

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LARISSA ROMANELLO

**ESTUDOS DAS ENZIMAS ADENOSINA KINASE E HIPOXANTINA-
GUANINA FOSFORIBOSILTRANSFERASE DE *Schistosoma mansoni***

**SÃO CARLOS
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LARISSA ROMANELLO

**ESTUDOS DAS ENZIMAS ADENOSINA KINASE E HIPOXANTINA-
GUANINA FOSFORIBOSILTRANSFERASE DE *Schistosoma mansoni***

**Dissertação apresentada para obtenção do
título de mestre na Universidade Federal de
São Carlos, Área de Biotecnologia.**

*Orientadores: Prof. Dr. Richard Charles Garratt
Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo*

**SÃO CARLOS
2011**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

R758ee

Romanello, Larissa.

Estudos das enzimas adenosina kinase e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase de *Schistosoma mansoni* / Larissa Romanello. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
95 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Enzimas. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Cristalografia de proteínas. 4. Adenosina kinase. 5. hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase. I. Título.

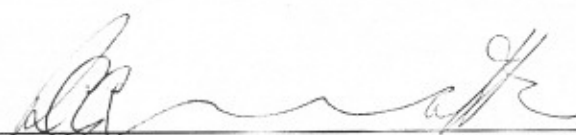
CDD: 574.1925 (20^a)

Larissa Romanello

Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 22/07/2011

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Richard Charles Garratt (Orientador)
(IFSC/USP)



Prof. Dr. Fernanda de Freitas Anibal
(CCBS-DMP/UFSCar)



Prof. Dr. André Luis Berteli Ambrosio
(LNLS-Campinas)

Dedico este trabalho à minha mãe Vera Aparecida Horvate Romanello por ser meu exemplo de vida, de força, de espiritualidade e infinito amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua presença constante em meu viver e colocar no meu caminho pessoas maravilhosas.

Em especial ao Prof. Dr. Humberto D`Muniz Pereira pelos primeiros passos na área acadêmica e científica, pela orientação, por acreditar e confiar no meu trabalho, por ser muito mais que um orientador e sim um grande amigo. Agradeço a oportunidade a mim oferecida de convivência e aprendizado.

Aos orientadores Prof. Dr. Richard Charles Garratt e Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo pela oportunidade e confiança.

Aos amigos Alexandre Cassago, Fernando Bachega e Gustavo Mercaldi por toda ajuda, ensinamentos e paciência.

À minha família, em especial a minha mãe Vera por me servir de exemplo todos os dias e minha irmã Vanessa pelo apoio incondicional emocional e financeiro.

Aos grandes amigos que tornaram-se minha família em São Carlos: Daiana Evelin Martil, Fernanda Cristina Costa, Livia Maria Faim, Malu Voltatodio (bonitinha), Marcos Michel de Souza e Maycou Deriggi pela dedicação à nossa amizade, por todo carinho, momentos e conversas compartilhadas.

Aos técnicos do laboratório de Cristalografia Suzana, Bianca, Kelven Ulisses, Maria, Livia Manzine e Augusto.

Aos queridos amigos de convivência do laboratório: Ricardo NS, Amanda, Ana, Jaque, Renata, Simone, Mamé, Mariane, Mariana, Fer Batista, Morenã, Tavin, Leo, Lis, Vivi, Heline, Fran, Bela, Thiago, Jademilson, Fernando Maluf, Nicole, Napoleão, Livia, Joci, Cesar, Mi Fagundes, Vanessa, Atílio, Ivan, Caio, Bruno e Marisa.

Aos amigos de grupo de trabalho Juliana Torini, B2, Victor Caldas e Angela Fala por todo apoio, ajuda e amizade.

Aos amigos Alexandre Bisson, Alex Kanno e Tatiana Zanfelicci por todo carinho e momentos únicos compartilhados, vocês são essenciais na minha vida.

Aos amigos de Descalvado: Marcela dos Santos, Rafael Mendes de Oliveira, Rafael Ricci, Marcos Cruz, Gustavo Guella, Diórgenes Lopes, João Paulo e Siméia Casatti, Maurício Toledo, César Perez e Gui Michalski pelos anos de convivência e momentos de descontração.

Aos grandes amigos de graduação Aline, André, Josi, Fá, Rodrigo (feio), Gilmar, Junior, Flávio e Daninha que de alguma forma fizeram-se presentes nesses anos.

Aos amigos da Biotec: Danilo, Carla, Nayara, Luis, Luiz, Laís, Huelinton e Débora.

Aos amigos de república Maria Clara de Freitas e Luís Francisco Gomes da Costa pelos anos de boa convivência e acolhimento.

Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP) por proporcionar o desenvolvimento integral do meu projeto em suas instalações.

A FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

*"Chegamos assim a uma concepção de relação entre ciência e religião muito diferente da usual... Sustento que o sentimento religioso cósmico é a mais forte motivação da pesquisa científica."
(Albert Einstein)*

*"Se a religião recusa caminhar com a ciência, a ciência avança sozinha."
(Allan Kardec)*

RESUMO

Schistosoma mansoni é o parasita responsável pela esquistossomose mansônica, doença que afeta cerca de 207 milhões de pessoas em todo mundo, e não possui a via de síntese *de novo* de purinas, dependendo integralmente da via de salvação para seu suprimento de purinas. A adenosina kinase (AK) e a Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT) são importantes enzimas desta via, sendo a AK responsável pela fosforilação direta de adenosina para adenosina monofosfato (AMP) e a HGPRT pela fosforibosilação reversível de hipoxantina ou guanina para IMP ou GMP respectivamente. Essa via tem sido citada como alvo potencial para o desenvolvimento de novos fármacos contra a esquistossomose. A região nucleotídica codificadora da enzima AK, isoforma 2, foi amplificada e clonada em vetor pGEM e pET28a, a proteína recombinante foi expressa em *E.coli* BL21 (DE3), purificada em coluna de níquel e AMP-agarose, submetida a ensaios de atividade e cristalizada. Dois conjuntos de dados foram obtidos por difração de raio-X: um complexo ternário de AK2-AMP-adenosina na linha de luz MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron e um complexo binário de AK2-tubercidina no raio-X do Instituto de Física de São Carlos – USP – ânodo rotatório, ambos a 2.3Å de resolução. A região nucleotídica codificadora da enzima HGPRT também foi amplificada, clonada em pGEM e pET28a, sendo a proteína recombinante expressa em *E.coli* BL21 (DE3) a 18°C e purificada em coluna de cobalto.

ABSTRACT


Schistosoma mansoni is the parasite responsible for schistosomiasis mansonica, a disease that affects about 207 million people worldwide, and does not have the purine de novo synthetic pathway, depending entirely on the purine salvage pathway to supply its demands on purines. Adenosine kinase (AK) and Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) are important enzymes of the purine salvage, the AK directly phosphorylates adenosine into adenosine monophosphate (AMP) and HGPRT is responsible for the reversible phosphorybosalation of hypoxanthine or guanine into IMP or GMP. The purine salvage pathway has been reported as a potential target for developing new drugs against schistosomiasis. The nucleotide coding region of the isoform 2 of AK enzyme was amplified and cloned into pGEM vector and pET28a, the recombinant protein was expressed in *E.coli* BL21 (DE3), purified in a his-tag nickel-affinity resin and AMP-agarose resin, tested for its activity and crystallized. Two data sets were obtained by X-ray diffraction: a ternary complex of AK2-AMP-adenosine in the MX2 light line of the Synchrotron Light National Laboratory and a binary complex AK2-tubercidin in the rotatory anode X-ray source of the Institute of Physics at São Carlos - USP, both at 2.3Å of resolution. The nucleotide coding region of the enzyme HGPRT was also amplified, cloned into pGEM and pET28a, which heterologous expression was done in *E.coli* BL21 (DE3) cells at 18°C and purified on a cobalt his-tag affinity resin.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Ciclo de vida do *Schistosoma*. ① Ovos são eliminados nas fezes ou urina, ② em condições ideais há eclosão dos ovos e liberação de miracídeos, ③ que nadam e penetram em hospedeiros intermediários específicos (moluscos). ④ Os estágios no caramujo incluem duas gerações de esporocistos ⑤ e a produção de cercárias. ⑥ Após liberadas do caramujo, as cercárias infectantes nadam e penetram na pele do hospedeiro humano, ⑦ perdem sua cauda, passando a ser esquistossômulo. (⑧, ⑨) Os esquistossômulos migram através de diversos tecidos para se instalarem as veias. ⑩ Os vermes adultos nos seres humanos residem nas vênulas mesentéricas em várias localizações, que parecem ser específicas para cada espécie. ⑪ As fêmeas (com tamanho de 7 a 20 mm, macho um pouco menor) depositam ovos em pequenas vênulas do sistema portal e perivesical. Os ovos são movidos progressivamente para o lúmen do intestino (*S. mansoni* e *S. japonicum*) e da bexiga e ureteres (*S. haematobium*), e são eliminados com as fezes ou urina, respectivamente..... **23**
- FIGURA 2.** Origem dos átomos do anel de purinas (via *de novo*) **26**
- FIGURA 3.** Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em *S. mansoni*. 1. Adenosina Kinase (AK), 2. Adenilato kinase (ADK), 3. Nucleosídeo difosfato kinase (NDPK), 4. Metiltioadenosina fosforilase (MTAP), 5. Adenina fosforibosiltransferase (APRT), 6. Adenina desaminase (ADA), 7. Purina nucleosídeo fosforilase (PNP), 8. Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT), 9. Adenilsuccinato sintetase (ADSS), 10. Adenilsuccinato liase (ADSL), 11. IMP-desidrogenase (IMPDH), 12. Guanosina monofosfato sintetase (GMPS), 13. Guanilato kinase (GUANK), 14. Nucleosídeo difosfato kinase (NDPK)..... **28**
- FIGURA 4.** Estrutura química dos compostos envolvidos na reação catalisada pela enzima adenosina kinase: ATP e Adenosina resultando em ADP e AMP..... **29**
- FIGURA 5.** Estrutura da adenosina kinase humana em modelo de fitas. As α -hélices estão em vermelho e as fitas β em azul. Pode ser observada a ligação de duas moléculas de adenosina na estrutura..... **30**
- FIGURA 6.** Alinhamento das duas seqüências da adenosina kinase de *Schistosoma mansoni*, estas possuem 79% de identidade seqüencial. **31**
- FIGURA 7.** Alinhamento múltiplo das duas seqüências de adenosina kinase de *Schistosoma mansoni* (Smp) e humana (1BX4)..... **31**

FIGURA 8.	Estrutura química da adenosina e os análogos de adenosina: 5'-deoxi-5'-iodo-2-fluoroadenosina, tubercidina, nebularina, toiocamicina, sangivamicina, 3'-deoxisangivamicina, 9-deazaadenosina, 7,9-dideaza-7-tiaadenosina e 1-metilformicina.....	33
FIGURA 9.	Estrutura química dos compostos envolvidos na reação catalisada pela enzima Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase, PRPP e hipoxantina resultando em IMP e pirofosfato.....	34
FIGURA 10.	Estrutura dimérica da hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase humana em modelo de fitas.....	35
FIGURA 11.	Alinhamento de HGPRT Smp_148820 de <i>Schistosoma mansoni</i> com HGPRT humana (2JBH), 32% de identidade seqüencial.....	36
FIGURA 12.	Alinhamento de HGPRT Smp_168500 de <i>Schistosoma mansoni</i> com HGPRT humana (2JBH), 38% de identidade sequencial.....	36
FIGURA 13.	Alinhamento de HGPRT Smp_103560 de <i>Schistosoma mansoni</i> com HGPRT humana (2JBH), 45% de identidade sequencial.....	36
FIGURA 14.	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para visualização da amplificação por PCR do cDNA correspondente as enzimas AK1, AK2 e HGPRT. Gel A. 1. Marcador de peso molecular; 2. AK2 (1059 pb). Gel B. 1. Marcador de peso molecular; 2. HGPRT (750 pb). Gel C. 1. Marcador de peso molecular; 2 e 3. AK1 (1059 pb).....	52
FIGURA 15.	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para visualização do PCR de colônia para confirmar presença do inserto. Gel A. 1. Marcador de peso molecular; 2.6.7.8.11.12. AK2 positivas. Gel B. 1. Marcador de peso molecular; 2.5.6.7.9.10.11.12 (superior) HGPRT positivas; 2.3.4.7.8.9.10.12 (inferior) HGPRT positivas. Gel C. 1. Marcador de peso molecular. 2.3.4.5.6.7.8.9.10.11 (superior) AK1 positivas; 3.4.5.6.7.8.10.11 (inferior) AK1 positivas.....	54
FIGURA 16.	Região de clonagem do vetor pET28a.....	55
FIGURA 17.	Análise da expressão de HGPRT em gel de poliacrilamida 15% corado por coomassie blue. Poço 1 . Marcador de peso molecular. 2. Bactéria não induzida (T0). 3. Bactéria induzida por 1 hora. 4. 2 horas. 5. 3 horas.....	56
FIGURA 18.	Análise da purificação de HGPRT em gel de poliacrilamida 15% corado por coomassie blue com as aliquotas da expressão e purificação da HGPRT. Poço 1 . Marcador de peso molecular. 2. Extrato bruto após a cromatografia em coluna de cobalto. 3. Lavagem da coluna. 4 e 5 frações da HGPRT purificada da coluna de cobalto (29 kDa).....	56

FIGURA 19.	Análise das alíquotas da clivagem da cauda de histidina da enzima HGPRT em gel de poliacrilamida 15% corado por coomassie blue. Poço 1 . Marcador de peso molecular. 2. Amostra de HGPRT não clivada. 3. Amostra de HGPRT clivada. 4. Amostra comparativa de HGPRT não clivada.....	57
FIGURA 20.	Gel de poliacrilamida 15% corado com coomassie blue para análise da expressão da enzima AK2 (aproximadamente 42 kDa) em vetor de expressão pET28a em bactérias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) a 37°C com 100µM de IPTG. Poço 1. Marcador de peso molecular. 2. Bactéria não induzida (T0). 3. Bactéria induzida por 1 hora. 4. 2 horas. 5. 3 horas. 6. 4 horas.....	58
FIGURA 21.	Gel de poliacrilamida 15% corado por coomassie blue para análise da expressão e purificação da enzima AK2 em coluna de níquel. Poço 1 . Marcador de peso molecular. 2. extrato bruto. 3. Extrato bruto após a cromatografia em coluna de níquel. 4. lavagem da coluna. 5 e 6 frações da AK2 purificada da coluna de níquel. A AK2 é a proteína nos poços 5 e 6 com peso em torno de 42kDa.....	58
FIGURA 22.	Gel de poliacrilamida 15% corado por coomassie blue para análise da purificação da AK2 em coluna de AMP-Agarose. Poço 1 . Marcador de peso molecular. 2. Eluato. 3. Lavagem da coluna. 4 a 10. Frações da purificação da AK2.....	59
FIGURA 23.	Análise da purificação da enzima AK2 de em coluna de níquel e AMP-agarose em gel de poliacrilamida 15% corado com coomassie blue. Poço 1. Marcador de peso molecular. 2. Eluição de AK2 da coluna de níquel. 3 a 8. Alíquotas coletadas da eluição da coluna de AMP-agarose. 9. AK2 concentrada a 8mg/mL.....	59
FIGURA 24.	Cristais da proteína AK2 (0.4 mm) de <i>S. mansoni</i> na condição G3 do kit Index: 100mM bis-tris pH 6,5; 25% de PEG3350 e 200mM de Li ₂ SO ₄	60
FIGURA 25.	Sítio de ligação de adenosina da AK2 mostrando o mapa de densidade eletrônica Fo-Fc correspondente ao ligante adenosina (3 σ).....	62
FIGURA 26.	Sítio de ligação de ATP da AK2 mostrando o mapa de densidade eletrônica Fo-Fc correspondente ao ligante AMP (3 σ).....	63
FIGURA 27.	Sítio de ligação da adenosina de AK2 mostrando o mapa de densidade eletrônica Fo-Fc correspondente ao ligante tubercidina (3 σ).....	64
FIGURA 28.	Sítio de ligação da ATP de AK2 mostrando o mapa de densidade eletrônica Fo-Fc correspondente ao ligante tubercidina (2 σ).....	64

- FIGURA 29.** Estrutura tridimensional de AK2-adenosina-AMP em modelo de fitas, as hélices estão em vermelho, fitas β em azul e loops em verde. Diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros para as duas subunidades da estrutura. A região representada em vermelho corresponde à região mais favorável para os valores dos ângulos, a região amarelo escuro é a adicionalmente permitida, amarelo claro é a generosamente permitida e a região em branco é a região não permitida. As glicinas são representadas por triângulos..... 66
- FIGURA 30.** Análise do mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc (1σ) correspondente ao resíduo Serina 197 que encontra-se na região não permitida do diagrama de Ramachandran..... 67
- FIGURA 31.** Estrutura tridimensional de AK2-tubercidina em modelo de fitas, as hélices estão em vermelho, fitas β em azul e loops em verde. Diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros para as duas subunidades da estrutura. A região representada em vermelho corresponde à região mais favorável para os valores dos ângulos, a região amarelo escuro é a adicionalmente permitida, amarelo claro é a generosamente permitida e a região em branco é a região não permitida. As glicinas são representadas por triângulos.... 68
- FIGURA 32.** Análise do mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc (1σ) correspondente ao resíduo Serina 197 que encontra-se na região não permitida do diagrama de Ramachandran e do resíduo Glutamina 78 que encontra-se na região generosamente permitida do diagrama de Ramachandran..... 68
- FIGURA 33.** Sobreposições das estruturas tridimensionais de AK depositadas no PDB com AK de *Schistosoma mansoni*. A: AK de *Schistosoma mansoni* (vermelho) e humana 1BX4 (azul escuro). Rmsd = 1.099 Å. B: AK de *Schistosoma mansoni* (vermelho) e *Anopheles gambiae* 3LOO (azul claro) Rmsd = 1.201 Å. C: AK de *Schistosoma mansoni* (vermelho) e *Toxoplasma gondii* 1LIK (rosa). Rmsd = 1.209 Å. D: AK de *Schistosoma mansoni* (vermelho) e *Micobacterium tuberculosis* 2PKM (amarelo). Rmsd = 10.908 Å..... 70
- FIGURA 34.** A: Estrutura tridimensional de AK de *Schistosoma mansoni* com adenosina e AMP ligados (preto). As α -hélices do domínio tampa estão representadas em azul claro, as fitas β em magenta e os loops em rosa. As α -hélices do domínio maior estão representadas em vermelho, as fitas β em azul escuro e os loops em verde. B: Estrutura secundária de AK em função da seqüência de aminoácidos gerada pelo pdb sum. As fitas β são representadas por setas rosa, as α -hélices por espirais roxas com a respectiva numeração em cima (H1, H2...H18), as 2 folhas β são classificadas como A e B, sendo essas letras colocadas acima das fitas identificando a qual folha pertencem. Os símbolos: β - beta turn, γ - gamma turn e  - beta hairpin..... 71

- FIGURA 35.** Topologia de AK2 gerada pelo PDB sum. As fitas β são representadas por setas rosa, as α -hélices em tubos vermelhos e os loops em azul. O N-terminal é indicado pela letra N e o C-terminal pela letra C..... 72
- FIGURA 36.** Alinhamento de AK humana e de *Schistosoma mansoni* em função da estrutura secundária de AK humana. A primeira linha corresponde à estrutura secundária formada, a segunda linha a sequência de aminoácidos de AK humana e a terceira linha de *Schistosoma mansoni*. Os resíduos brancos grifados em vermelho são conservados nas duas estruturas, os em vermelho grifados em branco são os resíduos não conservados, porém similares. A quarta linha corresponde a exposição dos resíduos ao solvente, em azul escuro os mais expostos, azul claro podem estar expostos e branco hidrofóbicos..... 73
- FIGURA 37.** Estrutura tridimensional de AK2 de *Schistosoma mansoni* destacando os resíduos conservados Gly63 (azul) e Gly64 (vermelho) no loop que liga fita β 4 e α -hélice4 e funcionam como uma dobradiça responsável pelo movimento de 30° do domínio chamado de tampa que se fecha em relação ao domínio maior após a ligação de adenosina no sítio de ligação de adenosina..... 74
- FIGURA 38.** Estrutura tridimensional de AK2 de *Schistosoma mansoni* destacando a região conservada DXNGAGD (resíduos 296 a 302), região de loop e início da α -hélice 16 posicionado próximo ao C-terminal..... 75
- FIGURA 39.** Mecanismo catalítico de AK, resíduo asp300 em AK humana que tem seu correspondente na posição 302 na AK de *Schistosoma mansoni*, este deprotona o grupo 5-hidroxila da molécula de adenosina que ataca o fosfato γ do ATP..... 75
- FIGURA 40.** Sítio de ligação de adenosina na estrutura de AK2-adn-amp de *Schistosoma mansoni* (branco) com adenosina (verde) ligada (vermelho) a três moléculas de água e aos resíduos Asp 18, Gly 64, Asn 68, Thr 136 e Asp 302. Tabela: Ligações de hidrogênio da molécula de adenosina no sítio de ligação de adenosina da AK de *Schistosoma mansoni* (<3.5Å)..... 77
- FIGURA 41.** Sítio de ligação de adenosina na estrutura de AK2-AMP-adn. Posição N7 da base nitrogenada da adenosina ligada ao resíduo de aminoácido Thr136 com distância de 2.82Å..... 78
- FIGURA 42.** Sobreposição do sítio ativo da adenosina de AK *Schistosoma mansoni* (branco) e AK humana (verde). Os sítios diferem em 5 resíduos de aminoácidos em relação ao sítio da enzima do parasita I38Q, A65S, V123C, M134L e T136A..... 78

FIGURA 43.	Sobreposição dos sítios de ligação de adenosina do parasita e humana. AK de <i>Schistosoma mansoni</i> representada em branco, ligações de hidrogênio e águas em azul. AK humana representada em verde, ligações e águas em vermelho.....	79
FIGURA 44.	Sítio de ligação de adenosina na estrutura de AK2-tubercidina de <i>Scshitosoma mansoni</i> (branco) com tubercidina (verde) ligada (vermelho) aos resíduos Asp 18, Gly 64, Asn 68 e Asp 302. Perdendo a ligação com Thr 136 pela substituição do átomo de Nitrogênio por um Carbono na posição 7 em relação a adenosina.....	80
FIGURA 45.	Sobreposição do sítio de ligação de adenosina das AKs de <i>Schistosoma mansoni</i> . Em branco a estrutura de AK-AMP-adn com ligações e águas representadas em azul. Em azul claro a estrutura de AK-tub com ligações e águas representadas em vermelho.....	81
FIGURA 46.	Sítio de ligação de ATP na estrutura de AK2-adn-amp de <i>Scshitosoma mansoni</i> (branco) com AMP (verde) ligado (azul) a quatro moléculas de água e ao resíduos Thr 265 e Gly267.....	82
FIGURA 47.	Sobreposição do sítio ativo de ATP da AK <i>Schistosoma mansoni</i> (branco) e AK humana (verde). Os sítios diferem nos principais resíduos de aminoácidos em relação ao sítio da enzima do parasita K268R, F289D288, Q289K290.....	83
FIGURA 48.	Sobreposição da molécula de AMP e adenosina, presentes no sítio de ligação do ATP da AK do parasita (branco) e humana (verde) respectivamente e as ligações de hidrogênio que realizam. Sendo azul para AK do parasita e vermelha para humana.....	84
FIGURA 49.	Sítio de ligação de ATP na estrutura de AK2-tubercidina de <i>Scshitosoma mansoni</i> (branco) com tubercidina (verde) ligado (vermelho) a três moléculas de água ligadas aos resíduos Thr 265, Arg 266, Gly 267 e Glu 287.....	84
FIGURA 50.	Sobreposição do sítio de ligação de ATP de AK2 ligando AMP (branco) e AK2 ligando tubercidina (azul claro). Ambos ligantes, apesar de ligações diferentes encontram-se com o mesmo posicionamento dentro do sítio.....	85
FIGURA 51.	Análise da atividade enzimática da enzima AK2 de <i>Schistosoma mansoni</i> . Gráfico de absorbância ao longo do tempo da solução controle, ou seja, aquela que não contém enzima adicionada na reação.....	86
FIGURA 52.	Análise da atividade enzimática da enzima AK2 de <i>Schistosoma mansoni</i> . Gráfico de absorbância ao longo do tempo de 100nM de AK2 e 200µM de adenosina.....	86

- FIGURA 53.** Análise da atividade enzimática da enzima AK2 de *Schistosoma mansoni*. Gráfico de absorvância ao longo do tempo de 200nM de AK2 e 200 μ M de adenosina..... **87**
- FIGURA 54.** Análise da atividade enzimática da enzima AK2 de *Schistosoma mansoni*. Gráfico de absorvância ao longo do tempo de 1 μ M de AK2 e 200 μ M de adenosina..... **87**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estágio de vida ao qual pertence cada homólogo da HGPRT e identidade sequencial entre eles.....	35
Tabela 2.	Estatísticas da coleta de dados e refinamento para os cristais da AK2.....	61
Tabela 3.	Análise da geometria de AK2 gerada pelo programa MOLPROBITY.....	65
Tabela 4.	Comparação de enovelamento de AK de <i>Schistosoma mansoni</i> e AKs depositadas no pdb através do valor de RMSD calculado da sobreposição destas.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Å	Angstrom
ADA	Adenosina desaminase
ADK	Adenilato kinase
ADP	Adenosina difosfato
ADSL	Adenilsuccinato liase
ADSS	Adenilsuccinato sintetase
AK	Adenosina Kinase
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
APRT	Adenina fosforibosiltransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
Bis	2-hidroxi-etil
cDNA	Ácido desoxirribonucléico codificante
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GDP	Guanosina difosfato
GMP	Guanosina monofosfato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
GUANK	Guanilato kinase
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
IMP	Inosina monofosfato
IMPDH	Inosina monofosfato desidrogenase
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	QuiloDalton
L	Litro
LDH	Lactato Desidrogenase
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
mM	mili molar
MTAP	Metiltioadenosina fosforilase
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NDPK	Nucleosídeo difosfato kinase

nM	nano molar
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
PEP	Fosfoenolpiruvato
pET28a	Plasmídeo para expressão heteróloga
pGEM	Plasmídeo para clonagem de fragmentos de DNA
Pi	Fosfato inorgânico
PNP	Purina nucleosídeo fosforilase
PPi	Pirofosfato inorgânico
PRPP	Fosforribosil-pirofosfato
pTZ	Plasmídeo para clonagem de fragmentos de DNA
PYK	Piruvato kinase
PZQ	Praziquantel
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	Ácido ribonucléico de interferência
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Tris	[Tris(hidroximetil)aminoetano]
U	unidade
UDP	Uridina difosfato
USP	Universidade de São Paulo
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
XMP	Xantosina monofosfato
α	alfa
β	beta
γ	gama
μ g	micro grama
μ L	micro litro
μ M	micro molar
Φ	phi
Ψ	psi

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1 A esquistossomose.....	22
1.2 Esquistossomose em números e tratamento.....	24
1.3 Metabolismo de nucleotídeos: uma visão geral.....	25
1.4 Metabolismo de Purinas em <i>Schistosoma mansoni</i>.....	26
1.5 A Enzima Adenosina Kinase (AK).....	29
1.6 A adenosina kinase de <i>Schistosoma mansoni</i>.....	30
1.7 A Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT).....	34
1.8 A Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase de <i>Schistosoma mansoni</i>.....	35
2. OBJETIVOS.....	38
2.1 Geral.....	38
2.2 Específicos.....	38
3. MATERIAIS e MÉTODOS.....	39
3.1 Amplificação do cDNA.....	39
3.2 Clonagem do cDNA.....	41
3.2.1 Ligação no vetor de clonagem pGEM.....	41
3.2.2 Transformação de bactérias competentes, plaqueamento, seleção de colônias recombinantes, extração de DNA plasmidial e seqüenciamento.....	41
3.2.3 Digestão do pGEM com as enzimas de restrição <i>NheI</i> , <i>XhoI</i> e <i>SalI</i> para extração do inserto.....	42
3.2.4 Digestão do pET28a para receber insertos.....	43
3.2.5 Ligação no vetor de expressão pET28a.....	44
3.2.6 Transformação de bactérias competentes <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	44
3.3 Expressão heteróloga e purificação das enzimas recombinantes.....	45
3.3.1 Expressão heteróloga da enzima HGPRT de <i>Schistosoma mansoni</i>	46
3.3.2 Purificação da enzima HGPRT de <i>Schistosoma mansoni</i>	46
3.3.3 Clivagem da cauda de histidina da enzima HGPRT de <i>Schistosoma mansoni</i>	47
3.3.4 Expressão heteróloga da AK2 de <i>Schistosoma mansoni</i>	47
3.3.5 Purificação da enzima AK2 de <i>Schistosoma mansoni</i>	47

3.4 Ensaios de cristalização.....	48
3.4.1 Ensaios de Cristalização de HGPRT de <i>Schistosoma mansoni</i>	48
3.4.2 Ensaios de Cristalização da AK2 de <i>Schistosoma mansoni</i>	49
3.5 Cristalização de AK2 de <i>Schistosoma mansoni</i>.....	49
3.6 Coleta de dados, resolução, refinamento, validação e análise da estrutura tridimensional de AK2 de <i>Schistosoma mansoni</i>.....	50
3.7 Teste de atividade da AK2 de <i>Schistosoma mansoni</i>.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1 Amplificação do cDNA.....	52
4.2 Clonagem do cDNA.....	53
4.2.1 Ligação em vetor de clonagem, transformação, plaqueamento, seleção de colônias, extração de DNA plasmidial e seqüenciamento.....	53
4.2.2 Digestão, ligação em vetor de expressão e transformação de bactérias competentes <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	54
4.3 Expressão hetelóloga, purificação da enzima recombinante e ensaios de cristalização de HGPRT de <i>Schistosoma mansoni</i>.....	55
4.4 Expressão hetelóloga e purificação da enzima recombinante AK2 de <i>Schistosoma mansoni</i>.....	57
4.5 Cristalização da AK2 de <i>Schistosoma mansoni</i>.....	60
4.6 Coleta de dados, processamento, resolução e refinamento de dados de difração de raios-X da AK2.....	61
4.7 Validação dos modelos.....	65
4.8 Análise das estruturas tridimensionais obtidas de AK2 de <i>Schistosoma mansoni</i>.....	69
4.8.1 Enovelamento.....	69
4.8.2 Estrutura secundária, topologia e regiões conservadas.....	70
4.8.3 Mecanismo catalítico.....	73
4.8.4 O sítio ativo.....	76
4.8.4.1 Sítio de ligação de adenosina.....	76
4.8.4.2 Sítio de ligação do ATP.....	81
4.9 Teste de atividade da AK2 de <i>Schistosoma mansoni</i>.....	85
5. CONCLUSÕES.....	88

6. PERSPECTIVAS.....90

REFERÊNCIAS91

1. INTRODUÇÃO

1.1 A esquistossomose

A esquistossomose, também conhecida popularmente como barriga d'água é o nome da infecção causada pelo platelminto trematodo do gênero *Schistosoma* (*Schistosoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*, ou *S. japonicum*), onde a espécie *Schistosoma mansoni* é a única predominante na América, inclusive no Brasil, e uma das mais predominantes na África [1].

É uma doença parasitária crônica, debilitante e pode ser fatal. Afeta indivíduos principalmente em áreas rurais, sendo endêmica em países tropicais e subtropicais. Nestes países constitui um dos principais problemas de saúde pública e está associada diretamente às condições sócio-econômicas da população, uma vez que a transmissão da doença ocorre pela utilização de água contaminada com a forma infectante do parasita [1,2].

O *S. mansoni* possui um ciclo de vida heteroxênico, que se alterna entre dois hospedeiros distintos (Figura 1): hospedeiro intermediário representado principalmente pelo caramujo do gênero *Biomphalaria* (*B. glabrata* no Brasil), onde ocorre a reprodução assexuada e o hospedeiro definitivo vertebrado, representado pelo homem, onde ocorre a fase sexuada da reprodução [3].

A infecção tem início quando o indivíduo entra em contato com a água contaminada contendo a forma larval (cercária) liberada pelo caramujo. As cercárias penetram na pele, perdem a cauda e se transformam em vermes imaturos (esquistossômulos). Estes migram para o sistema sanguíneo ou linfático e chegam aos pulmões onde passam para o sistema porta intra-hepática e atingem a maturidade sexual. Os machos e fêmeas vivem acasalados e migram até as veias mesentéricas inferiores onde ocorre a oviposição. Os ovos eliminados nas fezes eclodem em contato com a água liberando o miracídio, que penetra no caramujo se transformando em esporocistos que dão origem às cercárias, reiniciando o ciclo. Uma parte dos ovos liberados pelos vermes adultos se aloja na mucosa intestinal e/ou fígado e posteriormente nos capilares do sistema porta levando a formação de granulomas ou provocam hemorragias e ulcerações durante a sua passagem para a luz intestinal [3].

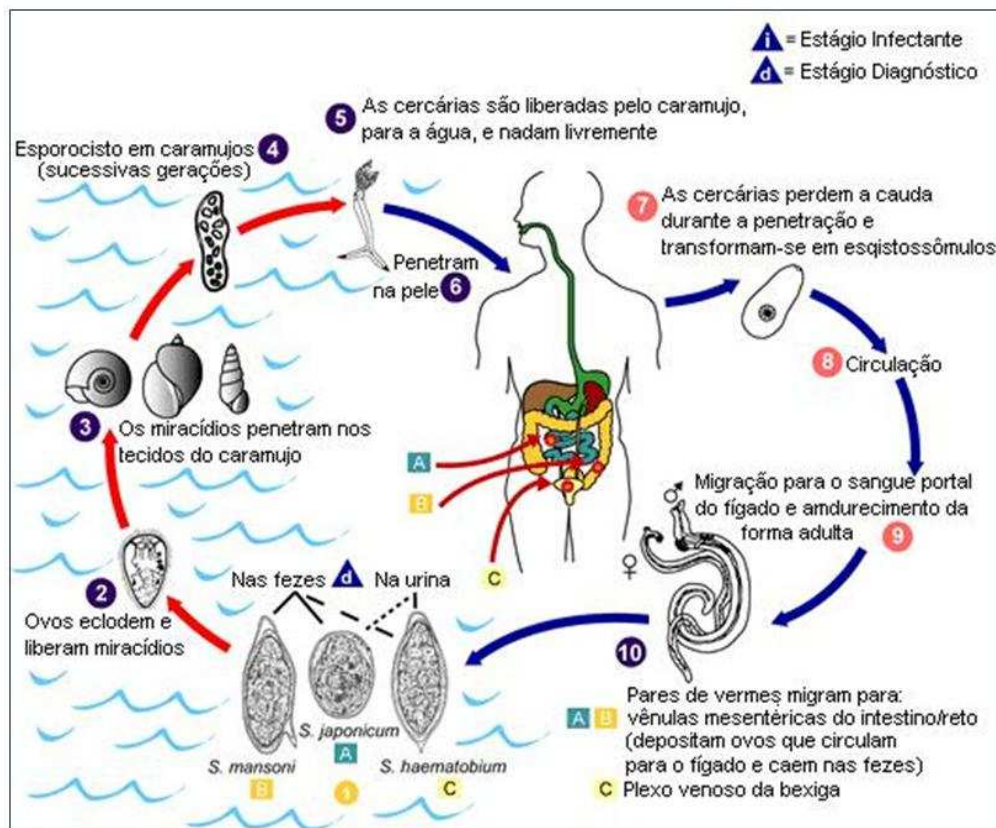


FIGURA 1: Ciclo de vida do *Schistosoma*. 1 Ovos são eliminados nas fezes ou urina, 2 em condições ideais há eclosão dos ovos e liberação de miracídeos, 3 que nadam e penetram em hospedeiros intermediários específicos (moluscos). 4 Os estágios no caramujo incluem duas gerações de esporocistos 5 e a produção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

A produção de ovos é o aspecto mais significativo do parasitismo e a maior causa da patologia da esquistossomose. A estimativa da produção de ovos fertilizados pelo parasita é de centenas a milhares de ovos por dia. Acredita-se que esta fecundidade persista por anos, representando um exemplo notável de capacidade biossintética altamente especializada que obviamente requer um ativo metabolismo de nucleotídeos de purina, tanto como fonte de energia (ATP) como para o suprimento de bases de purina nas sínteses de DNA e RNA [4].

1.2 Esquistossomose em números e tratamento

A esquistossomose é uma das doenças mais negligenciadas do mundo [5]. Em 2010 a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que cerca de 700 milhões de pessoas em todo o mundo estão em áreas de risco para a esquistossomose, e perto de 207 milhões de pessoas são atualmente continuamente ou intermitentemente infectadas. Os sintomas associados à doença incluem hepatomegalia, esplenomegalia, fibrose hepática e ascite, e cerca de 200.000 pessoas morrem por ano [6,7]. A doença é associada com uma morbidade crônica e debilitante que manifesta também suas conseqüências num déficit cognitivo, cansaço e redução do crescimento [8,9].

Na ausência de uma vacina, de um eficiente controle do vetor e de saneamento básico, o tratamento e controle da esquistossomose atualmente residem em um único fármaco administrado após infecção, o praziquantel (PZQ). Este fármaco é efetivo contra todas as espécies de *Schistosoma*, e nos últimos 25 anos foi estabelecido que seu uso é seguro e efetivo [9]. O principal problema com o PZQ é que ele é praticamente inativo contra esquistossômulos imaturos, nos quais a atividade só é alcançada cerca de 6 a 8 semanas após a infecção [6]. Além disto, a falha de um tratamento é frequentemente usada como o primeiro indicativo do fim da vida efetiva de um fármaco. No caso do PZQ várias comunicações da falha no tratamento já foram reportadas [9-17]. A OMS em seu Programa Especial Para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR) relata que milhões de doses de PZQ são administradas a cada ano, e que este número terá um significativo acréscimo nos próximos anos, possibilitando o aumento do número de parasitas resistentes [18].

Estudos recentes têm demonstrado que os derivados de artemisinina, usados com eficiência no tratamento da malária, também tem atividade contra a esquistossomose mansônica [19]. A ação esquistomicida do arthemeter foi descoberta e testada a princípio em diversos experimentos realizados com camundongos e cães infectados com *Schistosoma japonicum* que posteriormente foram tratados com doses variadas desse fármaco. Tais estudos demonstraram uma redução significativa na carga de vermes adultos, bem como ação sobre os esquistossômulos, porém não possui nenhum efeito sobre os ovos do parasita [20-22]. Posteriormente, novos estudos comprovaram a ação do arthemeter também contra a espécie de *Schistosoma mansoni*, principalmente contra a forma juvenil do parasita, os esquistossômulos [19,23-25]. Entretanto, a utilização do arthemeter contra a esquistossomose para tratamento e prevenção ainda está em fase de pesquisa. Além de que não seria estrategicamente desejado depender de um único agente para o controle sustentado da

esquistossomose. Idealmente, uma gama de opções de tratamento deveria ser disponível, de preferência incluindo o uso de diferentes classes de fármacos [18]. Dentro desse contexto surge a necessidade de iniciar a busca de novos fármacos contra a esquistossomose [1].

1.3 Metabolismo de nucleotídeos: uma visão geral

Os nucleotídeos são moléculas constituídas por uma base nitrogenada púrica (A ou G) ou pirimídica (C, T, ou U), uma ribose e um grupamento fosfato, as quais desempenham uma variedade de importantes papéis em todas as células de todos os organismos vivos. São precursores de DNA e RNA, sendo inclusive carregadores essenciais da energia química—função especialmente atribuída ao ATP e, em uma menor extensão, ao GTP. Além disso, são componentes dos cofatores NAD, FAD, S-adenosilmetionina e coenzima A, bem como de intermediários biossintéticos ativados, tais como UDP-glicose. Também são precursores de moléculas sinalizadoras na célula, tais como AMPc e GMPc [26].

Os conjuntos (*pools*) de nucleotídeos são geralmente pequenos nas células, perfazendo aproximadamente 1% ou menos das quantidades requeridas para síntese do DNA. Portanto, a síntese de nucleotídeos precisa ocorrer paralelamente à síntese de ácidos nucléicos, podendo inclusive ser um fator limitante dos processos celulares de replicação e transcrição [26]. Considerando a importância desses processos para as células em divisão, agentes que inibem a síntese de nucleotídeos têm se tornado de grande importância para a medicina atual.

Dois tipos de vias levam à síntese de nucleotídeos nos seres vivos: vias *de novo* e vias *de salvação*. As vias *de novo* para biossíntese de purinas e pirimidinas são idênticas em praticamente todos os organismos vivos e têm como precursores metabólicos aminoácidos, ribose 5-fosfato, CO₂ e NH₃. As bases livres não são intermediários utilizados pelas vias de síntese *de novo*, pois as bases não são sintetizadas previamente ao seu acoplamento à ribose, mas sim, acopladas ao grupo 5-fosfo- ribosil do nucleotídeo (Figura 2). As vias *de salvação*, no entanto, utilizam as bases livres e nucleosídeos liberados da quebra de ácidos nucléicos. Ambos os tipos de vias são importantes para o metabolismo celular [26,27].

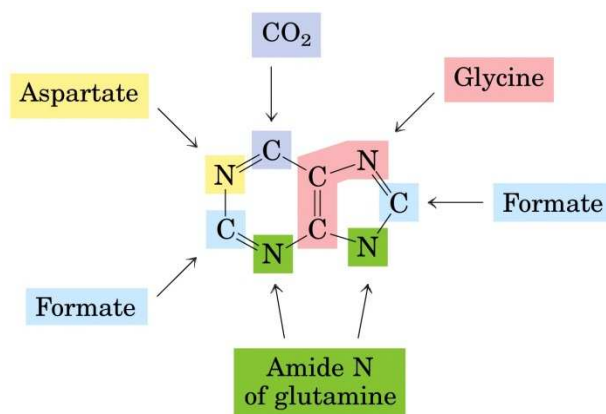


FIGURA 2. Origem dos átomos do anel de purinas (via *de novo*) [26].

1.4 Metabolismo de purinas em *Schistosoma mansoni*

Nucleotídeos de purina são requeridos em todos os organismos para síntese de DNA, RNA e outros metabólitos. É estimado que um grama de *Schistosoma* requeira nove vezes mais energia que um grama de tecido humano. Estes nucleotídeos podem ser obtidos de duas formas: pela síntese, a via “*de novo*” que utiliza precursores simples para a síntese de vários nucleotídeos ou pela via de salvação que reutiliza precursores pré-formados de purinas endógenas e exógenas [28].

Senft *et al.* [4], em seu trabalho sobre metabolismo de purinas em *S. mansoni*, demonstraram uma rápida incorporação de adenina em nucleotídeos e não conseguiram determinar a incorporação de ¹⁴C-glicina e ¹⁴C-glicose no anel púrico. Esta evidência tanto mostra uma grande dependência de um suprimento externo de bases pré-formadas para a síntese de nucleotídeos, como demonstra a perda da via “*de novo*” de síntese de purinas. Esta evidência foi confirmada por Dovey *et al.* [29], fato que mostra a dependência do parasita pela via de salvação de purinas. Deste modo o *S. mansoni*, ao contrário do seu hospedeiro, não possui a via biossintética de purinas “*de novo*” e depende integralmente da via de salvação para seu requerimento de purinas [30]. Por este motivo tem sido levantada a hipótese da via de salvação ser um alvo interessante para o desenvolvimento de fármacos específicos para o combate da esquistossomose. Coerente com esta hipótese são as observações de Senft & Cabtree [31] e de Ross & Jaffe [32] de que vários análogos de purinas inibem enzimas da via de salvação e que um deles, tubercidina, causa separação dos casais de *S. mansoni*, perda da capacidade de sucção da ventosa ventral, alteração do padrão de

atividade muscular e inibição da postura de ovos em concentrações menores que 10^{-7} M. Além disso, Jaffe *et al.* [33] mostraram que tubercidina pode ser usada como agente anti-esquistossomose em macacos, porém é bastante tóxico em humanos.

Stegman *et al.* [34] demonstraram que em *Schistosoma mansoni* a adenosina pode ser processada por dois mecanismos, uma via direta utilizando a enzima adenosina kinase que produz diretamente AMP, e a via indireta: adenosina \rightarrow inosina \rightarrow hipoxantina \rightarrow IMP \rightarrow AMP, sendo que a via indireta é muito mais ativa que a via direta utilizando a kinase.

Extratos de *S. mansoni* convertem mais da metade da adenosina para inosina e hipoxantina *in vitro*, utilizando as enzimas adenosina desaminase (ADA) e purina nucleosídeo fosforilase (PNP) [31,35]. Uma parte da adenosina é clivada em adenina via metiltioadenosina fosforilase (MTAP), quando PRPP (5-fosforribosil-1-pirofosfato) está presente, com posterior formação de AMP pela fosforibosilação da adenina pela enzima adenina fosforibosiltransferase (APRT) [35].

Miech *et al.* [36] reportaram que extratos e o vômito de *S. mansoni* possuem uma atividade enzimática que catalisa a fosforólise de adenosina produzindo adenina e ribose-1-fosfato, e que esta atividade é devido à enzima MTAP inteiramente separada da enzima PNP.

Completando a via, a enzima adenilsuccinato sintetase (ADSS) catalisa a conversão de IMP combinado com aspartato em adenilsuccinato que é hidrolisado pela enzima adenilsuccinato liase (ADSL) em furamato e AMP. Já a enzima IMP-desidrogenase (IMPDH) catalisa a conversão de IMP em xantosina-monofostato (XMP) através da redução de NAD^+ enquanto que a enzima GMP-sintetase converte XMP em GMP através da transferência do nitrogênio amídico da glutamina com hidrólise de ATP em AMP + PPi. [37].

Senft & Crabtree [31], esquematizaram as várias vias pelas quais a adenosina é convertida em nucleotídeos em *S. mansoni*. Este esquema modificado é mostrado na Figura 3.

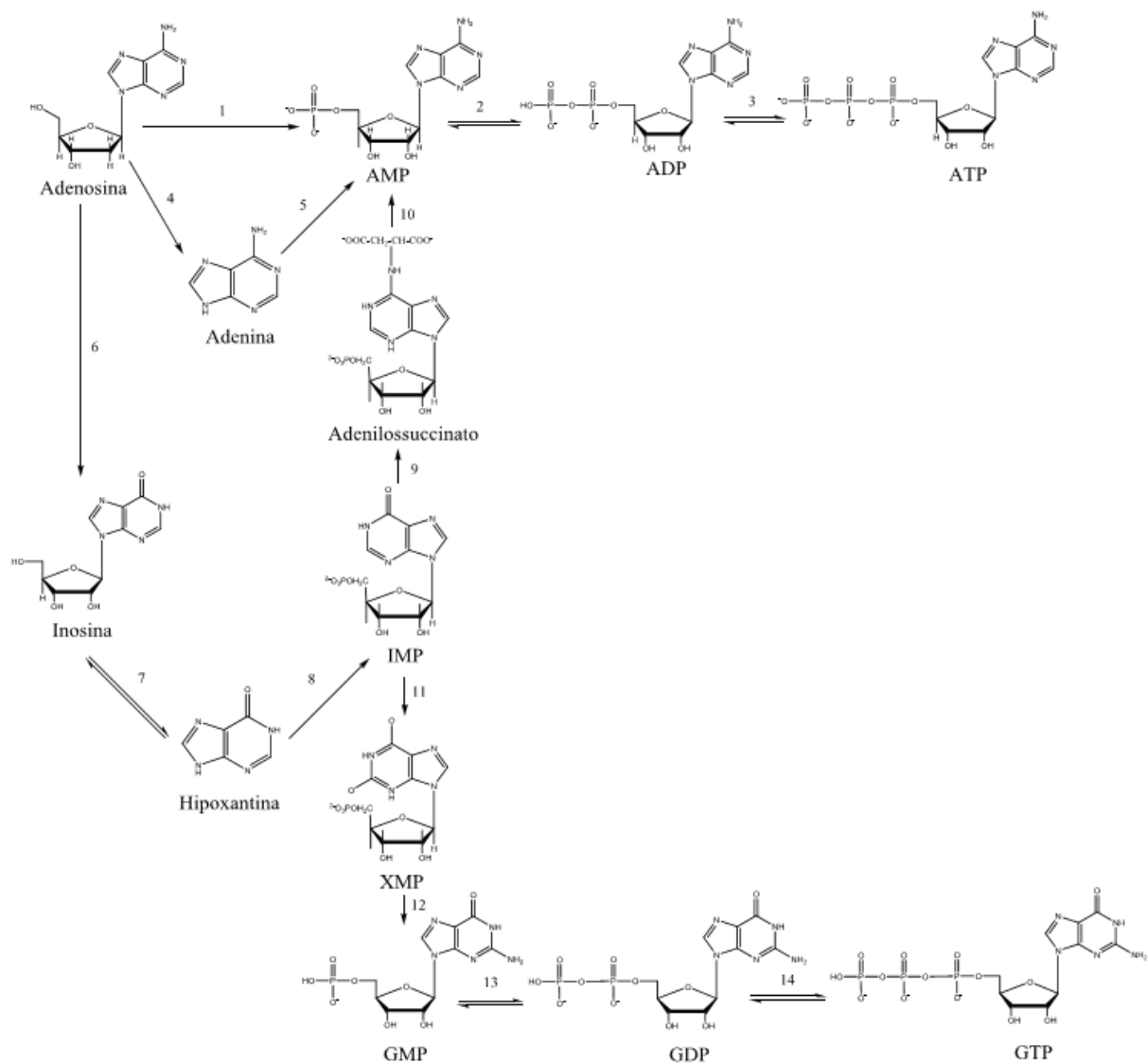


FIGURA 3. Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em *S. mansoni*. 1. Adenosina Kinase (AK), 2. Adenilato kinase (ADK), 3. Nucleosídeo difosfato kinase (NDPK), 4. Metiltioadenosina fosforilase (MTAP), 5. Adenina fosforibosiltransferase (APRT), 6. Adenina desaminase (ADA), 7. Purina nucleosídeo fosforilase (PNP), 8. Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT), 9. Adenilsuccinato sintetase (ADSS), 10. Adenilsuccinato liase (ADSL), 11. IMP-desidrogenase (IMPDH), 12. Guanosina monofosfato sintetase (GMPS), 13. Guanilato kinase (GUANK), 14. Nucleosídeo difosfato kinase (NDPK) [31,37] modificados.

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

1.5 A Enzima Adenosina Kinase (AK)

Uma das enzimas centrais da via de salvação é a adenosina kinase (E.C. 2.7.1.20), que catalisa a fosforilação de adenosina para adenosina monofosfato (AMP) na presença de magnésio, utilizando ATP ou GTP como doadores de fosfato (Figura 4) [38].

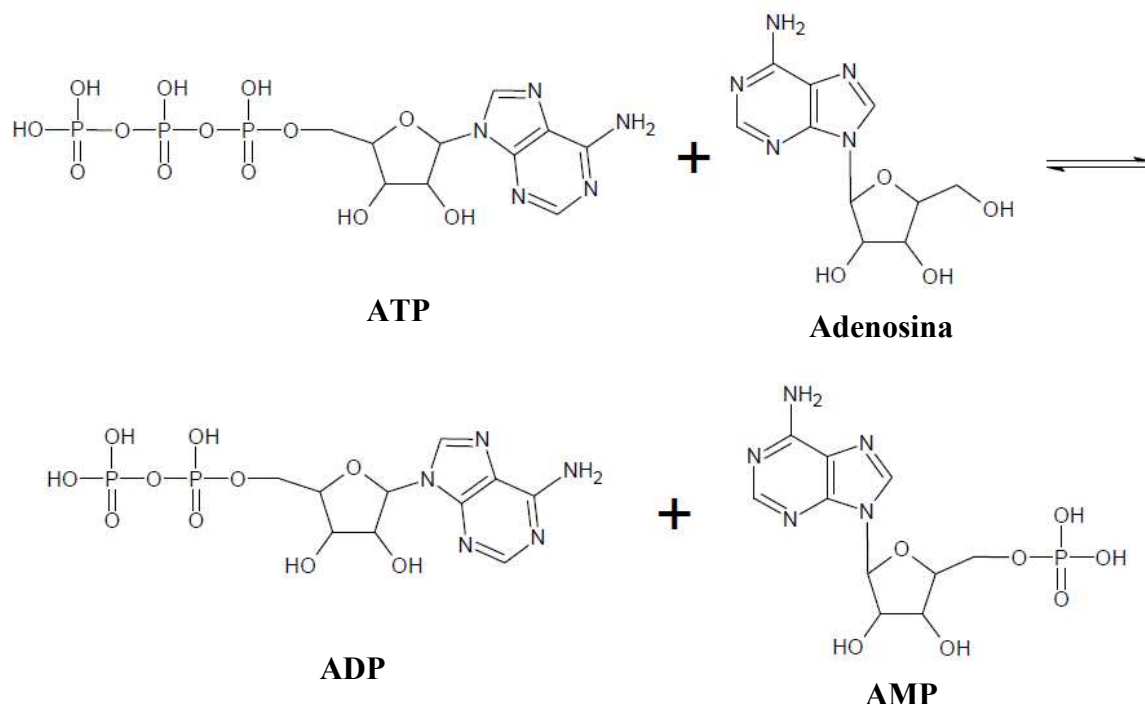


FIGURA 4: Estrutura química dos compostos envolvidos na reação catalisada pela enzima adenosina kinase: ATP e Adenosina resultando em ADP e AMP.

AK pertence à superfamília ribokinase, partilhando características estruturais comuns entre os membros desta, tais como um centro de oito fitas β flanqueados por oito α -hélices conservadas, bem como a localização do sítio ativo em um sulco pouco profundo ao longo da borda da folha β , com o fosfato aceptor do grupo hidroxila e γ -fosfato do ATP juntos no meio deste sulco, e o substrato e ATP ligados nas extremidades [39].

Sabe-se também que a enzima adenosina kinase apresenta uma especificidade de substrato relativamente ampla, tolerando alterações no açúcar e base [40], por esse motivo vários medicamentos nucleosídeos antivirais e anticancerígenos desenvolvidos são substratos de AK e, conseqüentemente, sofrem fosforilação rápida in vivo para 5'-monofosfato [41].

Estruturas de quatro adenosinas kinases estão disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB): humana (pdb 1BX4), *Mycobacterium tuberculosis* (pdb 2PKM), *Toxoplasma gondi* (pdb 1LIK) e *Anopheles gambiae* (pdb 3LOO) [38,41-44].

A estrutura da AK humana é composta de 12 hélices α e 14 fitas β e pode ser dividida em dois domínios. Dois sítios de ligação à adenosina foram identificados na AK [41] (Figura 5).

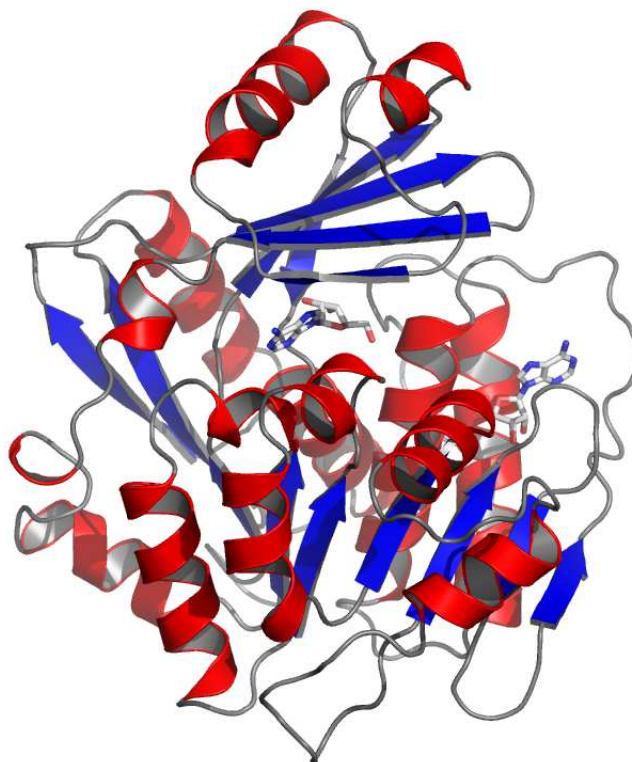


FIGURA 5. Estrutura da adenosina kinase humana em modelo de fitas. As α -hélices estão em vermelho e as fitas β em azul. Pode ser observada a ligação de duas moléculas de adenosina na estrutura.

1.6 A adenosina kinase de *Schistosoma mansoni*

Foram identificadas duas isoformas da enzima adenosina kinase no genoma do *Schistosoma mansoni*. As duas seqüências Smp_008360 (AK2) e Smp_008400 (AK1) contendo 352 aminoácidos possuem 79% de identidade seqüencial. O alinhamento destas pode ser observado na Figura 6.

Smp_008400	MRDLPEGYVFGMGNPLLDILVDADDYMYERYELQKDNAILAEEEHMAIYDEIQKRKDVKY	60
Smp_008360	MHDLSEGYVFGMGNPLLDIIVDADDFMYRKYNLKKNIVLAEKHMITYDEIQKKKLNLY	60
	*:	
Smp_008400	VAGGATLNTVKMIQWIIQKPFVCSYVGCIGADIQGYIKNDCRGLDVRTDFQITTKPLKT	120
Smp_008360	IAGGATLNTVKMIQWIIQKPFVCSYVGCIGADIQGYIKNDCSALDLVTEFQIAEEPLMT	120
	:*****:	
Smp_008400	GKVAVLISEKLRSMVTYLGAACDLSLAHIEQPHVWVSLVEKAQVYYIAGFVINTCYEGMLK	180
Smp_008360	GKVAVLVSEKLRSMVTYLGAACDLSLAHIEQPHVWVSLVEKAQVYYIAGFVINTCYEGMLK	180
	*****:	
Smp_008400	IAKHSLENEKLFNLSATFLPRFNTKEVNEMISYSRIVIGNESEAAATFGEVHSLTDGTV	240
Smp_008360	IAKHSLENEKLFNLSAPFLSQFNTKEVDEMISYSNIVFGNESEAEAYGEVHGLLEDTV	240
	*****:	
Smp_008400	HEAAQYIADLPFADGKKRRLVITQGDPIIYADSTDPTVHQYVVEQLKDEEMVDTNGA	300
Smp_008360	HATARYIADLPFADGKKRRLVITRGNPLLYTDSSEIHQFMVEQFKDDQIIDTNGA	300
	*:	
Smp_008400	GDSFAAGFIADYIRNKPMITSLQSGVKAAAYIIRRSFSLGLRESSAFKINL	352
Smp_008360	GDFAAGFIADYIRGKPMITSLHAAVKAAAYIICRSFSLGSRDSYSLKINK	352
	*:	

FIGURA 6. Alinhamento das duas seqüências da adenosina kinase de *Schistosoma mansoni*, estas possuem 79% de identidade seqüencial.

Quando alinhamos individualmente as seqüências da AK com seu homólogo humano (1BX4) a identidade seqüencial é de 34 e 33% respectivamente. O alinhamento múltiplo das três seqüências pode ser observado na Figura 7.

Smp_008400	MRDLPEGYVFGMGNPLLDILVDADDYMYERYELQKDNAILAEEEHMAIYDEIQKRKDVKY	60
Smp_008360	MHDLSEGYVFGMGNPLLDIIVDADDFMYRKYNLKKNIVLAEKHMITYDEIQKKKLNLY	60
1BX4	MTSVRENILFGMGNPLLDISAVVDKDFLDKYSCLKPNDQILAEDKHKELFDELVKKFKVEY	60
	.::	
Smp_008400	VAGGATLNTVKMIQWIIQKPFVCS-YVGCIGADIQGYIKNDCRGLDVRTDFQITTKPLK	119
Smp_008360	IAGGATLNTVKMIQWIIQKPFVCS-YVGCIGADIQGYIKNDCSALDLVTEFQIAEEPLM	119
1BX4	HAGGSTQNSIKVAQWMIQQPHKAATFFGCIGIDKFGIILKRKAAEAHVDAHYEQNE-QP	119
	***:	
Smp_008400	TGKVAVLISEKLRSMVTYLGAA-CDLSLAHIEQPHVWVSLVEKAQVYYIAGFVINTCYEGM	178
Smp_008360	TGKVAVLVSEKLRSMVTYLGAA-CDLSLAHIEQPHVWVSLVEKAQVYYIAGFVINTCYEGM	178
1BX4	TGTCACITGDNRSLIANLAAANCYKKEKHLDEKNWMLVEKARVCYIAGFFLTVPESV	179
	**.*:	
Smp_008400	LKIAKHSLENEKLFNLSATFLPRFNTKEVNEMISYSRIVIGNESEAAATFGEVHSLTDG	238
Smp_008360	LKIAKHSLENEKLFNLSAPFLSQFNTKEVDEMISYSNIVFGNESEAEAYGEVHGLLED	238
1BX4	LKVAHHAENNRIFTLNLSAPFISQFYKESLMKVMPIYVDILFGNETEAATFAREQGFETK	239
	*:	
Smp_008400	TVHEAAQYIADLPFADGKKRRLVITQGDPIIYADSTDPTVHQYVVEQLKDEEMVDTN	298
Smp_008360	TVHATARYIADLPFADGKKRRLVITRGNPLLYTDSSEIHQFMVEQFKDDQIIDTN	298
1BX4	DIKEIAKKTQALPKMNSK-RQRIVIFTQGRDDTMA--TESEVTAFVLDQDQKEIIDTN	296
	::*:	
Smp_008400	GAGDSFAAGFIADYIRNKPMITSLQSGVKAAAYIIRRSFSLGLRESSAFKINL	352
Smp_008360	GAGDAFAAGFIADYIRGKPMITSLHAAVKAAAYIICRSFSLGSRDSYSLKINK	352
1BX4	GAGDAFVGGFSLQVSDKPLTECIRAGHYAASIIIRRTGCTFPEKPDFH-----	345
	***:	

FIGURA 7. Alinhamento múltiplo das duas seqüências de adenosina kinase de *Schistosoma mansoni* (Smp) e humana (1BX4).

Senft & Crabtree, [30]; relataram que os análogos de nucleotídeos 2-fluoroadenosina e 7-dezaadenosina são rapidamente incorporados no *pool* de nucleosídeos do *S. mansoni*. Nenhum destes análogos são substratos das enzimas adenosina desaminase e purina nucleosídeo fosforilase. Desta forma, a conversão destes análogos às suas correspondentes bases, seguida da fosforibosilação gerando seus nucleotídeos não é realizada. Portanto, a fosforilação direta mediada pela adenosina kinase é a rota do anabolismo de 2-fluoroadenosina e 7-dezaadenosina. Estes autores foram os primeiros a identificar a presença da enzima AK no parasita. Dovey *et al.* [29] identificaram baixos níveis de atividade para enzima AK de *S. mansoni*, sendo que ambos autores acima citados realizaram seus estudos com extratos do parasita.

EL Kouni & Cha [28] testaram a incorporação de nove análogos de adenosina: 5'-deoxi-5'-iodo-2-fluoroadenosina, tubercidina, nebularina, toiocamicina, sangivamicina, 3'-deoxisangivamicina, 9-dezaadenosina, 7,9-dideza-7-tiaadenosina e 1-metiformicina (Figura 8), no verme adulto intacto e demonstraram que o *S. mansoni* poderia incorporar seis desses compostos no *pool* de nucleotídeos, exceto: sangivamicina, 3'-deoxisangivamicina e 1-metiformicina em contraste com os outros análogos de adenosina testados, fato este que pode ser atribuído ao grupo inserido na posição 7 da base nitrogenada, no lugar do N, ser muito volumoso.

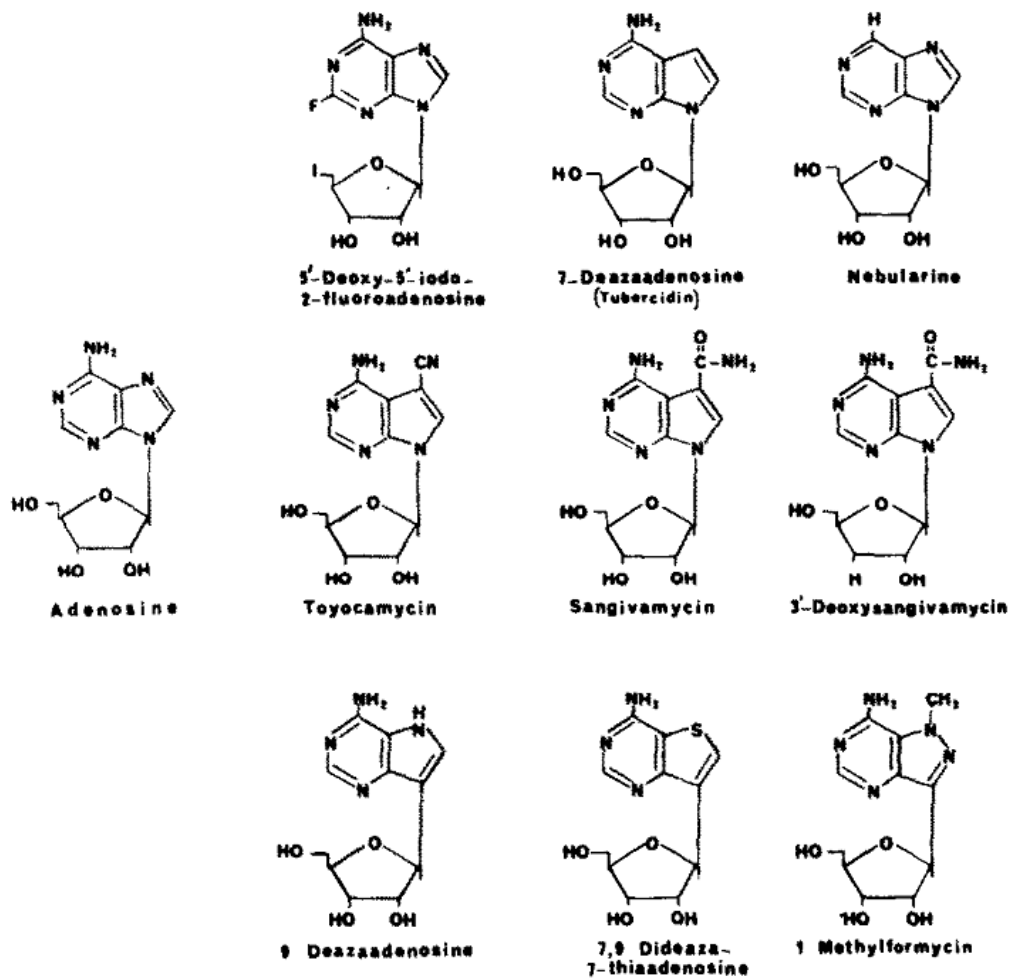


FIGURA 8: Estrutura química da adenosina e os análogos de adenosina: 5'-deoxi-5'-iodo-2-fluoroadenosina, tubercidina, nebularina, toiocamicina, sangivamicina, 3'-deoxisangivamicina, 9-deazaadenosina, 7,9-dideaza-7-tiaadenosina e 1-metilformicina [28].

Todos os análogos incorporados entram no *pool* de nucleotídeos só depois de serem fosforilados pela adenosina kinase, reforçando a importância dessa enzima do parasita no metabolismo de análogos de adenosina. Por esta razão, esta enzima é um alvo atraente para o desenvolvimento de inibidores seletivos contra a esquistossomose. Na verdade, vários análogos de purinas tem sido utilizados no tratamento experimental da doença [45-47].

Até a presente data nenhum trabalho com a enzima AK purificada foi identificado em nossa revisão da literatura. Desta forma, a produção recombinante das isoformas da AK de *S. mansoni*, bem como a realização dos testes de atividade enzimática irão ajudar na compreensão da importância desta enzima na via de salvação de purinas do parasita.

1.7 A Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT)

A HGPRT (E.C 2.4.2.8) catalisa a fosforibosilação reversível de hipoxantina e guanina para IMP ou GMP respectivamente e pirofosfato, tendo como doador de fosfato e ribose o 5-fosforribosil 1-difosfato (PRPP) [48] (Figura 9).

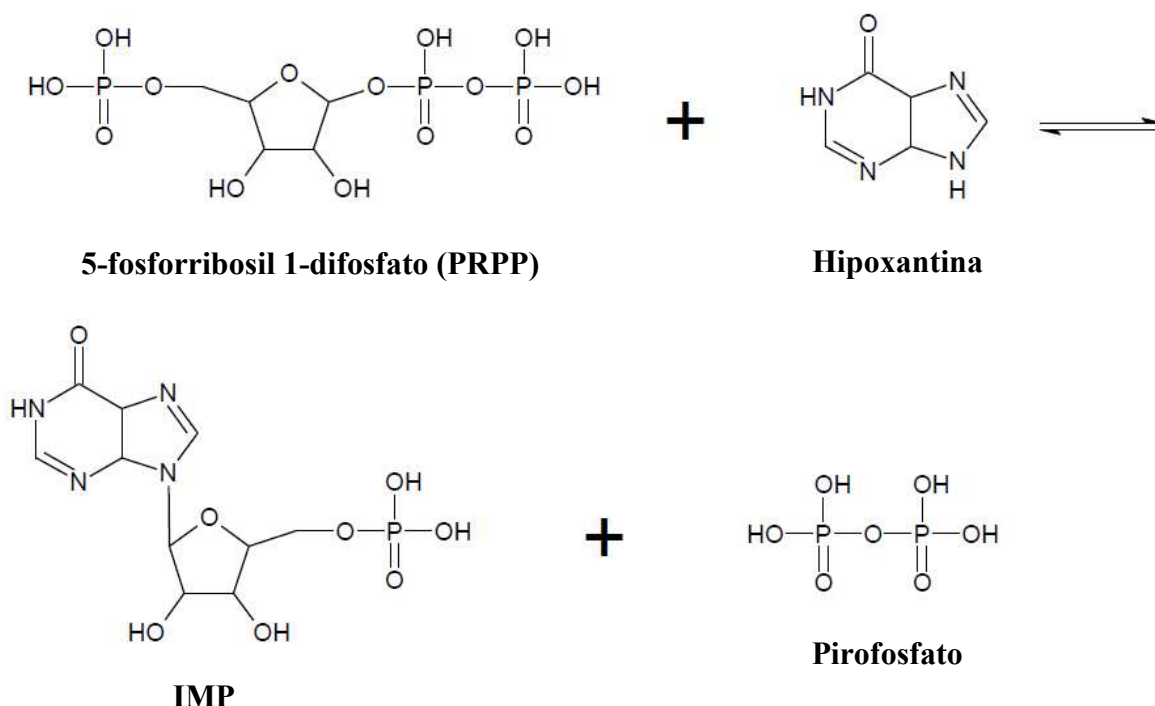


FIGURA 9: Estrutura química dos compostos envolvidos na reação catalisada pela enzima Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase, PRPP e hipoxantina resultando em IMP e pirofosfato.

Em humanos a completa ou quase completa deficiência da enzima HGPRT resulta em uma doença chamada Síndrome de Lesch-Nyhan [49], caracterizada pela superprodução e acúmulo de ácido úrico, chamada hiperuricemia. Os sintomas são graves e consistem basicamente em retardos psicomotores [50]. Os devastadores efeitos dessa síndrome ilustram a importância da via de salvação. O cérebro é especialmente dependente dessa via, o que pode explicar os danos ao sistema nervoso central em crianças portadoras da síndrome.

Já quando a deficiência da HGPRT é parcial, a doença por manifestar sintomas mais leves como formação e depósito de cristais nas articulações e no rim, é chamada de gota ou Síndrome de Kelley-Seegmille [51,52].

Hipoxantina e guanina surgem constantemente da quebra de ácidos nucleicos. Na ausência de HGPRT, os níveis de PRPP aumentam e purinas são, portanto mais produzidas

pela via *de novo*, resultando no acúmulo de ácido úrico devido à redução do resgate de hipoxantina e guanina para produção de IMP e GMP [53].

A estrutura da HGPRT humana pode ser visualizada na figura 10 (pdb 2JBH) [54].

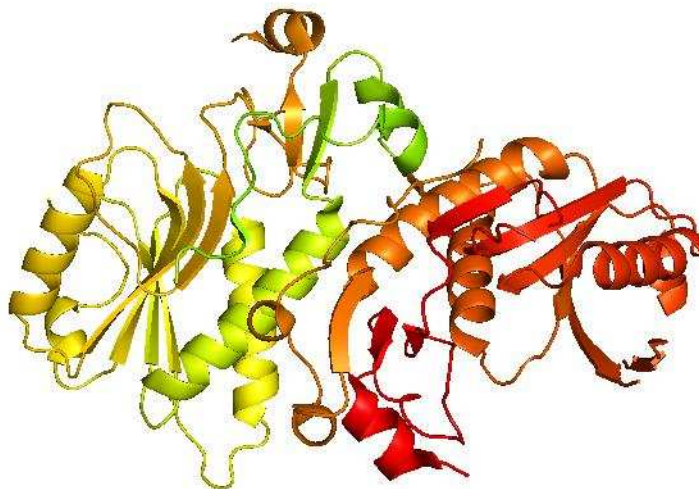


FIGURA 10: Estrutura dimérica da hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase humana em modelo de fitas.

1.8 A Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase de *Schistosoma mansoni*

A HGPRT (E.C 2.4.2.8) é codificada por um gene essencial do parasita *Schistosoma mansoni* [48]. No genoma deste foram encontrados três genes homólogos para a HGPRT (Smp_148820, Smp_168500, Smp_103560) que estão relacionados com diferentes estágios de vida do parasita. A tabela 1 mostra a localização das três proteínas em distintos estágios de vida e a identidade sequencial entre elas.

Tabela 1. Estágio de vida ao qual pertence cada homólogo da HGPRT e identidade sequencial entre eles.

HGPRT	Estágios de vida do <i>S. mansoni</i>	Identidade sequencial
Smp_148820	<i>Schistosoma mansoni</i> adulto	Smp_168500 – 46%
Smp_168500	<i>Schistosoma mansoni</i> adulto	Smp_103560 – 46%
Smp_103560	esquistossômulo (corpúsculo vivo resultante após a penetração da cercária no tecido do hospedeiro)	Smp_148820 – 39%

Já quando alinhadas as 3 seqüências com seu correspondente humano pdb 2JBH [54] essa identidade é de 32% para Smp_148820 (Figura 11), 38% para Smp_168500 (Figura 12) e de 45% para Smp_103560 (Figura 13).

```

2JBH      MAGSSEEAPDYGRGVVIMDDWPGYDLNLFYTPQHYYGDLEYVLIIPHGIIVDRIERLAKDI
Smp_148820 MASREGKS----DCIIFDSDYEGYSAKNFTLPEPEYKIHISTILIPGGMVRSRLDRMSIDI
          *. . . : : : * . : * . : * * * : * . . : * * * * : : * : * : * *
2JBH      MKDIGYS---DIMVLCVLLKGGYKFCADLVEHLKNI SRNSDRFVSMKVDFIRLKS YRNDQS
Smp_148820 LDDYEKSGVKS VYIICILKGGFKFASDLFKTLQEYSFTRRSYIKVSI DFLAASTYVDDSV
          : . * * . . : : * : * * * : * * : * * : * . . : : : * * : : * : * .
2JBH      MGEMQIIGGDDLSTLAGKNVLIVEDVVGTRMTKALLS NIEKYKPNMIKVASLLVKRTSR
Smp_148820 GHDTNITPCTNMEKFRDKDVLIVEDMVDGTGSLIELERFVRKYEPKSVYSACFSSKKQPI
          : : * . . . . : * : * * * * : * . * * : : * . : * * * : : * . : * : .
2JBH      SD-GFRPDYAGFEIPNLFVVG YALDYNEYFRDLNHICVINEHGKEKYRV--
Smp_148820 TFPGYKPTYVGFV PNVFIVGYGIDYNDQFRELPHVCAVND EGKREFLGKG
          : * : * * . * * * : * : * * * : * * : * * * * . * . : * : * * : :

```

FIGURA 11: Alinhamento de HGPRT Smp_148820 de *Schistosoma mansoni* com HGPRT humana (2JBH), 32% de identidade sequencial.

```

2JBH      MAGSSEEAPDYGRG-VVIMDDWPGYDLNLFYTPQHYYGDLEYVLIIPHGIIVDRIERLAKD 59
Smp_168500 -----MQPSYRKNFVVIDDDDFPGYSEKCFNLASKYTPYIESIIVPNGMIKDRLEKMSID 54
          * . * : . * * * * * : * . . : * : * : : * : * * * : : *
2JBH      IMKD---IGYSDIMVLCVLLKGGYKFCADLVEHLKNI SRNSDRFVSMKVDFIRLKS YRNDQ 116
Smp_168500 ILETFELLNATAINLLCVLKG GFKFASDLSEKIHNSAVTRSKSIPIFMDFIVSSTYENDI 114
          * : : . . : * : * * * * * : * . * * * : * . . : : : * * * . : * . * *
2JBH      SMGEMQIIGGDDLSTLAGKNVLIVEDVVGTRMTKALLS NIEKYKPNMIKVASLLVKRTS 176
Smp_168500 VGHEPQFH TYTNLTSEFKDKDVLIVEDLLDSGTTLSRLVPIKSFEP RSVLVAACLLVKKRQ 174
          * * : . : * : : * : * * * * * : : * * . * . * . : : * . : * * . * * * . .
2JBH      RSDGFRPDYAGFEIPNLFVVG YALDYNEYFRDLNHICVINEHGKEKYRV----- 225
Smp_168500 NCSEFQPDFVGFV PNRFIVGYAIDYNDFFRDIPHIC SINDEAKKTF AISKSDK 228
          . . . * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

FIGURA 12: Alinhamento de HGPRT Smp_168500 de *Schistosoma mansoni* com HGPRT humana (2JBH), 38% de identidade sequencial.

```

2JBH      MAGSSEEAPDYGRG-----VVIMDDWPGYDLNLFYTPQHYYGDLEYVLIIPH 46
Smp_103560 MNSSVLDNGNHSNPQIRDMSSNM IKADCVVIEDSFRGFPT EYFCTSPRYDECLDYVLI PN 60
          * . * : : : . . . * * * * . : * : * . : * * * * * :
2JBH      GIIVDRIERLAKDIMK---DIGYSDIMVLCVLLKGGYKFCADLVEHLKNI SRNSDRFVSMK 103
Smp_103560 GMIKDRLEKMSMNIVDY YEACNATSITLMCVLKG GFKFLADLVDGLE RTVVRARGIVLPMS 120
          * : * * * : : : : * : . . : * : * * * * * : * * * * : * . * . . : * .
2JBH      VDFIRLKS YRNDQSMGEMQIIGGDDLSTLAGKNVLIVEDVVGTRMTKALLS NIEKYKPN 163
Smp_103560 VEFVRVKS YVNDVSIHEPILTGLGDPSEYKDKNVLVVEDI IDTGKTITKLI SHLDSLSTK 180
          * : * : * * * * * * : * : * . * * . * * * * * * : * * : * . : * : * : . . .
2JBH      MIKVASLLVKRTSRSDGFRPDYAGFEIPNLFVVG YALDYNEYFRDLNHICVINEHGKEKY 223
Smp_103560 SVKVASLLVKRTSP RNDYRPFVGFV PNRFVVG YALDYNDNFRDLH HICVINEVGQK KF 240
          : * * * * * * * * * * : : * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
2JBH      RV----- 225
Smp_103560 SVPCTSKPV 249
          *

```

FIGURA 13: Alinhamento de HGPRT Smp_103560 de *Schistosoma mansoni* com HGPRT humana (2JBH), 45% de identidade sequencial.

Diferentemente das outras enzimas da via de salvação de purinas, vários estudos já foram realizados utilizando a HGPRT Smp_103560 de *S. mansoni*. Esta proteína já foi expressa em *E. coli* anteriormente por outros pesquisadores na década passada [55,56].

Recentemente, em 2008, estudos utilizando a técnica de RNAi reforçaram a importância desta enzima para a sobrevivência do parasita. Pequenos RNAs de interferência (RNAis) foram produzidos contra HGPRT, injetados após 70 dias de infecção com cercárias em camundongos, sendo o número de vermes contado seis dias após a injeção. O número total de parasitas foi reduzido em aproximadamente 27% após o tratamento [57].

O presente trabalho foi realizado com a enzima recombinante HGPRT Smp_103560.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

1. Clonagem para expressão heteróloga e purificação das enzimas adenosina kinase e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase de *Schistosoma mansoni* para fins de caracterização bioquímica das proteínas recombinantes por meio da determinação da estrutura tridimensional e da atividade catalítica.

2.2 Específicos

Adenosina Kinase e Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase

1. Amplificação e clonagem do cDNA.
2. Expressão em *E.coli* e purificação das enzimas recombinantes.
3. Cristalização das enzimas com diferentes substratos e/ou inibidores.
4. Experimentos de difração de raios-X com os cristais obtidos.
5. Teste de atividade enzimática.
6. Resolução e refinamento das estruturas.

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1 Amplificação do cDNA

As seqüências de DNA codificantes para as enzimas foram obtidas do banco de dados *Schistosoma mansoni* GeneDB (<http://www.genedb.org/genedb/smansoni>).

Foram identificadas duas seqüências correspondentes à enzima adenosina kinase no genoma completo do *S. mansoni* denominadas Smp_008360 e Smp_008400. Já para a enzima HGPRT foram encontrados três seqüências: Smp_148820, Smp_168500, Smp_103560, sendo a última o alvo deste trabalho.

Visando a amplificação dos fragmentos de cDNA foram desenhados e adquiridos comercialmente dois pares de iniciadores (*primers*) específicos para estas seqüências:

Primers para a seqüência Smp_008400

AK1_F Sense- (sítio *Nhe* I)

5 – ACTGTATGCTAGCATGCGTGATCTTCCAGAAG – 3

AK1_R Reverse (sítio *Xho* I)

5- TACAGTCTCGAGCTATAAATTTATTTTGAACGACTAGAC -3

Primers para a seqüência Smp_008360

AK2_F Sense- (sítio *Nhe* I)

5 – ACTGTATGCTAGCATGCACGATTTATCG – 3

AK2_R Reverse (sítio *Xho* I)

5- TACAGTCTCGAGCTATTTGTTTATTTTAAAGG -3

Primers para a seqüência Smp_103560

HGPRT_F Sense (sítio *Nhe* I)

5 – ACTGTATGCTAGCATGAACTCCTCTGTC – 3

HGPRT_R Reverse (sítio *Sal* I)

5 – TACAGTGTCGACTTAAACAGGTTTTGATG – 3

No desenho desses iniciadores foram inseridos sítios de restrição (em vermelho) para as enzimas *NheI* e *XhoI* para AK e *NheI* e *SalI* para HGPRT, visando sua ligação correta no vetor de expressão pET28a, que possui o sítio de restrição para as mesmas enzimas.

O cDNA foi amplificado por PCR [58] utilizando como molde uma biblioteca de cDNA já disponível no laboratório cedida pelo Prof. Dr. Ricardo De Marco (USP-São Carlos/SP), de acordo com o protocolo a seguir:

Por reação:

Tampão [10x]	2 μ L
MgCl ₂ [25mM]	1 μ L
dNTP [10mM]	0.5 μ L
<i>primer</i> R e F (100pmol/ μ L)	2,0 μ L
DNA molde	0.5 μ L
Enzima Taq DNA pol. [50U/ μ L]	0.5 μ L
Água	13.5 μ L
Total	20 μ L

Inseriu-se a reação em um termociclador programado com as seguintes etapas:

- Primeira desnaturação a 96°C por 3 min. e 35 ciclos de:
- Desnaturação a 96°C por 30 s;
- Anelamento a 57°C (AK1), 52,5°C (AK2) e 54°C (HGPRT) por 1 min;
- Extensão a 72°C por 90 s;
- Finalização a 4°C.

Após completados os ciclos um volume de 5 μ L da reação de amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Confirmando-se a amplificação do cDNA, foi realizado um PCR em maior escala (100 μ L volume final) para a produção de uma maior quantidade de DNA. As amostras correspondentes à amplificação foram então purificadas a partir de gel de agarose utilizando-se o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up* (Promega), sendo o DNA ressuspenso em 35 μ L de água e quantificado em Qubit (Invitrogen). O resultado da amplificação foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

O DNA foi submetido ao processo de adenilação, que consiste na inserção uma base de adenina nas extremidades do DNA para que este possa parear com a timina presente nas extremidades do vetor de clonagem utilizando a seguinte reação:

Tampão [10x]	1 µL
MgCl ₂ [25mM]	1 µL
dATP [1mM]	0,5 µL
DNA molde	4 µL
Enzima <i>Taq</i> DNA pol. 50u/µL	1 µL
H ₂ O	2,5 µL
Total	10 µL

Incubou-se em termociclador a 70°C por 30 minutos.

3.2 Clonagem do cDNA

3.2.1 Ligação no vetor de clonagem pGEM

Adenilado o DNA, o mesmo foi ligado no vetor de clonagem, o plasmídeo pGEM, utilizando a seguinte reação:

Tampão Ligase [2x]	5 µL
Inserto adenilado	3 µL
Vetor pGEM [50 ng/µL]	1 µL
T4 DNA ligase [30/µL]	1 µL
Total	10 µL

Incubou-se a reação por 16 horas a 4° C em câmara fria.

3.2.2 Transformação de bactérias competentes, plaqueamento, seleção de colônias recombinantes, extração de DNA plasmidial e sequenciamento

Misturou-se em tubo de 1,5 mL:

- 50 µL de bactérias *E. coli* competentes DH5α previamente tratadas com cloreto de cálcio e 10 µL de DNA plasmidial, produto da ligação.
- Incubou-se em banho a 42° C por 90 segundos e em gelo por 5 minutos (choque-térmico).
- Adicionou-se 250 µL de meio de cultura LB.
- Incubou-se em agitador a 37° C por 1 hora a 250rpm.
- Plaqueou-se, 100 e 200 µL em placa de Petri contendo meio LB suplementado com ampicilina (30µg/mL), X-gal (200 µg/mL) e IPTG (20 µg/mL).

- Incubou-se em estufa a 37°C.

Após 14 horas observou-se crescimento de colônias brancas e azuis isoladas nas placas. Fez-se PCR de colônia das colônias brancas (que consiste em utilizar parte da própria colônia como DNA molde na reação e os *primers* correspondentes às sequências do vetor utilizado que flanqueiam a região de clonagem) para confirmação da existência do inserto no vetor inserido na bactéria transformada, conforme a seguir:

PCR de colônia:		[] final
Tampão [10x]	1,5 µL	1 x
MgCl ₂ [25mM]	0,9 µL	1,5 mM
dNTP [10mM]	0,3 µL	0,2 mM
primer sense T73G (5pmol/µL)	2,0 µL	
primer reverse SP6 (5pmol/µL)	2,0 µL	
DNA molde	obtido com palito inserido na colônia	
Enzima <i>Taq</i> DNA pol. [50U/µL]	0,2 µL	
Água	8,1 µL	
Total	15 µL	

Após confirmação dos insertos fez-se a extração do DNA plasmidial recombinante (pGEM + inserto) utilizando o Kit *Promega Wizard Mini Prep*. O resultado da amplificação e extração foi verificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e o DNA foi quantificado no aparelho Qubit.

Também visando confirmação da presença e sequência correta do inserto, realizou-se seqüenciamento do plasmídeo pelo método de terminação da cadeia de DNA por incorporação de didesoxinucleotídeos, com iniciadores fluorescentes e seguindo-se o protocolo do Kit “*Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing with 7-deaza-dGTP*” da *Amersham/Pharmacia*.

3.2.3 Digestão do pGEM com as enzimas de restrição *NheI*, *XhoI* e *Sall* para extração do inserto

A digestão visando à extração do inserto do vetor de clonagem para posterior ligação no vetor de expressão foi realizada utilizando as enzimas de restrição acima citadas de acordo com a seguinte reação:

	AKs	HGPRT
DNA	10 µg – 58 µL	5,25 µg – 28 µL
Tampão [10x] Buffer 2	10 µL	4 µL
Enzima <i>Nhe</i> I (10u/µL)	1,5 µL	2 µL
Enzima <i>Xho</i> I (20u/µL)	1 µL	-
Enzima <i>Sal</i> I (20u/µL)	-	2 µL
BSA [10000 µg/µL)	1 µL	1 µL
Água	28,5 µL	3 µL
Total	100 µL	40 µL

Incubou-se a 37°C por 3 horas.

O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, a região do gel que continha o DNA digerido (de tamanho correspondente ao esperado para a região amplificada) foi recortada e o DNA foi purificado do gel utilizando-se o kit *Eppendorf Perfect gel Cleannup* (Cat # 955152051), ressuspendido em 35 µL de água e quantificado.

3.2.4 Digestão do pET28a para receber insertos

O vetor de expressão, o plasmídeo pET28a foi digerido com as mesmas enzimas de restrição para receber os insertos. Utilizando a seguinte reação:

DNA pET 28a (2,4 µg/µL)	10 µL
Tampão Buffer 2 (10x)	5 µL
Enzimas (<i>Nhe</i> I e <i>Xho</i> I, <i>Nhe</i> I e <i>Sal</i> I)	5 µL (2,5 µL cada enzima)
BSA (10000 µg/mL)	2 µL
Água	28 µL
Total	50 µL

Incubou-se a 37°C por 3 horas.

Após a incubação, o produto da digestão foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e então o vetor digerido foi purificado utilizando o *kit Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Cat# A9280).

3.2.5 Ligação no vetor de expressão pET28a

Para a ligação do inserto no vetor pET28a, ambos já com extremidades coesivas, utilizou-se a seguinte reação:

Tampão [10x]	1 µL
Inserto cDNA [100 ng/µL]	6 µL
Vetor pET 28a [100 ng/µL]	2 µL
Enzima T4 DNA Ligase [400 U/µL NE Biolabs]	1 µL
Água	5 µL
Total	15 µL

Incubou-se a 4°C em câmara fria por 16 horas.

3.2.6 Transformação de bactérias competentes *E. coli* BL21 (DE3)

Misturou-se em tubo de 1,5 mL:

- 50 µL de bactérias *E. coli* competentes BL21 e 15 µL de DNA plasmidial, produto da ligação.
- Incubou-se em banho a 42° C por 90 segundos e gelo por 5 minutos.
- Adicionou-se 250 µL de meio de cultura LB.
- Incubou-se em agitador a 37° C por 1 hora a 250 rpm.
- Plaqueou-se, 100 e 200 µL em placa de Petri contendo meio LB suplementado com kanamicina (100µg/mL).
- Incubou-se em estufa a 37°C.

Após 14 horas observou-se crescimento de colônias isoladas nas placas. Foi realizado PCR de colônia para confirmação do inserto no vetor inserido na bactéria competente.

PCR de colônia:		[] final
Tampão [10x]	1,5 µL	1 x
MgCl ₂ [25mM]	0,9 µL	1,5 mM
dNTP [10mM]	0,3 µL	0,2 mM
<i>primer sense</i> T74G (5pmol/µL)	2,0 µL	
<i>primer reverse</i> T7 terminator (5pmol/µL)	2,0 µL	

DNA molde	obtido com palito inserido na colônia
Enzima <i>Taq</i> DNA pol. [50/ μ L]	0,2 μ L
Água	8,1 μ L
Total	15 μ L

O resultado da amplificação foi verificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

3.3 Expressão heteróloga e purificação das enzimas recombinantes

Para a determinação das condições ótimas de expressão das enzimas foram conduzidos diversos experimentos para padronizar de forma sistemática as diversas variáveis como: concentração de IPTG utilizada (100 e 300 μ M/mL), temperatura de expressão (37°C, 30°C e 18°C no caso de proteína insolúvel), volume do pré-inoculo (5 e 10 mL), meio de cultura (LB e 2XYT) e tempo de expressão após indução.

Após a determinação das condições ótimas de expressão foi realizado um experimento piloto visando à determinação das condições de purificação. A técnica de purificação utilizada nestes experimentos foi a cromatografia de afinidade. O vetor pET28a codifica inserção, no N-terminal das proteínas expressas, de uma seqüência de 6 histidinas (cauda poli-His), a qual tem afinidade por íons níquel ou cobalto. Desta maneira, podemos utilizar resinas cromatográficas contendo esses íons imobilizados para a purificação em um único passo da proteína de interesse.

As colunas utilizadas: níquel, cobalto e AMP-agarose armazenadas em etanol 20%, foram lavadas com aproximadamente 10 volumes de coluna (50 mL) de água ultra pura para que este fosse completamente removido. As colunas foram então equilibradas, ou seja, percoladas com o tampão de lavagem antes de receber o extrato bruto da proteína.

Após a ligação da proteína de interesse na coluna e lavagem da mesma para retirar os contaminantes, a proteína de interesse foi eluída utilizando-se uma solução contendo imidazol que compete pelos íons com a cauda de histidina. As alíquotas recolhidas da purificação foram visualizadas utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida SDS.

O vetor pET28a também codifica a inserção de um sítio para a protease trombina no N-terminal das proteínas, entre a cauda poli-His e a seqüência propriamente dita da proteína. Esta protease pode então ser utilizada para retirar a cauda poli-His codificada pelo vetor.

Após purificadas, as enzimas foram utilizadas em ensaios de cristalização e de atividade enzimática.

3.3.1 Expressão heteróloga da enzima HGPRT de *Schistosoma mansoni*

Os testes de expressão da HGPRT foram realizados em 500 mL de meio de cultura 2XTY suplementado com 30µg/mL de kanamicina onde foram inoculados 10 mL de uma cultura incubada por 16 horas de bactérias *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídio pET28a e o gene da HGPRT de *S. mansoni*.

Os tubos foram mantidos sob agitação (250rpm) a 37°C até que a DO (densidade óptica) fosse igual ou superior a 0,5. Então os meios de cultura foram esfriados e adicionou-se 100µM/mL de IPTG. As culturas foram mantidas a 18°C sob agitação de 250rpm por aproximadamente 12 horas.

O produto da expressão foi centrifugado por 20 minutos a 9000 g. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi suspenso em 50 mL de tampão de lise (50mM NaH₂PO₄ pH 7.4, 300mM NaCl, 10mM imidazol, 5mM β-Mercaptoetanol e 1mM MgCl₂) e congelado a -20°C.

3.3.2 Purificação da enzima HGPRT de *Schistosoma mansoni*

Para a purificação da enzima foi utilizada na cromatografia de afinidade a resina de cobalto agarose.

As bactérias foram lisadas por sonicação utilizando a programação de 6 pulsos de duração de 1 minuto com pausas de 30 segundos entre cada pulso. Centrifugou-se o produto da sonicação por 20 minutos a 12000g.

Aplicou-se o extrato bruto (sobrenadante) contendo a proteína na coluna de afinidade previamente lavada com água ultra pura para retirar o etanol e equilibrada com tampão de lavagem (50mM NaH₂PO₄ pH 7.4, 300mM NaCl, 20mM imidazol, 5mM β-Mercaptoetanol e 1mM MgCl₂), coletou-se o eluato e a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de tampão de lavagem (aproximadamente 50 mL).

Para a eluição da proteína ligada à coluna foram utilizados 30 mL de tampão de eluição (50mM NaH₂PO₄ pH 7.4, 300mM NaCl, 200mM imidazol, 5mM β-Mercaptoetanol e 1mM MgCl₂). O eluato, o lavado e a eluição foram visualizados em SDS-PAGE.

3.3.3 Clivagem da cauda de histidina da enzima HGPRT de *Schistosoma mansoni*

Após a purificação, uma parte da proteína eluída teve a cauda de histidina removida utilizando a protease trombina na seguinte proporção:

1 unidade de trombina cliva 200 µg de proteína
--

Sendo assim foram inseridas 4 unidades/ml de trombina no tubo contendo 813,88 µg/ml. Este permaneceu a 4°C por 16 horas para clivagem completa. A clivagem foi visualizada em SDS-PAGE comparando amostras de proteína não clivada com a clivada.

3.3.4 Expressão heteróloga da AK2 de *Schistosoma mansoni*

Para a expressão da AK2 de *S. mansoni* em 500 mL de meio 2XTY suplementado com 30µg/mL de kanamicina foi inoculado o volume de 10 mL de uma cultura de bactérias recombinantes de *E. coli* BL21(DE3) (contendo o plasmídio pET28a e o gene da AK2 de *S. mansoni*), previamente crescida por 16 horas.

Os tubos foram mantidos sob agitação (250rpm) a 37°C até que a DO (densidade óptica) fosse igual ou superior a 0,5. Foram então adicionados 100µM/mL de IPTG e as culturas foram mantidas nas mesmas condições por 3 horas.

O produto da expressão foi centrifugado por 20 minutos a 9000 g. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 50 mL de tampão de lise (50mM NaH₂PO₄ pH 7.8, 300mM NaCl, 10mM imidazol, 5mM β-Mercaptoetanol e 1mM MgCl₂) e congelado a -20°C.

3.3.5 Purificação da enzima AK2 de *Schistosoma mansoni*

Para a completa purificação da enzima AK foram utilizadas duas cromatografias de afinidade: a resina cromatográfica de níquel Ni-NTA agarose da Quiagen e a resina AMP-agarose. Ambas colunas foram lavadas abundantemente com água ultra pura antes e após a purificação e então armazenadas em câmara fria com etanol 20%.

As bactérias (tubos mantidos em gelo) foram lisadas por sonicação utilizando a programação de 6 pulsos de duração de 1 minuto com pausas de 30 segundos entre cada pulso. Centrifugou-se o produto da sonicação por 20 minutos a 12000g.

Aplicou-se o extrato bruto (sobrenadante) contendo a proteína na coluna de níquel previamente equilibrada com tampão de lavagem (50mM NaH₂PO₄ pH 7.8, 300mM NaCl, 20mM imidazol, 5mM β-Mercaptoetanol e 1mM MgCl₂). Após coletar todo o eluato a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de tampão de lavagem (aproximadamente 50 mL).

Para a eluição da proteína ligada à coluna foi utilizado aproximadamente 30 mL de tampão de eluição (50mM NaH₂PO₄ pH 7.8, 300mM NaCl, 200mM imidazol, 5mM β-Mercaptoetanol e 1mM MgCl₂). O eluato, o lavado e a eluição foram visualizados em SDS-PAGE.

Para completar a purificação da enzima foi utilizada a resina de AMP-agarose (SIGMA). A coluna foi equilibrada com tampão 50mM NaH₂PO₄ pH 7.8, 200mM NaCl, 5mM β-Mercaptoetanol e 1mM MgCl₂, a proteína foi aplicada à coluna e após a lavagem da coluna com o tampão, a eluição foi realizada utilizando-se 2mM de AMP no tampão. As amostras resultantes foram visualizadas em SDS-PAGE.

3.4 Ensaios de cristalização

De posse das enzimas purificadas foram realizados ensaios de cristalização visando à obtenção de cristais para difração de raios-X dos mesmos e resolução da estrutura cristalina.

Os ensaios de cristalização utilizam de protocolos de busca convencionais multi-paramétricos em gotas sentadas utilizando o robô *Honeybee 931* da *Genomic Solutions Inc*, em câmaras termoestáveis, a 4°C ou 18°C. Este realiza os ensaios de cristalização de forma automatizada, utilizando placas contendo 96 poços. Cada poço permite o uso de três diferentes proteínas ou diferentes concentrações da mesma proteína, acelerando a busca pela formação do cristal. O *screening* completo realizado possui 1248 condições diferentes.

3.4.1 Ensaios de Cristalização de HGPRT de *Schistosoma mansoni*

As amostras contendo a proteína pura (com cauda e sem cauda de histidina) foram dialisadas contra 20mM Tris pH 7.4, 200mM KCl, 5mM β-Mercaptoetanol e 500μM MgCl₂. Após a diálise com 100 volumes do tampão de diálise, as proteínas foram concentradas até 6, 8 e 10mg/mL filtrando-se em membrana *Centricon* 10kDa a 2000g.

As diferentes concentrações de proteína também foram incubadas com os ligantes: hipoxantina, guanina, IMP e PRPP.

De forma automatizada conforme descrito no item 3.4 foram preparadas diversas placas com 1µL de proteína + 1µL de solução do poço, utilizando no *screening* os kits *Index HT* e *SaltX* da *hampton Research* e *Classic I suite* e *PEG I suite* da Quiagen, cada *kit* contendo 96 diferentes condições de cristalização.

3.4.3 Ensaio de Cristalização da AK2 de *Schistosoma mansoni*

A proteína purificada foi dialisada contra 20mM tris pH 7.8, 200mM NaCl, 5mM β-Mercaptoetanol e 1mM MgCl₂. Após a diálise com 100 volumes do tampão de diálise a proteína foi concentrada até 4, 6 e 8mg/ml utilizando-se um *Centricon* 30kDa.

Num primeiro momento, de forma automatizada, foram preparadas 4 placas utilizando 1µL de proteína (uma concentração diferente em cada poço) + 1µL de solução do poço, utilizando os *kits Index HT* e *SaltX da hampton Research* e *Classic I suite* e *PEG I suite* da Quiagen, cada *kit* contendo 96 diferentes condições de cristalização.

3.5 Cristalização de AK2 de *Schistosoma mansoni*

Após uma semana, cristais de AK2 surgiram na condição G3 do kit IndexHT, a qual consiste em 100mM Bis-Tris, pH6,5; 25% de PEG3350 e 200mM de Li₂SO₄. Então essa condição foi otimizada manualmente utilizando o método de difusão de vapor em gotas suspensas em placas limbro de 28 poços, varrendo-se as diferentes concentrações de PEG 3350 e pHs. Foram utilizadas as seguintes concentrações de PEG 3350: 21, 23, 25 e 27% e pH 6,1, 6,3, 6,5, 6,7 e 6,9, o sulfato de lítio foi mantido inalterado (200mM), somando 20 combinações diferentes.

As placas são então identificadas e engraxadas. Nos poços foram adicionados 500 µL de cada solução de cristalização. A “gota suspensa” consiste em 2µL da solução poço e 2µL de AK2 (4mg/mL) em uma lamínula, cobre-se cada um dos reservatórios das placas com as lamínulas correspondentes, estas são pressionadas sobre a graxa, vedando os poços. Essas placas permanecem incubadas a 18°C.

Cristais de AK surgem após três dias e atingem cerca de 0,4 mm na maior direção.

Diversos cristais foram montados em *crio loops* e congelados em nitrogênio líquido utilizando-se como crioprotetor a solução mãe contendo 20% de glicerol.

Também foram realizados experimentos de cristalização com a proteína nativa e incubada com os ligantes: ADP, ATP, GDP, GTP, tubercidina e 2-fluoroadenosina para obtenção de novas estruturas cristalográfica dos complexos da AK.

3.6 Coleta de dados, resolução, refinamento, validação e análise da estrutura tridimensional de AK2 de *Schistosoma mansoni*

A coleta de dados e a resolução das estruturas obtidas foram realizadas pelo Prof. Dr. Humberto D'Muniz Pereira, assim como grande parte do refinamento. Os dados de difração de raios-X foram coletados na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e no Laboratório de Cristalografia e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP).

Para a redução dos dados foram utilizados os programa MOSFLM e SCALA [59,60]. Para a resolução da estrutura da AK2 foi utilizado o método de substituição molecular implementado no programa PHASER [61], empregando como modelo de busca AK humana (1BX4) para a estrutura coletada de AK-adenosina-AMP e esta refinada para AK-tubercidina.

Resolvidas as estruturas, estas foram submetidas a ciclos de refinamento utilizando o programa PHENIX [62] onde são calculados os mapas de densidade eletrônica $2F_o-F_c$ e F_o-F_c . O modelo resultante da substituição molecular bem como os mapas de densidade eletrônica foram visualizados e manipulados utilizando-se o programa COOT [63].

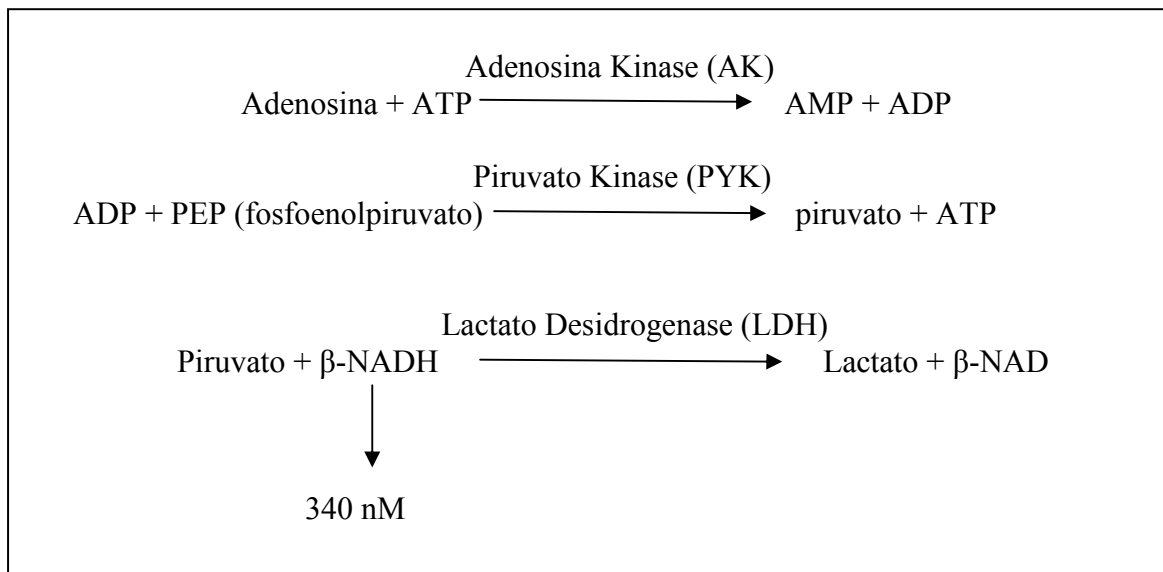
Após refinados, ambos os modelos foram validados utilizando o programa PROCHECK [64] e MOLPROBITY [65]. Dentre as várias análises fornecidas pelo programa (comprimento de ligação, ângulo de ligação, ligação peptídica e planaridade de anéis da cadeia lateral, quiralidade, ângulos de torção da cadeia principal e cadeia lateral e choques entre pares de átomos não ligados) foi escolhido para representar essa validação o gráfico de Ramachandran que apresenta a distribuição dos ângulos Φ e Ψ formados entre o carbono α e o nitrogênio ($C\alpha - N$) e o ângulo formado entre o carbono e o carbono α da cadeia principal ($C - C\alpha$).

Após validadas, as estruturas foram submetidas a análise comparativa de estrutura tridimensional com as 4 AKs depositadas no pdb utilizando o programa PYMOL [66], análise de estrutura secundária e topologia pelo site do pdb sum e programa PROMOTIF [67].

As análises de sítio ativo: ligações, interações, ligantes e comparação com sítio ativo da enzima humana foram realizadas através de visualização e figuras geradas no programa PYMOL.

3.7 Teste de atividade da AK2 de *Schistosoma mansoni*

Para o teste de atividade da AK de *S. mansoni* foi utilizado um ensaio acoplado com as enzimas piruvato kinase e lactato desidrogenase, que permite a medida do ADP formado na reação da AK quando fornecido adenosina e ATP. Este ensaio permite o monitoramento da conversão de β -NADH em β -NAD espectrofotometricamente a 340 nm [68,69].



Foram testadas três concentrações de AK2: 100nM, 200nM e 1 μ M em soluções contendo 200 μ M adenosina, 500 μ M de ATP, 400 μ M de MgCl_2 , 70 mM de Tris pH 7.4, 500 μ M de PEP, 500 μ M de β -NADH, 20 u/mL de PYK, 29 u/mL de LDH, 50 mM de KCl e água ultra pura para completar o volume de reação que ocorreu a 37°C monitorada durante 10 minutos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amplificação do cDNA

Os cDNAs correspondentes às enzimas AK1, AK2 e HGPRT foram amplificados com sucesso. O primeiro cDNA amplificado (Figura 14: Gel A) foi da enzima AK2, depois HGPRT (Figura 14: Gel B) e por último após diversas tentativas e extensa análise da sequência codificadora pelo Prof. Dr. Ricardo De Marco e novos *primers* desenhados, o cDNA da enzima AK1 (Figura 14: Gel C).

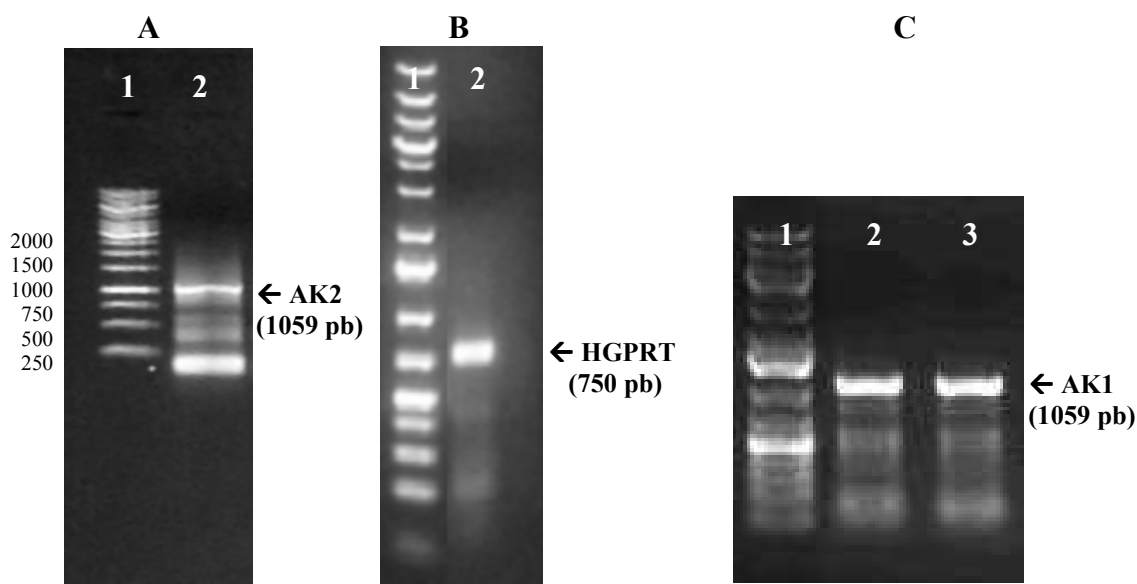


FIGURA 14: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para visualização da amplificação por PCR do cDNA correspondente às enzimas AK1, AK2 e HGPRT. Gel A. 1. Marcador de peso molecular; 2. AK2 (1059 pb). Gel B. 1. Marcador de peso molecular; 2. HGPRT (750 pb). Gel C. 1. Marcador de peso molecular; 2 e 3. AK1 (1059 pb).

O primeiro par de *primers* desenhado para amplificação do cDNA de AK1 foi confeccionado a partir da sequência de nucleotídeos do cDNA da enzima depositada no banco de dados, esta possui 1101 nucleotídeos e codificaria uma enzima de 366 aminoácidos. Entretanto, esta sequência não era amplificada em nossos experimentos. Os estudos computacionais da sequência depositada sugeriram que esta possuía um éxon de 42 nucleotídeos a mais no N-terminal. O novo *primer* desenhado, que resultou na amplificação do cDNA, excluía essa sequência apresentada em vermelho na região 5' de parte da sequência abaixo retirada do banco de dados, resultando em uma sequência de 1059 nucleotídeos que codifica uma enzima de 352 aminoácidos, assim como AK2.

5´ ATGCTAAGTACCGGTTGGCTGAAAGAGGAAAAGTTCGTTAAAATGCGTGATCTTCCAGAA...3´

4.2 Clonagem do cDNA

4.2.1 Ligação em vetor de clonagem, transformação, plaqueamento, seleção de colônias, extração de DNA plasmidial e seqüenciamento

O plasmídeo pGEM, um vetor de clonagem, recebeu os cDNAs purificados de gel de agarose, amplificados e adenilados de forma eficiente para ser utilizado na “transformação de bactérias competentes”, fato esse comprovado mais adiante pelo PCR de colônia.

Este processo chamado de “transformação de bactérias” consiste na inserção de um DNA exógeno no interior da bactéria, sendo esta chamada de “competente” por estar fisiologicamente capacitada a receber esse DNA, uma vez que naturalmente esse é um evento raro devido à repulsão eletrostática que ocorre entre as cargas negativas dos fosfolipídios da membrana plasmática da bactéria e dos grupamentos fosfato do DNA do plasmídeo. Nesse caso a bactéria tornou-se competente através do tratamento com cloreto de cálcio, um íon divalente que atua neutralizando essas cargas negativas. E então o choque-térmico cria poros na membrana e possibilita a entrada no plasmídeo no interior da célula [70,71].

O plaqueamento das bactérias em meio LB ágar previamente suplementado com ampicilina possibilita uma pré-seleção das bactérias que carregam o plasmídeo com o cDNA de interesse, uma vez que o vetor pGEM possui resistência a esse antibiótico. A adição de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo) no meio é comumente utilizada na seleção, pois o vetor utilizado também possui em sua estrutura o gene *lacZ*, que induzido pelo IPTG, expressa uma enzima chamada β -galactosidase que degrada o X-gal produzindo um composto azul. A região de clonagem do vetor se localiza exatamente na região onde está o gene *lacZ*. Assim, quando introduzimos o fragmento de cDNA exógeno nesta região, esse gene é interrompido, produzindo assim colônias brancas. Já as colônias de bactérias que possuem o plasmídeo com *lacZ* intacto produzem colônias azuis [72].

Portanto, selecionou-se colônias brancas para o “PCR de colônia” para confirmação da presença do inserto. Na figura 15 podemos ver o resultado desse procedimento, onde observa-se a presença de colônias positivas e negativas para a presença do inserto.

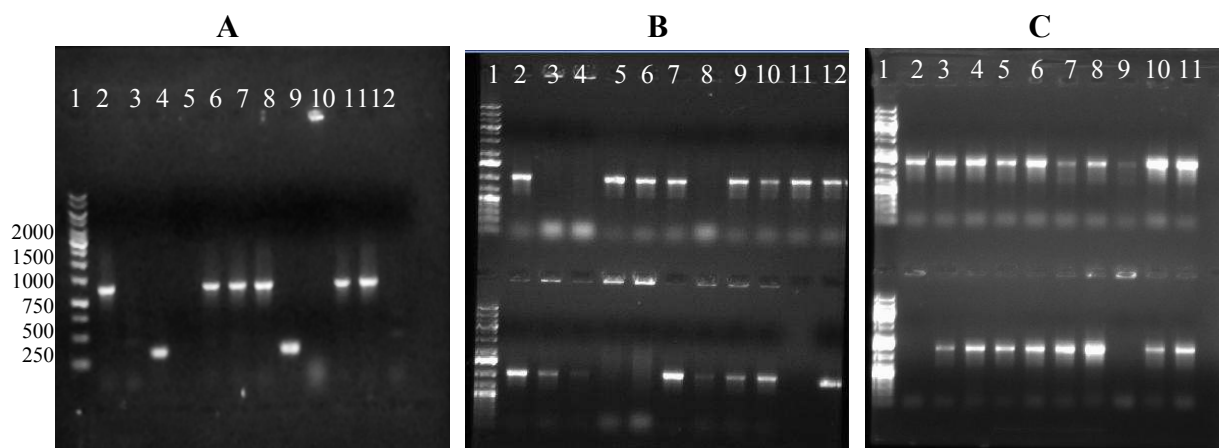


FIGURA 15: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para visualização do PCR de colônia para confirmar presença do inserto. Gel A. 1. Marcador de peso molecular; 2.6.7.8.11.12. AK2 positivas. Gel B. 1. Marcador de peso molecular; 2.5.6.7.9.10.11.12 (superior) HGPRT positivas; 2.3.4.7.8.9.10.12 (inferior) HGPRT positivas. Gel C. 1. Marcador de peso molecular. 2.3.4.5.6.7.8.9.10.11 (superior) AK1 positivas; 3.4.5.6.7.8.10.11 (inferior) AK1 positivas.

Após a confirmação da presença do inserto através do PCR de colônia, fez-se a extração do DNA plasmidial e o seqüenciamento confirmou a presença dos DNAs codificantes de AK1, AK2 e HGPRT no pGEM.

4.2.2 Digestão, ligação em vetor de expressão e transformação de bactérias competentes *E. coli* BL21 (DE3)

O pGEM foi então digerido com as enzimas de restrição cujas regiões de reconhecimento foram inseridas nos *primers* que flanqueiam o DNA a fim de se realizar a troca de vetor. Os DNAs foram purificados com sucesso do gel de agarose e a quantificação obteve resultado de 100 ng/ μ L.

O pET 28a foi o vetor de expressão utilizado (Figura 16). O plasmídeo recombinante foi digerido com as mesmas enzimas de restrição do inserto visando a formação de extremidades coesivas complementares que garantam a inserção correta do DNA no vetor. Sua purificação do gel de agarose também foi realizada com sucesso.

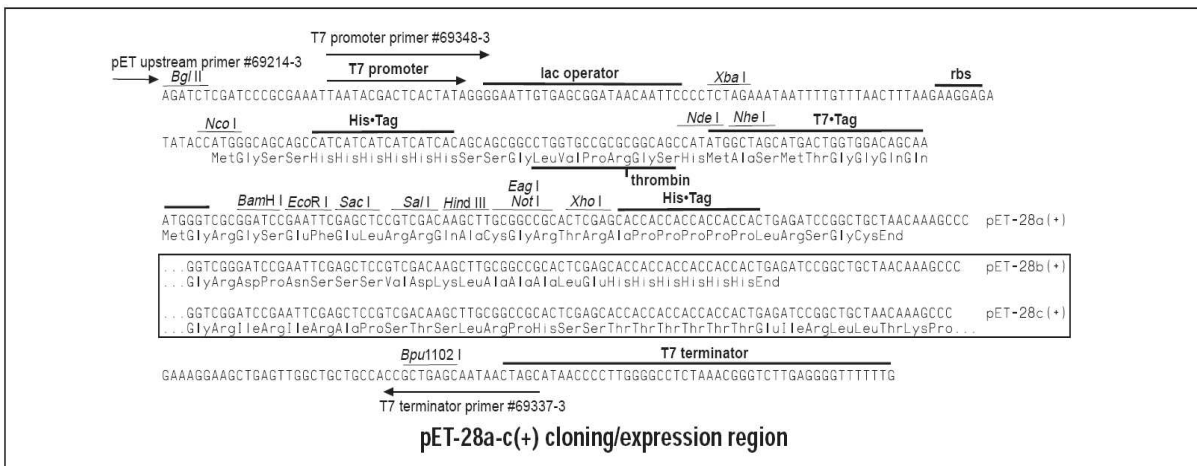


FIGURA 16: Região de clonagem do vetor pET28a.

A ligação das extremidades coesivas geradas pela digestão com as mesmas enzimas de restrição ocorreu de forma efetiva, visto que se obteve bactérias transformadas recombinantes em *E. coli* BL21 a partir da ligação realizada (pET28a + inserto de DNA).

Com o DNA de interesse presente no vetor de expressão pET28a e inserido em *E. coli* BL21 também utilizada para expressão, os ensaios de expressão foram iniciados.

4.3 Expressão hetelóloga, purificação da enzima recombinante e ensaios de cristalização de HGPRT de *Schistosoma mansoni*

Após testes pilotos de expressão da enzima HGPRT estabeleceu-se seu protocolo de expressão em meio 2XYT suplementado com kanamicina a 18°C por aproximadamente 12 horas após indução com 100µM de IPTG (Figura 17). O crescimento até a DO 0,5 ocorre a 37°C, porém essa temperatura é reduzida para 18°C uma vez que a proteína é expressa na forma insolúvel a 37°C.

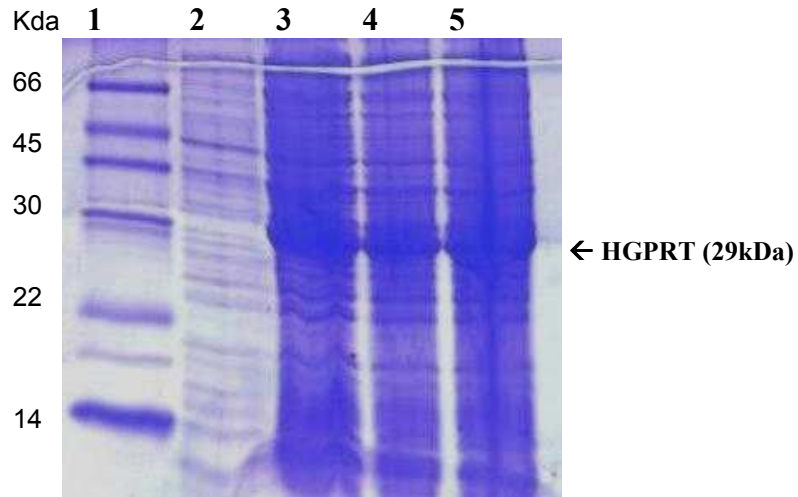


FIGURA 17. Análise da expressão de HGPRT em gel de poliacrilamida 15% corado por coomassie blue. Poço 1. Marcador de peso molecular. 2. Bactéria não induzida (T0). 3. Bactéria induzida por 1 hora. 4. 2 horas. 5. 3 horas.

A purificação da enzima HGPRT se deu em somente um passo de afinidade, utilizando a coluna de cobalto (Figura 18). O rendimento foi de aproximadamente 10 mg em 1 L de cultura.

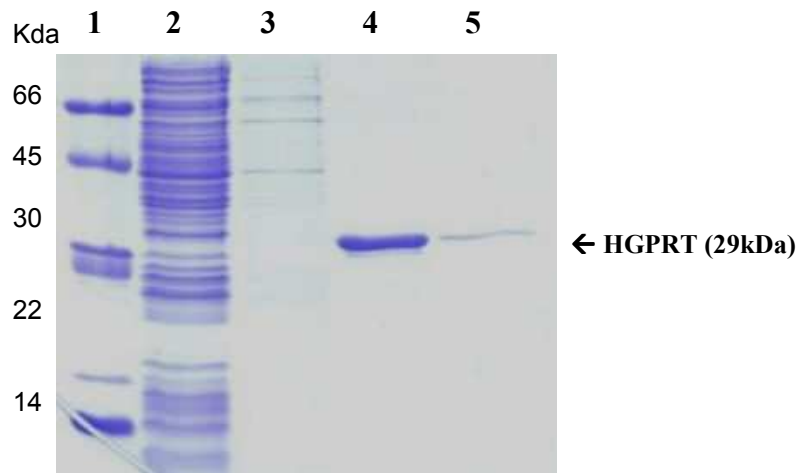


FIGURA 18. Análise da purificação de HGPRT em gel de poliacrilamida 15% corado por coomassie blue com as aliquotas da expressão e purificação da HGPRT. Poço 1 . Marcador de peso molecular. 2. Extrato bruto após a cromatografia em coluna de cobalto. 3. Lavagem da coluna. 4 e 5 frações da HGPRT purificada da coluna de cobalto (29 kDa).

A cauda de histidina foi removida com a protease trombina visando testes de cristalização da enzima com e sem essa cauda (Figura 19). Nota-se pela diferença de massa molecular que a cauda de histidina foi removida.

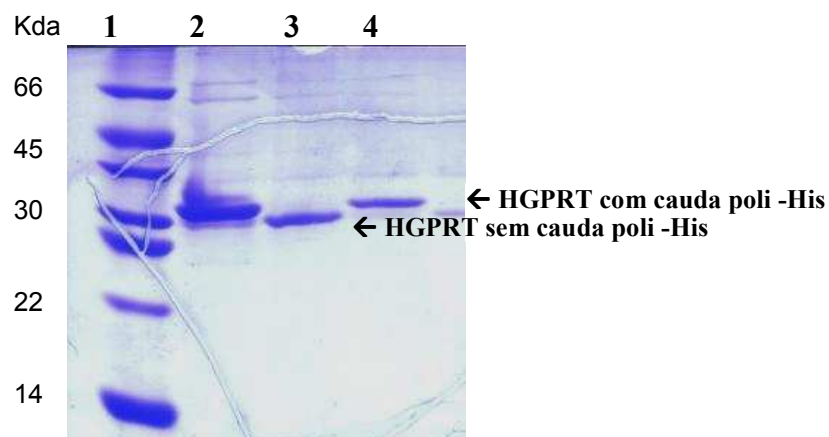


FIGURA 19. Análise das alíquotas da clivagem da cauda de histidina da enzima HGPRT em gel de poliacrilamida 15% corado por coomassie blue. Poço 1 . Marcador de peso molecular. 2. Amostra de HGPRT não clivada 3. Amostra de HGPRT clivada. 4. Amostra comparativa de HGPRT não clivada.

Os ensaios de cristalização foram realizados com a enzima com e sem cauda de histidina conforme metodologia já descrita, entretanto até o presente momento nenhum cristal de proteína foi obtido. Diversos cristais de sal foram observados.

Novos estudos computacionais da sequência que codifica a enzima foram realizados e identificou-se que provavelmente a sequência do banco de dados utilizada, assim como AK1, também possui um éxon a mais em seu N-terminal. Novo *primer* foi desenhado para o reinício das atividades com a enzima.

4.4 Expressão heteróloga e purificação da enzima recombinante AK2 de *Schistosoma mansoni*

Para os ensaios de expressão foram utilizadas duas diferentes temperaturas de crescimento (30 e 37°C) e duas concentrações de IPTG (100 e 300µM). A melhor condição de crescimento e expressão foi de 37°C e a melhor concentração de IPTG para a indução foi de 100µM (Figura 20).

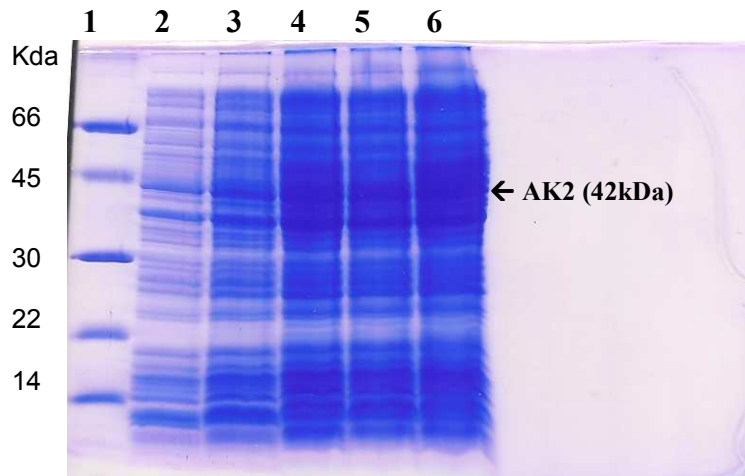


FIGURA 20. Gel de poliacrilamida 15% corado com coomassie blue para análise da expressão da enzima AK2 (aproximadamente 42 kDa) em vetor de expressão pET28a em bactérias *E. coli* BL21 (DE3) a 37°C com 100µM de IPTG . Poço 1 . Marcador de peso molecular. 2. Bactéria não induzida (T0). 3. Bactéria induzida por 1 hora. 4. 2 horas. 5. 3 horas. 6. 4 horas.

As bactérias foram sonicadas e centrifugadas, o extrato bruto foi purificado por cromatografia de afinidade em uma coluna de níquel. Após a lavagem da coluna a proteína foi eluída e o resultado da eletroforese das alíquotas coletadas pode ser visualizado na figura 21.

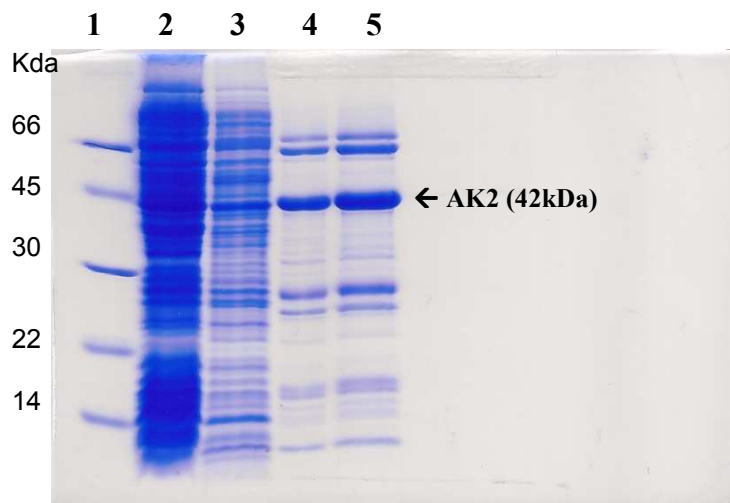


FIGURA 21. Gel de poliacrilamida 15% corado por coomassie blue para análise da expressão e purificação da enzima AK2 em coluna de níquel. Poço 1 . Marcador de peso molecular. 2. extrato bruto. 3. Extrato bruto após a cromatografia em coluna de níquel. 4. lavagem da coluna. 5 e 6 frações da AK2 purificada da coluna de níquel. A AK2 é a proteína nos poços 5 e 6 com peso em torno de 42kDa.

Nota-se ao observar a figura 21, que somente utilizando a coluna de afinidade de níquel, a purificação da AK2 não foi satisfatória, havendo ainda muitos contaminantes presentes nas alíquotas coletadas da eluição da enzima desta coluna. Portanto, fez-se necessário um segundo passo de purificação. Para tanto, analisando a afinidade da enzima,

ponderou-se utilizar uma segunda cromatografia de afinidade: a coluna de AMP-agarose, uma vez que a AK possui afinidade pelo ligante AMP. A estratégia adotada resultou em uma purificação bastante satisfatória de AK2 e relativamente simples para ser amplamente reproduzida para os ensaios de cristalização da mesma. (Figura 22). O rendimento foi de ~4mg da enzima a partir de 1L de cultura.

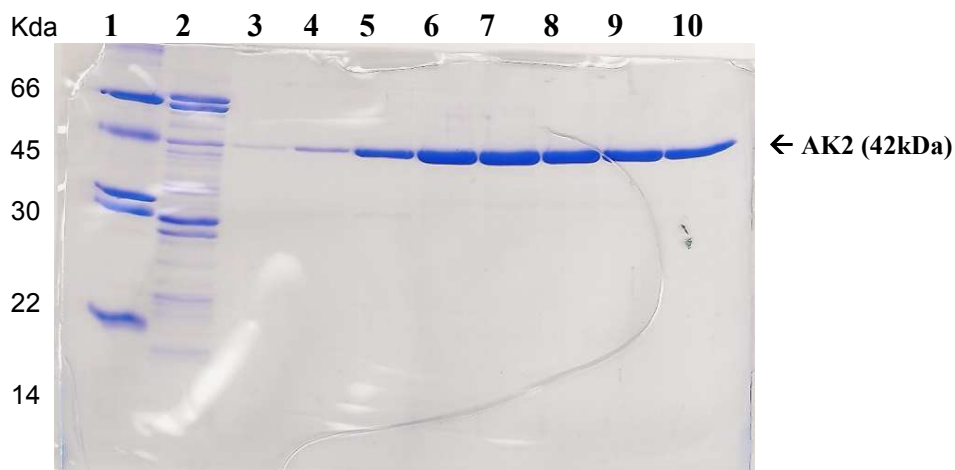


FIGURA 22. Gel de poliácridamida 15% corado por coomassie blue para análise da purificação da AK2 em coluna de AMP-Agarose. Poço 1 . Marcador de peso molecular. 2. Eluato. 3. Lavagem da coluna. 4 a 10. Frações da purificação da AK2.

Na figura 23 pode-se observar um comparativo entre a purificação resultante da coluna de níquel (poço 2) e eluída da coluna de AMP-agarose (poços 5 – 8). Bem como posteriormente a enzima dialisada e concentrada até 4, 6 e 8mg/ml (poço 9 – AK2 a 8mg/mL).

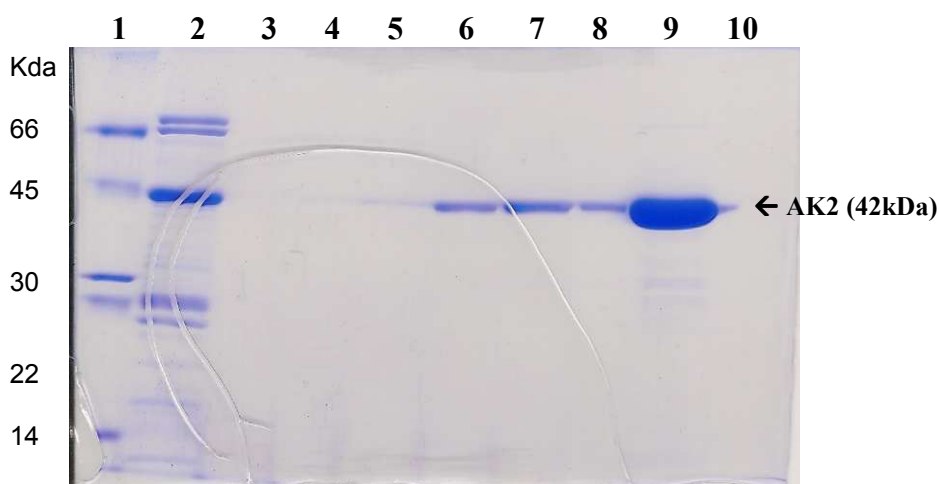


FIGURA 23. Análise da purificação da enzima AK2 de em coluna de níquel e AMP-agarose em gel de poliácridamida 15% corado com coomassie blue. Poço 1. Marcador de peso molecular. 2. Eluição de AK2 da coluna de níquel. 3 a 8. Alíquotas coletadas da eluição da coluna de AMP-agarose. 9. AK2 concentrada a 8mg/mL.

Em testes preliminares a enzima AK1 não foi expressa de forma a corresponder ao tamanho esperado para a enzima (menor). Acredita-se que esta enzima possua um *stop* códon em sua sequência (resultados não apresentados).

4.5 Cristalização da AK2 de *Schistosoma mansoni*

Após uma semana de incubação, as 4 placas contendo as diferentes condições de cristalização e as diferentes concentrações de AK2 (4, 6 e 8 mg/mL) em tampão Tris (20mM tris pH 7.8, 200mM NaCl, 5mM β -Mercaptoetanol e 1mM $MgCl_2$) foram analisadas. Observou-se a formação de cristais na condição G3 do kit IndexHT, a qual consiste em 100mM Bis-Tris pH 6,5; 25% de PEG3350 e 200mM de Li_2SO_4 . Os cristais mais bem formados surgiram na placa que continha a concentração 4mg/mL de AK2.

A condição otimizada utilizando variáveis de pH (6.1, 6.3, 6.5, 6.7 e 6.9) e concentração de PEG 3350 (21, 23, 25 e 27%) com 200mM de Li_2SO_4 inalterado, resultaram em muitos cristais de tamanhos e formatos diferentes como pode ser observado na Figura 24.

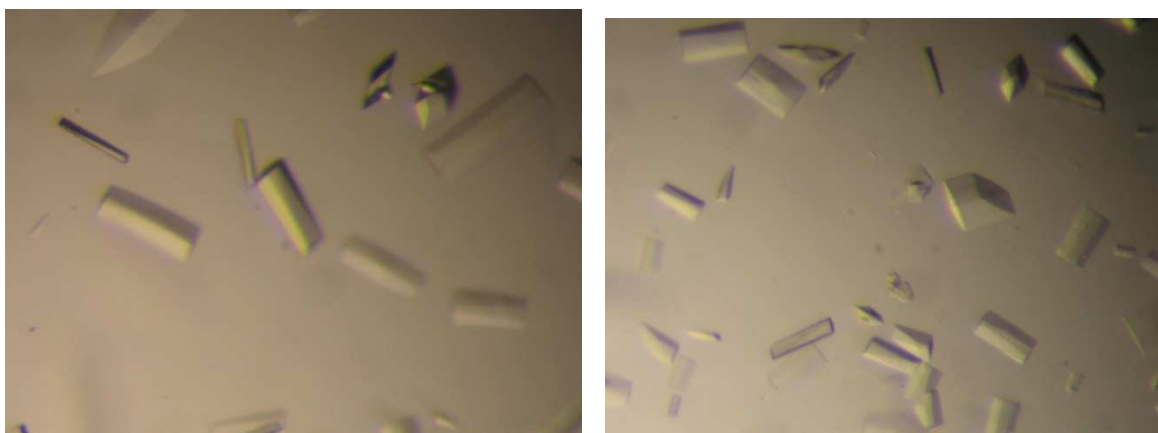


FIGURA 24. Cristais da proteína AK2 (0.4 μ m) de *S. mansoni* na condição G3 do kit Index: 100mM bis-tris pH 6,5; 25% de PEG3350 e 200mM de Li_2SO_4 .

Os cristais surgem em aproximadamente três dias após a montagem das gotas e em uma semana atingem 0.4 μ m em sua maior dimensão. Os cristais foram congelados em nitrogênio para a coleta de dados na estação MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) ou no Laboratório de Cristalografia IFSC-USP.

Dentre todos os ligantes testados na co-cristalização, surgiram cristais nas condições contendo: AMP, ADP, ATP, proteína nativa, tubercidina e 2-fluoroadenosina. Nas condições testadas com GTP e GMP não houve o aparecimento de cristais.

Os cristais de proteína incubada com 2-fluoroadenosina são muito pequenos e frágeis, portanto, juntamente com outros cristais (proteína nativa e incubada com AMP, ADP, ATP e tubercidina) foram congelados e serão submetidos à difração de raio-X nas instalações do síncrotron Diamond em Oxfordshire, Inglaterra pelo Prof. Dr. Humberto D’Muniz Pereira.

4.6 Coleta de dados, processamento, resolução e refinamento de dados de difração de raios-X da AK2

Foram obtidos dois conjuntos de dados de AK, o primeiro complexo ternário AK2-adenosina-AMP à 2.3Å de resolução coletado na linha de luz MX2 no LNLS e o segundo conjunto de dados coletado no Laboratório de Cristalografia e Biologia Estrutural IFSC-USP, o complexo binário AK2-tubercidina também a 2.3Å de resolução.

Os parâmetros de coleta de dados e refinamento atuais podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2: Estatísticas da coleta de dados e refinamento para os cristais da AK2.

Cristal	AK-Ade-AMP (2.3Å)	AK-tubercidina (2.3Å)
Detector	Marmosaic 225	Raxis IV++
Parâmetros de cela (Å) a, b, c	a=59.98, b=180.53, c=78.32	a=59.58., b=78.94, c=181.52
Resolução (Å)*	42.48 -2.3 (2.36 -2.30) e	20.0-2.35 (2.48-2.25)e
Mosaicidade	0.5	0.4
Grupo Espacial	<i>P2₁2₁2</i>	<i>P2₁2₁2</i>
Fonte de Raios-X	W01B-MX2	Rigaku MicroMax007
λ (Å)	1.45	1.54
Nº de imagens	150 (1.0) ^e	150 (0.5) ^e
Multiplicidade	3.4 (3.4) ^e	2.7 (2.2) ^e
R_{meas} (%)^a	12.1 (64.5) ^e	8.8 (45.1) ^e
R_{sym} (%)^b	10.3 (55.2) ^e	-
Completeza (%)	93.3 (88.6) ^e	96.6 (88.2) ^e
Nº de reflexões	123531(16846) ^e	95546 (11340) ^e
Nº de reflexões únicas	35871 (4886) ^e	35262 (4735) ^e
I/σ	10.7 (2.1) ^e	11.82 (2.38) ^e
Nº moléculas por UA	2	2
Nº átomos refinados:	5548	5755
Proteína	5259	5340
Água	200	325
Cl	2	2
Ligantes	87	88
R/R_{free}^c	20.78/24.88	19.67/24.75
RMSD comprimento de ligações/ângulos^d	0.023Å/1.53°	0.008Å/1.05°
Ramachandran:	90.8/ 8.9/ 0.3	93.6/ 6.0/ 0.3
Preferida/permitida/não permitida (%)		

^a $R_{meas} = \sum_h (n_h/n_h - 1)^{1/2} \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)$, onde $I_i(h)$ e $\langle I(h) \rangle$ são os i^{th} e intensidade média e n_h é a multiplicidade de todas as reflexões h com simetrias equivalentes [73].

^b $R_{sym} = \sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)$, onde $I_i(h)$ e $\langle I(h) \rangle$ são os i^{th} e intensidade média de todas as reflexões h com simetrias equivalentes [73].

^c $R = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ onde $|F_c|$ é a amplitude do fator de estrutura calculado do modelo e $|F_o|$ é a amplitude do fator de estrutura observado do modelo. R_{free} é calculado com base em 5% do conjunto de reflexões que não é utilizado durante o refinamento [74].

^d RMSD "*root mean square deviation*", desvio quadrático médio do conjunto de parâmetros de estereoquímica ideal [75].

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

O método utilizado para a resolução da estrutura tridimensional foi o de substituição molecular, tendo como modelo de busca a estrutura da adenosina kinase humana (1BX4) para o complexo ternário e este refinado para o complexo binário.

Analisando os mapas de densidade eletrônica da primeira estrutura coletada nota-se a presença de ligantes na região do sítio ativo das duas moléculas de AK presentes na unidade assimétrica, estas foram identificados como sendo adenosina (Figura. 25) e AMP (Figura.26). O mapa de densidade eletrônica $F_o - F_c$ encontra-se em vermelho e contorna perfeitamente os ligantes.

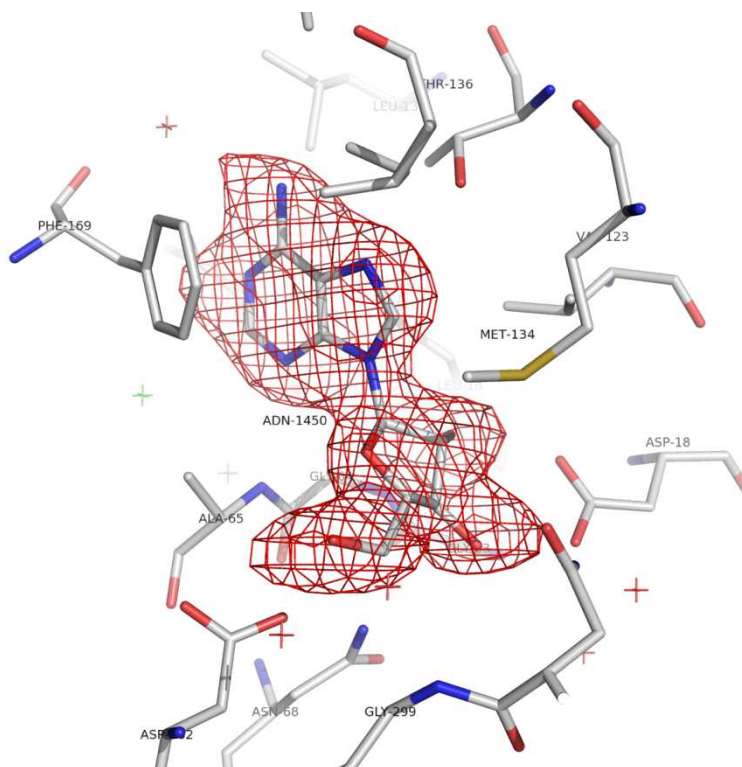


FIGURA 25: Sítio de ligação de adenosina da AK2 mostrando o mapa de densidade eletrônica $F_o - F_c$ correspondente ao ligante adenosina (3σ).

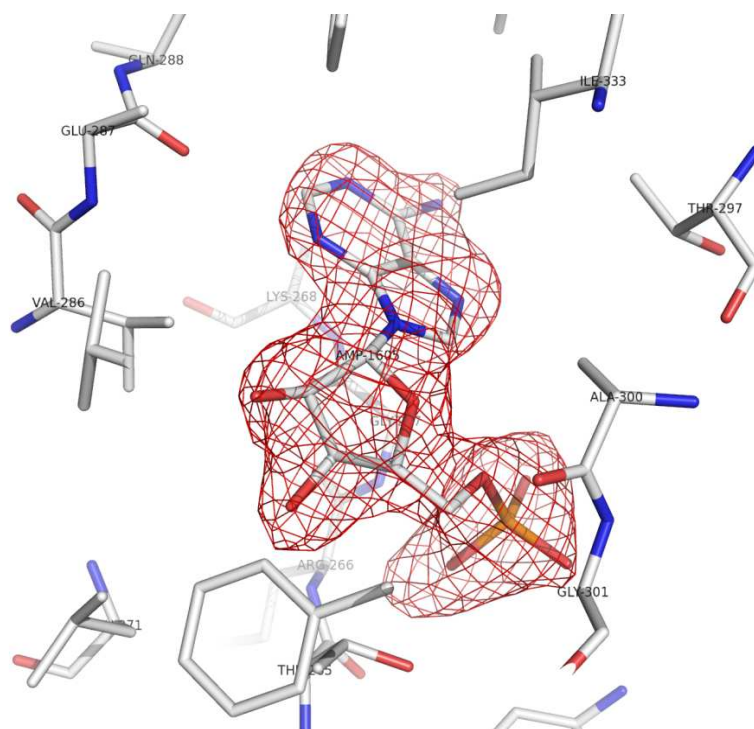


FIGURA 26: Sítio de ligação de ATP da AK2 mostrando o mapa de densidade eletrônica Fo-Fc correspondente ao ligante AMP (3 σ).

Quando analisado o mapa de densidade eletrônica da segunda estrutura coletada, também nota-se a presença de ligantes na região do sítio ativo das duas moléculas presentes na unidade assimétrica (Figuras 27 e 28), neste caso elas foram identificadas como sendo tubercidina. Entretanto, pelo fato da tubercidina ser um análogo de adenosina, sua densidade eletrônica é muito similar a esta. O que nos leva a crer que a densidade eletrônica realmente corresponde a tubercidina é o fato da enzima purificada, antes de ser submetida ao ensaio de cristalização, ter sido incubada com uma grande quantidade deste ligante, aproximadamente 5 mM e a densidade eletrônica indicar que esta também encontra-se presente no sítio de ligação do ATP.

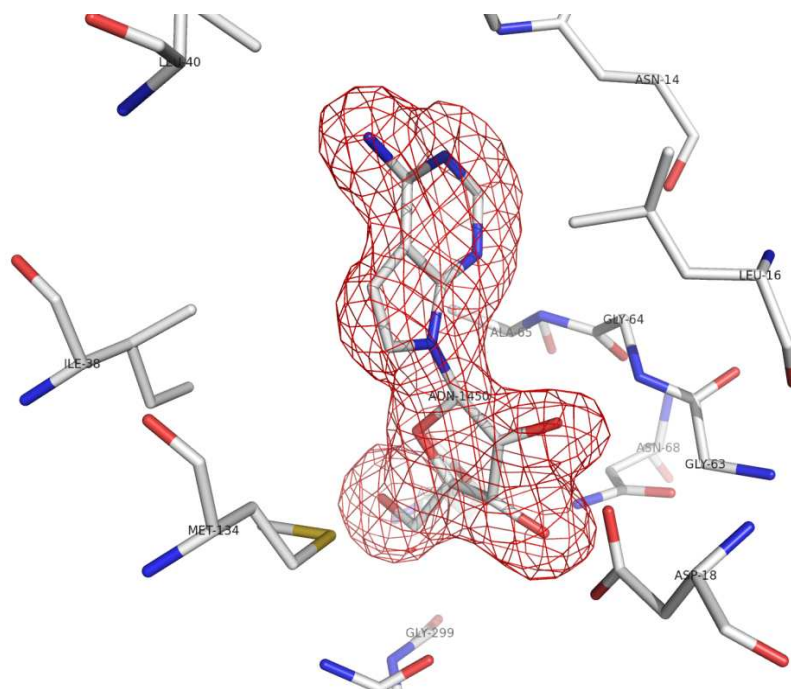


FIGURA 27: Sítio de ligação da adenosina de AK2 mostrando o mapa de densidade eletrônica Fo-Fc correspondente ao ligante tubercidina (3σ)

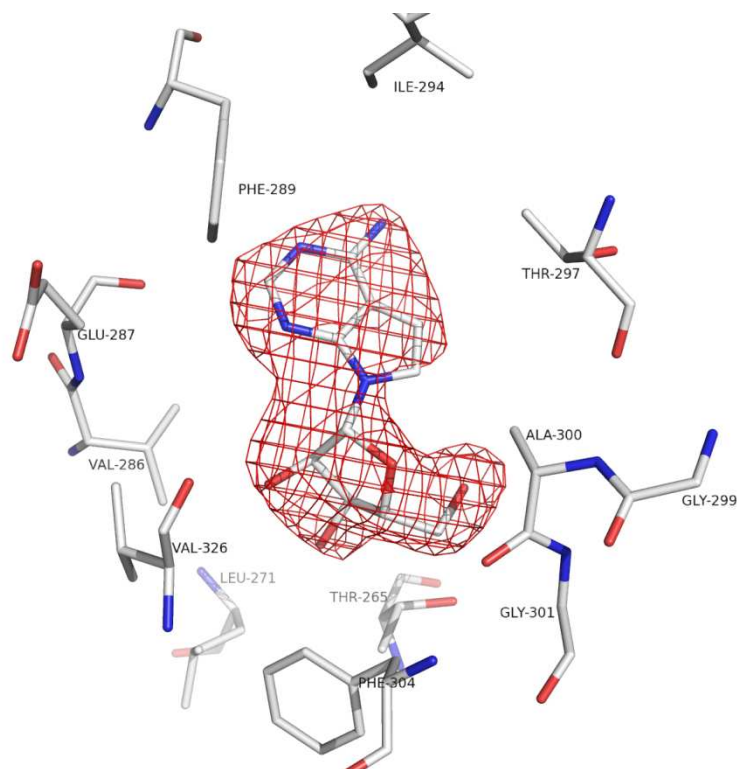


FIGURA 28: Sítio de ligação da ATP de AK2 mostrando o mapa de densidade eletrônica Fo-Fc correspondente ao ligante tubercidina (2σ).

4.7 Validação dos modelos

Os modelos tridimensionais de AK2 obtidos após o completo refinamento foram validados de três formas, primeiro avaliando-se o valor do R_{work} e R_{free} obtidos ao final do refinamento, que correspondem a $R_{\text{work}} = 0.2078$ e $R_{\text{free}} = 0.2488$ para AK2-AMP-adn e a $R_{\text{work}} = 0.1967$ e $R_{\text{free}} = 0.2475$ para AK2-tubercidina. Valores coerentes e considerados bons em relação ao valor da resolução obtida [76].

A segunda foi a utilização do programa MOLPROBITY [65] para avaliação da geometria da proteína. Cujo resultado pode ser visualizado na tabela 3.

Tabela 3: Análise da geometria de AK2 gerada pelo programa MOLPROBITY [65].

Parâmetro analisado	AK2-AMP-adn	AK2-tubercidina	Parâmetros referenciais (ideal)
Rotâmeros ruins	6.47%	1.58%	<1%
Desvio $C\beta > 0.25\text{\AA}$	4	0	0
Resíduos com ligações ruins	3.39%	0.00%	0%
Resíduos com ângulos ruins	2.80%	0.00%	<0.1%

Nota-se que a estrutura AK2-tubercidina do ponto de vista geométrico pode ser considerada melhor que a estrutura de AK2-AMP-adn, que possui uma porcentagem maior de resíduos com rotâmeros, desvio de $C\beta$, ligações e ângulos fora do padrão considerado ideal. Entretanto, esta, apesar de não ideal é a melhor geometria alcançada após o refinamento do complexo ternário. Já o complexo binário possui uma geometria considerada ideal.

A terceira forma de validação utilizada foi o programa Procheck. O resultado do gráfico de Ramachandran gerado pode ser visualizado na figura 29 para a estrutura de AK2-adenosina-AMP e figura 31 para a estrutura de AK2-tubercidina.

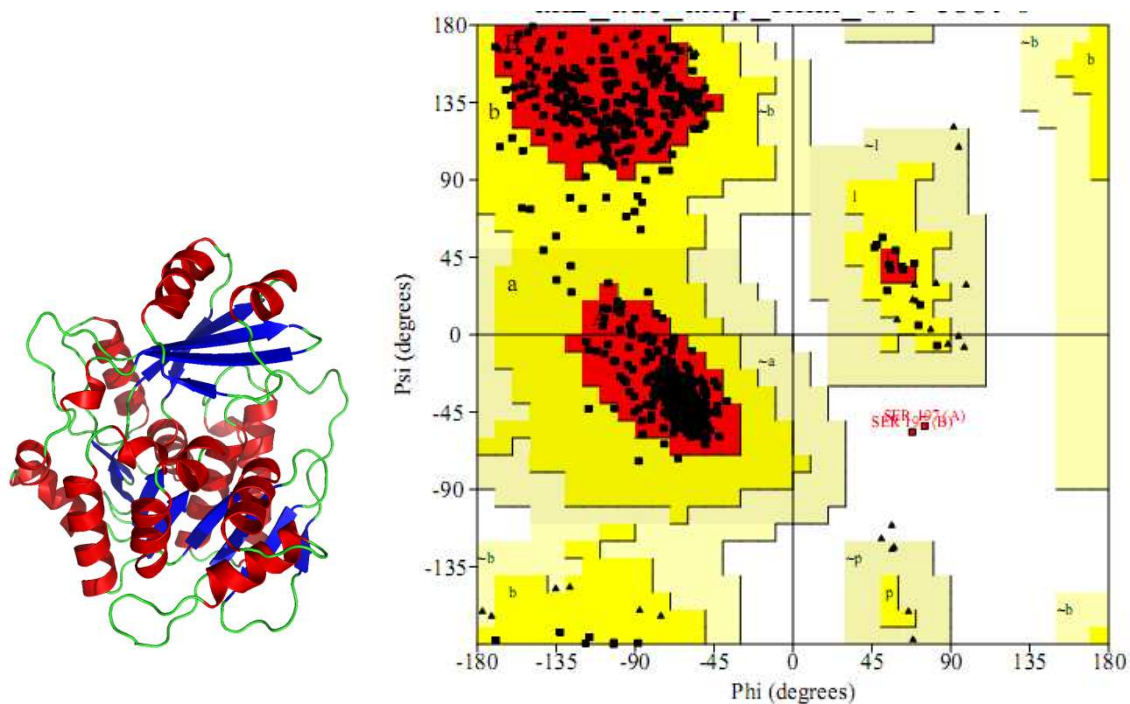


FIGURA 29: Estrutura tridimensional de AK2-adenosina-AMP em modelo de fitas, as hélices estão em vermelho, fitas β em azul e loops em verde. Diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros para as duas subunidades da estrutura. A região representada em vermelho corresponde à região mais favorável para os valores dos ângulos, a região amarelo escuro é a adicionalmente permitida, amarelo claro é a generosamente permitida e a região em branco é a região não permitida. As glicinas são representadas por triângulos.

Na estrutura de AK2-AMP-adenosina os resíduos em regiões mais favoráveis (vermelho) correspondem a 90.8%, adicionalmente permitida (amarelo escuro) a 8.9% e não permitida a 0.3%. Nesta região não permitida e correspondente a esta porcentagem encontra-se um único resíduo (Ser197), entretanto analisando o mapa de densidade eletrônica (2Fo-Fc) correspondente a esta região nota-se que este resíduo encontra-se nessa conformação, mesmo contrariando os ângulos preferenciais para este resíduo (figura 30).

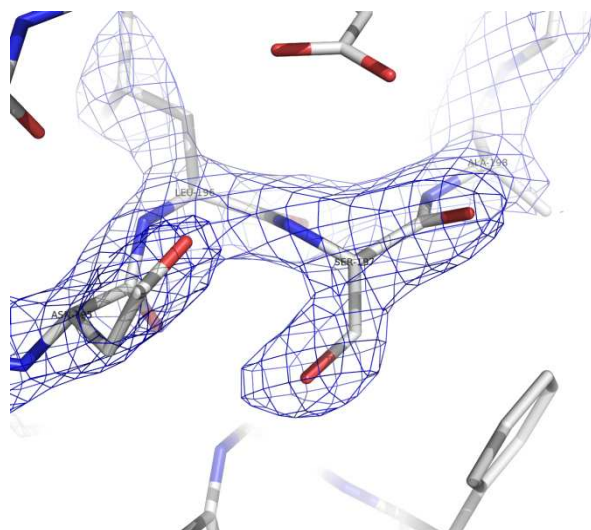


FIGURA 30: Análise do mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc (1σ) correspondente ao resíduo Serina 197 que encontra-se na região não permitida do diagrama de Ramachandran.

Já para a estrutura contendo o inibidor tubercidina os resíduos em regiões mais favoráveis (vermelho) correspondem a 93.6%, adicionalmente permitida (amarelo escuro) a 5.7%, generosamente permitida (amarelo claro) 0.3% e não permitida a 0.3%. Na região generosamente permitida correspondente a esta porcentagem encontra-se o resíduo Gln78 e na região não permitida encontra-se o resíduo Ser197, o mesmo resíduo localizado na região não permitida no diagrama de Ramachandran da estrutura de AK2-AMP-adn. Este resíduo está localizado no loop que liga a fita β 11 e a α -hélice11 e parece estar conservado nessa conformação (AK humana, AK de *Anopheles gambiae* e AK de *Toxoplasma gondii* também apresentam esse resíduo nessa conformação e em região não permitida no diagrama de Ramachandran) devido sua proximidade do sítio ativo da enzima, mais precisamente próximo ao sítio de ligação de adenosina e do resíduo Phe169.

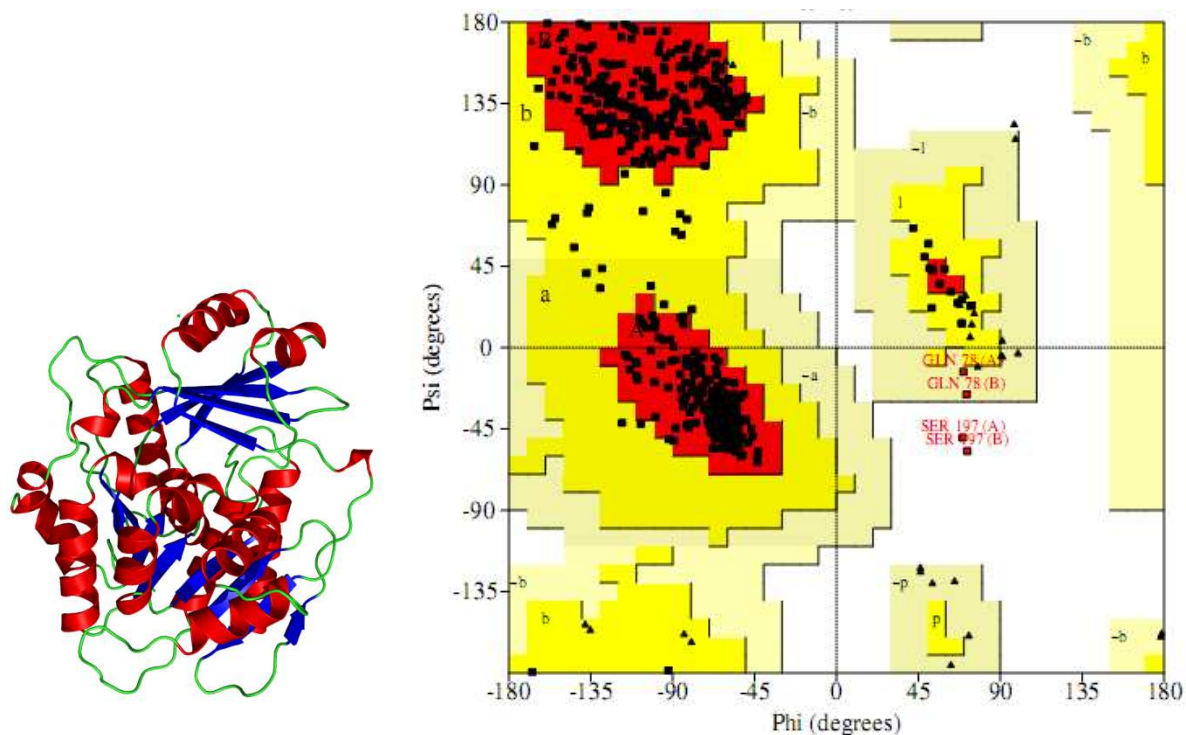


FIGURA 31: Estrutura tridimensional de AK2-tubercidina em modelo de fitas, as hélices estão em vermelho, fitas β em azul e loops em verde. Diagrama de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros para as duas subunidades da estrutura. A região representada em vermelho corresponde à região mais favorável para os valores dos ângulos, a região amarelo escuro é a adicionalmente permitida, amarelo claro é a generosamente permitida e a região em branco é a região não permitida. As glicinas são representadas por triângulos.

Os mapas de densidade eletrônica (2Fo-Fc) correspondentes às regiões dos resíduos Ser197 e Gln78 podem ser visualizados nas figuras 32. O resíduo Gln78 inicia o loop entre α -hélice4 e fita β 5 em uma região exposta ao solvente na superfície da proteína.

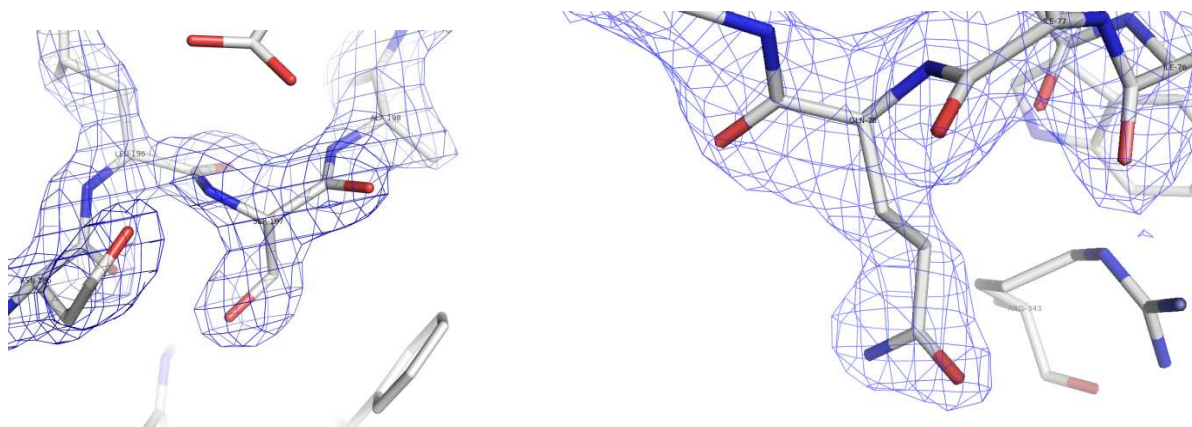


FIGURA 32: Análise do mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc (1σ) correspondente ao resíduo Serina 197 que encontra-se na região não permitida do diagrama de Ramachandran e do resíduo Glutamina 78 que encontra-se na região generosamente permitida do diagrama de Ramachandran.

A partir dos métodos utilizados para a validação do modelo podemos considerá-los bons e confiáveis para a análise da estrutura tridimensional da enzima adenosina kinase isoforma 2.

4.8 Análise das estruturas tridimensionais obtidas de AK2 de *Schistosoma mansoni*

4.8.1 Enovelamento

A estrutura global da proteína é muito similar a das outras AKs depositadas no PDB. A maior diferença encontrada entre essas proteínas é da AK de *Micobacterium tuberculosis* (2PKM) que possui duas hélices adicionais no domínio da tampa que funcionam como uma interface de interação para criar a estrutura dimérica que é descrita como a estrutura ativa dessa enzima [43]. Diferente das enzimas humana [41], *Anopheles gambiae* [44], *Toxoplasma gondii* [38] e *Trypanosoma brucei rhodesiense* [74], cuja atividade é descrita na forma monomérica.

A sobreposição da AK de *Schistosoma mansoni* na forma fechada com as AKs na mesma conformação depositadas no PDB pode ser visualizada na figura 33 e os valores de RMSD gerados são comparados na tabela 4.

Tabela 4: Comparação de enovelamento de AK de *Schistosoma mansoni* e AKs depositadas no pdb através do valor de RMSD calculado da sobreposição destas.

Estruturas sobrepostas	RMSD
A. AK de <i>Schistosoma mansoni</i> e AK humana (pdb 1BX4)	1.099 Å
B. AK de <i>Schistosoma mansoni</i> e AK de <i>Anopheles gambiae</i> (pdb 3LOO)	1.201 Å.
C. AK de <i>Schistosoma mansoni</i> e AK de <i>Toxoplasma gondii</i> (pdb 1LIK)	1.209 Å
D. AK de <i>Schistosoma mansoni</i> e AK de <i>Micobacterium tuberculosis</i> (pdb 2PKM)	10.908 Å

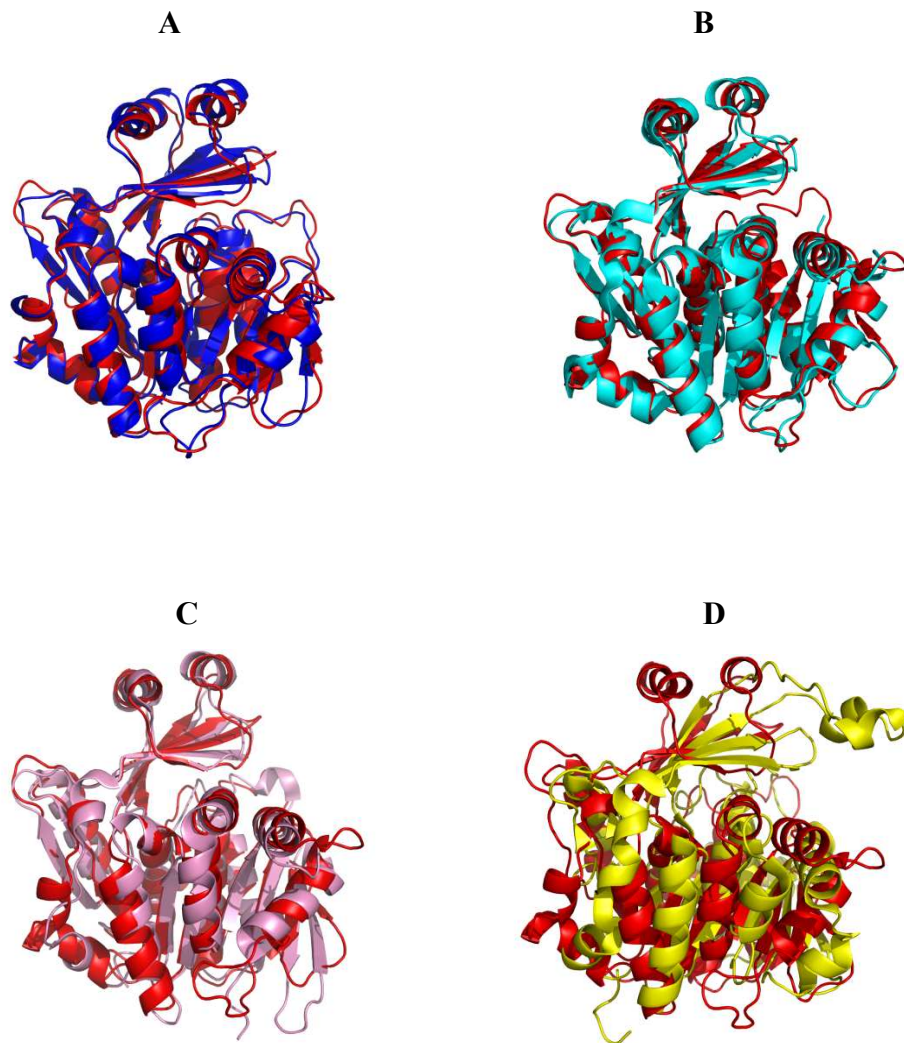


FIGURA 33: Sobreposições das estruturas tridimensionais de AK depositadas no PDB com AK de *Schistosoma mansoni*. A: AK de *Schistosoma mansoni* (vermelho) e humana 1BX4 (azul escuro). Rmsd = 1.099 Å. B: AK de *Schistosoma mansoni* (vermelho) e *Anopheles gambiae* 3LOO (azul claro) Rmsd = 1.201 Å. C: AK de *Schistosoma mansoni* (vermelho) e *Toxoplasma gondii* 1LIK (rosa). Rmsd = 1.209 Å. D: AK de *Schistosoma mansoni* (vermelho) e *Micobacterium tuberculosis* 2PKM (amarelo). Rmsd = 10.908 Å.

4.8.2 Estrutura secundária, topologia e regiões conservadas

A estrutura de AK2 é composta por: 2 folhas β , 15 fitas β (sendo 10 da folha A e 5 da folha B), 2 β bulges, 18 α -hélices (sendo 5 delas hélices 3,10), 21 interações entre as hélices, 16 β turns, 3 β hairpins e 4 γ turns.

AK possui dois domínios característicos dessas proteínas, um domínio menor (chamado de tampa) α/β formado por uma folha com 5 fitas β (β_2 , β_3 , β_4 , β_8 , β_9) e duas α -hélice (α_1 , α_2) na parte superior desta folha expostas ao solvente. O domínio maior $\alpha/\beta/\alpha$ é formado por 10 fitas β , sendo 9 paralelas (β_1 , β_5 , β_6 , β_7 , β_{10} , β_{11} , β_{12} , β_{13} , β_{15}) e 1 anti-paralela (β_{14}) formando uma folha na região mais interna da proteína. As fitas β são rodeadas

por 15 α -hélices ($\alpha 4$ a $\alpha 18$), sendo 4 delas 3.10, expostas ao solvente lembrando um Rossman fold [77] (Figura 34).

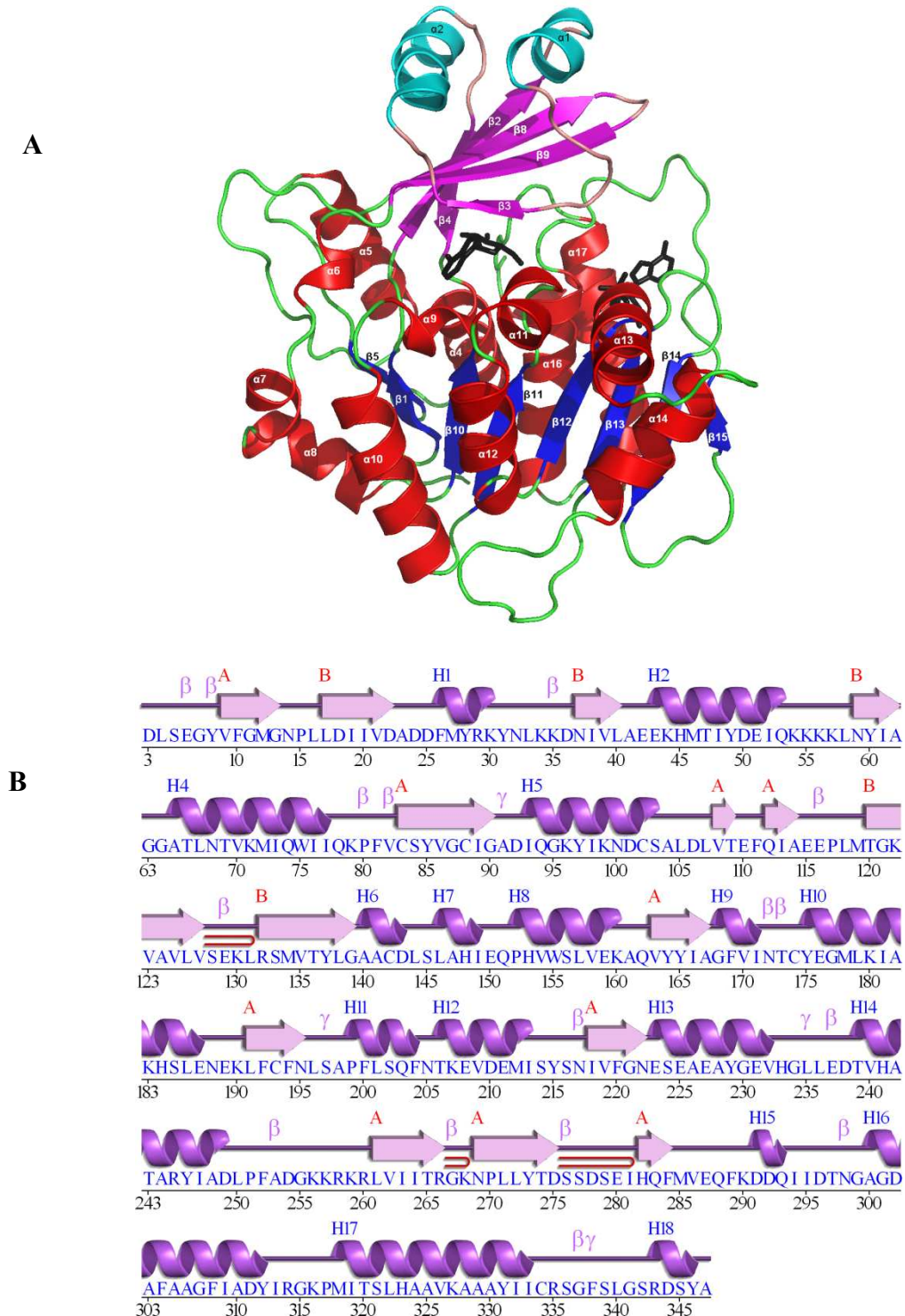


FIGURA 34: A: Estrutura tridimensional de AK de *Schistosoma mansoni* com adenosina e AMP ligados (preto). As α -hélices do domínio tampa estão representadas em azul claro, as fitas β em magenta e os loops em rosa. As α -hélices do domínio maior estão representadas em vermelho, as fitas β em azul escuro e os loops em verde. B: Estrutura secundária de AK em função da seqüência de aminoácidos gerada pelo pdb sum. As fitas β são representadas por setas rosa, as α -hélices por espirais roxas com a respectiva numeração em cima (H1, H2...H18), as 2 folhas β são classificadas como A e B, sendo essas letras colocadas acima das fitas identificando a qual folha pertencem. Os símbolos: β - beta turn, γ - gamma turn e \equiv - beta hairpin.

A topologia da AK está esquematizada na figura.35.

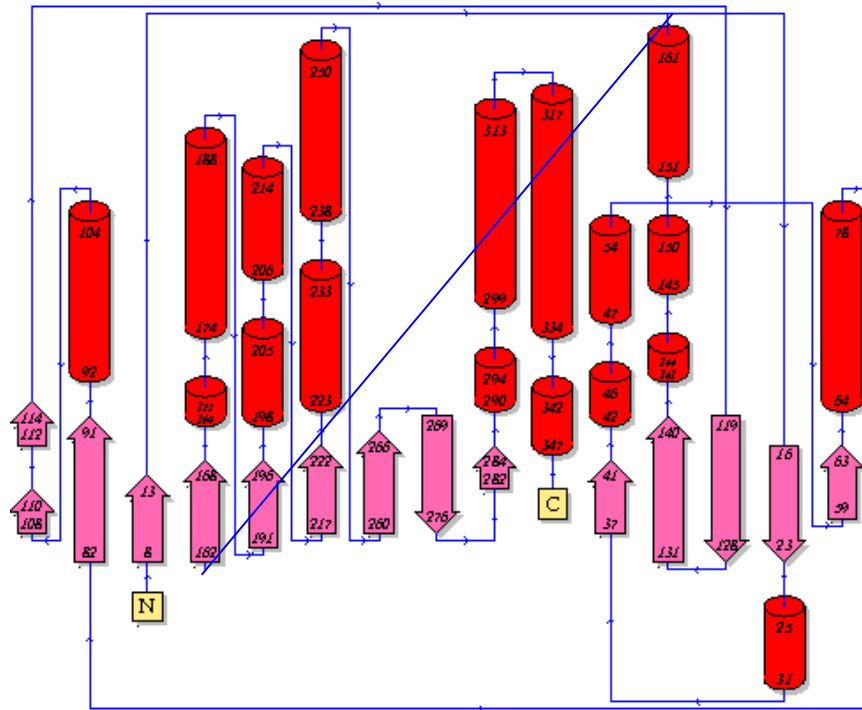


FIGURA 35: Topologia de AK2 gerada pelo PDB sum. As fitas β são representadas por setas rosa, as α -hélices em tubos vermelhos e os loops em azul. O N-terminal é indicado pela letra N e o C-terminal pela letra C.

Além do enovelamento bem conservado [39], outra característica marcante dos membros da superfamília ribokinase, a qual pertence a AK são duas sequências de aminoácidos altamente conservadas: di-glicina (Gly63 e Gly64) posicionadas próximo ao N-terminal e DXNGAGD (resíduos de aminoácidos 296 a 302, região de loop e início da α -hélice 16) posicionada próximo ao C-terminal [78]. Estas regiões conservadas são muito importantes no mecanismo catalítico da enzima e podem ser visualizadas na figura 36 do alinhamento com AK humana juntamente com outros resíduos conservados (<http://esript.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>)

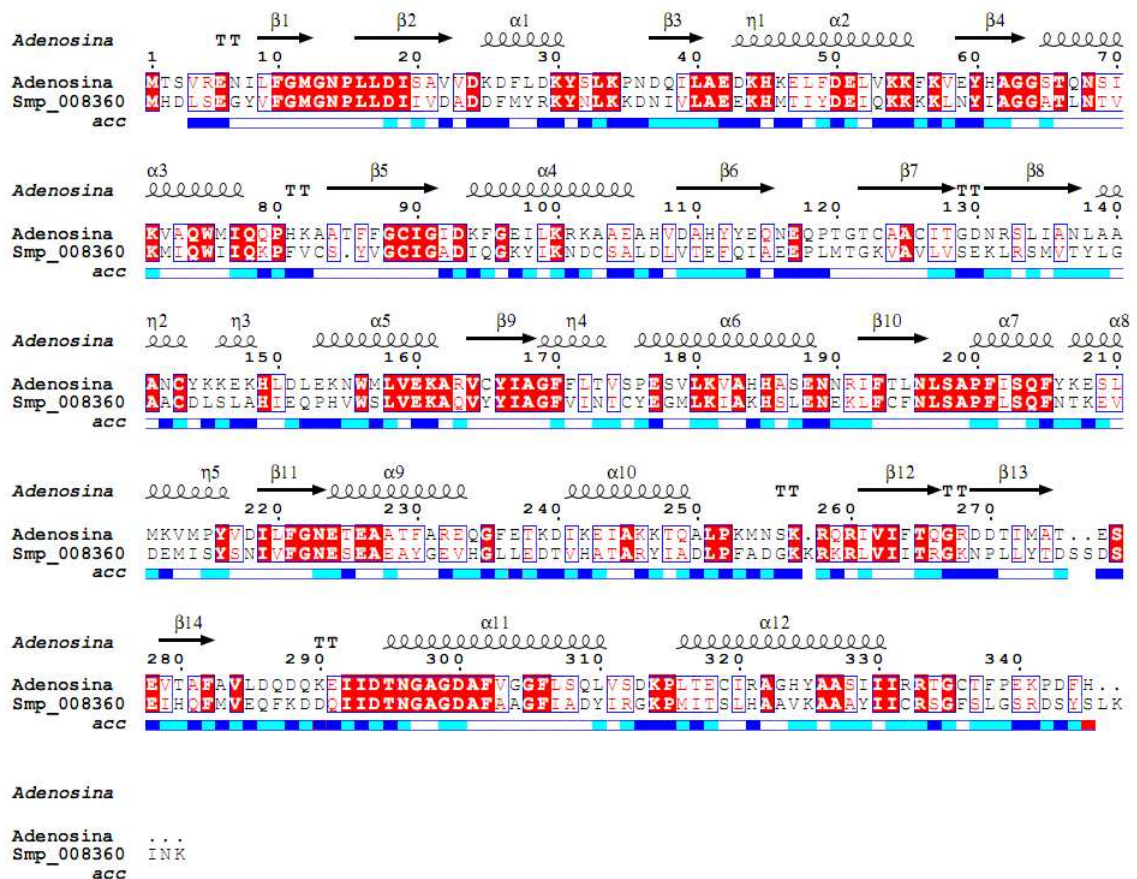


FIGURA 36. Alinhamento de AK humana e de *Schistosoma mansoni* em função da estrutura secundária de AK humana. A primeira linha corresponde à estrutura secundária formada, a segunda linha a sequência de aminoácidos de AK humana e a terceira linha de *Schistosoma mansoni*. Os resíduos brancos grifados em vermelho são conservados nas duas estruturas, os em vermelho grifados em branco são os resíduos não conservados, porém similares. A quarta linha corresponde a exposição dos resíduos ao solvente, em azul escuro os mais expostos, azul claro podem estar expostos e branco hidrofóbicos.

4.8.3 Mecanismo catalítico

Estudos cristalográficos recentes realizados na presença e ausência de substrato tem revelado o mecanismo catalítico de AK. Tais estudos demonstraram que a AK pode sofrer mudanças conformacionais durante a ligação do substrato, uma vez que o sítio ativo da enzima está localizado na interface dos dois domínios. O sítio de ligação de adenosina está situado em uma cavidade profunda coberta pelo domínio tampa após a ligação da adenosina. Já o sítio de ligação do ATP está localizado em uma região adjacente no domínio maior com a ribose e os fosfatos apontando para a adenosina. A conformação da estrutura chamada de aberta é encontrada para a forma apo da enzima [74,79].

Iniciando o mecanismo catalítico é proposto que a adenosina se ligue primeiro no sítio de ligação da adenosina, induzindo um movimento de aproximadamente 30° do domínio

chamado de tampa que se fecha em relação ao domínio maior (conformação pré-catalítica) por meio dos resíduos conservados Gly63 e Gly64 (loop que liga fita β 4 e α -hélice4) que funcionam como uma dobradiça [74] (Figura 37). Fato que justifica a conservação desses resíduos nessa posição e desempenhando esse papel por serem resíduos pequenos e possuírem uma maior flexibilidade.

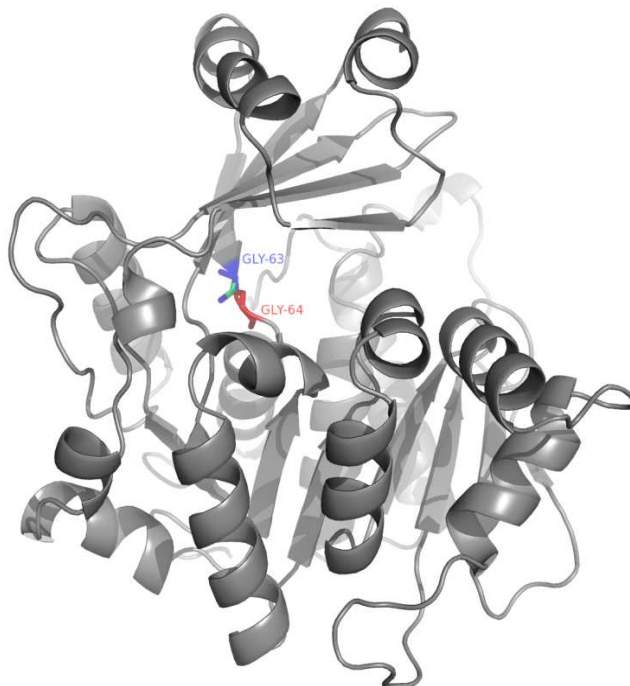


FIGURA 37: Estrutura tridimensional de AK2 de *Schistosoma mansoni* destacando os resíduos conservados Gly63 (azul) e Gly64 (vermelho) no loop que liga fita β 4 e α -hélice4 e funcionam como uma dobradiça responsável pelo movimento de 30° do domínio chamado de tampa que se fecha em relação ao domínio maior após a ligação de adenosina no sítio de ligação de adenosina.

Essa mudança conformacional “sequestra” a adenosina e ao mesmo tempo inicia a formação do sítio de ligação do ATP no domínio maior. Subsequentemente o ATP se liga no sítio de ligação do ATP e induz outras mudanças conformacionais locais através da molécula de adenina e os fosfatos β e γ , que criam um extenso buraco de anions formado pela região conservada DXNGAGD (resíduos 296 a 302) que corresponde a parte de um loop e início da α -hélice 16 posicionado próximo ao C-terminal (Figura 38) [74,79]. O fato dessa região ser bastante conservada faz todo sentido tendo em vista que o dipolo da α -hélice (positivo no N-terminal) ajuda estabilizar as cargas negativas dos fosfatos. Portanto, na ausência da ligação de ATP, essas mudanças estruturais que ocorrem posteriormente ao fechamento do domínio tampa, não ocorrem mais, pois as cargas negativas do grupo fosfato não precisam ser estabilizadas e a reação catalítica não ocorre.

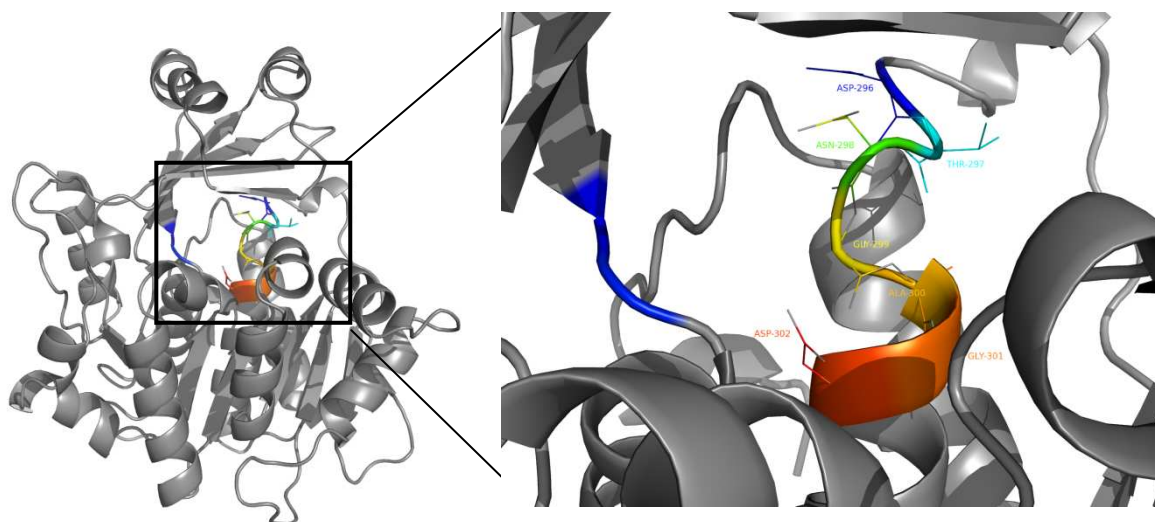


FIGURA 38: Estrutura tridimensional de AK2 de *Schistosoma mansoni* destacando a região conservada DXNGAGD (resíduos 296 a 302), região de loop e início da α -hélice 16 posicionado próximo ao C-terminal.

Uma vez que a conformação fechada é completamente alcançada, os resíduos cataliticamente importantes estão posicionados e orientados corretamente para a transformação catalítica, ou seja, a transferência do fosfato γ do ATP para a molécula de adenosina.

É proposto que a reação é efetivamente catalisada pelo resíduo Asp302 (correspondente ao resíduo Asp300 na estrutura de AK humana, Figura 39), pois o grupo 5-hidroxila da molécula de adenosina encontra-se próximo ao carboxilato (COO^-), sugerindo que o carboxilato é a base catalítica que deprotona a hidroxila da adenosina antes de atacar o fosfato γ do ATP [41].

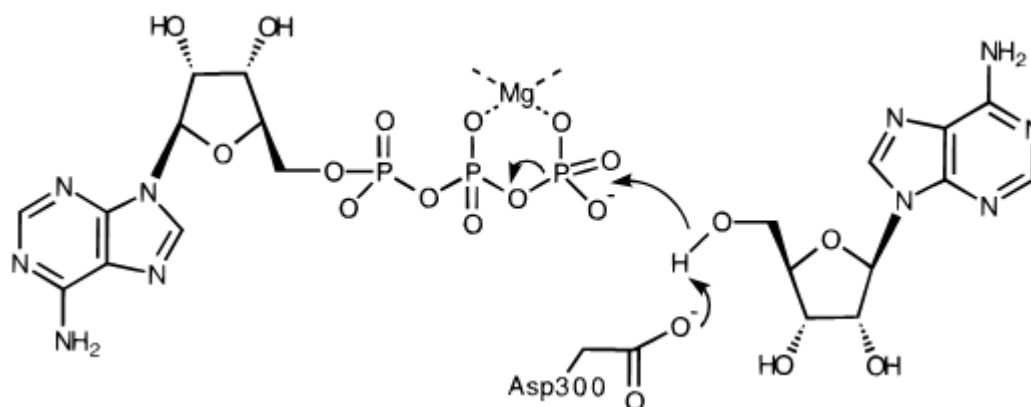


FIGURA 39: Mecanismo catalítico de AK, resíduo asp300 em AK humana que tem seu correspondente na posição 302 na AK de *Schistosoma mansoni*, este deprotona o grupo 5-hidroxila da molécula de adenosina que ataca o fosfato γ do ATP [41].

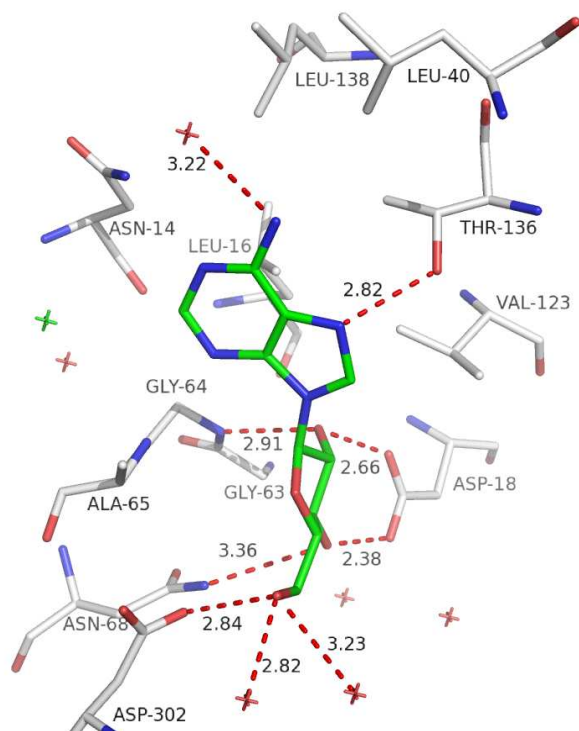
Ao final da reação catalisada, temos como produtos: o AMP no sítio de ligação de adenosina que recebeu um fosfato e um ADP no sítio de ligação do ATP que sedeu o fosfato γ para a adenosina. Sendo assim, o sistema relaxa, libera o ADP que promove a abertura do domínio tampa e posteriormente a liberação da molécula de AMP.

4.8.4 O sítio ativo

4.8.4.1 Sítio de ligação de adenosina

Na primeira estrutura de AK coletada (complexo ternário) no sítio de ligação de adenosina encontra-se uma molécula de adenosina, Apesar da grande quantidade de AMP (2mM) utilizada na última etapa de purificação da enzima, esta molécula não foi encontrada neste sítio provavelmente devido a alta especificidade deste para a molécula de adenosina e conseqüentemente alguns análogos. Portanto, a adenosina presente no sítio provavelmente é proveniente do metabolismo da bactéria, uma vez que a enzima não foi incubada com esta molécula.

A molécula de adenosina encontra-se estabilizada nesse sítio pelas interações e ligações de hidrogênio que realiza com três moléculas de água (11, 157 e 160) e com os resíduos de aminoácidos Asp 18, Gly 64, Asn 68, Thr 136 e Asp 302 (Figura 40).



Adenosina (sítio de ligação de adenosina)		
N6	H ₂ O 11	3.22
N7	Thr136 OG1	2.82
O2'	Asp18 OD1	2.66
O2'	Gly64 N	2.91
O3'	Asp18 OD2	2.38
O3'	Asn68 ND2	3.36
O5'	Asp302 OD2	2.84
O5'	H ₂ O 157	2.82
O5'	H ₂ O 160	3.23

FIGURA 40: Sítio de ligação de adenosina na estrutura de AK2-aden-amp de *Schistosoma mansoni* (branco) com adenosina (verde) ligada (vermelho) a três moléculas de água e aos resíduos Asp 18, Gly 64, Asn 68, Thr 136 e Asp 302. Tabela: Ligações de hidrogênio da molécula de adenosina no sítio de ligação de adenosina da AK de *Schistosoma mansoni* (<3.5Å).

Analisando o posicionamento da adenosina no sítio e as ligações de hidrogênio que esta faz, fica coerente a observação de EL Kouni & Cha [28] que testaram a incorporação de nove análogos de adenosina (Figura 8) e demonstraram que o *S. mansoni* não é capaz de fosforilar os análogos: sangivamicina, 3'-deoxisangivamicina e 1-metiformicina em contraste com os outros testados. Fato esse que pode ser atribuído ao tamanho do grupo inserido na posição 7 no lugar do nitrogênio da base nitrogenada, por ser muito volumoso este grupo provavelmente se chocaria com o resíduo Thr136 que está ligado ao N7 da molécula de adenosina com distância de 2.82Å (Figura 41).

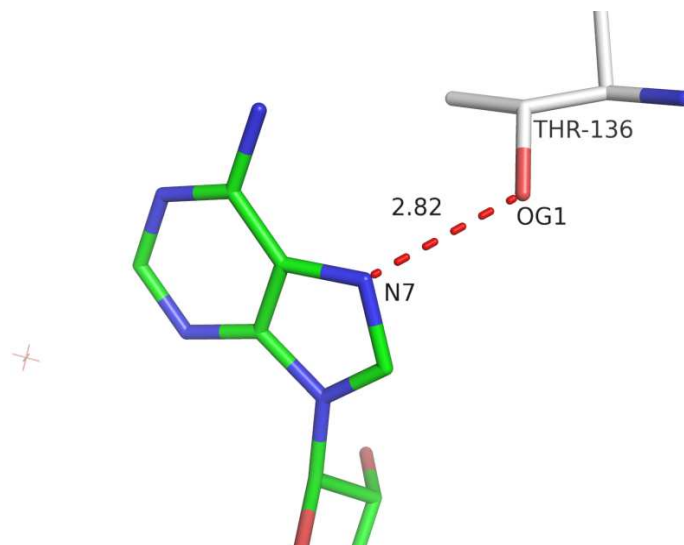


FIGURA 41: Sítio de ligação de adenosina na estrutura de AK2-AMP-adn. Posição N7 da base nitrogenada da adenosina ligada ao resíduo de aminoácido Thr136 com distância de 2.82Å.

Quando comparados os sítios de ligação de adenosina da AK do parasita e humana, em relação aos resíduos de aminoácidos que compõe cada sítio, existem algumas diferenças. Sobrepondo essas estruturas, nota-se que estas diferem em cinco resíduos de aminoácidos: (relação parasita/humana) Ile38Gln, Ala65Ser, Val123Cys, Met134Leu e Thr136Ala. A sobreposição dos sítios pode ser visualizada na figura 42, onde a estrutura da AK do parasita é representada em branco e humana em verde.

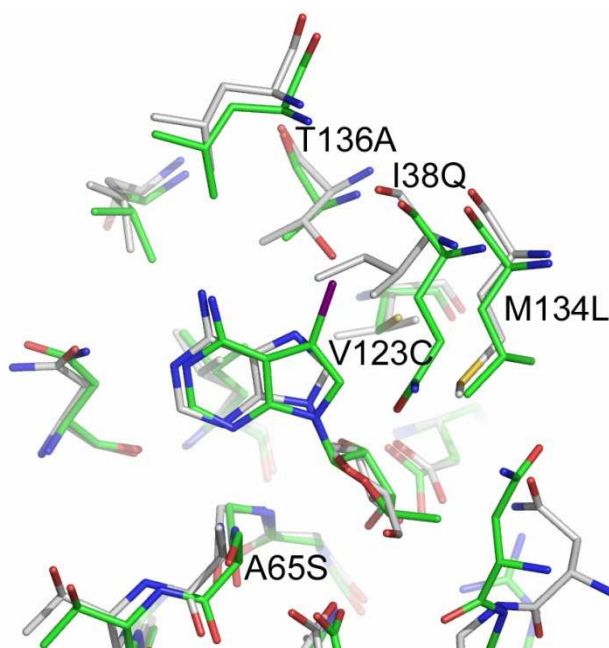


FIGURA 42. Sobreposição do sítio ativo da adenosina de AK *Schistosoma mansoni* (branco) e AK humana (verde). Os sítios diferem em 5 resíduos de aminoácidos em relação ao sítio da enzima do parasita I38Q, A65S, V123C, M134L e T136A.

Essa diferença de resíduos resulta em um padrão ligeiramente diferente de estabilização da molécula de adenosina no sítio ativo da AK humana. Em contraste com a AK do parasita os átomos N6 e N7 da base nitrogenada de adenosina fazem ligação de hidrogênio com a água 11 que está ligada ao resíduo Ile 39, substituindo a ligação de hidrogênio que o átomo N7 da adenosina faz com o resíduo Thr 136 no parasita. Também na estrutura humana os átomos O4' e O5' da ribose se ligam a uma água 26 e o átomo O3' da ribose se liga ao N do resíduo Gly64. Já as outras ligações são conservadas em relação à estrutura da enzima do parasita, inclusive de N6 com a água 11 que corresponde a 12 na humana. Esta sobreposição e comparação dos sítios de ligação de adenosina do parasita e humana podem ser visualizadas na figura 43, onde a estrutura do parasita e a adenosina são representadas em branco, suas ligações de hidrogênio e águas em azul e a estrutura humana e adenosina em verde com ligações e águas em vermelho.

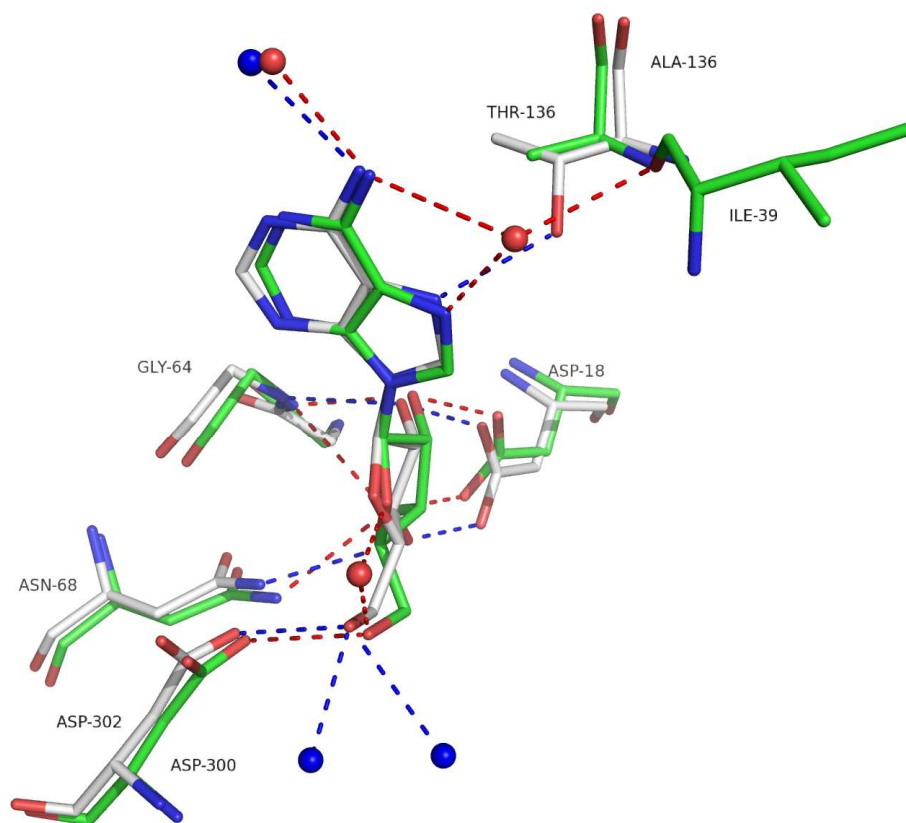


FIGURA 43: Sobreposição dos sítios de ligação de adenosina do parasita e humana. AK de *Schistosoma mansoni* representada em branco, ligações de hidrogênio e águas em azul. AK humana representada em verde, ligações e águas em vermelho.

Já na segunda estrutura de AK coletada (complexo binário) encontra-se presente em ambos os sítios de ligação, o análogo de adenosina e inibidor de AK, a molécula de tubercidina. No sítio de ligação de adenosina, a tubercidina é estabilizada pelas interações e ligações com quatro moléculas de água (29, 215, 298, 317) e com os resíduos Asp 18, Gly 64, Asn 68 e Asp 302 (Figura 44).

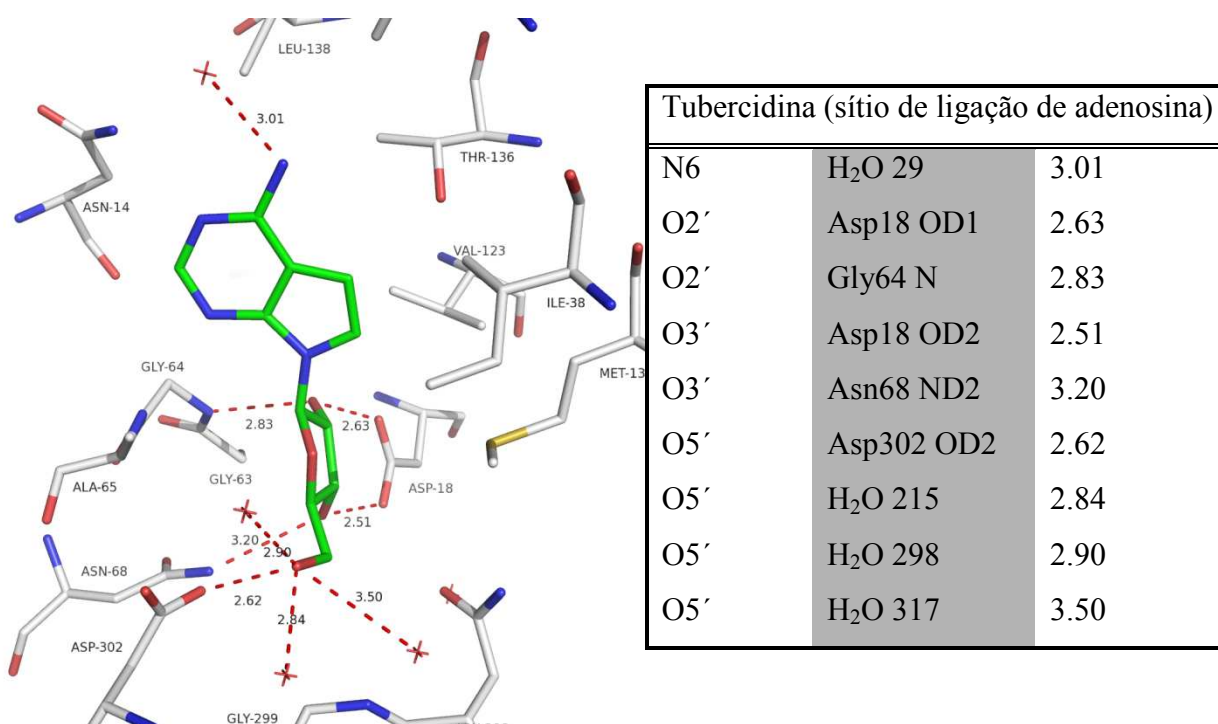


FIGURA 44: Sítio de ligação de adenosina na estrutura de AK2-tubercidina de *Scshitosoma mansoni* (branco) com tubercidina (verde) ligada (vermelho) aos resíduos Asp 18, Gly 64, Asn 68 e Asp 302. Perdendo a ligação com Thr 136 pela substituição do átomo de Nitrogênio por um Carbono na posição 7 em relação a adenosina.

Neste caso, tendo a tubercidina um átomo de Carbono no lugar do Nitrogênio na posição 7 da base nitrogenada em relação à adenosina, essa troca caracteriza a perda da ligação de hidrogênio que a adenosina realiza com o resíduo Thr136, como pode ser observado na figura 45 da sobreposição, dos sítios de ligação de adenosina, das estruturas de AK-AMP-adn (branco) com ligações de hidrogênio e águas representadas em azul e AK-tub (azul claro) com ligações de hidrogênio e águas representadas em vermelho.

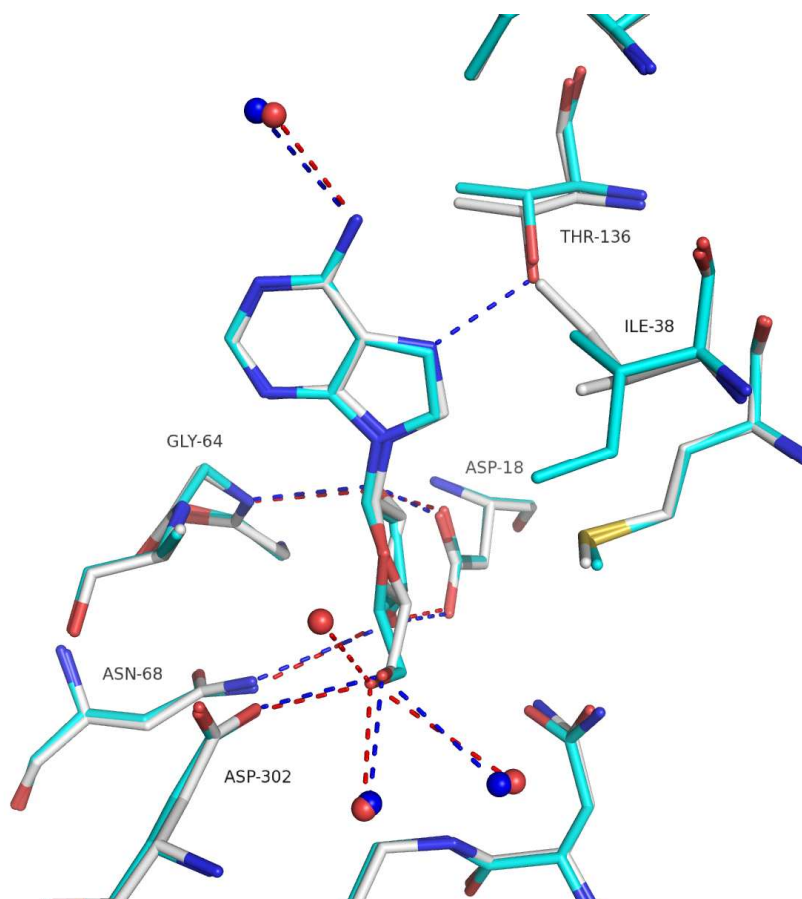


FIGURA 45: Sobreposição do sítio de ligação de adenosina das AKs de *Schistosoma mansoni*. Em branco a estrutura de AK-AMP-adn com ligações e águas representadas em azul. Em azul claro a estrutura de AK-tub com ligações e águas representadas em vermelho.

Aparentemente na estrutura de AK do parasita além da água ligada ao N6 da base nitrogenada da adenosina, mais duas moléculas de água ligadas ao O5' da ribose são conservadas no sítio de ligação de adenosina.

4.8.4.2 Sítio de ligação do ATP

Na estrutura de AK-AMP-adn no sítio de ligação de ATP encontra-se uma molécula de AMP, provavelmente proveniente da utilização desta em grande quantidade (2mM) na segunda e última etapa de purificação da enzima. A molécula de AMP é estabilizada neste sítio pelas interações e ligações de hidrogênio que realiza com quatro moléculas de água (45, 64, 65 e 156) e com os resíduos Thr 265 e Gly 267 (Figura 46).

Interessante observar neste caso que a base nitrogenada não faz nenhuma ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos da enzima, somente o fosfato do AMP interage com os resíduos Thr265 e Gly267, o que sugere que a AK de *Schistosoma mansoni* também é

pouco seletiva em relação à base nitrogenada do substrato no sítio de ligação de ATP, corroborando com a observação de outros pesquisadores [40] em relação a AK extraída de fígado de coelho.

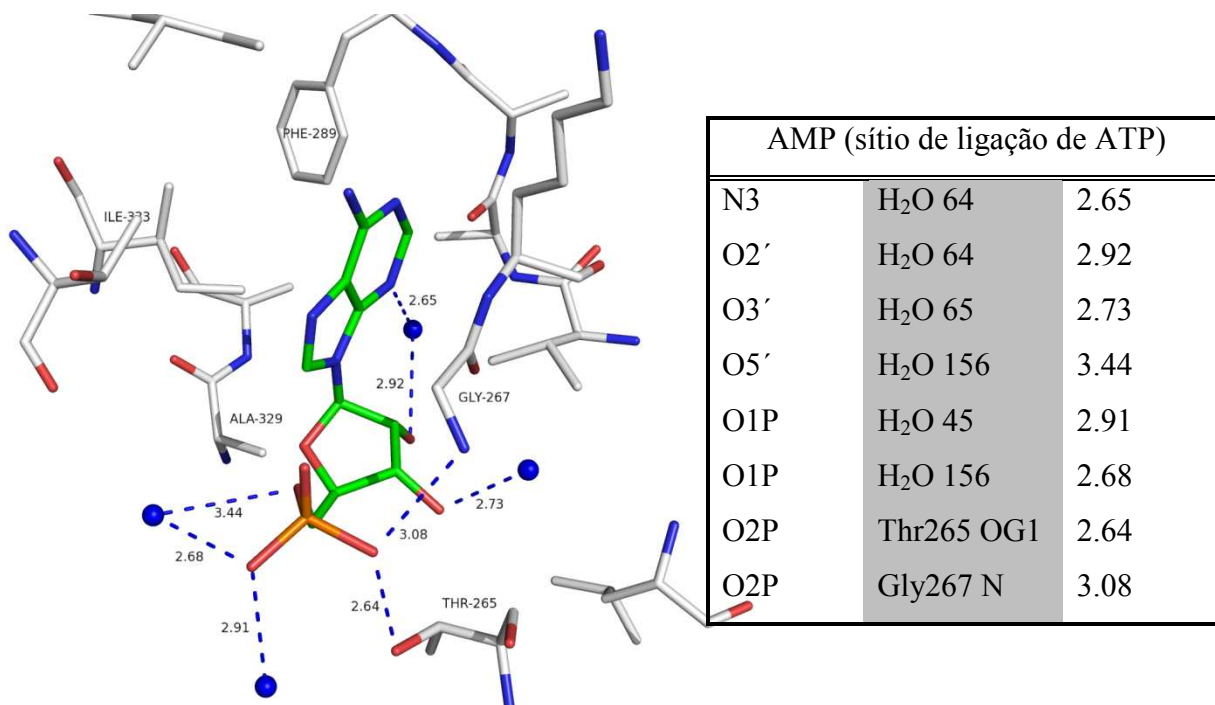


FIGURA 46: Sítio de ligação de ATP na estrutura de AK2-adn-amp de *Scshistosoma mansoni* (branco) com AMP (verde) ligado (azul) a quatro moléculas de água e ao resíduos Thr 265 e Gly267.

Sobrepondo e analisando o sítio de ligação do ATP do parasita e o de AK humana, duas coisas são importantes de se destacar: a região mais interna do sítio é bastante conservada por ser composta pela sequência de resíduos de aminoácidos DTNGAGD (resíduos 296 a 302) conforme descrito anteriormente. Já a região mais externa, exposta ao solvente, onde se liga a base nitrogenada do ATP é pouco conservada, que corresponde a uma região de loop que antecede a sequência altamente conservada.

Dentre as principais mutações observadas no sítio de ligação de ATP podemos destacar, Lys268Arg, de forma que ambas cadeias laterais apontam para o solvente. Na estrutura de *S.mansoni* a cadeia lateral do resíduo Phe289 está enterrada no sítio ativo, enquanto que tal posição, na enzima humana, é ocupada por um resíduo de Asp288 cuja cadeia lateral aponta para o solvente. O resíduo seguinte, Gln289 cuja cadeia lateral aponta para a região interna do sítio, onde realiza ligação de hidrogênio com o substrato, não possui equivalente na estrutura do parasita, esta posição é ocupada pelo resíduo Lys290 cuja cadeia lateral aponta em direção ao solvente (Figura 47).

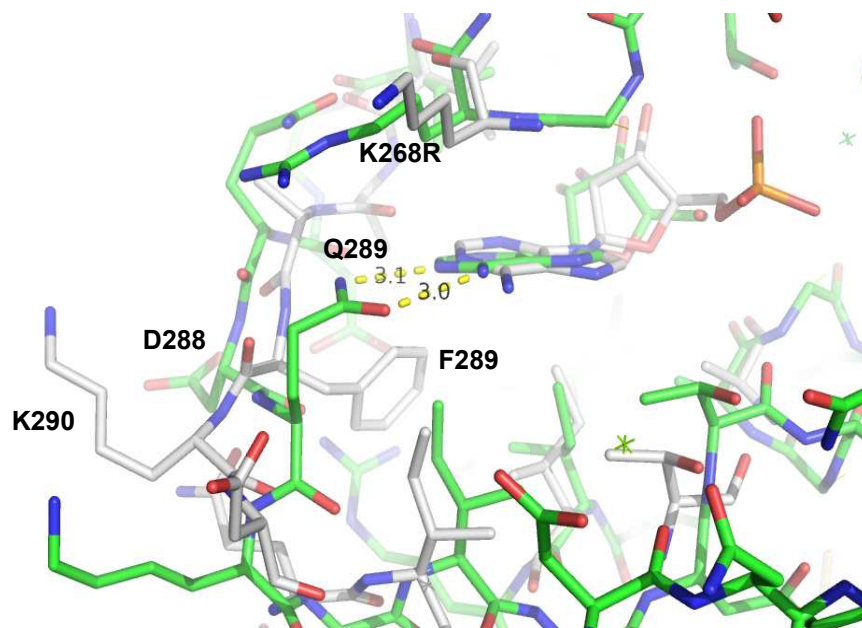


FIGURA 47. Sobreposição do sítio ativo de ATP da AK *Schistosoma mansoni* (branco) e AK humana (verde). Os sítios diferem nos principais resíduos de aminoácidos em relação ao sítio da enzima do parasita K268R, F289D288, Q289K290.

Sobrepondo as estruturas de AK humana (verde) e AK do parasita (branco) de modo a analisar as interações e ligações que os substratos realizam dentro do sítio de ligação de ATP fica evidente a diferença dessas interações e a importância da presença das moléculas de água nesse sítio, uma vez que em ambas estruturas não se encontra o ATP ligado. Na humana observa-se a presença de uma molécula de adenosina estabilizada pela ligação com 7 moléculas de água e somente uma ligação de hidrogênio com o resíduo Gln 289 (figura 48).

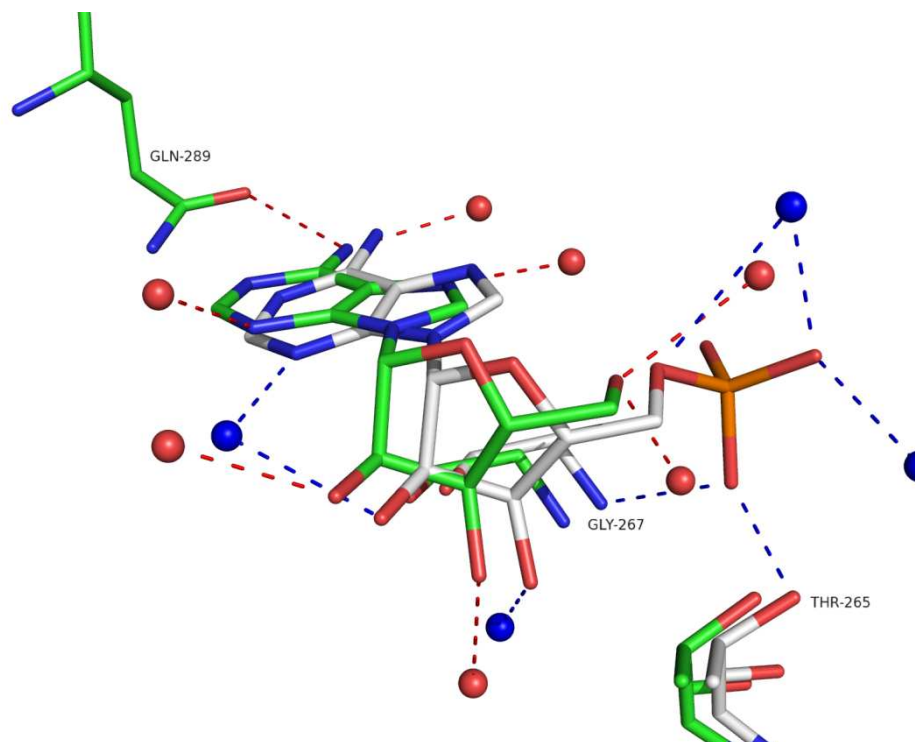
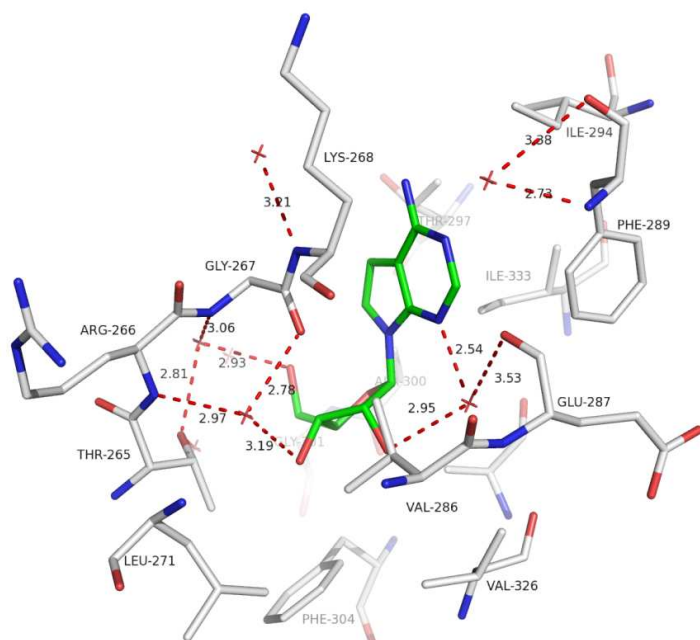


FIGURA 48: Sobreposição da molécula de AMP e adenosina, presentes no sítio de ligação do ATP da AK do parasita (branco) e humana (verde) respectivamente e as ligações de hidrogênio que realizam. Sendo azul para AK do parasita e vermelha para humana.

Na estrutura de AK-tub, a tubercidina é estabilizada no sítio de ligação do ATP pelas interações e ligações com três moléculas de água, que por sua vez são estabilizadas no sítio pela ligação com os resíduos Thr 265, Arg 266, Gly 267 e Glu 287 (Figura 49).



Tubercidina (sítio de ligação de ATP)		
N3	H ₂ O 72	2.54
O2'	H ₂ O 72	2.95
O3'	H ₂ O 16	3.19
O5'	H ₂ O 18	2.93

FIGURA 49: Sítio de ligação de ATP na estrutura de AK2-tubercidina de *Scshistosoma mansoni* (branco) com tubercidina (verde) ligado (vermelho) a três moléculas de água ligadas aos resíduos Thr 265, Arg 266, Gly 267 e Glu 287.

Apesar de a tubercidina estar estabilizada por ligações com moléculas de água no sítio de ligação do ATP, sobrepondo os sítios ativos da primeira com a segunda estrutura de AK (Rmsd = 0.178 Å) nota-se que ambos os ligantes: tubercidina e AMP se ligam com o mesmo posicionamento no sítio (Figura 50).

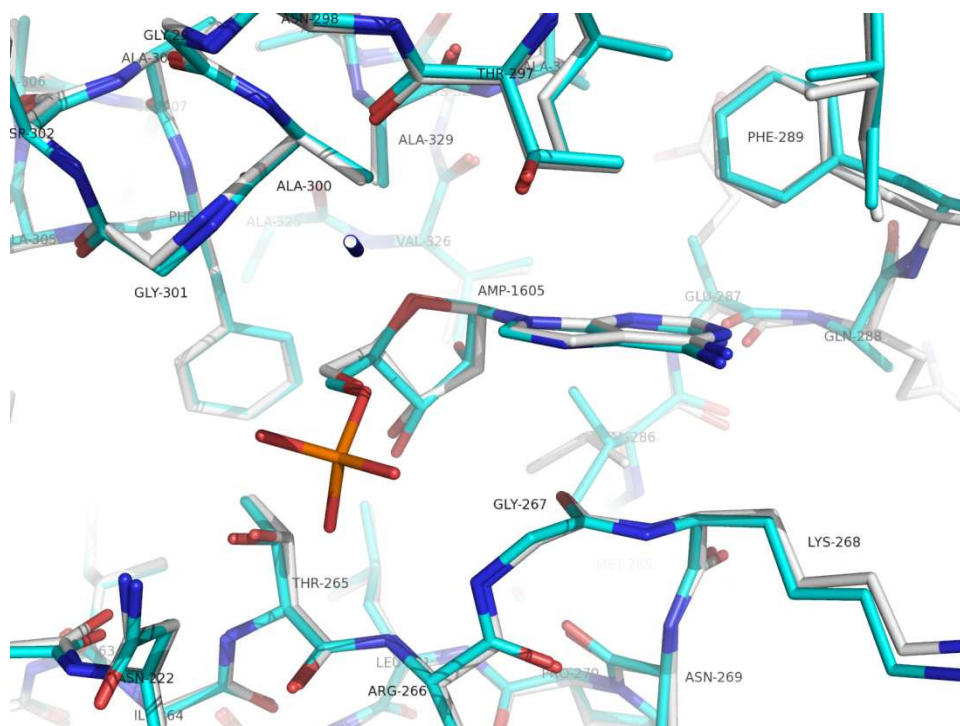


FIGURA 50: Sobreposição do sítio de ligação de ATP de AK2 ligando AMP (branco) e AK2 ligando tubercidina (azul claro). Ambos ligantes, apesar de ligações diferentes encontram-se com o mesmo posicionamento dentro do sítio.

Essas diferenças entre os dois sítios de ligação de AK humana e do parasita talvez sejam significativas para o desenvolvimento de um fármaco que seja substrato desta enzima.

4.9 Teste de atividade da AK2 de *Schistosoma mansoni*

A atividade da enzima AK2, através da utilização do ensaio acoplado com as enzimas piruvato kinase e lactato desidrogenase, é associada com o consumo de β -NADH para β -NAD, sendo o primeiro monitorado a 340 nm. Portanto, o resultado desta análise corresponde à observação de um decaimento na curva de monitoramento resultado do consumo de β -NADH. Uma vez que este só é consumido à medida que a enzima AK produz ADP e consequentemente dispara a reação acoplada, é possível relacionar esse decaimento com a atividade da enzima.

Confirmando esse evento, a figura 51 corresponde ao gráfico gerado pelo

monitoramento da solução controle, ou seja, a solução que contém todos os componentes do ensaio exceto a enzima AK utilizada para disparar a reação. O ideal nesse caso é que não haja decaimento na curva de monitoramento, uma vez que teoricamente, essa reação não ocorre.

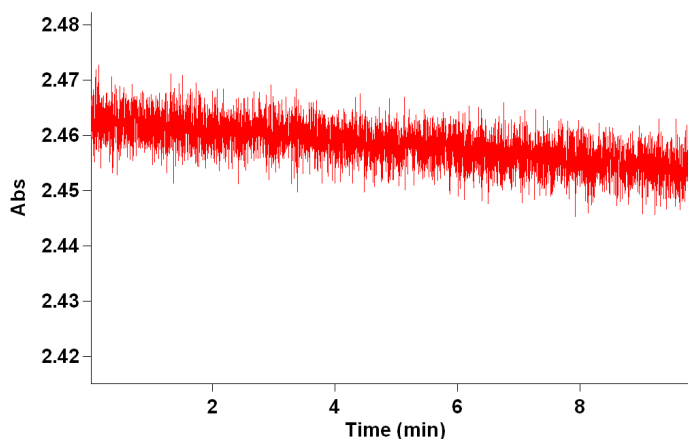


FIGURA 51: Análise da atividade enzimática da enzima AK2 de *Schistosoma mansoni*. Gráfico de absorvância ao longo do tempo da solução controle, ou seja, aquela que não contém enzima adicionada na reação.

Nota-se que a solução controle apresenta um decaimento bastante sutil, de 2.465 a 2.458 de absorvância, uma diferença de 0,007.

Visando testar a atividade da enzima foram utilizadas 3 concentrações desta: 100 nM (figura 52), 200 nM (figura 53) e 1 μ M (figura 54) para monitoramento do consumo de adenosina.

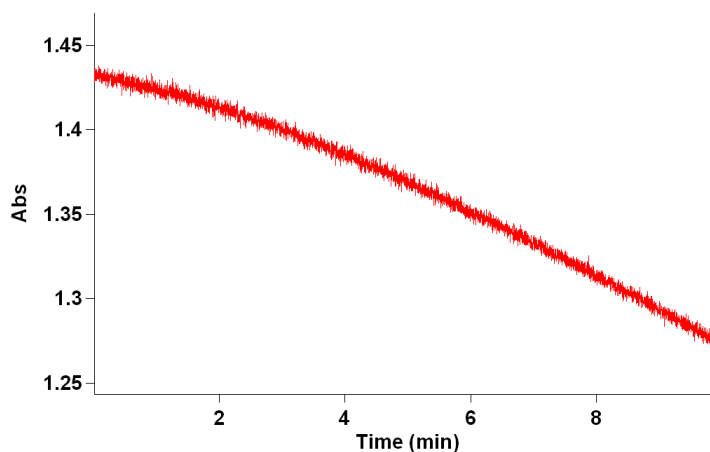


FIGURA 52: Análise da atividade enzimática da enzima AK2 de *Schistosoma mansoni*. Gráfico de absorvância ao longo do tempo de 100nM de AK2 e 200 μ M de adenosina.

No primeiro gráfico gerado observa-se um decaimento de 1.43 a 1.27 de absorvância (diferença de 0,16) ao longo de 10 minutos, quando utilizada a concentração de 100nM de

AK2 e 200 μ M de adenosina.

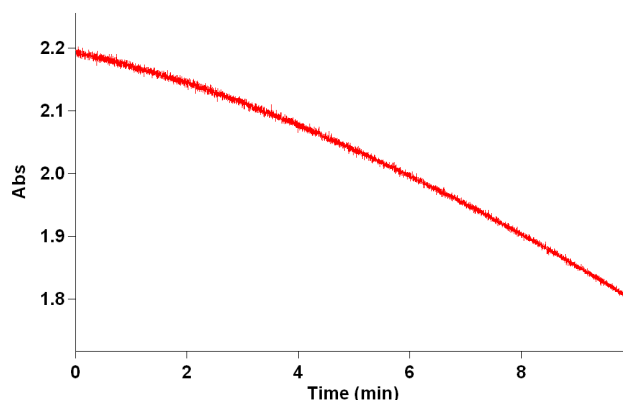


FIGURA 53: Análise da atividade enzimática da enzima AK2 de *Schistosoma mansoni*. Gráfico de absorvância ao longo do tempo de 200nM de AK2 e 200 μ M de adenosina.

Já na concentração de 200nM de AK2 para 200 μ M de adenosina o decaimento da curva corresponde a 2.2 a 1.8 de absorvância, uma diferença de 0,4.

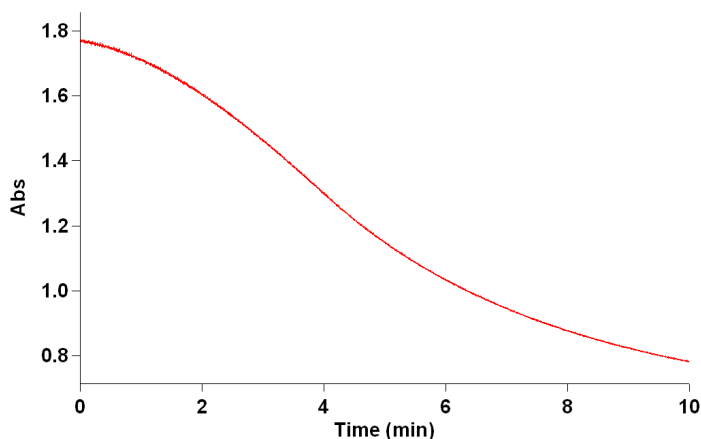


FIGURA 54: Análise da atividade enzimática da enzima AK2 de *Schistosoma mansoni*. Gráfico de absorvância ao longo do tempo de 1 μ M de AK2 e 200 μ M de adenosina.

Aumentando a concentração de AK2 para 1 μ M essa diferença na absorvância, ou seja, no decaimento da curva é ainda maior, uma vez que o substrato é consumido mais rapidamente. Essa diferença foi de 1.78 a 0.78, diferença de 1 de absorvância.

Diante dos gráficos gerados pelo monitoramento da reação ao longo de 10 minutos nota-se claramente, pelo decaimento apresentado nas curvas, que a enzima AK2 está ativa. Fato esse ressaltado quando comparadas as curvas geradas pelas diferentes concentrações de enzima utilizada, o maior decaimento corresponde a maior quantidade de enzima (1 μ M).

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível a amplificação e clonagem em vetor de expressão pET28a do cDNA das três enzimas estudadas: AK1, AK2 e HGPRT, entretanto, o fato da sequência de nucleotídeos que codifica a enzima AK1, que está depositada no banco de dados, possuir um éxon a mais na região do N-terminal, prejudicou o avanço dos experimentos realizados com a mesma. Já as enzimas recombinantes AK2 e HGPRT foram expressas em bactérias *E. coli* BL21(DE3) satisfatoriamente, sendo AK2 expressa a 37°C durante o período de 4 horas e HGPRT a 18°C por 12 horas, uma vez que, apresenta-se insolúvel quando expressa a 37°C.

Ambas as enzimas foram purificadas utilizando-se colunas de afinidade: níquel e AMP-agarose para purificação de AK2 e cobalto para HGPRT. Até o presente momento a enzima HGPRT não foi cristalizada, fato este que remeteu a uma nova análise computacional da sequência de nucleotídeos que codifica a mesma e sugeriu que esta, a exemplo de AK1, também possui um éxon a mais na região do N-terminal.

Em contrapartida, a enzima AK2 foi cristalizada em 100mM Bis-Tris pH 6,5; 25% de PEG3350 e 200mM de Li_2SO_4 . Os cristais obtidos forneceram dois bons conjuntos de dados provenientes da difração de raio-X. O primeiro modelo cristalográfico corresponde ao complexo ternário AK2-AMP-adenosina, com parâmetros $R_{\text{work}} = 0.2078$ e $R_{\text{free}} = 0.2488$. O segundo modelo cristalográfico corresponde ao complexo binário AK2-tubercidina, com parâmetros $R_{\text{work}} = 0.1967$ e $R_{\text{free}} = 0.2475$, ambos modelos com 2.3Å de resolução e amplo acordo com os critérios que avaliam a qualidade dos modelos depositados no bando de dados.

A conformação da estrutura tridimensional obtida de AK2 apresenta grande semelhança com as outras enzimas depositadas no bando de dados. Esta possui dois sítios de ligação: um de adenosina e um de ATP, sendo que o segundo é formado após a ligação da adenosina em seu sítio que induz um movimento de aproximadamente 30° do domínio tampa se fechando em relação ao domínio maior. Ambos os sítios são formados por regiões bastante conservadas na família ribokinase, a qual AK pertence.

Uma comparação minuciosa, entre AK2 do parasita com a enzima humana, determinou algumas diferenças que podem ser relevantes no desenho de novos inibidores. Os sítios de ligação de adenosina do parasita e humana diferem em cinco resíduos de aminoácidos: Ile38Gln, Ala65Ser, Val123Cys, Met134Leu e Thr136Ala. Já no sitio de ligação do ATP as diferenças são ainda maiores, onde o maior destaque é a mutação de Gln289 que na estrutura humana faz ligação com substrato por uma Lys290 no parasita cuja

cadeia lateral aponta para o solvente e não para o sítio ativo. O mapeamento das ligações de hidrogênio dentro da cavidade de ligação de adenosina e tubercidina do parasita sugere que estas são bastante compatíveis e conservadas, exceto pela perda de ligação N7 com Thr136, pela substituição deste átomo na molécula de tubercidina por um Carbono.

O teste de atividade realizado com a enzima AK2 demonstrou que a enzima recombinante é ativa.

6. PERSPECTIVAS

- Como perspectivas para a continuidade do trabalho destaca-se o reinício das atividades com as enzimas AK1 e HGPRT a partir das novas construções identificadas, ou seja, amplificação, clonagem, expressão, purificação, cristalização e ensaio de atividade a partir da nova sequência de cDNA de AK1 e HGPRT.

- Elaboração e aperfeiçoamento de um protocolo para determinação das constantes catalíticas de AK2, bem como ensaios de inibição desta com diversos compostos.

- Cristalização e obtenção de novas estruturas cristalográficas de AK2 com outros ligantes e inibidores.

REFERÊNCIAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO - **Report of the Scientific Working Group meeting on Schistosomiasis**. In, pp. 144. TDR- Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Geneva (2006).
2. King CH, Dickman K, Tisch DJ: **Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis**. *Lancet* (2005) **365**(9470):1561-1569.
3. Pessoa SM, Martins AV: **Parasitologia Médica**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (1977) 10 (Ed).
4. Senft AW, Miech RP, Brown PR, Senft DG: **Purine metabolism in Schistosoma mansoni**. *Int J Parasitol* (1972) **2**(2):249-260.
5. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Ottesen E, Ehrlich Sachs S, Sachs JD: **Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria**. *PLoS Med* (2006) **3**(5):e102.
6. WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO: **Report on Schistosomiasis**, World Health Organization (2010).
7. van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD, Engels D: **Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa**. *Acta Trop* (2003) **86**(2-3):125-139.
8. Abdulla MH, Lim KC, Sajid M, McKerrow JH, Caffrey CR: **Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor**. *PLoS Med* (2007) **4**(1):e14.
9. Caffrey CR: **Chemotherapy of schistosomiasis: present and future**. *Curr Opin Chem Biol* (2007).
10. Fenwick A, Webster JP: **Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance**. *Curr Opin Infect Dis* (2006) **19**(6):577-582.
11. Silva IM, Thiengo R, Conceicao MJ, Rey L, Lenzi HL, Pereira Filho E, Ribeiro PC: **Therapeutic failure of praziquantel in the treatment of Schistosoma haematobium infection in Brazilians returning from Africa**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2005) **100**(4):445-449.
12. Wolfe MS: **Schistosoma mansoni infection: failure of standard treatment with praziquantel in a returned traveller**. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2003) **97**(6):720; author reply 720.
13. Danso-Appiah A, De Vlas SJ: **Interpreting low praziquantel cure rates of Schistosoma mansoni infections in Senegal**. *Trends Parasitol* (2002) **18**(3):125-129.
14. Fallon PG, Doenhoff MJ: **Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in Schistosoma mansoni in mice is drug specific**. *Am J Trop Med Hyg* (1994) **51**(1):83-88.
15. Ismail MM, Taha SA, Farghaly AM, el-Azony AS: **Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis**. *J Egypt Soc Parasitol* (1994) **24**(3):685-695.
16. Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D: **Resistance of Schistosoma mansoni to praziquantel: is there a problem?** *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2002) **96**(5):465-469.
17. Coles GC: **Drug resistance or tolerance in schistosomes?** *Trends Parasitol* (2002) **18**(7):294.
18. Hagan P, Appleton CC, Coles GC, Kusel JR, Tchuem-Tchuente LA: **Schistosomiasis control: keep taking the tablets**. *Trends Parasitol* (2004) **20**(2):92-97.

19. Lescano SZ, Chieffi PP, Canhassi RR, Boulos M, Amato Neto V: **[Antischistosomal activity of artemether in experimental Schistosomiasis mansoni]**. *Rev Saude Publica* (2004) **38**(1):71-75.
20. Utzinger J, Xiao S, N'Goran EK, Bergquist R, Tanner M: **The potential of artemether for the control of schistosomiasis**. *Int J Parasitol* (2001) **31**(14):1549-1562.
21. Le WJ, You JQ, Yang YQ, Mei JY, Guo HF, Yang HZ, Zhang CW: **[Studies on the efficacy of artemether in experimental schistosomiasis (author's transl)]**. *Yao Xue Xue Bao* (1982) **17**(3):187-193.
22. Yue WJ, You JQ, Mei JY: **[Effects of artemether on Schistosoma japonicum adult worms and ova]**. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* (1984) **5**(1):60-63.
23. Araujo N, Kohn A, Katz N: **Activity of the artemether in experimental schistosomiasis mansoni**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (1991) **86** Suppl 2:185-188.
24. Utzinger J, N'Goran EK, N'Dri A, Lengeler C, Xiao S, Tanner M: **Oral artemether for prevention of Schistosoma mansoni infection: randomised controlled trial**. *Lancet* (2000) **355**(9212):1320-1325.
25. Xiao SH, Catto BA: **In vitro and in vivo studies of the effect of artemether on Schistosoma mansoni**. *Antimicrob Agents Chemother* (1989) **33**(9):1557-1562.
26. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM: **Lehninger principles of biochemistry**, W.H. Freeman, New York (2008).
27. Voet D, Voet JG: **Biochemistry**, J. Wiley & Sons, New York (2004).
28. el Kouni MH, Cha S: **Metabolism of adenosine analogues by Schistosoma mansoni and the effect of nucleoside transport inhibitors**. *Biochem Pharmacol* (1987) **36**(7):1099-1106.
29. Dovey HF, McKerrow JH, Wang CC: **Purine salvage in Schistosoma mansoni schistosomules**. *Mol Biochem Parasitol* (1984) **11**:157-167.
30. Senft AW, Crabtree GW: **Purine metabolism in the schistosomes: potential targets for chemotherapy**. *Pharmacol Ther* (1983) **20**(3):341-356.
31. Senft AW, Crabtree GW: **Pathways of nucleotide metabolism in Schistosoma mansoni--VII. Inhibition of adenine and guanine nucleotide synthesis by purine analogs in intact worms**. *Biochem Pharmacol* (1977) **26**(20):1847-1855.
32. Ross AF, Jaffe JJ: **Effects of tubercidin and its ribonucleotides on various metabolic pathways in Schistosoma mansoni**. *Biochem Pharmacol* (1972) **21**(22):3059-3069.
33. Jaffe JJ, Doremus HM, Dunsford HA, Kammerer WS, Meymarian E: **Antischistosomal activity of tubercidin in monkeys**. *Am J Trop Med Hyg* (1973) **22**(1):62-72.
34. Stegman RJ, Senft AW, Brown PR, Parks RE, Jr.: **Pathways of nucleotide metabolism in Schistosoma mansoni. IV. Incorporation of adenosine analogs in vitro**. *Biochem Pharmacol* (1973) **22**(4):459-468.
35. Crabtree GW, Senft AW: **Pathways of nucleotide metabolism in schistosoma mansoni. V. Adenosine cleavage enzyme and effects of purine analogues on adenosine metabolism in vitro**. *Biochem Pharmacol* (1974) **23**(3):649-660.
36. Miech FP, Senft AW, Senft DG: **Pathways of nucleotide metabolism in Schistosoma mansoni--VI adenosine phosphorylase**. *Biochem Pharmacol* (1975) **24**(3):407-411.
37. Voet D, Voet JG, Pratt CW: **Fundamentals of biochemistry**, Wiley, New York (1999).

38. Zhang Y, El Kouni MH, Ealick SE: **Structure of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase in complex with an ATP analog at 1.1 angstroms resolution.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (2006) **62**(Pt 2):140-145.
39. Zhang Y, Dougherty M, Downs DM, Ealick SE: **Crystal structure of an aminoimidazole riboside kinase from *Salmonella enterica*: implications for the evolution of the ribokinase superfamily.** *Structure* (2004) **12**(10):1809-1821.
40. Miller RL, Adameczyk DL, Miller WH, Koszalka GW, Rideout JL, Beacham LM, 3rd, Chao EY, Haggerty JJ, Krenitsky TA, Elion GB: **Adenosine kinase from rabbit liver. II. Substrate and inhibitor specificity.** *J Biol Chem* (1979) **254**(7):2346-2352.
41. Mathews, II, Erion MD, Ealick SE: **Structure of human adenosine kinase at 1.5 Å resolution.** *Biochemistry* (1998) **37**(45):15607-15620.
42. Schumacher MA, Scott DM, Mathews, II, Ealick SE, Roos DS, Ullman B, Brennan RG: **Crystal structures of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase reveal a novel catalytic mechanism and prodrug binding.** *J Mol Biol* (2000) **298**(5):875-893.
43. Reddy MC, Palaninathan SK, Shetty ND, Owen JL, Watson MD, Sacchettini JC: **High resolution crystal structures of *Mycobacterium tuberculosis* adenosine kinase: insights into the mechanism and specificity of this novel prokaryotic enzyme.** *J Biol Chem* (2007) **282**(37):27334-27342.
44. Cassera MB, Ho MC, Merino EF, Burgos ES, Rinaldo-Matthis A, Almo SC, Schramm VL: **A high-affinity adenosine kinase from *Anopheles gambiae*.** *Biochemistry* **50**(11):1885-1893.
45. Dovey HF, McKerrow JH, Wang CC: **Action of tubercidin and other adenosine analogs on *Schistosoma mansoni* schistosomules.** *Mol Biochem Parasitol* (1985) **16**(2):185-198.
46. el Kouni MH: **Efficacy of combination therapy with tubercidin and nitrobenzylthioinosine 5'-monophosphate against chronic and advanced stages of schistosomiasis.** *Biochem Pharmacol* (1991) **41**(5):815-820.
47. el Kouni MH, Messier NJ, Cha S: **Treatment of schistosomiasis by purine nucleoside analogues in combination with nucleoside transport inhibitors.** *Biochem Pharmacol* (1987) **36**(22):3815-3821.
48. Keough DT, Brereton IM, de Jersey J, Guddat LW: **The crystal structure of free human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase reveals extensive conformational plasticity throughout the catalytic cycle.** *J Mol Biol* (2005) **351**(1):170-181.
49. Lesch M, Nyhan WL: **A Familial Disorder of Uric Acid Metabolism and Central Nervous System Function.** *Am J Med* (1964) **36**:561-570.
50. Torres RJ, Puig JG: **Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome.** *Orphanet J Rare Dis* (2007) **2**:48.
51. Saigal R, Chakraborty A, Yadav RN, Prashant RK: **Partial HPRT deficiency (Kelley-Seegmiller syndrome).** *J Assoc Physicians India* (2006) **54**:49-52.
52. Kelley WN, Rosenbloom FM, Henderson JF, Seegmiller JE: **A specific enzyme defect in gout associated with overproduction of uric acid.** *Proc Natl Acad Sci U S A* (1967) **57**(6):1735-1739.
53. Palella TD, Kelley WN: **An approach to hyperuricemia and gout.** *Geriatrics* (1984) **39**(11):89-92, 95-86, 101-102.
54. Welin M, Egeblad L, Johansson A, Stenmark P, Wang L, Flodin S, Nyman T, Tresaugues L, Kotenyova T, Johansson I, Eriksson S *et al*: **Structural and functional studies of the human phosphoribosyltransferase domain containing protein 1.** *FEBS J* **277**(23):4920-4930.

55. Yuan L, Wu CS, Craig SP, 3rd, Liu AF, Wang CC: **Comparing the human and schistosomal hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases by circular dichroism.** *Biochim Biophys Acta* (1993) **1162**(1-2):10-16.
56. Dovey HF, McKerrow JH, Aldritt SM, Wang CC: **Purification and characterization of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Schistosoma mansoni*. A potential target for chemotherapy.** *J Biol Chem* (1986) **261**(2):944-948.
57. Pereira TC, Pascoal VD, Marchesini RB, Maia IG, Magalhaes LA, Zanotti-Magalhaes EM, Lopes-Cendes I: **Schistosoma mansoni: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene.** *Exp Parasitol* (2008) **118**(4):619-623.
58. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (1986) **51 Pt 1**:263-273.
59. Battye TG, Kontogiannis L, Johnson O, Powell HR, Leslie AG: **iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**(Pt 4):271-281.
60. **The CCP4 suite: programs for protein crystallography.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (1994) **50**(Pt 5):760-763.
61. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ: **Phaser crystallographic software.** *J Appl Crystallogr* (2007) **40**(Pt 4):658-674.
62. Adams PD, Grosse-Kunstleve RW, Hung LW, Ioerger TR, McCoy AJ, Moriarty NW, Read RJ, Sacchettini JC, Sauter NK, Terwilliger TC: **PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (2002) **58**(Pt 11):1948-1954.
63. Emsley P, Cowtan K: **Coot: model-building tools for molecular graphics.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (2004) **60**(Pt 12 Pt 1):2126-2132.
64. Laskowski RA, Rullmannn JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM: **AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR.** *J Biomol NMR* (1996) **8**(4):477-486.
65. Chen VB, Arendall WB, 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC: **MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**(Pt 1):12-21.
66. Lua RC, Lichtarge O: **PyETV: a PyMOL evolutionary trace viewer to analyze functional site predictions in protein complexes.** *Bioinformatics* **26**(23):2981-2982.
67. Hutchinson EG, Thornton JM: **PROMOTIF--a program to identify and analyze structural motifs in proteins.** *Protein Sci* (1996) **5**(2):212-220.
68. Shimofuruya H, Mizutani T, Shimono A, Nakamura M, Suzuki J: **Determination of pyrimidine nucleoside diphosphates by use of combined reactions of pyruvate kinase and lactate dehydrogenase.** *Biochem Mol Biol Int* (1993) **31**(3):463-468.
69. Dolle C, Ziegler M: **Application of a coupled enzyme assay to characterize nicotinamide riboside kinases.** *Anal Biochem* (2009) **385**(2):377-379.
70. Brown TA: **Clonagem Gênica e Análise de DNA,** *Artmed*, Porto Alegre (2003).
71. Lima LMD: **Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular.** In, pp. 18. Embrapa, Campina Grande - PB (2008).

72. Zwieb C, Kim J, Adhya S: **DNA bending by negative regulatory proteins: Gal and Lac repressors.** *Genes Dev* (1989) **3**(5):606-611.
73. Diederichs K, Karplus PA: **Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography.** *Nat Struct Biol* (1997) **4**(4):269-275.
74. Kuettel S, Greenwald J, Kostrewa D, Ahmed S, Scapozza L, Perozzo R: **Crystal Structures of T. b. rhodesiense Adenosine Kinase Complexed with Inhibitor and Activator: Implications for Catalysis and Hyperactivation.** *PLoS Negl Trop Dis* **5**(5):e1164.
75. Engh RA, Huber R: **Accurate Bond and Angle Parameters for X-Ray Protein-Structure Refinement.** *Acta Crystallographica Section A* (1991) **47**:392-400.
76. Kleywegt GJ, Jones TA: **Homo crystallographicus--quo vadis?** *Structure* (2002) **10**(4):465-472.
77. Rossmann MG, Argos P: **The taxonomy of binding sites in proteins.** *Mol Cell Biochem* (1978) **21**(3):161-182.
78. Park J, Gupta RS: **Adenosine kinase and ribokinase--the RK family of proteins.** *Cell Mol Life Sci* (2008) **65**(18):2875-2896.
79. Schumacher MA, Scott DM, Mathews, II, Ealick SE, Roos DS, Ullman B, Brennan RG: **Crystal structures of Toxoplasma gondii adenosine kinase reveal a novel catalytic mechanism and prodrug binding.** *J Mol Biol* (2000) **296**(2):549-567.