosas. Isso porque é possível explorar estas diferenças para identificar inibidores específicos que afetam o agente causador da doença, sem modular a atividade da enzima do enfermo. Nesse sentido, esforços têm sido realizados para identificar inibidores contra a iPGAM.<sup>35</sup>

Os tripanosomatídeos, agentes causadores das doenças do sono africana, Chagas e leishmaniose, possuem exclusivamente a iPGAM participando da via glicolítica.<sup>36-37</sup> Por outro



lado, os hospedeiros mamíferos possuem a dPGAM.<sup>23-24</sup> Sendo assim, estudos com esta enzima podem contribuir para o desenvolvimento de fármacos tripanocidas. Além disso, outros fatores reforçam a iPGAM como um potencial alvo molecular. Através de experimentos de RNA de interferência, mostrou-se que baixos níveis de iPGAM no *Trypanosoma brucei* (*Tb* iPGAM) leva a forma sanguínea do parasito a morte.<sup>38</sup> Do mesmo modo, mostrou-se que as formas tripomastigostas procíclica são dependentes da iPGAM para seu crescimento,<sup>39</sup> mesmo que estas não dependam exclusivamente do metabolismo de glicose para a obtenção de energia.<sup>40</sup>

Para organismos da família *Trypanosomatidae* a única iPGAM com estrutura de alta resolução conhecida é de *Leishmania mexicana* (*Lm* iPGAM, código PDB: 3IGZ e 3IGY). A enzima foi co-cristalizada com o seu ligante natural (3PGA/2PGA) e assim apresenta um pequeno sítio ativo enterrado na proteína e sem contato com o solvente.<sup>41</sup> Uma consequência disto é que experimentos de docagem molecular em larga escala (HTD, *high throughput docking*) utilizando a estrutura da *Lm* iPGAM, a fim de identificar possíveis inibidores competitivos, se torna inviável.

Outras iPGAMs tem estrutura conhecida, sendo na maioria enzimas pertencentes a procariotos do gênero *Bacillus*. Para *Bacillus stearothermophilus* podemos encontrar quatro estruturas (*Bs* iPGAM, códigos PDB: 1EJJ, 1EQJ, 1O98 e 1O99), sendo todas encontradas na conformação ligada. Apesar das enzimas de *Bacillus* e *Trypanosomatidae* apresentarem baixa identidade seqüencial entre si (aproximadamente 35%), elas compartilham uma alta similaridade estrutural.<sup>29,31,42</sup> A iPGAM de *Bacillus anthracis* (*Ba* iPGAM, código PDB: 2IFY) é a única estrutura conhecida onde enzima não esta ligada ao substrato ou produto, estando em uma conformação livre. Esta apresenta uma grande separação entre os dois domínios que formam a enzima e estudos de Dinâmica Molecular indicam que esta conformação não é a mais estável na ausência de ligantes.<sup>42</sup> Assim como no caso da *Lm* iPGAM, todas as estruturas citadas não apresentam os requisitos para serem utilizadas em estudos de triagem *in silico* para identificação de ligantes virtuais.

O desenvolvimento de fármacos baseado na estrutura é uma estratégia largamente empregada para identificação de inibidores. Esta pode ser útil para identificar pequenas moléculas que modulam seletivamente as iPGAMs. Entretanto, como exposto anteriormente, as estruturas disponíveis atualmente não apresentam as características necessárias para serem usadas em estudos de triagem virtual. A estrutura da iPGAM em conformação livre de ligante pode servir a este propósito, já que novos sub-sítios para ligação de pequenas moléculas podem ser identificados. Além disso, a flexibilidade desta proteína e seu mecanismo de reação

forneem indícios que a proteína passa por uma mudança conformacional induzida pelo ligante, no caso o substrato da reação. Assim, o conhecimento da estrutura em uma nova conformação pode auxiliar no entendimento do processo de catálise enzimática das iPGAMs.

## 2 OBJETIVOS

- ✓ Obter uma estrutura de alta resolução da *Tb* iPGAM em conformação livre.
- ✓ Analisar a mudança de conformação da enzima induzida pelo substrato da reação.
- ✓ Identificar novos sítios que possam ser explorados no desenvolvimento de fármacos baseado na estrutura.



## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Expressão e Purificação da Proteína

Para a execução do projeto de mestrado havia a necessidade de quantidades razoáveis da proteína objeto de estudo em elevado grau de pureza. Sendo assim, inicialmente fizemos otimizações no protocolo de expressão e purificação da *Tb* iPGAM e as melhores condições estão descritas a seguir.

Na expressão da enzima recombinante, usamos bactérias *Escherichia coli* da cepa BL21(DE3) pLysS transformadas com o plasmídeo pET28a contendo o gene para expressão da *Tb* iPGAM, que foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Paul Michels, da Universidade Católica do Louvain, Bruxelas, Bélgica. Essas foram usadas no preparo de um pré-inóculo, onde cresceram durante toda a noite em 5 mL de meio Luria-Bertani (LB), contendo 30 µg/mL de canamicina, a 37°C e sob agitação de 250 rpm.

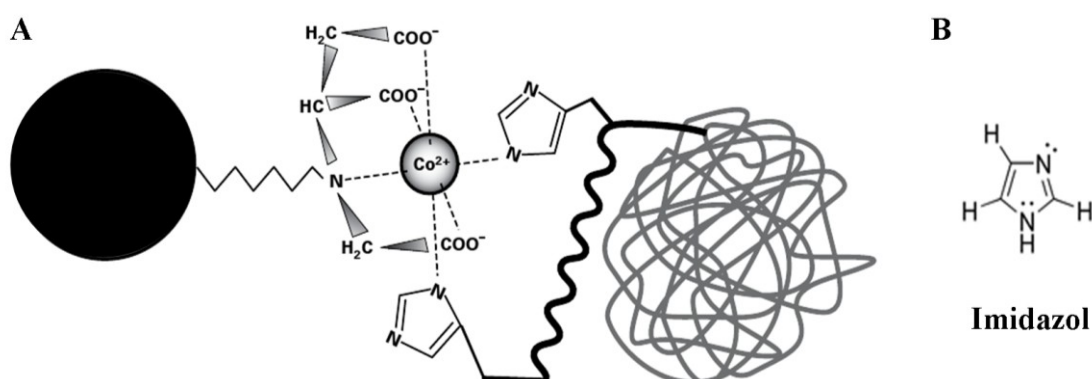
Usando o pré-inóculo, inoculamos 250 mL de meio LB acrescido de 30 µg/mL de canamicina. Além disso, o meio de cultivo continha 1 M de sorbitol que era empregado para causar pressão osmótica nas células e estabilizar a forma nativa das proteínas.<sup>43</sup> Inicialmente, o meio de cultivo foi mantido a temperatura de 37°C com agitação de 250 rpm. Ao atingir uma densidade ótica a 600 nm de 0.6-0.8 unidades de absorbância, o meio de cultivo passou por um choque térmico, 20 minutos a 47°C, seguido de incubação a 25°C. A mudança de temperatura foi utilizada para induzir a produção de proteínas de choque térmico, que auxiliam no enovelamento de proteínas e consequentemente podem aumentar a quantidade de enzimas recombinantes solúveis produzidas durante a expressão.<sup>43-44</sup> Posteriormente, a expressão da *Tb* iPGAM foi induzida pela adição de 1 mM de isopropil tio-β-D-galactosídeo (IPTG). O crescimento foi continuado durante toda a noite a 25°C com agitação de 250 rpm.

No dia seguinte, as células foram sedimentadas por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Após descartar o sobrenadante, dissolvemos o precipitado de bactérias em 25 mL de tampão de lise (50 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH pH 7.0, 0.6 M de NaCl, 1 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de imidazol, 0.5 mM de tris-[2-caboxietil]-fosfano (TCEP), 0.4 mM de fluoreto de fenil metano sulfonil (PMSF), 10 µM de Leupeptina, 1µM de Pepstatina e 10% de glicerol). Usando uma Prensa French (Thermo Scientific), as bactérias foram submetidas a dois ciclos de lise mecânica. O lisado foi clarificado por centrifugação a 10.000g por 10

minutos a 4°C e o sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, utilizado nas etapas seguintes.

Os ácidos nucleicos foram degradados pela adição de nuclease (benzonase, 10 U/mL) por 30 minutos a 37°C, seguido pela adição de 15 mg de sulfato de protamina a amostra para precipitar o DNA e mativemos por 15 minutos sob agitação em temperatura ambiente. Centrifugamos a amostra a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi recuperado para utilização na cromatografia de afinidade.

A *Tb* iPGAM foi isolada utilizando cromatografia de afinidade por metal (figura 6) usando resina Talon<sup>®</sup>. A cauda de histidinas expressa em fusão com a proteína de interesse interage com o cobalto imobilizado na resina, fazendo com que a *Tb* iPGAM seja retida. As proteínas contaminantes podem ser eliminadas através de lavagem com o tampão de lise. Para eluir a enzima, aplicamos um tampão de lise contendo imidazol nas concentrações 10, 20, 30 e 50 mM. O imidazol compete com as histidinas pela ligação ao cobalto fazendo com que a interação da cauda de histidina com a resina seja substituída pela interação do Imidazol.



**Figura 6** - Esquema ilustrando a cromatografia de afinidade por metal.

**A)** Interação da cauda de histidina da enzima recombinante presente na fase móvel com o metal quelado na resina da fase estacionária, permitindo recuperar de maneira seletiva as proteínas de interesse.

**B)** Estrutura do imidazol, que compete com as histidinas pela interação com o cobalto.

A amostra obtida foi concentrada e dialisada em tampão 50 mM de trietanolamina (TEA) pH=7.5 contendo 150 mM de NaCl. A pureza da amostra foi avaliada por SDS-PAGE visualizado por coloração pelo método de Comassie. A concentração de proteína foi determinada utilizando reagente Bradford e assim pode-se estimar o rendimento do processo de expressão e purificação.

### 3.2 Cromatografia de Exclusão por Tamanho

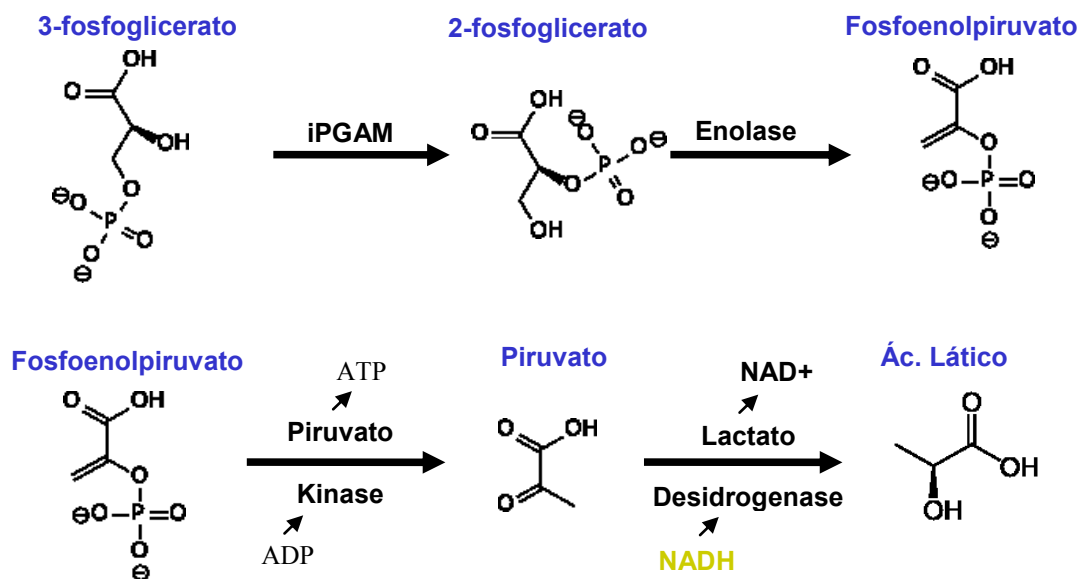
A separação de proteínas através de gel filtração se baseia no conceito de que moléculas com diferenças em sua massa molecular apresentam diferentes coeficientes de permeação na fase estacionária. Deste modo, empregando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) acoplado a coluna Superdex 200 GL 10/30 (GE Healthcare) preparamos uma curva de calibração usando como padrões de massa molecular as proteínas: Ferritina (440kDa), Aldolase (158kDa), Ribonuclease A (137kDa), Conalbumina (75kDa), Ovalbumina (44kDa) e Anidrase Carbônica (29kDa). Todas as amostras foram diluídas no tampão de corrida (50mM de TEA pH 7.5 contendo 150mM de NaCl). A cromatografia da *Tb* iPGAM foi então realizada em duas condições diferentes. Na primeira usamos o tampão de corrida sem presença de cobalto, enquanto na segunda adicionamos 0.4 M de  $\text{CoCl}_2$ . Em ambos os casos a concentração da amostra foi 5 mg/mL e antes da injeção esta foi centrifugada a 10.000 g por 1 minuto.

O volume de exclusão da coluna ( $V_o$ ) foi obtido com uso de “*Blue Dextran*”, enquanto o volume total de coluna ( $V_c$ ) é fornecido pelo fabricante. Os valores dos volumes de eluição ( $V_e$ ) obtidos para cada proteína foram usados para estimar o peso molecular da *Tb* iPGAM.

### 3.3 Cinética Enzimática

A fim de determinar a velocidade de uma reação enzimática é necessário medir a formação de produto, ou de consumo de substrato, em função do tempo. O tipo de sinal medido varia com o experimento e a enzima, mas usualmente baseia-se em propriedades físico-químicas únicas ao substrato ou produto.<sup>45</sup>

Para confirmar se a enzima recombinante obtida por expressão heteróloga representa uma enzima cataliticamente ativa, realizamos ensaios cinéticos acoplados utilizando a amostra purificada. Conforme ilustrado na figura 7, acoplando a reação de isomerização do 3-PGA para 2-PGA com a reação da lactato desidrogenase (LDH), por meio da enolase (ENO) e piruvato kinase (PYK), medimos a atividade da enzima *Tb* iPGAM monitorando o consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH) a 340 nm.<sup>36</sup>



**Figura 7** - Esquema mostrando o ensaio cinético da *Tb* iPGAM. Neste experimento a formação de 2-fosfoglicerato é acoplada ao consumo de NADH usando as enzimas auxiliares enolase, piruvato kinase e lactato desidrogenase. O decréscimo na absorvância relativo ao consumo de NADH é monitorado espectrofotometricamente a 340 nm. **Abreviações:** nicotinamida adenina dinucleotídeo, NADH; adenosina difosfato, ADP; adenosina trifosfato, ATP.

Os experimentos foram realizados a 25°C em 100 mM TEA pH=7.4, contendo 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM adenosina difosfato (ADP), 0.5 mM NADH, 1 U/mL lactato desidrogenase (LDH) e enolase (ENO), 2U/mL piruvato kinase (PYK) e 100 nM *Tb* iPGAM. Nestas condições, medimos a atividade da enzima variando a concentração 3-PGA de 23.43 até 2000 μM. As medidas foram feitas em triplicata e o valor da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) foi obtido através do ajuste dos pontos por regressão não-linear, usando a equação:

$$v = V_{\max} \cdot [S] / K_m + [S],$$

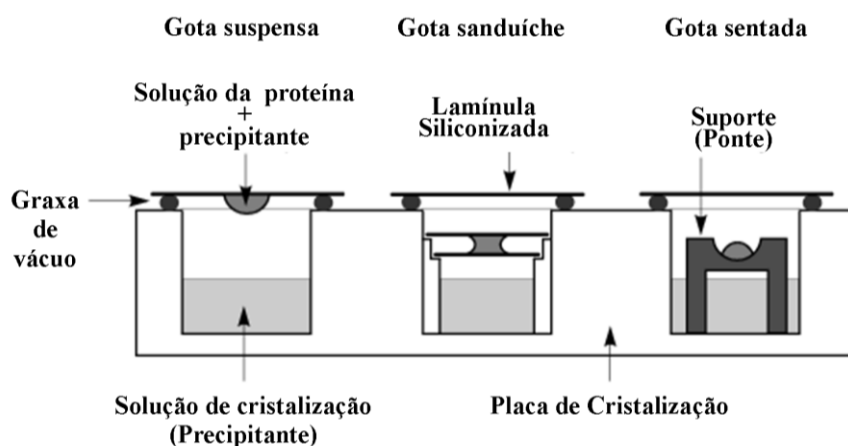
onde  $v$  é velocidade de reação,  $V_{\max}$  é a velocidade máxima de reação quando a concentração de substrato  $[S] \gg K_m$ .



### 3.4 Cristalização e Coleta de Dados

O processo de cristalização de proteínas envolve uma seqüência de eventos complexos que estão intimamente relacionados. De maneira geral, o sistema contendo a macromolécula de interesse em alto nível de pureza deve ser levado gradualmente a um estado de supersaturação, para que ocorra a nucleação (formação de pequenos agregados ordenados) e posteriormente o crescimento do cristal.<sup>46-47</sup>

Um dos métodos mais usados para rastrear condições de cristalização de proteínas é a difusão de vapor. Usando um sistema fechado, onde podemos ter a gota suspensa, sentada ou em sanduíche, o equilíbrio é alcançado pela difusão de vapor da gota para a solução de precipitação (figura 8).

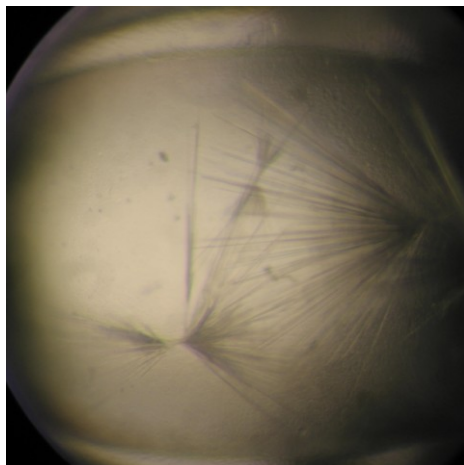


**Figura 8** - Técnica de difusão de vapor usada na cristalização de macromoléculas.

Na triagem para identificação das condições iniciais de cristalização da *Tb* iPGAM foi empregado o sistema robotizado Honeybee 931 (Genomic Solutions Inc). Em nossa busca pelas condições iniciais de cristalização usamos oito fatoriais, somando um total de 786 condições. Assim, a enzima na concentração de 10 mg/mL (em tampão TEA 50 mM pH=7.4 contendo 150 mM de NaCl) foi misturada com solução de cristalização do poço na proporção de 1:1.

A melhor condição (Index HT, poço G7 – 0.2 M acetato de amônio, 0.1 M de Bis-Tris pH=6.5 e 25% PEG 3350) apresentava cristais na forma de agulha que cresciam a partir de um mesmo núcleo (figura 9) e esta foi selecionada para futuras otimizações manuais. Para melhorar a formação de cristais usamos a técnica de difusão de vapor em gota suspensa. Nos

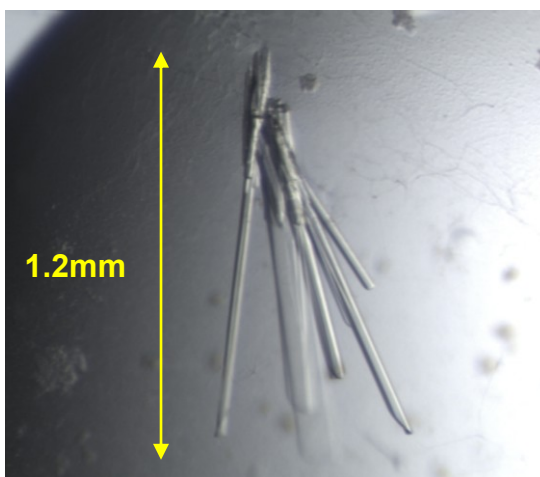
vários testes realizados variamos concentração da enzima, concentração do agente precipitante, concentração e tipo de sal, pH e concentração do agente tamponante, temperatura e finalmente proporção da mistura amostra/solução de cristalização. Além disso, como a *Tb* iPGAM é dependente de cobalto para sua atividade<sup>27</sup>, passamos a adicionar 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  na solução da amostra.



**Figura 9** - Cristais da *Tb* iPGAM formados na triagem com robô. A condição que estes cristais se formaram veio do poço G7 do fatorial Index HT (Hampton).

Novamente cristais na forma de agulha foram obtidos (figura 10). Estes cresceram até seu tamanho máximo em aproximadamente 30 dias quando misturamos 1  $\mu\text{L}$  da solução da enzima (8 mg/mL *Tb* iPGAM, 20 mM TEA pH=7.4, 50 mM NaCl e 10  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ ) a 1  $\mu\text{L}$  da solução de cristalização (0.05 M sulfato de amônio, 0.1 M Bis-Tris pH=6.1 e 25% PEG 3350). Os cristais foram transferidos para uma solução crio protetora quase idêntica à solução de cristalização, acrescida apenas de 20% de glicerol e os cristais foram congelados em nitrogênio líquido para serem usados na coleta dos dados de difração.

Os dados foram coletados na linha W01B-MX2,<sup>48</sup> no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Os padrões de difração foram obtidos a 100 °K utilizando o método de rotação-oscilação,<sup>49</sup> onde o cristal pertencente ao grupo espacial  $P2_1$  ( $a = 62.67 \text{ \AA}$ ,  $b = 85.66 \text{ \AA}$ ,  $c = 109.11 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 102.2^\circ$ ) teve 300 imagens coletadas. Em cada exposição o cristal sofreu oscilações de 0.7 graus em torno de um eixo perpendicular a direção do feixe de raios-X incidente, tendo assim um intervalo de oscilação total de  $210^\circ$ .



**Figura 10** - Cristais da *Tb* iPGAM formados após otimizações da condição inicial. Este grupo de cristais foi separado e os melhores fragmentos foram congelados e usados nos experimentos de difração de raios-X.

### 3.5 Determinação da Estrutura e Refinamento

Os dados de difração de raios-X foram indexados e integrados usando o programa MOSFLM<sup>50-51</sup> e foram escalonados através do programa SCALA<sup>52</sup> do pacote CCP4<sup>53</sup>. O arquivo gerado foi usado na obtenção da fase e refinamento do modelo cristalográfico.

Considerando que estrutura cristalográfica da enzima homóloga *Lm* iPGAM (PDB code: 3IGZ) era conhecida e apresentava uma identidade de 78% com a *Tb* iPGAM, para recuperação das fases utilizou-se o método de substituição molecular. Para tanto, empregamos o programa Phaser<sup>54</sup> usando como modelos de busca os domínios transferase e fosfatase da *Lm* iPGAM.

Após obtenção das fases, seguimos para a etapa de refinamento do modelo inicial obtido. O refinamento é um processo onde buscamos ajustar um modelo a fim de encontrar alta concordância entre os fatores de estrutura calculados ( $F_c$ ) e observados ( $F_o$ ), sendo que o índice de concordância entre o  $F_c$  e  $F_o$  é usualmente representado pelo  $R_{\text{fator}}$ . Geralmente os fatores de estrutura teóricos ( $F_c$ ) que são calculados com base no modelo inicial apresentam baixa concordância com os fatores de estrutura determinados experimentalmente ( $F_o$ ). Deste modo, foi necessário realizar o ajuste do modelo, que consiste basicamente em mudar os parâmetros posicionais e os fatores de temperatura para todos os átomos da estrutura com exceção do hidrogênio. Sendo assim, empregando os programas PHENIX<sup>55</sup> e REFMAC<sup>56</sup> realizamos o refinamento no espaço recíproco. O programa Coot<sup>57</sup> foi utilizado para o

refinamento no espaço real através do ajuste do modelo teórico ao mapa de densidade eletrônica. Ciclos de refinamento no espaço real e recíproco foram realizados sequencialmente até o valor do  $R_{\text{fator}}$  não apresentar variações.<sup>47</sup>

Outro parâmetro observado durante o processo de refinamento foi o  $R_{\text{livre}}$ . Semelhante ao  $R_{\text{fator}}$ , este é também uma comparação entre a concordância entre a amplitude dos fatores de estrutura observados e calculados a partir do modelo, sendo usado para validar a qualidade do modelo de maneira independente e imparcial ao processo. Para estimar e usar o  $R_{\text{livre}}$ , 5% das reflexões observadas foram escolhidas de forma aleatória e distribuídas uniformemente no espaço recíproco. Durante o refinamento, os parâmetros do modelo são ajustados para convergir com os dados do conjunto de trabalho, mas não são expostos as medidas contidas no conjunto usado para o cálculo do  $R_{\text{livre}}$ . Assim, foi possível monitorar o refinamento através da comparação entre o  $R_{\text{fator}}$  do conjunto de trabalho com o  $R_{\text{livre}}$ .

### 3.6 Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS)

Empregando esta técnica podemos obter informações estruturais de macromoléculas biológicas em condições que mimetizam o ambiente fisiológico. Basicamente, em um experimento de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) a intensidade espalhada  $I(q)$  é registrada como uma função da transferência do momento  $q$  ( $q = 4\pi\text{sen}\theta/\lambda$ , onde  $2\theta$  é o ângulo entre a onda espalhada e incidente). Deste modo, para soluções diluídas de proteínas que formam um sistema monodisperso de partículas idênticas, a orientação aleatória das partículas leva a uma média esférica do espalhamento de uma partícula única. Através da análise dessa informação, é possível investigar interações intermoleculares que incluem formação de oligômeros ou grandes mudanças conformacionais.<sup>58-60</sup>

Sendo assim, coletamos dados de SAXS para a *Tb* iPGAM na linha D02A-SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Nestes experimentos a distância da amostra para o detector foi 1.543 m, o comprimento de onda 1.488 Å e o tempo de exposição 300 segundos. O espalhamento da nossa amostra foi aferido nas concentrações 2.5, 5 e 10 mg/mL em 50mM TEA pH 7.5, 150 mM NaCl e 5% glicerol. O espalhamento do tampão também foi medido e subtraído das amostras.

As imagens obtidas foram integradas usando o programa FIT2D v12.077 (<http://www.esrf.fr/computing/scientific/FIT2D/>) para obter as curvas de espalhamento. O

programa PRIMUS<sup>61</sup> foi usado para verificar a interferência entre as partículas, assim como para avaliar a agregação e determinar o raio de giro ( $R_g$ , parâmetro que está relacionado com tamanho total das partículas) pelo método de Guinier<sup>62</sup>.

Utilizando o software GNOM-4.5<sup>63-64</sup>, obtivemos o  $R_g$  para o espaço real. Isso é feito gerando a função de distribuição de distância  $p(r)$  através da transformada inversa de Fourier. Vale lembrar que a representação do espaço real na  $p(r)$  contém as mesmas informações que a representação no espaço recíproco das intensidades de espalhamento.

Finalmente, o programa Crysol<sup>65</sup> foi usado para gerar as curvas de espalhamento em solução teóricas tanto para o monômero quanto para o dímero da *Tb* iPGAM usando a nova estrutura. O mesmo foi feito para os monômeros da *Ba* e *Lm* iPGAM, usando suas respectivas estruturas. Essas curvas teóricas foram comparadas com a curva experimental obtida com a *Tb* iPGAM. Além disso, determinamos o  $R_g$  teórico em todos os casos para comparar com o valor obtido experimentalmente.

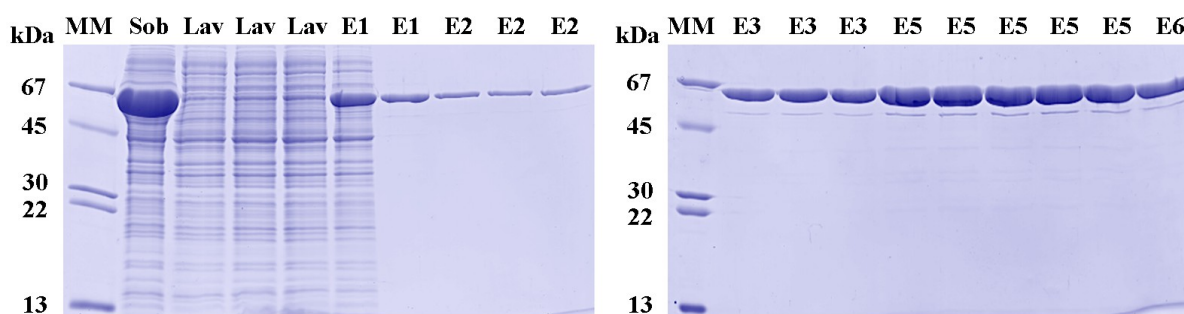


## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Expressão, Purificação e Cinética Enzimática

Em nossos experimentos o emprego da pressão osmótica, choque térmico e baixa temperatura (após a indução com IPTG) mostraram-se eficientes e alcançamos uma alta taxa de expressão da enzima *Tb* iPGAM na forma solúvel (figura 11).

Na etapa de purificação empregando cromatografia de afinidade por metal também foi observada uma alta eficiência na recuperação das enzimas contendo a cauda de histidina. Na figura 11 nota-se que nas frações onde a concentração de imidazol era de 20 a 50 mM, a enzima apresentava um bom grau de pureza e assim estas foram recuperadas e concentradas. O rendimento do processo de expressão e purificação foi de aproximadamente 70 mg de proteína por litro de cultura bacteriana.



**Figura 11** - Géis de poliacrilamida mostrando as etapas de purificação da *Tb* iPGAM por cromatografia de afinidade. Destaca-se a alta taxa de produção da proteína recombinante contra as proteínas constitutivas da bactéria na fração solúvel do lisado (sob). **Abreviações:** marcadores de massa molecular, MM; sobrenadante do lisado após remoção dos ácidos nucléicos, Sob; lavagem com tampão de lise, Lav; eluição com tampão de lise contendo 10, 20, 30 e 50 mM de imidazol, E1, E2, E3 e E5, respectivamente.

A enzima recombinante *Tb* iPGAM foi empregada nos ensaios de atividade cinética. Vale lembrar que no ensaio acoplado empregado, as enzimas auxiliares enolase, piruvato kinase e lactato desidrogenase, estavam em excesso com relação à *Tb* iPGAM. Sendo assim, a velocidade da reação catalisada pela *Tb* iPGAM pode ser medida com segurança já que esta é a etapa limitante do processo. Deste modo, a atividade da enzima foi medida em triplicata para diferentes concentrações do substrato 3PGA (tabela 3) e estes dados usados para gerar o

gráfico de Michaelis-Menten (figura 12). O valor de  $K_m$  obtido ( $144 \pm 6.83 \mu\text{M}$ ) estava de acordo com o valor descrito anteriormente.<sup>36</sup>

Tabela 3 - Atividade enzimática da *Tb* iPGAM para diferentes concentrações de 3PGA.

[3PGA] ( $\mu\text{M}$ )	Atividade enzimática		
	$v_1$	$v_2$	$v_3$
23.40	3.73	3.97	3.36
35.16	5.22	5.37	5.34
46.87	6.00	6.22	5.57
70.31	8.51	8.54	8.92
93.75	11.42	9.95	11.39
140.63	15.61	11.44	15.69
187.50	15.47	13.42	17.57
281.25	19.48	19.02	19.91
750.00	23.15	22.86	23.88
1125.00	24.67	24.12	25.23
1500.00	24.64	24.03	25.26
2000.00	25.06	25.32	26.32

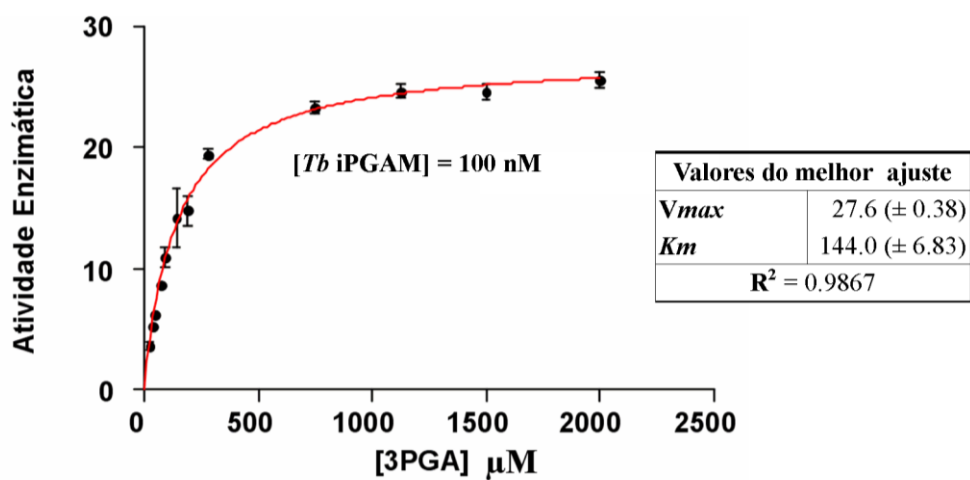


Figura 12 - Gráfico de Michaelis-Menten do substrato 3PGA para a *Tb* iPGAM (gerado a partir dos dados da tabela 3).



## 4.2 Cromatografia de Exclusão por Tamanho

Inicialmente calculamos o coeficiente de partição ( $K_{av}$ ) dos padrões de massa molecular (tabela 4) e com esses foi gerada a curva de calibração da coluna (figura 13-A). Esta curva foi empregada para estimar a massa molecular da *Tb* iPGAM a partir dos valores de  $K_{av}$  apresentados pela amostra.

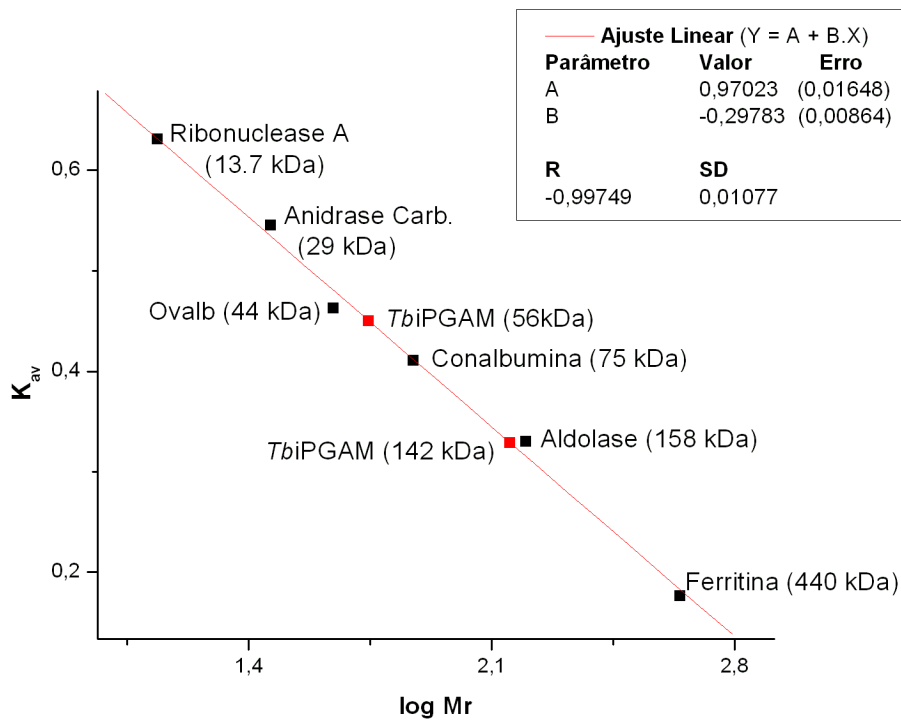
**Tabela 4 - Coeficientes de partição determinados na cromatografia de exclusão por tamanho.**

Amostra	Massa Molecular	† $K_{av}$
Ferritina	440 kDa	0.18
Aldolase	158 kDa	0.33
Conalbumina	75 kDa	0.41
Ovalbumina	44 kDa	0.46
Anidrase Carbonica	29 kDa	0.54
Ribonuclease A	13.7 kDa	0.63
<i>Tb</i> iPGAM (pico menor)	142 kDa *	0.33
<i>Tb</i> iPGAM (pico maior)	56 kDa *	0.45

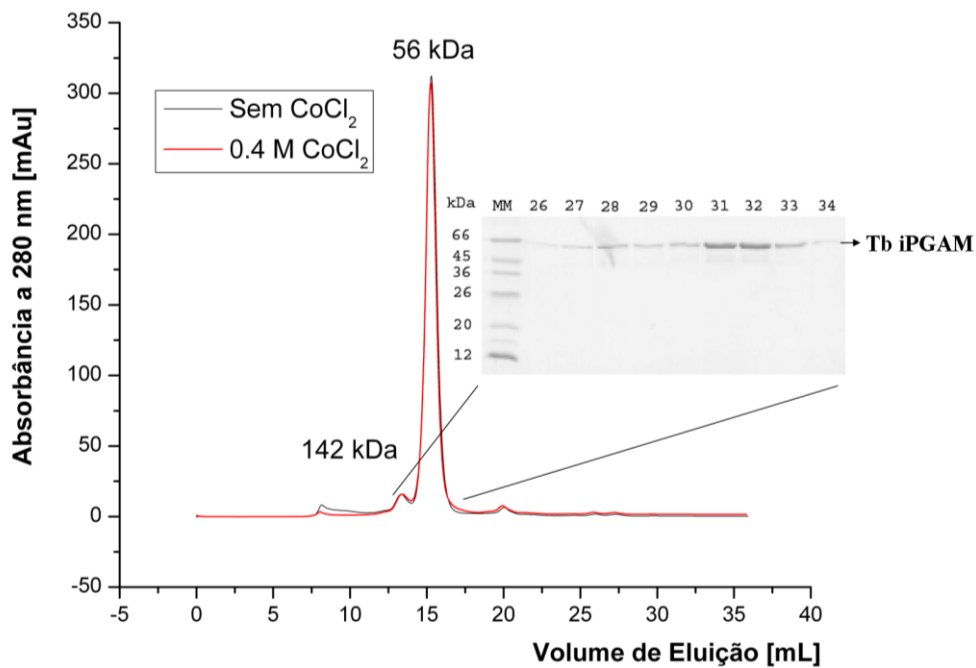
†  $K_{av} = (V_e - V_o) \cdot (V_c - V_o)^{-1}$ , onde  $V_e$ ,  $V_o$  e  $V_c$  são, respectivamente, os volumes de eluição, morto e de coluna.  
\* Valores calculados.

Na cromatografia de exclusão por tamanho com a *Tb* iPGAM, o primeiro experimento foi realizado sem a presença de cobalto e dois picos foram identificados, sendo ambos correspondentes a proteína recombinante (figura 13-B). O pico menor correspondia a aproximadamente 5% do total de amostra aplicada e representava uma proteína de massa molecular de 142 kDa. O pico maior, representando 95% da amostra aplicada, corresponde a massa molecular de um monômero de 56 kDa. Como as iPGAMs são proteínas muito flexíveis, poderíamos esperar que diferentes conformações teriam comportamentos distintos na cromatografia de exclusão por tamanho. Somado a isso, havia a suspeita que os metais poderiam estabilizar alguma conformação intermediária da enzima. Sendo assim, realizamos testes para avaliar se o aumento da concentração de cobalto no meio poderia alterar o comportamento de nossa amostra. Entretanto, neste segundo experimento realizado na presença de cobalto não foi observada diferença na velocidade de eluição da proteína (figura 13-B).

A



B



**Figura 13** - Determinação da massa molecular da *Tb* iPGAM por cromatografia de exclusão por tamanho.

A. Os valores de  $K_{av}$  experimentalmente determinados para as proteínas na forma nativa foram usados para determinar a massa molecular da *Tb*iPGAM.

B. Cromatogramas para as corridas da *Tb* iPGAM na presença ou não de cobalto. O SDS-PAGE para as frações coletadas entre 12.5 até 17 mL (cada fração tinha 0.5mL) mostra que em ambos os picos são da *Tb* iPGAM.

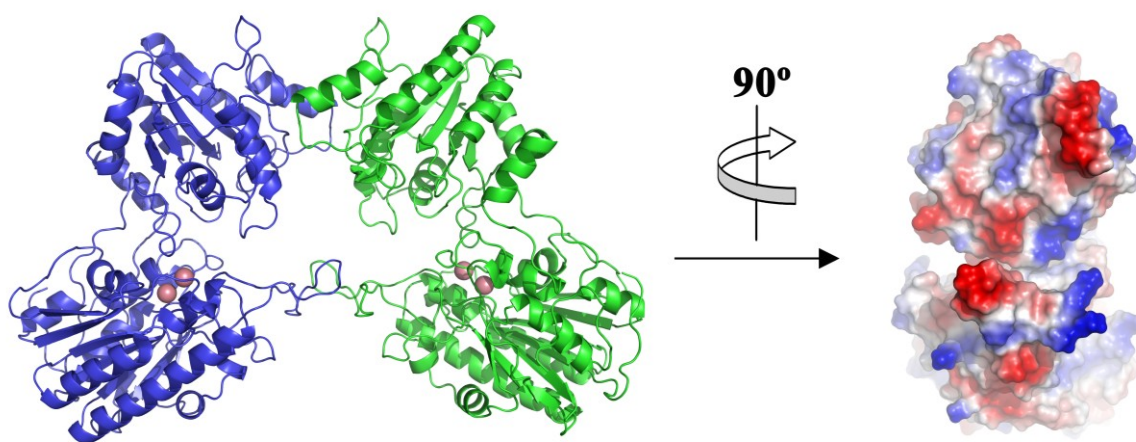
### 4.3 Estrutura Cristalográfica

A estrutura cristalográfica da *Tb* iPGAM foi resolvida por substituição molecular até uma resolução de 2.3Å usando os domínios fosfatase e transferase da *Lm* iPGAM (código PDB: 3IGY/3IGZ) como modelos de busca. Essa foi depositada no PDB com o código 3NVL, e aguarda publicação do artigo para ser liberada. Na tabela 5 estão apresentados os dados da coleta e refinamento.

Tabela 5 - Estatística da coleta de dados e refinamento

Parâmetro	
<b>Coleta de dados</b>	
Fonte	LNLS MX2
Comprimento de onda (Å)	1.4586
Faixa de Resolução (Å)	35.5 – 2.3
Reflexões Totais / Únicas	196486 / 46642
Completeza (%)	92.7 (82.8)
$R_{merge}$	0.10 (0.66)
$I/\sigma(I)$ Médio	9.2 (2.2)
<b>Cristal</b>	
Grupo Espacial	P2 <sub>1</sub>
Dimensão da célula (Å)	
a	62.67
b	85.66
c	109.11
β	102.2
<b>Refinamento do Modelo</b>	
$R_{fator}/R_{livre}$ †	0.16/0.21
RMSD – distância das ligações (Å)	0.004
RMSD – ângulos das ligações (°)	0.8
Átomos de Proteína	8518
Átomos de Solvente	237
Íons Metálicos (Co <sup>+2</sup> )	4
B-fator Médio (Å <sup>2</sup> )	42.96
† $R_{livre}$ – calculado a partir de um subgrupo de 5% das reflexões removidas aleatoriamente antes do refinamento. Os valores em parênteses são dados para a camada de maior resolução (2.42–2.3Å).	

Cada unidade assimétrica contém um dímero e as moléculas de *Tb* iPGAM fazem contato entre si em duas regiões distintas (figura 14). A primeira é uma alça do domínio fosfatase que envolve os resíduos 476 a 487, enquanto a segunda envolve os resíduos 212 até 246 no domínio transferase. A área de contato entre as macromoléculas é de aproximadamente  $390 \text{ \AA}^2$  e existe uma prevalência por resíduos polares nestas regiões (figura 14). Estas evidências indicam que o monômero provavelmente é a forma funcional da proteína, entretanto não excluem uma possível formação transitória de dímeros.<sup>66-67</sup>

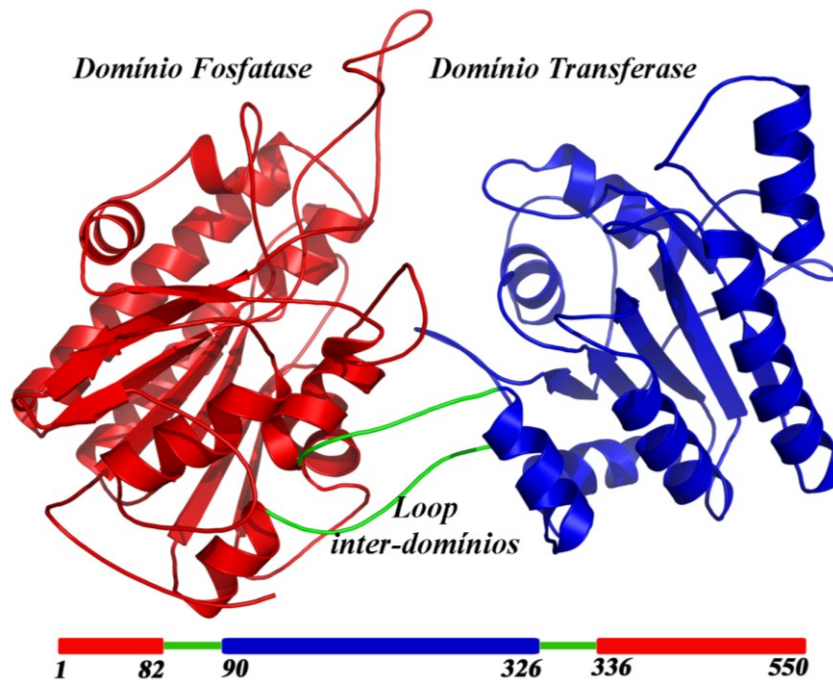


**Figura 14** - Estrutura cristalográfica da *Tb* iPGAM. A unidade assimétrica é formada por um homo-dímero e os monômeros estão coloridos em azul e verde. O íon cobalto está destacado em magenta. Removendo o monômero colorido em verde, rotacionando a molécula que estava inicialmente em azul (conforme ilustrado) e adicionando a superfície eletrostática, podemos observar as regiões com carga positiva (azul), negativa (vermelho) e neutra (cinza). Nota-se que a área de contato é predominantemente polar.

Ambas as moléculas são formadas pelos domínios transferase e fosfatase, que estão conectados por duas alças (figura 15). Cada domínio possui uma topologia do tipo  $\alpha/\beta$  praticamente idêntica a da *Lm* iPGAM (RMSD para  $C\alpha$  entre os domínios fosfatases de  $0.47 \text{ \AA}$  e para os domínios transferases  $0.33 \text{ \AA}$ ), com folhas- $\beta$  cercadas por hélices- $\alpha$ . Apesar da similaridade entre os domínios, o alinhamento estrutural dos monômeros da *Tb* iPGAM e *Lm* iPGAM resultava em um RMSD para  $C\alpha$  de  $8.32 \text{ \AA}$ .

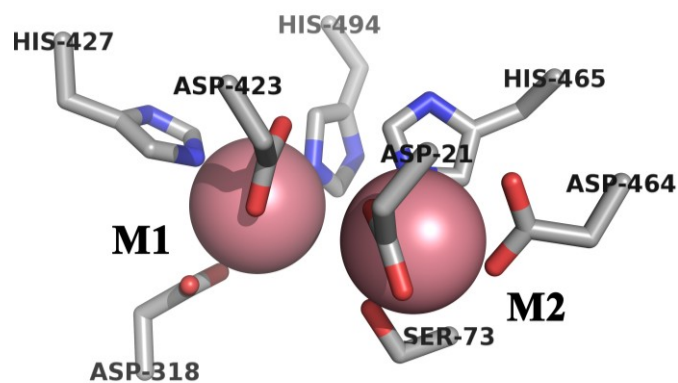
A diferença conformacional entre a forma livre (*Tb* iPGAM) e ligada (*Lm* iPGAM) está de acordo com o mecanismo de reação proposto para estas enzimas, que exige uma proteína com flexibilidade. De maneira geral, a reação se dá através da ligação do substrato a enzima na forma livre formando o complexo enzima-substrato. Com o substrato seqüestrado em um pequeno sítio ativo enterrado na proteína, ocorre a transferência intramolecular do grupo fosforila. Neste processo, existe a formação transitória de uma fosfoserina e um ácido

glicérico que é mantido ligado à enzima até que ocorra a refosforilação.<sup>25-26,30,68-70</sup> Subsequentemente, o produto da reação é liberado e a proteína retorna à conformação livre.



**Figura 15** - Monômero da *Tb* iPGAM mostrando os domínios e como eles se conectam. Em destaque na parte inferior da figura esta a sequência da *Tb* iPGAM, mostrando a que domínio pertence cada região.

O domínio fosfatase apresenta dois sítios metálicos (M1 e M2). O cobalto do sítio M1 é coordenado pelos resíduos Asp318, Asp423, His427 e His494; enquanto o cobalto do sítio M2 é coordenado pelo Asp21, Ser73, His464 e Asp465 (figura 16). Por sua vez, o domínio transferase possui um íon fosfato ligado a um sítio raso com característica polar e exposto ao solvente (figura 21). Este sítio é formado pelos resíduos Asp165, Arg200, Arg164, His134, Val133, Arg280, Asp282, Arg207 e Arg283.

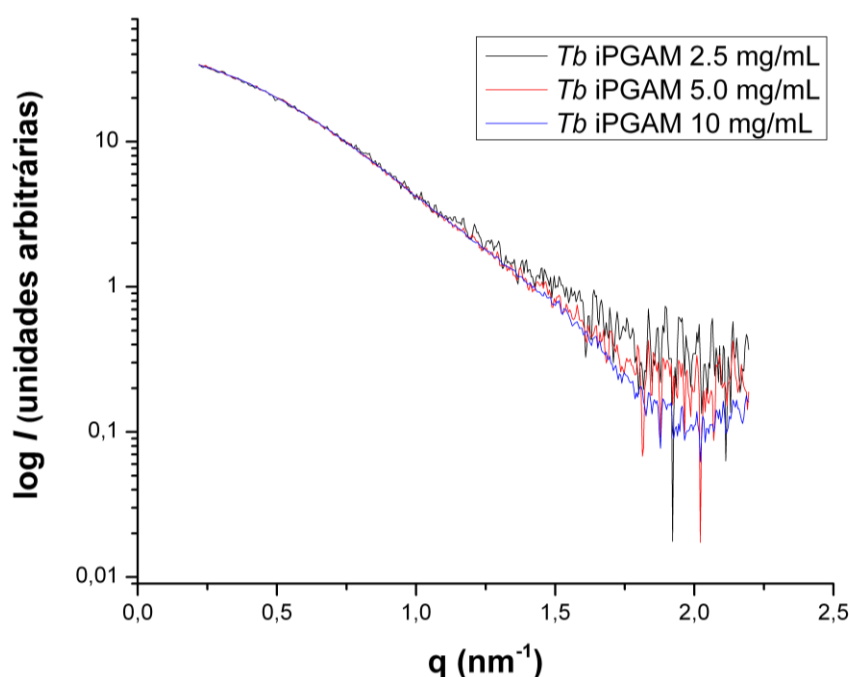


**Figura 16** - Sítios metálicos M1 e M2, mostrando os resíduos que coordenam os íons cobalto.

A *Tb* iPGAM na forma livre apresenta uma cavidade entre os domínios que não era encontrada em iPGAMs na forma ligada. Assim, esta região pode ser explorada para fazer estudos de ancoragem de compostos em experimentos de triagens virtuais. Deste modo, esta estrutura pode contribuir com o esforço internacional de desenvolver novos compostos tripanocidas. Além disso, como as iPGAMs são promissores alvos moleculares validados por métodos genéticos, este novo modelo de alta resolução pode servir para o desenvolvimento de novos fármacos baseado na estrutura contra diversas doenças infecciosas.

#### 4.4 Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS)

Com a intenção de investigar uma possível formação de dímeros, coletamos dados de SAXS da *Tb* iPGAM. Para as curvas de espalhamento coletadas nas três diferentes concentrações usadas, pouca interferência inter-partículas foi observada (figura 17).

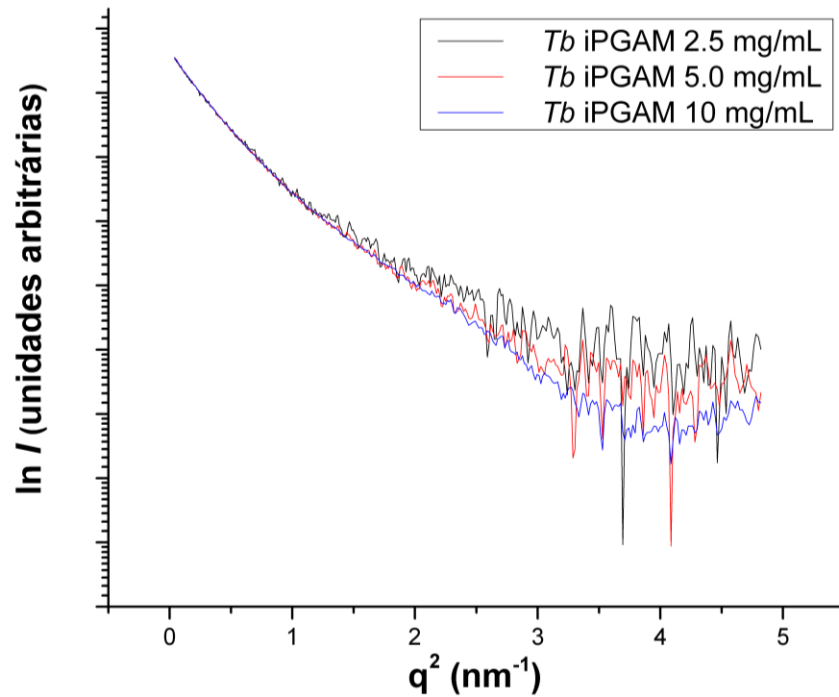


**Figura 17** - Curvas de espalhamento experimental para a *Tb* iPGAM. Observa-se que havia pouca interferência inter-partículas.

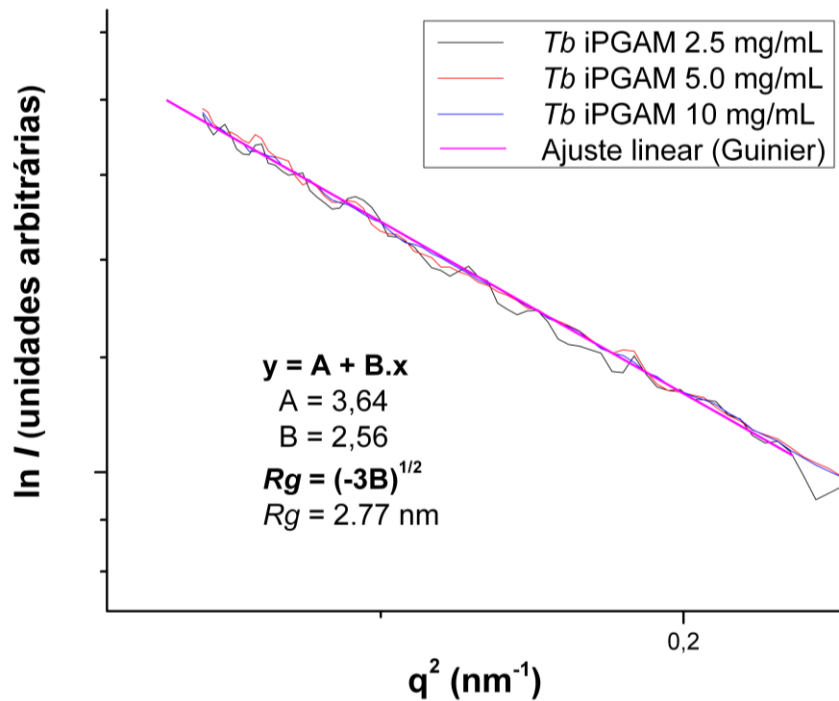
Geramos o gráfico de Guinier ( $\ln I$  versus  $q^2$ ) e analisando estes observamos que não houve aumento do  $R_g$  nas diferentes medidas. Isto mostra que não há agregação ou formação de oligômeros com o aumento da concentração da *Tb* iPGAM (figura 18). Como descrito na

metodologia, calculamos  $R_g$  experimental para o espaço real e recíproco obtendo um valor de  $27.7 \pm 0.2 \text{ \AA}$ .

A



B

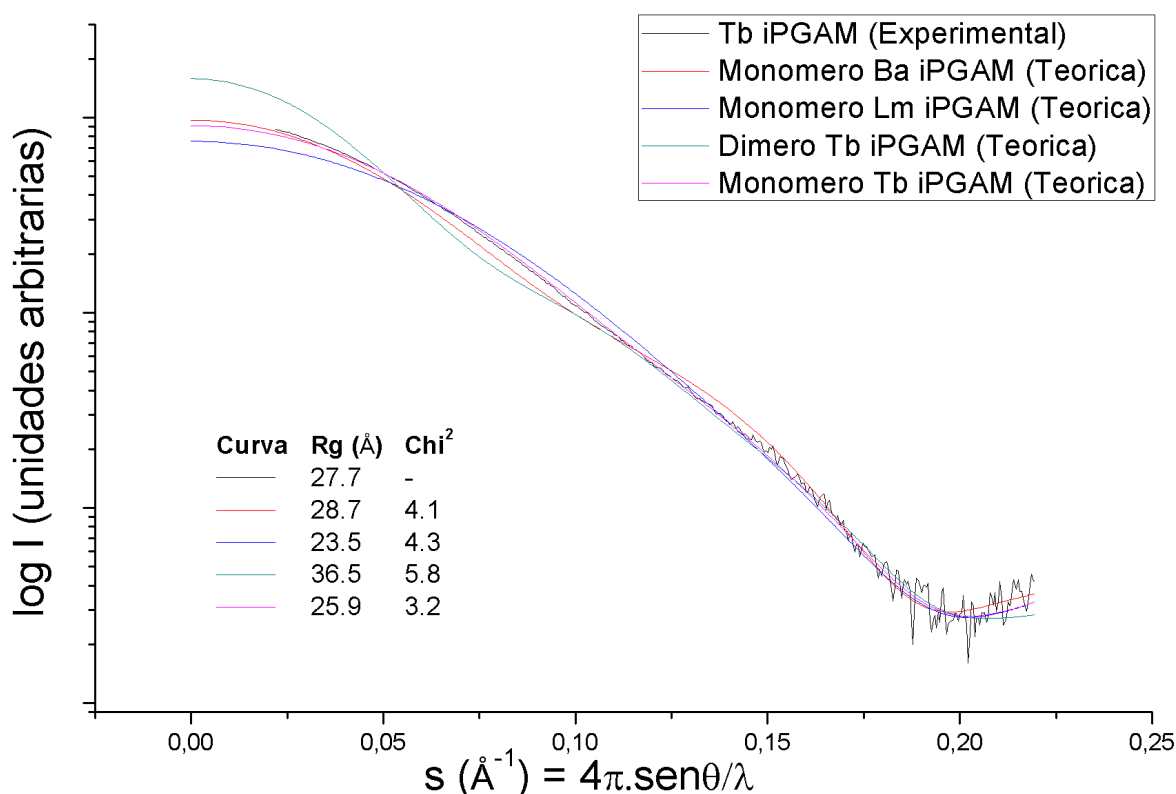


**Figura 18** - Gráficos de Guinier.

A) Curvas experimentais mostrando que não há agregação ou formação de oligômeros com o aumento da concentração da proteína.

B) Determinação do  $R_g$  pelo método de Guinier. Observa-se que o ajuste dos dados obedece à restrição:  $q \cdot R_g < 1.3$ .

Uma abordagem bastante comum é a comparação entre curvas de SAXS obtidas experimentalmente com curvas teóricas que são geradas a partir de estruturas cristalográficas. Deste modo, é possível verificar diferenças estruturais, validar modelos teóricos e prever estruturas quaternárias da macromolécula.<sup>60</sup> Sendo assim, comparamos a curva experimental da *Tb* iPGAM com curvas teóricas geradas a partir do dímero e monômero (figura 19). Concluímos que em soluções que mimetizam a presumida condição fisiológica a *Tb* iPGAM é monomérica, o que também é confirmado pelos valores de  $R_g$  obtidos.



**Figura 19** - Comparação da curva de espalhamento experimental da *Tb* iPGAM com curvas teóricas geradas a partir de modelos de alta resolução. Fica claro que a forma funcional da *Tb* iPGAM é monomérica. Além disso, a curva para estrutura em conformações livre da *Tb* iPGAM é a que mais se assemelha com a curva experimental coletada na ausência de ligantes.

Considerando que as iPGAMs apresentam uma alta similaridade estrutural entre os domínios transferase e fosfatase, podemos assumir que as estruturas de diferentes organismos podem representar diferentes conformações. Assim, comparamos a curva experimental da *Tb* iPGAM com as curvas teóricas da *Lm* e *Ba* iPGAM (figura 19). Notamos que a curva experimental (coletada na ausência de ligantes) apresenta um melhor ajuste com a curva teórica gerada a partir do monômero da *Tb* iPGAM. Vale lembrar que a *Ba* iPGAM apresenta uma conformação que não é estável segundo estudos de dinâmica molecular<sup>42</sup>, corroborando



com nossos dados de SAXS. Deste modo, acreditamos que a conformação encontrada na nova estrutura da *Tb* iPGAM pode ser encontrada em solução.

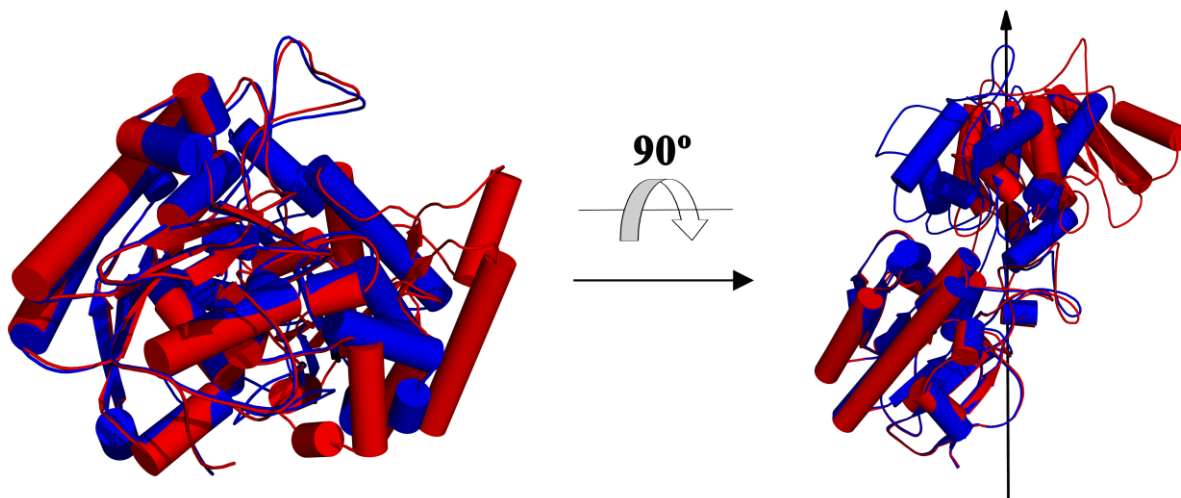
#### 4.5 Movimento dos Domínios Induzido pelo Ligante

Empregando o programa DynDom<sup>71-72</sup> analisamos a mudança de conformação induzida pelo ligante na *Tb* iPGAMs. Foram usadas as estruturas *Lm* iPGAM e *Tb* iPGAM como representantes da conformação ligada e livre, respectivamente. No caso da *Tb* iPGAM, usamos apenas um dos monômeros encontrados na unidade assimétrica. Assim, determinou-se que o domínio fosfatase permaneceu fixo no espaço, enquanto o domínio transferase foi permitido ser móvel (figura 15). Conforme ilustrado na figura 20, os movimentos de interesse foram caracterizados a partir de um eixo dobradiço e assim o domínio transferase (móvel) apresenta uma rotação de 66.8° e uma translação de 0.8 Å para ir de uma conformação para outra.

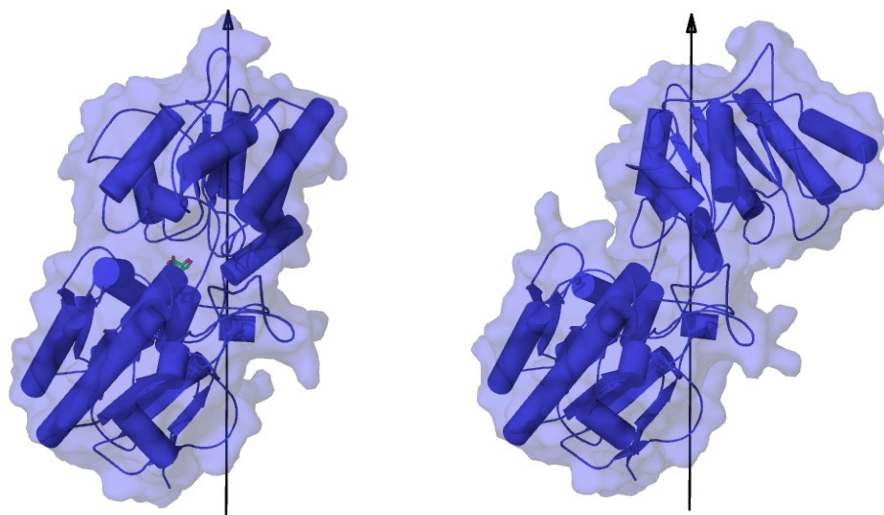
Os resíduos 86 até 88 e 327 até 334 localizados nas alças inter-domínios (figura 15) apresentaram grandes mudanças nos ângulos torcionais da cadeia principal phi ( $\phi$ ) e psi ( $\psi$ ) e, portanto, atuam como dobradiças mecânicas. Apesar de esses resíduos serem conservados nas iPGAMs da família *Trypanosomatidae*, o mesmo não ocorre em outros organismos. Assim, a sequência não parece estar relacionada com a função que eles exercem.

O sítio ativo das iPGAMs na conformação ligada são formados por resíduos dos dois domínios. Por outro lado, na conformação livre estes dois sítios estão separados. Sendo assim, para obter maior clareza vamos nos referir a estas regiões como sítio ativo fosfatase e transferase. Deste modo, a mudança da conformação ligada para a livre, faz com que o sítio ativo transferase fique exposto ao solvente (figura 21). Na estrutura da *Tb* iPGAM podemos encontrar um fosfato ligado nesta região.

A



B



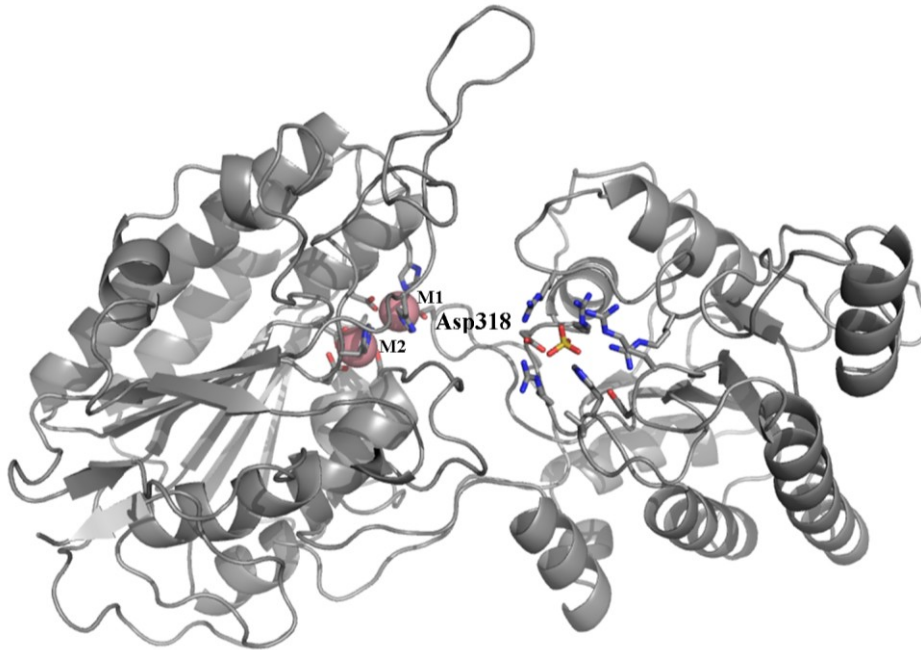
**Figura 20** - Movimento dos domínios na mudança de conformação induzida pelo ligante.

**A.** Comparação entre a conformação livre da *Tb* iPGAM (vermelho) e ligada da *Lm* iPGAM (azul). O eixo dobradiço esta perpendicular ao plano do papel na imagem da esquerda, enquanto fica paralelo ao mesmo plano na imagem da direita.

**B.** Enzima ligada (*Lm* iPGAM, esquerda) e livre (*Tb* iPGAM, direita) mostradas separadamente. A superfície com transparência das moléculas é exibida.

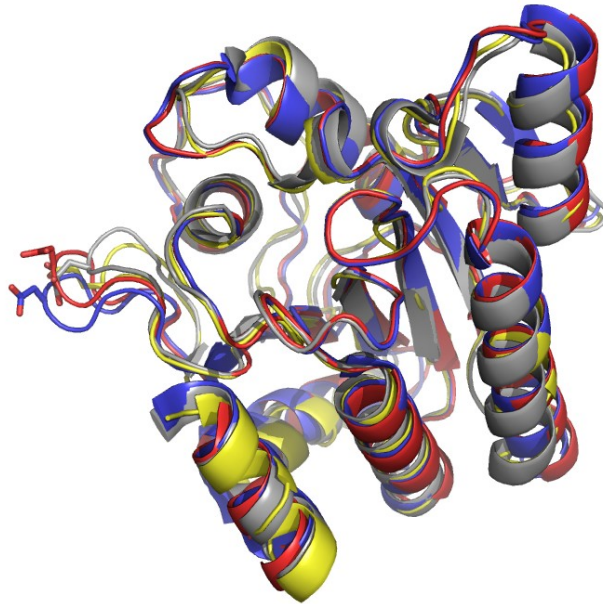
Por sua vez, na conformação livre o sítio ativo fosfatase apresenta o resíduo Asp318 ligado ao  $\text{Co}^{+2}$  (figura 19 e 21). Esse resíduo ácido se localiza em uma região de alça, que na forma ligada se encontra exposto ao solvente. Foi mostrado anteriormente que na presença de íons metálicos e sem substrato no meio, o sítio fosfatase fica protegido do solvente.<sup>73</sup> Isso porque o resíduo de histidina do sítio M2 (His465 na estrutura da *Tb* iPGAM, veja figura 16) não pode ser covalentemente modificado pela ação do agente químico dietilpirocarbonato (DEPC),<sup>73</sup> que reage irreversivelmente com resíduos de histidina com razoável especificidade.

Este comportamento pode ser explicado pela nova forma livre da *Tb* iPGAM, onde a interação iônica do metal com o resíduo ácido do domínio transferase faz com que o sítio ativo fosfatase se torne inacessível (figura 21).



**Figura 21** - Disposição dos sítios ativos da enzima na conformação livre. O sítio ativo transferase fica exposto ao solvente e apresenta um fosfato ligado. Os cobaltos (esferas na cor magenta) estão presentes no sítio ativo fosfatase, que fica inacessível graças a interação do resíduo Asp318 com o metal. Observamos que nesta conformação os sítios estão distantes um do outro.

Na conformação ligada das iPGAMs o cobalto tem um papel funcional, enquanto na nova conformação livre da *Tb* iPGAM o metal atua estabilizando a estrutura pela interação  $\text{Co}^{+2}$ -Asp318. Isso não é incomum, já que uma grande variedade de metaloproteínas são encontradas na natureza, com os metais desempenhando papéis funcionais (como na ativação do substrato e/ou estabilização eletrostática de estados de transição intermediários), estruturais (quando estabilizam uma estrutura terciária ou quaternária) e/ou regulatórios.<sup>74-75</sup> Sendo assim, resolvemos analisar outras iPGAMs com estruturas conhecidas e percebemos que o resíduo ácido do domínio transferase também está presente nestas (figura 22), sendo Asp320 na *Lm* iPGAM (PDB code: 3IGZ), Glu300 na *Bs* iPGAM (PDB code: 1EJJ) e Glu299 na *Ba* iPGAM (PDB code: 2IFY). Além disso, fizemos uma busca no banco de dados de sequências não-redundantes de proteínas do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) usando o Blastn e empregando a sequência da *Tb* iPGAM (XP\_823027). Analisando os resultados observamos o resíduo ácido (Asp/Glu) está presente em várias outras iPGAMs.



**Figura 22** - Alinhamento estrutural dos domínios transferase da iPGAM de diversos organismos. *Trypanosoma brucei* (vermelho), *Leishmania mexicana* (azul), *Bacillus stearothermophilus* (amarelo) e *Bacillus anthracis* (cinza). Os resíduos Asp/Glu estão mostrados como bastão (esquerda) e podemos observar que eles estão presentes em todas as estruturas em uma posição semelhante no loop.

Baseados nas evidências expostas, podemos esperar que essa nova conformação livre seja encontrada em outras iPGAMs. Além disso, para esta classe de enzimas a interação da região de alça contendo o resíduo Asp/Glu com o metal se mostra essencial para estabilização da forma livre da enzima durante a reação enzimática.

Todas as figuras de estruturas de proteínas foram geradas usando o programa Pymol v0.99 (DeLano Scientific; [www.pymol.org](http://www.pymol.org)).

## 5 CONCLUSÕES

- ✓ Nas iPGAMs os metais desempenham um papel funcional e estrutural.
- ✓ A nova estrutura na forma livre mostra que a reação catalisada pelas iPGAMs é guiada por um ajuste induzido onde há grande mudança conformacional.
- ✓ O domínio transferase possui uma região de loop que apresenta um resíduo ácido importante para a estabilização da enzima na forma livre.
- ✓ Um novo sub-sítio encontrado na conformação livre oferece novas oportunidades para o desenho de fármacos baseado em estrutura.
- ✓ Em condições fisiológicas a forma funcional da *Tb* iPGAM é monomérica.



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- 1 LIESE, B.; ROSENBERG, M.; SCHRATZ, A. Programmes, partnerships, and governance for elimination and control of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 67-76, 2010.
- 2 GYAPONG, J. O.; GYAPONG, M.; YELLU, N.; ANAKWAH, K.; AMOFAH, G.; BOCKARIE, M.; ADJEI, S. Integration of control of neglected tropical diseases into healthcaresystems: challenges and opportunities. **Lancet**, v. 375, n. 9709, p. 160-5, 2010.
- 3 CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 239-47, 2010.
- 4 BAKER, M. C.; MATHIEU, E.; FLEMING, F. M.; DEMING, M.; KING, J. D.; GARBA, A.; KOROMA, J. B.; BOCKARIE, M.; KABORE, A.; SANKARA, D. P.; MOLYNEUX, D. H. Mapping, monitoring, and surveillance of neglected tropical diseases: towards a policy framework. **Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 231-8, 2010.
- 5 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 01 abr. 2010.
- 6 WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 11, p. 31, 2009. doi: 10.1017/S1462399409001252.
- 7 REDDY, M.; GILL, S. S.; KALKAR, S. R.; WU, W.; ANDERSON, P. J.; ROCHON, P. A. Oral drug therapy for multiple neglected tropical diseases: a systematic review. **The Journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 16, p. 1911-24, 2007.
- 8 FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D. C.; SOLOMON, A. W. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, n. 1, p. 179-200, 2009.
- 9 MORAN, M.; GUZMAN, J.; ROPARS, A. L.; MCDONALD, A.; JAMESON, N.; OMUNE, B.; RYAN, S.; WU, L. Neglected disease research and development: how much are we really spending? **PLoS Medicine**, v. 6, n. 2, p. 30, 2009.
- 10 BRUN, R.; BLUM, J.; CHAPPUIS, F.; BURRI, C. Human African trypanosomiasis. **Lancet**, v. 375, n. 9709, p. 148-59, 2009.

---

<sup>1</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

11 SIMARRO, P. P.; JANNIN, J.; CATTAND, P. Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? **PLoS Medicine**, v. 5, n. 2, p. 55, 2008.

12 MICHELS, P. A.; BRINGAUD, F.; HERMAN, M.; HANNAERT, V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, n. 12, p. 1463-77, 2006.

13 IVENS, A. C.; et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-42, 2005.

14 EL-SAYED, N. M.; et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-15, 2005.

15 BERRIMAN, M.; *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416-22, 2005.

16 CAVALLI, A.; LIZZI, F.; BONGARZONE, S.; BELLUTI, F.; PIAZZI, L.; BOLOGNESI, M. L. Complementary medicinal chemistry-driven strategies toward new antitrypanosomal and antileishmanial lead drug candidates. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 51-60, 2009.

17 BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469-80, 2003.

18 RENSLO, A. R.; MCKERROW, J. H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 12, p. 701-10, 2006.

19 NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 11, p. 941-55, 2006.

20 FREARSON, J. A.; *et al.* N-myristoyltransferase inhibitors as new leads to treat sleeping sickness. **Nature**, v. 464, n. 7289, p. 728-32, 2010.

21 VERLINDE, C. L.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PERIE, J. J.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W. G.; MICHELS, P. A. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. **Drug Resistance Updates**, v. 4, n. 1, p. 50-65, 2001.



22 GRANA, X.; PEREZ DE LA OSSA, P.; BROCCENO, C.; STOCKER, M.; GARRIGA, J.; PUIGDOMENECH, P.; CLIMENT, F. 2,3-Bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase is conserved among different phylogenetic kingdoms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 112, n.2, p. 287-93, 1995.

23 FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; WATSON, H. C. The phosphoglycerate mutases. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 62, p. 227-313, 1989. doi: 10.1002/9780470123089.ch6.

24 CARRERAS, J.; MEZQUITA, J.; BOSCH, J.; BARTRONS, R.; PONS, G. Phylogeny and ontogeny of the phosphoglycerate mutases--IV. Distribution of glycerate-2,3-P<sub>2</sub> dependent and independent phosphoglycerate mutases in algae, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 71, n. 4, p. 591-7, 1982.

25 BLATTLER, W. A.; KNOWLES, J. R. Phosphoglycerate mutases: stereochemical course of the phosphoryl group transfers catalyzed by the cofactor-dependent enzyme from rabbit muscle and the cofactor-independent enzyme from wheat germ. **Biochemistry**, v. 19, n. 4, p. 738-43, 1980.

26 BRITTON, H. G.; CARRERAS, J.; GRISOLIA, S. Mechanism of action of 2,3-diphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase. **Biochemistry**, v. 10, n. 24, p. 4522-33, 1971.

27 COLLET, J. F.; STROOBANT, V.; SCHAFTINGEN, E. van. The 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase from *Trypanosoma brucei*: metal-ion dependency and phosphoenzyme formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 1, p. 39-44, 2001.

28 JEDRZEJAS, M. J.; CHANDER, M.; SETLOW, P.; KRISHNASAMY, G. Mechanism of catalysis of the cofactor-independent phosphoglycerate mutase from *Bacillus stearothermophilus*. Crystal structure of the complex with 2-phosphoglycerate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 30, p. 23146-53, 2000.

29 \_\_\_\_\_. Structure and mechanism of action of a novel phosphoglycerate mutase from *Bacillus stearothermophilus*. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 7, p. 1419-31, 2000.

30 LEADLAY, P. F.; BREATHNACH, R.; GATEHOUSE, J. A.; JOHNSON, P. E.; KNOWLES, J. R. Phosphoglycerate mutase from wheat germ: studies with isotopically labeled 3-phospho-D-glycerates showing that the catalyzed reaction is intramolecular. Appendix: phosphoglycerate mutase from wheat germ: isolation, crystallization, and properties. **Biochemistry**, v.16, n.14, p.3045-53, 1977.

31 RIGDEN, D. J.; LAMANI, E.; MELLO, L. V.; LITTLEJOHN, J. E.; JEDRZEJAS, M. J. Insights into the catalytic mechanism of cofactor-independent phosphoglycerate mutase from X-ray crystallography, simulated dynamics and molecular modeling. **Journal of Molecular Biology**, v. 328, n. 4, p. 909-20, 2003.

32 JEDRZEJAS, M. J.; SETLOW, P. Comparison of the binuclear metalloenzymes diphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase and alkaline phosphatase: their mechanism of catalysis via a phosphoserine intermediate. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 3, p. 607-18, 2001.

33 RIGDEN, D. J.; MELLO, L. V.; SETLOW, P.; JEDRZEJAS, M. J. Structure and mechanism of action of a cofactor-dependent phosphoglycerate mutase homolog from *Bacillus stearothermophilus* with broad specificity phosphatase activity. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, n. 5, p. 1129-1143, 2002.

34 JEDRZEJAS, M. J. Structure, function, and evolution of phosphoglycerate mutases: comparison with fructose-2,6-bisphosphatase, acid phosphatase, and alkaline phosphatase. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 73, n. 2-4, p. 263-287, 2000.

35 BOOKER, M. L.; FIFE, A. M.; RAVERDY, S.; KRAMER, M. L.; BELENKY, A.; CARLOW, C. K. S. Identification of Inhibitors of Cofactor-Independent Phosphoglycerate Mutase (Ipgm) for Potential Treatment of Lymphatic Filariasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 6, p. 154, 2008.

36 CHEVALIER, N.; RIGDEN, D. J.; VAN ROY, J.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. *Trypanosoma brucei* contains a 2,3-bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 5, p. 1464-72, 2000.

37 POONPERM, B.; GUERRA, D. G.; MCNAE, I. W.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; WALKINSHAW, M. D. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Leishmania mexicana* phosphoglycerate mutase. **Acta Crystallographica Section D - biological crystallography**, v. 59, n. 7, p. 1313-6, 2003.

38 ALBERT, M. A.; HAANSTRA, J. R.; HANNAERT, V.; VAN ROY, J.; OPPERDOES, F. R.; BAKKER, B. M.; MICHELS, P. A. Experimental and in silico analyses of glycolytic flux control in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 31, p. 28306-15, 2005.

39 DJIKENG, A.; RAVERDY, S.; FOSTER, J.; BARTHOLOMEU, D.; ZHANG, Y.; EL-SAYED, N. M.; CARLOW, C. Cofactor-independent phosphoglycerate mutase is an essential gene in procyclic form *Trypanosoma brucei*. **Parasitology Research**, v. 100, n. 4, p. 887-92, 2007.

40 BESTEIRO, S.; BARRETT, M. P.; RIVIERE, L.; BRINGAUD, F. Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 4, p.185-191, 2005.

41 NOWICKI, M. W.; KUAPRASERT, B.; MCNAE, I. W.; MORGAN, H. P.; HARDING, M. M.; MICHELS, P. A.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; WALKINSHAW, M. D. Crystal structures of *Leishmania mexicana* phosphoglycerate mutase suggest a one-metal mechanism and a new enzyme subclass. **Journal of Molecular Biology**, v. 394, n. 3, p. 535-43, 2009.

42 NUKUI, M.; MELLO, L. V.; LITTLEJOHN, J. E.; SETLOW, B.; SETLOW, P.; KIM, K.; LEIGHTON, T.; JEDRZEJAS, M. J. Structure and molecular mechanism of *Bacillus anthracis* cofactor-independent phosphoglycerate mutase: a crucial enzyme for spores and growing cells of *Bacillus* species. **Biophysical Journal**, v. 92, n. 3, p. 977-88, 2007.

43 OGANESYAN, N.; ANKOUDINOVA, I.; KIM, S. H.; KIM, R. Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. **Protein Expression and Purification**, v. 52, n. 2, p. 280-5, 2007.

44 KOLAJ, O.; SPADA, S.; ROBIN, S.; WALL, J. G. Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 9, 2009. doi: 10.1186/1475-2859-8-9.

45 COPELAND, R. A. **Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2000.

46 MCPHERSON, A. **Crystallization of Biological Macromolecules**. New York: Cold Spring Harbor, 1999.

47 DRENTH, J. **Principles of X-ray Crystallography**. 3rd ed. New York: Springer, 2007.

48 GUIMARAES, B. G.; SANFELICI, L.; NEUENSCHWANDER, R. T.; RODRIGUES, F.; GRIZOLLI, W. C.; RAULIK, M. A.; PITON, J. R.; MEYER, B. C.; NASCIMENTO, A. S.; POLIKARPOV, I. The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 16, n. 1, p. 69-75, 2009.

49 DAUTER, Z. Data-collection strategies. **Acta Crystallographica Section D - biological crystallography**, v. 55, n. 10, p. 1703-17, 1999.

50 LESLIE, A. G. W.; POWELL, H. R. Processing diffraction data with MOSFLM. **Evolving Methods for Macromolecular Crystallography**, v. 245, p. 41-51, 2007. doi: 10.1007/978-1-4020-6316-9\_4.

51 POWELL, H. R. The Rossmann Fourier autoindexing algorithm in MOSFLM. **Acta Crystallographica Section D - biological crystallography**, v. 55, n. 10, p. 1690-1695, 1999.

52 EVANS, P. Scaling and assessment of data quality. **Acta Crystallographica Section D - biological crystallography**, v. 62, n. 1, p. 72-82, 2006.

53 BAILEY, S. The Ccp4 Suite - Programs for Protein Crystallography. **Acta Crystallographica Section D - biological crystallography**, v. 50, n. 5, p. 760-763, 1994.

54 MCCOY, A. J. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. **Acta Crystallographica Section D - biological crystallography**, v. 63, n. 1, p. 32-41, 2007.

55 ADAMS, P. D.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; HUNG, L. W.; IOERGER, T. R.; MCCOY, A. J.; MORIARTY, N. W.; READ, R. J.; SACCHETTINI, J. C.; SAUTER, N. K.; TERWILLIGER, T. C. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. **Acta Crystallographica Section D - biological crystallography**, v. 58, n. 11, p. 1948-1954, 2002.

56 MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallographica Section D - biological crystallography**, v. 53, n. 3, p. 240-255, 1997.

57 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D - biological crystallography**, v.60, n.1, p.2126-2132, 2004.

58 PETOUKHOV, M. V.; SVERGUN, D. I. Analysis of X-ray and neutron scattering from biomacromolecular solutions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, n. 5, p. 562-71, 2007.

59 LIPFERT, J.; DONIACH, S. Small-angle X-ray scattering from RNA, proteins, and protein complexes. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v.36, p.307-27, 2007. doi: 10.1146/annurev.biophys.36.040306.132655.

60 SVERGUN, D. I.; KOCH, M. H. J. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. **Reports on Progress in Physics**, v.66, n.10, p.1735-1782, 2003.

61 KONAREV, P. v.; VOLKOV, V. v.; SOKOLOVA, A. v.; KOCH, M. H. J.; SVERGUN, D. I. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, n. 5, p. 1277-1282, 2003.

62 GUINIER, A.; FOURNET, G. **Small angle scattering of x-rays**. New York: Wiley, 1995.

63 SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography**, v. 25, n. 4, p. 495-503, 1992.

64 SEMENYUK, A. V.; SVERGUN, D. I. GNOM - a program package for small-angle scattering data-processing. **Journal of Applied Crystallography**, v.24, n.5, p.537-540, 1991.

65 SVERGUN, D.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. J. CRY SOL - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. **Journal of Applied Crystallography**, v. 28, n. 6, p. 768-773, 1995.

66 NOOREN, I. M.; THORNTON, J. M. Diversity of protein-protein interactions. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 14, p. 3486-92, 2003.

67 \_\_\_\_\_. Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 325, n. 5, p. 991-1018, 2003.

68 JEDRZEJAS, M. J.; CHANDER, M.; SETLOW, P.; KRISHNASAMY, G. Mechanism of catalysis of the cofactor-independent phosphoglycerate mutase from *Bacillus stearothermophilus*. Crystal structure of the complex with 2-phosphoglycerate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 30, p. 23146-53, 2000.

69 \_\_\_\_\_. Structure and mechanism of action of a novel phosphoglycerate mutase from *Bacillus stearothermophilus*. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 7, p. 1419-31, 2000.

70 COLLET, J. F.; STROOBANT, V.; VAN SCHAFTINGEN, E. The 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase from *Trypanosoma brucei*: metal-ion dependency and phosphoenzyme formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 1, p. 39-44, 2001.

71 HAYWARD, S.; BERENDSEN, H. J. Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change: new results on citrate synthase and T4 lysozyme. **Proteins**, v. 30, n. 2, p. 144-54, 1998.

72 HAYWARD, S.; KITAO, A.; BERENDSEN, H. J. Model-free methods of analyzing domain motions in proteins from simulation: a comparison of normal mode analysis and molecular dynamics simulation of lysozyme. **Proteins**, v. 27, n. 3, p. 425-37, 1997.

73 GUERRA, D. G.; VERTOMMEN, D.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. Characterization of the cofactor-independent phosphoglycerate mutase from *Leishmania mexicana mexicana*. Histidines that coordinate the two metal ions in the active site show different susceptibilities to irreversible chemical modification. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 9, p. 1798-810, 2004.

74 ANDREINI, C.; BERTINI, I.; CAVALLARO, G.; HOLLIDAY, G. L.; THORNTON, J. M. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1205-18, 2008.

75 ANDREINI, C.; BERTINI, I.; CAVALLARO, G.; NAJMANOVICH, R. J.; THORNTON, J. M. Structural analysis of metal sites in proteins: non-heme iron sites as a case study. **Journal of Molecular Biology**, v. 388, n. 2, p. 356-80, 2009.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)