

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

ROBSON RODRIGO MIRANDA

ESTUDOS ESTRUTURAIS DA ENZIMA HISTIDINA AMÔNIO LIASE DE  
*Trypanosoma cruzi*

PONTA GROSSA  
2015

ROBSON RODRIGO MIRANDA

ESTUDOS ESTRUTURAIS DA ENZIMA HISTIDINA AMÔNIO LIASE DE  
*Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Química Aplicada no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek  
Coorientador: Prof. Dr. Marcio Silva

PONTA GROSSA  
2015

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

Miranda, Robson Rodrigo  
M672        Estudos estruturais da enzima histidina  
             amônio liase de Trypanosoma cruzi/ Robson  
             Rodrigo Miranda. Ponta Grossa, 2015.  
             74f.

             Dissertação (Mestrado em Química  
             Aplicada - Área de Concentração: Química),  
             Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
             Orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek.  
             Coorientador: Prof. Dr. Marcio Silva.

             1.Histidina Amônio Liase. 2.Trypanosoma  
             cruzi. 3.Ensaio cinético. 4.Estrutura  
             tridimensional. I.Iulek, Jorge. II.  
             Silva, Marcio. III. Universidade Estadual  
             de Ponta Grossa. Mestrado em Química  
             Aplicada. IV. T.

CDD: 574.192

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**ROBSON RODRIGO MIRANDA**

**“ESTUDOS ESTRUTURAIS DA ENZIMA HISTIDINA AMÔNIO  
LIASE DE *Trypanosoma cruzi*.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:

  
Prof. Dr. Jorge Iulek  
UEPG/PR

  
Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann  
IFSC-USP/SP

  
Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana  
UEPG/PR

**Ponta Grossa, 10 de março de 2015.**

Dedico aos meus pais, José e Roselina. Meus irmãos William e Jocelianna. Agradeço à vocês por tudo que fizeram e ainda tem feito por mim. Agradeço por estarem sempre ao meu lado apoiando as minhas decisões. Minha eterna gratidão.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, o autor da vida, que me deu saúde, coragem, força e equilíbrio para continuar até o fim essa maravilhosa e difícil caminhada.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, dando apoio, incentivo e compreensão para que eu pudesse seguir em frente e, principalmente, *in memoriam* de meu pai.

À amiga Sheila Boreiko Sánchez pela amizade e companheirismo de longa data, pois estamos juntos na mesma caminhada, superando as mesmas dificuldades e compartilhando vários momentos desde a graduação.

Ao amigo Alfonso Sánchez Ayala pelo incentivo e ajuda para que eu pudesse continuar na jornada acadêmica.

Ao Prof. orientador Dr. Jorge Iulek por ter-me dado oportunidade para o desenvolvimento do presente trabalho de pesquisa, o qual foi de grande importância para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. coorientador Dr. Marcio Silva por ter acreditado no meu potencial, repassando ensinamentos e confiança, tendo paciência ao longo das supervisões, tornando possível o desenvolvimento do trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariza Boscacci Marques, imensamente, pela disciplina Química de Proteínas, que foi fundamental para a execução deste projeto, e também pelos conselhos, discussões e observações.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Paula Martini pela amizade e esclarecimentos, estando sempre disposta a ajudar nos momentos de necessidade.

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber e à doutoranda Raíssa Melo pelo fornecimento das bactérias contendo o gene codificante da enzima em estudo.

À colega de laboratório Agnes Thiane Pereira Machado pela ajuda durante o projeto.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao programa de Pós-Graduação em Química Aplicada pela oportunidade de realização deste projeto.

Aos órgãos financiadores do projeto, Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa, INBEQMeDI (Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas) e CNPq, pelos recursos para aquisição de equipamentos e reagentes, (573607/2008-7 e 08/57910-00).

## RESUMO

A Doença de Chagas é uma das dezessete doenças tropicais negligenciadas de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Nas últimas décadas foram descritas novas vias metabólicas deste parasita, o que abre perspectivas para o desenvolvimento de medicamentos mais específicos e menos tóxicos, para vias cruciais como alvo. Uma vez identificado o alvo terapêutico, passa a ser necessária a caracterização estrutural e bioquímica das enzimas envolvidas. Especula-se como alvo terapêutico para combater a Doença de Chagas a enzima Histidina Amônio Liase, que participa da via catabólica da histidina. Sendo assim, visando contribuir com o entendimento estrutural e bioquímico desta, foi realizada a sua produção heteróloga em *E. coli*. Esta foi purificada por cromatografia de afinidade e utilizada em diversas técnicas para caracterização inicial. A atividade foi determinada em ensaio cinético, a estabilidade térmica e as estruturas secundárias foram investigadas por Dicroísmo Circular (CD) e o estado de oligomerização em solução foi analisado por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). A técnica de difração de raios X foi empregada para elucidação da estrutura tridimensional. A TcHAL foi expressa e purificada de maneira satisfatória. A atividade revelou um adequado enovelamento protéico e o Dicroísmo Circular indicou predominância de estruturas secundárias hélices- $\alpha$  e início da desnaturação térmica próximo a 68 °C. A TcHAL foi cristalizada e forneceu padrões de difração suficientes para elucidação da estrutura 3D. Os estudos bioquímicos e estruturais avançaram o entendimento desta enzima e das possibilidades de sua inibição.

**Palavras-chave:** Histidina Amônio Liase. *Trypanosoma cruzi*. Ensaio cinético. Estrutura tridimensional.



## ABSTRACT

Chagas disease is one of the seventeen neglected tropical diseases according to the World Health Organization. In the recent decades, new parasite metabolic pathways were identified, what brings perspectives for the development of more specific and less toxic drugs, towards crucial target pathways. Once the therapeutic target is identified, a structural and biochemical characterization of the enzymes involved becomes necessary. It may be speculated that one possible therapeutic target to combat Chagas disease is the Histidine Ammonia-Lyase enzyme, which participates in the catabolic pathway of histidine. Therefore, in order to contribute to the structural and biochemical understanding of this enzyme, their heterologous production in *E. coli* was performed. The product protein was purified by affinity chromatography and used in various techniques for initial characterization. The activity was determined by kinetic assay, the thermal stability and secondary structure content were investigated by Circular Dichroism (CD) and the oligomerization stated in solution was analyzed by Dynamic Light Scattering (DLS). The X ray diffraction technique was used to elucidate the three dimensional structure. *TcHAL* was expressed and purified satisfactorily. The activity proved adequate protein folding and the Circular Dichroism indicated a predominance of  $\alpha$ -helix secondary structure and the start of the thermal denaturation at 68°C. *TcHAL* was crystallized and provided suitable diffraction patterns for the 3D structure elucidation. These biochemical and structural studies advanced the understanding of this enzyme and of the inhibition potentialities.

**Keywords:** Histidine Ammonia-Lyase. *Trypanosoma cruzi*. Kinetic assay. Three dimensional structure.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. (a) Epimastigota, forma replicativa não infecciosa. (b) Tripomastigota metacíclico, predominantemente presente no inseto vetor, forma não replicativa infecciosa. (c) Formas metacíclicas invadem as células hospedeiras e se diferenciam nas formas replicativas amastigotas. (d) Estas formas dão origem a uma fase transitória chamada de epimastigota intracelular, (e) que posteriormente diferenciam-se em tripomastigotas. Os tripomastigotas rompem as células hospedeiras liberando estes parasitas na corrente sanguínea. O inseto vetor, eventualmente, pode ingerir estas formas durante o repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo biológico.....17
- Figura 2. Representação das estruturas químicas das principais drogas usadas para o tratamento da doença de Chagas. a) Nifurtimox; b) Benzonidazol. .... 19
- Figura 3. Etapas envolvidas no catabolismo da histidina em *T. cruzi*. A enzima Histidina Amônio Liase (HAL) está destacada em verde .....20
- Figura 4. Mecanismo proposto para biossíntese do MIO .....21
- Figura 5. Cromatograma das frações eluídas (representadas em vermelho) durante a purificação da *TcHAL* por cromatografia de afinidade. A linha rosa tracejada representa a posição do início da injeção do extrato protéico. A linha azul representa a miliabsorbância enquanto que a verde relaciona-se, de forma não proporcional, à concentração de imidazol, que foi 5 mmol L<sup>-1</sup> para as frações 31 a 40, 60 mmol L<sup>-1</sup> para as frações 31 a 40 e aumentada linearmente de 60 a 500 mmol L<sup>-1</sup> para as frações 41 a 60 .....34
- Figura 6. Figura do gel em SDS-PAGE 12% das frações da cromatografia de afinidade. Raia MMM contém os marcadores de massa molecular (kDa): 116,0-66,2 - 45,0-35,0 - 25,0-18,4 - 14,4. 15 µL de solução de proteína foram injetadas por raia. A linha em vermelho destaca as bandas da *TcHAL* purificada (58 kDa).....35
- Figura 7. Teste de atividade enzimática da *TcHAL*. A linha azul representa o aumento da absorvância, evidenciando a atividade enzimática .....36
- Figura 8. Espectro de dicroísmo circular da enzima *TcHAL*. A legenda mostra o perfil experimental e aqueles obtidos a partir de modelos com os programas SELCON3 e CDSSTR para quantidade de estruturas secundárias .....37

Figura 9.	Espectro de desnaturação térmica da enzima <i>TcHAL</i> obtido pela técnica de dicroísmo circular. Monitoramento do mínimo em 222 nm com variação da temperatura durante o aquecimento (10 a 100 °C) com resfriamento (100 a 10 °C) subsequente .....	38
Figura 10.	Cristais obtidos com a utilização do <i>kit</i> Morpheus e JCSG. Enzima <i>TcHAL</i> a 10,0 mg mL <sup>-1</sup> . Dimensões aproximadas dos maiores cristais de cada condição: (a) 80 µm × 15 µm; (b) 90 µm × 15 µm; (c) 220 µm × 22 µm e (d) 100 µm × 15 µm.....	39
Figura 11.	Melhor padrão de difração obtido a partir dos cristais crescidos em 10% (m/V) de PEG 8.000, 20% (V/V) etilenoglicóis, 0,12 mol L <sup>-1</sup> de monossacarídeos, 0,1 mol L <sup>-1</sup> <i>Buffer System 2</i> pH 7,5 .....	40
Figura 12.	Cristais obtidos com a utilização do <i>kit</i> JCSG. Enzima <i>TcHAL</i> a 10,0 mg mL <sup>-1</sup> . Dimensões aproximadas dos maiores cristais de cada condição: (a) 300 µm × 40 µm e (b) 250 µm × 25 µm .....	41
Figura 13.	(a) Imagem de difração do cristal HAL_jcsg_71_90gPc com pontos difratados à 2,55 Å de limite de resolução. (b) Ampliação da região da imagem de difração com a seta representando o ponto de reflexão coletado a 2,55 Å .....	43
Figura 14.	Alinhamento da sequência de aminoácidos da enzima <i>TcHAL</i> com a proteína mais similar disponível no PDB, HAL de <i>Pseudomonas putida</i> . Em vermelho estão representadas as estruturas secundárias obtidas por meio do programa DSSP; em preto e tons de cinza está indicada a conservação dos resíduos de acordo com a convenção de Alscript Calcons .....	45
Figura 15.	Qualidade de ajuste na densidade eletrônica para o resíduo modificado MDO <sup>143</sup> do monômero A. Figura produzida pelo programa COOT. Os mapas de densidade eletrônica (azul) foram desenhados com 1 σ de contorno, mapas de Fourier diferença com contornos em + 3 σ (verde) e -3 σ (vermelho) .....	47
Figura 16.	Qualidade de ajuste na densidade eletrônica para o resíduo da Cys <sup>393</sup> . As figuras estão apresentadas na seguinte ordem: monômeros a) A, b) B, c) C e d) D. Figuras produzidas pelo programa COOT. Os mapas de densidade eletrônica (azul) foram desenhados com 1 σ de contorno, mapas de Fourier diferença com contornos em + 3 σ (verde) e -3 σ (vermelho) .....	47

- Figura 17. Gráfico de Ramachandran da estrutura HAL\_jcsg\_71\_90gPc. As glicinas são representadas por triângulos e os demais aminoácidos por quadrados. As áreas em vermelho são chamadas de regiões mais favoráveis; em amarelo de regiões favoráveis; em bege de regiões generosamente favoráveis e em branco de regiões desfavoráveis. Figura gerada por meio do programa Procheck .....49
- Figura 18. Qualidade do ajuste na densidade eletrônica representado em gráficos para a estrutura HAL\_jcsg\_71\_90gPc. Os gráficos estão apresentadas na seguinte ordem: monômero (a) A, (b) B, (c) C e (d) D. As setas indicam alguns resíduos que se encontram em regiões de alta flexibilidade .....50
- Figura 19. Estrutura tridimensional do homotetrâmero da HAL\_jcsg\_71\_90gPc. Em vermelho estão representadas as hélices- $\alpha$ , em setas amarelas as fitas- $\beta$  e em verde os *loops*. Figura produzida com o programa PyMOL .....52
- Figura 20. Estrutura tridimensional do homotetrâmero da HAL\_jcsg\_71\_90gPc. A orientação é a mesma da figura 19. Os monômeros estão coloridos da seguinte forma: A (violeta), B (vermelho), C (laranja) e D (rosa). Figura produzida com o programa PyMOL .....52
- Figura 21. Diagrama de topologia para a estrutura HAL\_jcsg\_71\_90gPc. Em forma de bastão vermelho estão as hélices- $\alpha$ , em setas rosas as fitas- $\beta$  e em azul os *loops*. Figura gerada por meio da ferramenta PDBsum .....53
- Figura 22. Regiões de interface entre os monômeros do homotetrâmero. As áreas interfaciais entre os monômeros A, B, C e D estão representadas proporcionalmente de acordo com suas colorações principais, A, violeta, B, vermelho, C, laranja, e D, rosa. As linhas em azul representam as pontes salinas, azul as ligações de hidrogênio e em laranja os contatos não ligados. Figura obtida da ferramenta PDBsum .....54
- Figura 23. Sítio ativo da estrutura da HAL\_jcsg\_71\_90gPc. (a) Representação do monômero D em forma de bastão, em vermelho estão as hélices- $\alpha$ , em setas amarelas as fitas- $\beta$ , em verde os *loops* e em roxo os resíduos pertencentes a esta cavidade. (b) Ampliação da região do sítio ativo. Figura produzida com o programa PyMOL.....55
- Figura 24. Alinhamento da sequência de aminoácidos da HAL\_jcsg\_71\_90gPc com a da estrutura 3UNV. As marcações na coloração azul representam os resíduos idênticos e em vermelho os não idênticos do sítio ativo. Nas colorações em

	preto e tons de cinza está indicada a conservação dos resíduos de acordo com a convenção de Alscript Calcons .....	56
Figura 25.	Sobreposição de parte dos resíduos da cavidade do sítio ativo do monômero D da HAL_jcsg_71_90gPc com o monômero B da estrutura homóloga 3UNV. Na coloração azul os resíduos da estrutura HAL_jcsg_71_90gPc, em vermelho da 3UNV e o ligante SFE em verde. A figura (b) corresponde a rotação de 180° em relação a figura (a). Figuras produzidas com o programa PyMOL.....	57
Figura 26.	Sobreposição do monômero D da HAL_jcsg_71_90gPc com as estruturas de maior homologia. HAL_jcsg_71_90gPc em vermelho, 1GKM em azul, 3KDY em amarelo e 3UNV em verde. Figuras produzidas com o programa PyMOL.....	58
Figura 27.	Alinhamento da sequência de aminoácidos da <i>Tc</i> HAL e da HAL humana. As marcações na coloração azul representam os resíduos idênticos e em vermelho os não idênticos do sítio ativo. Nas colorações em preto e tons de cinza está indicada a conservação dos resíduos de acordo com a convenção de Alscript Calcons.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estimativas de estrutura secundária da enzima <i>Tc</i> HAL. Valores, média e desvio padrão em percentagens obtidos a partir da desconvolução pelos programas utilizados (SELCON3 e CDSSTR). ....	38
Tabela 2.	Dados estatísticos do processamento. Os valores entre parênteses correspondem à última faixa de resolução .....	44
Tabela 3.	Soluções de rotação e translação encontradas pelo programa de substituição molecular Phaser para a estrutura HAL_jcsg_71_90gPc.....	44
Tabela 4.	Valores estatísticos de refinamento da estrutura HAL_jcsg_71_90gPc.....	46
Tabela 5.	Valores globais de RSCC e RSR por cadeia .....	51
Tabela 6.	Resíduos e áreas de interface nas superfícies dos monômeros. A, B, C, e D correspondem aos monômeros do homotetrâmero. O símbolo ":" representa as inter-relações entre os monômeros, entre os resíduos e áreas de interface. Dados obtidos pela ferramenta do PDBsum.....	54
Tabela 7.	Dados das proteínas homólogas à <i>Tc</i> HAL obtidos a partir de alinhamento feito com as sequências de aminoácidos das estruturas depositadas no PDB.....	58
Tabela 8.	Representação das estruturas químicas de ligantes de proteínas homólogas.....	59

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>2xYT</b>	<i>Yeast Extract Tryptone</i> - Extrato de levedura com triptona
<b>3D</b>	Tridimensional
$\Delta\epsilon_{porresi}$	Elipticidade molar média por resíduo
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment search Tool</i> - Ferramenta de pesquisa para alinhamento local básica
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin - Albumina sérica bovina
<b>CATH</b>	<i>Class, Architecture, Topology and Homology Protein Structure Database</i> - Classe, Arquitetura, Topologia e Dados de Homologia de Estrutura de Proteína
<b>CCP4</b>	Pacote de programas ( <i>Collaborative Computational Project No.4</i> )
<b>CD</b>	<i>Circular dichroism</i> - Dicroísmo circular
<b>DLS</b>	<i>Dynamic Light Scattering</i> - Espalhamento Dinâmico de Luz
<b>COOT</b>	<i>Crystallographic Object-Oriented Toolkit</i> - Conjunto de ferramentas orientadas a objeto para cristalografia
<b>CSO</b>	Cisteína oxidada
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>EDO</b>	Etilenoglicol
<b>HEPES</b>	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic-4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfônico
<b>IPTG</b>	Isopropiltio- $\beta$ -D-galactosídeo
<b>JCSG</b>	<i>Joint Center for Structural Genomics</i> - Centro de Conjunto de Genômica Estrutural
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LNBio</b>	Laboratório Nacional de Biociências
<b>LNLS</b>	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
<b>mAU</b>	miliunidades de absorbância
<b>MES</b>	2-(N-morpholino)ethanesulfonic / 2-(N-morfolino)etanosulfônico
<b>MIO</b>	4-metilideno-5-imidazolona
<b>MIDAS</b>	<i>Modern Intelligent Dynamic Alternative Screen</i> - Conjunto Alternativo Dinâmico Inteligente Moderno
<b>mme</b>	monomethyl ether - monometil éter
<b>MMM</b>	Marcador de Massa Molecular
<b>MOPS</b>	3-(N-morpholino)propanesulfonic / 3-(N-morfolino)propanosulfônico

<b>NCBI</b>	<i>National Center of Biotechnology Information</i> - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
<b>NCS</b>	<i>Non-Crystallographic Symmetry</i> - Simetria Não Cristalográfica
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana de Saúde
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i> – Banco de dados de proteínas
<b>PEG</b>	Polietileno Glicol
<b>PGA</b>	<i>Poly-γ-glutamic acid</i> - ácido poli-γ-glutâmico
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>rmsba</b>	<i>root mean square bond angle</i> - desvios médios quadráticos de ângulos de ligação
<b>rmsbl</b>	<i>root mean square bond length</i> - desvios quadráticos de comprimentos de ligação
<b>rmscc</b>	<i>root mean square chiral center</i> - desvios médios quadráticos de centros quirais
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>rsc</b>	<i>real space correlation coefficient</i> - valor do coeficiente de correlação do espaço real
<b>rsr</b>	<i>real space residual</i> - valor residual no espaço real
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> - Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
<b>TcHAL</b>	Histidina Amônio Liase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TLS</b>	<i>Translation/Libration/Screw</i> - Translação/ Libração/ Parafuso
<b>Tris</b>	Tris-(hidroximetil)aminoetano
<b>UniProt</b>	<i>Universal Protein Resource</i> - Recurso Universal de Proteína



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
1.1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas .....	16
1.1.2 Via catabólica da histidina .....	19
1.1.3 Enzima Histidima Amônio Liase .....	21
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>22</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E COMPUTACIONAIS</b> .....	<b>24</b>
4.1 PRINCIPAIS MATERIAIS .....	24
4.2 EQUIPAMENTOS .....	24
4.3 MEIOS DE CULTIVO E ADITIVOS .....	24
4.4 SOLUÇÕES .....	25
4.5 BASE DE DADOS .....	25
4.6 PROGRAMAS E SITES ACESSADOS .....	26
4.7 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	26
4.7.1 Clonagem De enzima <i>TcHAL</i> .....	26
4.7.2 Expressão da proteína recombinante <i>TcHAL</i> .....	27
4.7.3 Extração da <i>TcHAL</i> .....	27
4.7.4 Purificação da <i>TcHAL</i> por cromatografia de afinidade .....	28
4.7.5 Quantificação de <i>TcHAL</i> .....	28
4.7.6 Avaliação da atividade enzimática da <i>TcHAL</i> .....	28
4.7.7 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) .....	29
4.7.8 Dicroísmo circular (CD) .....	29
4.7.9 Cristalização da enzima <i>TcHAL</i> .....	30
4.7.10 Coleta de dados de difração de raios X .....	30
4.8 PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS .....	31
4.8.1 Processamento das imagens de difração .....	31
4.8.2 Resolução da estrutura por substituição molecular .....	31
4.8.3 Refinamento .....	31

4.8.4 Validação .....	32
4.8.5 Análises estruturais .....	32
4.8.5.1 Enovelamento global .....	32
4.8.5.2 Sítio ativo .....	32
4.8.6 Comparações estruturais .....	33
4.8.6.1 Sobreposição com similares .....	33
4.8.6.2 Ligantes das homólogas da <i>Tc</i> HAL disponíveis no PDB .....	33
4.8.6.3 Alinhamento de sequências de <i>Tc</i> HAL e HAL humana .....	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES. ....</b>	<b>34</b>
5.1 PARTE EXPERIMENTAL .....	34
5.1.1 Obtenção da enzima <i>Tc</i> HAL .....	34
5.1.1.1 Expressão e purificação por cromatografia de afinidade .....	34
5.1.1.2 Atividade enzimática .....	36
5.1.1.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) .....	36
5.1.1.4 Dicroísmo circular (CD) da <i>Tc</i> HAL .....	36
5.1.1.4.1 Estimativa da composição de estruturas secundárias e estabilidade térmica da <i>Tc</i> HAL.....	36
5.1.1.5 Cristalização da <i>Tc</i> HAL .....	39
5.2 DETERMINAÇÃO DE ESTRUTURA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X .....	42
5.2.1 Coleta e processamento das imagens de difração .....	42
5.2.2 Substituição molecular .....	44
5.2.3 Refinamento da estrutura cristalográfica .....	46
5.2.4 Validação da estrutura .....	48
5.2.4.1 Gráfico de Ramachandran .....	48
5.2.4.2 Coeficiente de correlação no espaço real (RSCC) e valor residual no espaço real (RSR).....	49
5.2.4.3 Avaliação da geometria dos rotâmeros .....	51
5.2.5 Análises estruturais .....	53
5.2.5.1 Enovelamento global .....	53
5.2.5.2 Sítio ativo .....	54
5.2.6 Comparações estruturais .....	57
5.2.6.1 Sobreposição com similares .....	57
5.2.6.2 Ligantes das homólogas da <i>Tc</i> HAL disponíveis no PDB .....	58
5.2.6.3 Alinhamento de sequências da <i>Tc</i> HAL e HAL humana .....	63

<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>7 TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1 *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

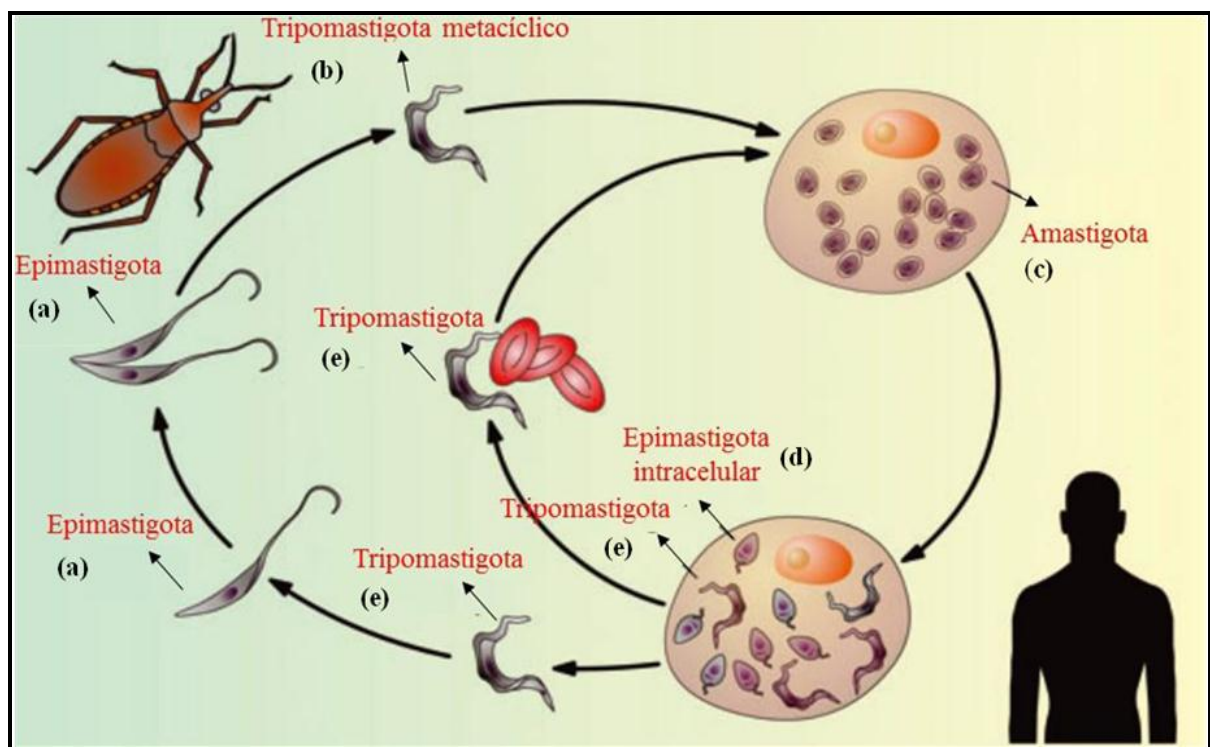
A Tripanossomíase americana, também chamada de mal de Chagas ou chaguismo, é uma infecção causada pelo protozoário parasita cinetoplastídeo *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). É considerada uma das dezessete doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2011), que têm na pobreza seu pilar de sustentação (OMS, 2002). Estima-se que entre 7 a 8 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo (OMS, 2013), principalmente nas áreas endêmicas de 21 países da América Latina (OMS, 2010). Esta doença também apresenta destaque em países desenvolvidos devido à migração (OMS 2013). De acordo com estimativas da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e da OMS, entre 7,7 a 10 milhões de pessoas estão cronicamente infectados com o *T. cruzi* e 10 a 14 mil mortes são atribuídas à doença de Chagas por ano (RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Nos Estados Unidos existem mais de 300 mil pessoas infectadas, 5,5 mil no Canadá, 80 mil na Europa, 3 mil no Japão e 1,5 mil na Austrália (COURA; VINAS, 2010). No Brasil, estima-se que cerca de 3 milhões de pessoas estejam infectadas pelo patógeno (PETHERICK, 2011).

Essa zoonose é transmitida ao ser humano e outros animais principalmente através das espécies de percevejos hematófagos, sendo o primeiro vetor descoberto foi o *Panstrongylus megistus* (CHAGAS, 1909). Além da transmissão vetorial, outros meios ocupam um papel importante na disseminação da doença: transmissão via transfusão de sangue e transplantes de órgãos de doadores infectados para receptores saudáveis, transmissão vertical durante a gravidez ou nascimento, contaminação através de acidentes de laboratório e contaminação por ingestão de líquidos ou alimentos (RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

O ciclo biológico do *T. cruzi* ocorre em insetos vetores e em mamíferos hospedeiros (Figura 1). Ao infectar o inseto vetor, mediante ingestão de sangue, a maioria dos tripomastigotas morrem na parte anterior do intestino, mas um pequeno número de parasitas migra para região do intestino médio e se transforma em epimastigotas (forma replicativa não infecciosa). Ao se multiplicarem, os epimastigotas colonizam o trato digestório, onde se diferenciam a tripomastigotas metacíclicos. Neste estágio de desenvolvimento os parasitas

não se dividem e possuem alta capacidade de infectar o hospedeiro mamífero (TYLER; ENGMAN, 2001). Durante o repasto de sangue, o inseto contaminado defeca e libera formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes e urina, as quais são levadas até o local da picada ou mucosas de forma inconsciente pelo próprio hospedeiro. Uma vez na circulação, os tripomastigotas metacíclicos invadem as células do hospedeiro e se forma um vacúolo parasitóforo temporário. Após degradação da membrana do vacúolo, os tripomastigotas metacíclicos invadem o citoplasma da célula hospedeira e se diferenciam em amastigotas (forma replicativa e infecciosa). Após sucessivas divisões no citoplasma, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas e as células hospedeiras rompem, liberando os parasitas na corrente sanguínea. Na corrente sanguínea os tripomastigotas podem ser absorvidos pelo vetor durante a alimentação, reiniciando o ciclo biológico (RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Figura 1. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. (a) Epimastigota, forma replicativa não infecciosa. (b) Tripomastigota metacíclico, predominantemente presente no inseto vetor, forma não replicativa infecciosa. (c) Formas metacíclicas invadem as células hospedeiras e se diferenciam nas formas replicativas amastigotas. (d) Estas formas dão origem a uma fase transitória chamada de epimastigota intracelular, (e) que posteriormente diferenciam-se em tripomastigotas. Os tripomastigotas rompem as células hospedeiras liberando estes parasitas na corrente sanguínea. O inseto vetor, eventualmente, pode ingerir estas formas durante o repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo biológico.



Fonte: Adaptada de Boscardin *et al.*, (2009).

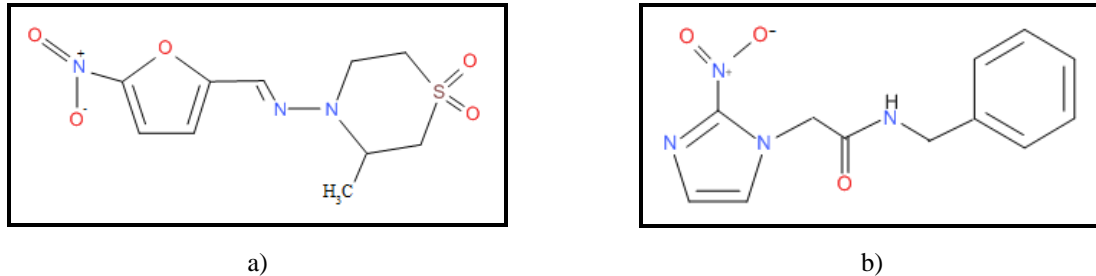
A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas em humanos: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por uma elevada parasitemia, a qual permite a identificação da espécie, porém, não apresenta resposta humoral (SILBER *et al.*, 2005). Esta fase pode durar de várias semanas a vários meses e é, quase sempre, assintomática. Em alguns casos, a fase aguda podem apresentar sintomas inespecíficos, na forma de febre e cefaléias (PAES *et al.*, 2011). A porta de entrada da infecção pode ser aparente, como o sinal de Romana. Porém, em casos mais graves, eventualmente, sintomatologias mais complexas podem ser observadas, tais como insuficiência cardíaca devido à miocardite ou derrame miocárdico, ou meningoencefalite (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006).

Na fase crônica os pacientes podem desenvolver manifestações relacionadas a cardiopatias. Outra manifestação grave na fase crônica é o comprometimento do sistema digestório (megasôfago e megacólon). Também são relatados casos em que as formas cardíaca e digestiva ocorrem simultaneamente. A fase crônica aparece depois de um longo período sem a manifestação da doença, chamado período de latência, período este que pode durar vários anos, razão pela qual esta fase indeterminada ou subclínica pode ser considerada inclusive como uma fase crônica assintomática (PAES *et al.*, 2011).

As drogas mais frequentemente utilizadas são os componentes nitroheterocíclicos Nifurtimox (Figura 2a) e o Benzonidazol (Figura 2b). Estudos indicam que o mecanismo de ação destes compostos estão relacionados com a formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. O grupo nitro (NO<sub>2</sub>) presente nestas moléculas é reduzido ao grupo amino (NH<sub>2</sub>) pela ação de enzimas do tipo nitroredutases, que atuam especificamente em sistemas moleculares do tipo R-NO<sub>2</sub> (MAYA *et al.*, 2003; MAYA *et al.*, 2007). Evidências experimentais indicam que ação antiparasitária do Nifurtimox está associada a presença de oxigênio por meio da redução do grupo nitro para radicais nitroânions instáveis, levando ao surgimento de moléculas tóxicas ao parasita (BOIANI; GONZALEZ, 2005). O Benzonidazol age no estresse redutivo, que poderia inibir a síntese de macromoléculas por ligação covalente entre intermediários de nitroredução com os componentes celulares do parasita (DÍAZ DE TORANZO *et al.*, 1988). Além disso, esta droga potencializa a fagocitose, melhorando a resposta imune do hospedeiro por meio da produção de  $\gamma$ -interferon (ROMANHA *et al.*, 2002), inibindo a fumarato redutase e interferindo com a resistência ao estresse oxidativo (TURRENS *et al.*, 1996). Ambos os fármacos podem ser considerados efetivos na fase aguda com índice de cura definida em cerca de 80% dos casos. Esse tratamento é realizado por um longo período, de 30-90 dias, e as drogas apresentam vários efeitos colaterais, tais como:

anorexia, náusea, vômito, polineuropatia periférica e dermatopatia alérgica, o que pode em alguns casos levar à interrupção do tratamento (URBINA; DOCAMPO, 2003).

Figura 2. Representação das estruturas químicas das principais drogas usadas para o tratamento da doença de Chagas. a) Nifurtimox; b) Benzonidazol.



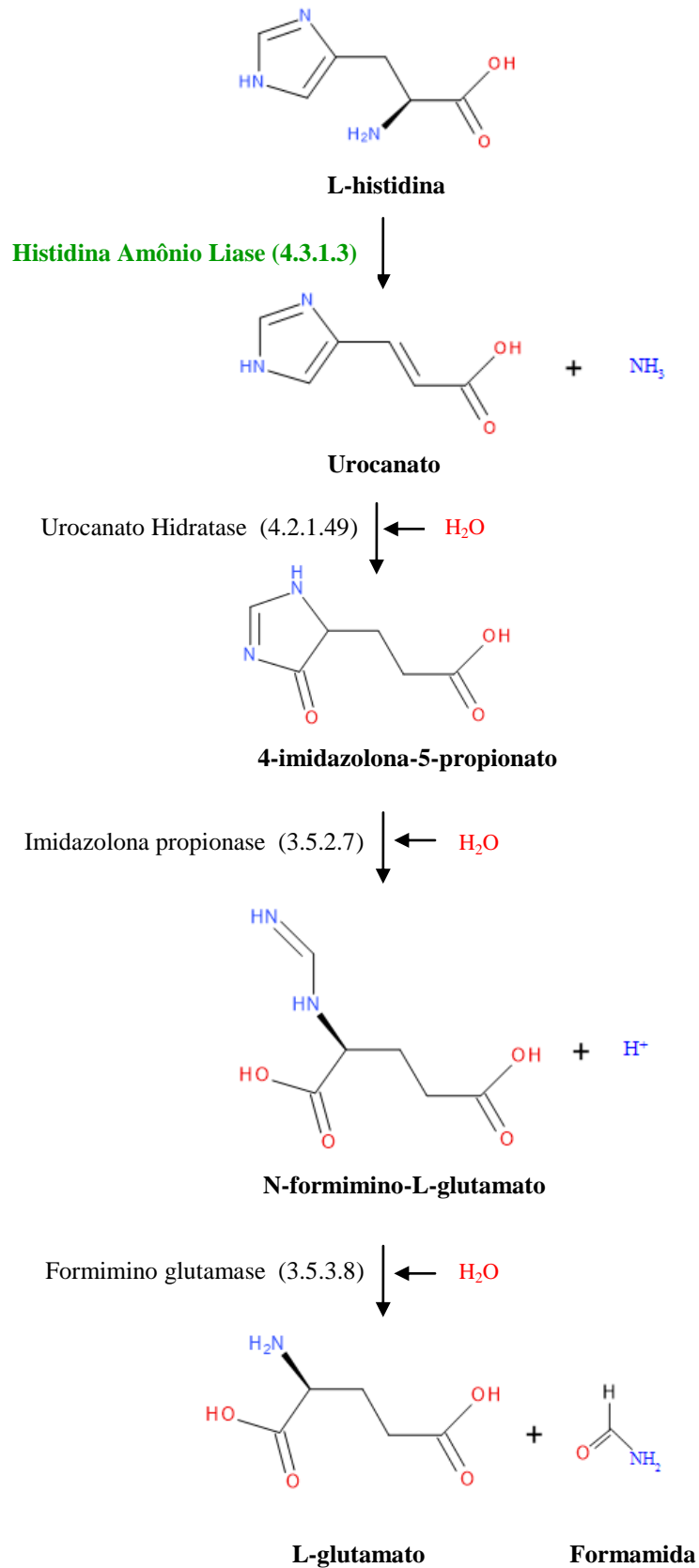
Fonte: (URBINA; DOCAMPO, 2003).

### 1.1.2 Via catabólica da histidina

As análises genômica e proteômica do *T. cruzi* contribuíram para a identificação de um grande número de alvos biológicos presentes no parasita, em sua maioria vias metabólicas, abrindo a perspectiva para o desenvolvimento de medicamentos mais específicos e menos tóxicos para o tratamento da doença de Chagas. Nessas perspectivas, alguns dos principais alvos terapêuticos considerados até o momento são: cisteína proteases, via de biossíntese de esteróis, biossíntese de poli-isoprenóides, enzimas das vias glicolíticas, via das pentoses fosfato, arginina quinase, metabolismo das poliaminas, biossíntese de lipídios, topoisomerases, proteínas editoras de RNA e estresse oxidativo (DUSCHAK; COUTO, 2007; PAES *et al.*, 2011).

Na procura por alvos terapêuticos, enzimas do metabolismo de aminoácidos que contribuem como fonte de energia ao *T. cruzi* vêm sendo estudadas. Dentre esses aminoácidos, a L-histidina tem sua degradação que leva ao glutamato e a outros produtos. Por meio de banco de dados de genomas e do proteoma do *T. cruzi*, foi possível identificar as enzimas que fazem parte desta via: histidina amônio liase (EC 4.3.1.3), urocanato hidratase (EC 4.2.1.49), imidazolona propionase (EC 3.5.2.7) e formimino glutamase (EC 3.5.3.8) (Figura 3). No caso particular deste trabalho, o interesse está na primeira enzima da via, Histidina Amônio Liase de *Trypanosoma cruzi* (TcHAL).

Figura 3. Etapas envolvidas no catabolismo da histidina em *T. cruzi*. A enzima Histidina Amônio Liase (HAL) está destacada em verde.



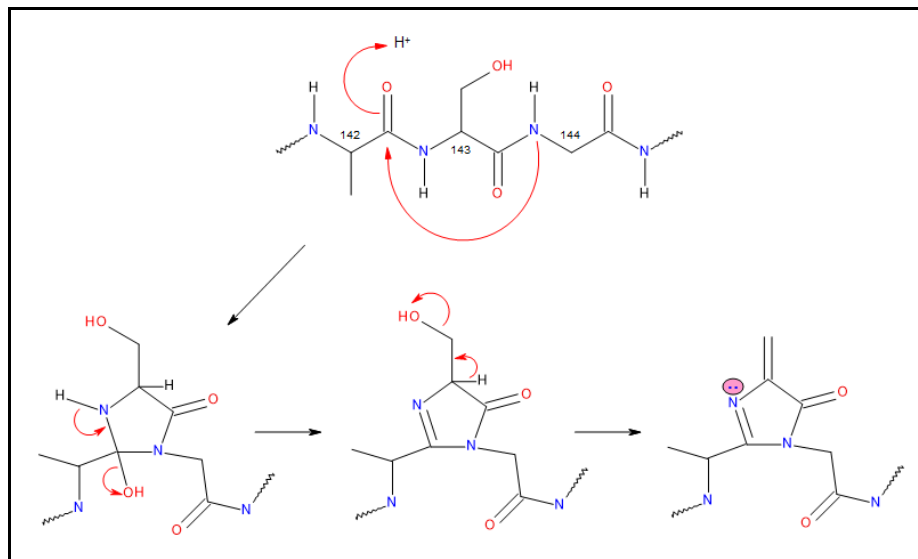


### 1.1.3 Enzima Histidina Amônio Liase

A enzima HAL (EC 4.3.1.3), também conhecida como histidase, participa da via metabólica da histidina, catalisando a desaminação não oxidativa da L-histidina a ácido urocânico (TAYLOR, 1991). A HAL já foi isolada do organismo *Pseudomonas putida* Baedeker; Schulz, (2002) e de humanos Eckhart *et al.*, (2008); Yoko *et al.*, (2005). A deficiência desta enzima no organismo humano pode levar a histidinemia, uma doença de caráter autossômico recessivo que provoca um erro inato do metabolismo de aminoácidos (YOKO *et al.*, 2005). Relatos confirmam como principais manifestações clínicas, o retardo mental e distúrbios de linguagem (SCRIVER; LEVY, 1983).

Em condições fisiológicas, a HAL é um homotetrâmero (SCHWEDE; RÉTEY; SCHULZ, 1999; CALABRESE *et al.*, 2004; CHRISTIANSON *et al.*, 2007; RÖTHER *et al.*, 2001). Cada monômero apresenta como grupo prostético 4-metilideno-5-imidazolona (MIO), ele é formado pela ciclização espontânea (autocatalítica) do segmento do tripeptídeo Ala-Ser-Gly (Figura 4) (SCHWEDE; RÉTEY; SCHULZ, 1999).

Figura 4. Mecanismo proposto para biossíntese do MIO.



Fonte: (RÉTEY, 2003).

Alguns dos compostos caracterizados como inibidores ou com significativa ação de inibição da enzima HAL são moléculas do grupo heteroaril: furanilo, tiofinilo, benzofuranilo, benzotiofenilo (KATONA *et al.*, 2006). Também a L-cisteína foi caracterizada como inibidor da enzima em *Pseudomonas putida* (KLEE, 1970).

## 2 JUSTIFICATIVA

A enzima *TcHAL*, participante da via metabólica da histidina do parasita *T. cruzi*, vem sendo expressa e estudada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Ariel Mariano Silber, do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo (USP). Outros grupos de pesquisa confirmam que ela está presente nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclico do *T. cruzi*, porém, novas investigações se fazem necessárias para caracterizar a *TcHAL* como possível alvo terapêutico para doença de Chagas (ATWOOD *et al.*, 2005). Uma vez confirmado o alvo terapêutico, passa a ser relevante o conhecimento estrutural da enzima envolvida. O presente trabalho realizado no Laboratório de Purificação de Proteínas da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) consiste em um estudo aprofundado da enzima *TcHAL* a nível molecular visando contribuir com informações estruturais relevantes. Desta forma, o presente trabalho servirá de suporte para investigações posteriores que esclareçam a participação da enzima no metabolismo do *T. cruzi*. Na comprovação da enzima como alvo terapêutico para doença de Chagas, as informações estruturais obtidas neste estudo poderão contribuir para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para doença de Chagas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Obter informações estruturais e bioquímicas da enzima *TcHAL* por Cristalografia de Raios X, Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Dicroísmo Circular (CD).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter a *TcHAL* recombinante pura e ativa no Laboratório de Purificação de Proteínas na UEPG a partir de protocolo pré-estabelecido;
- b) Realizar estudos espectroscópicos por Espalhamento Dinâmico de Luz e Dicroísmo Circular;
- c) Obter cristais da *TcHAL* adequados para coleta de difração de raios X;
- d) Resolver a estrutura tridimensional por cristalografia;
- e) Realizar estudos comparativos entre a estrutura obtida e as homólogas encontradas em banco de dados.

## 4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E COMPUTACIONAIS

### 4.1 PRINCIPAIS MATERIAIS

- Coluna HisTrap™ FF crude de 1 mL (*GE Life Sciences*);
- Concentradores, modelo Vivaspin 6, 10 kDa (*GE Life Sciences*);
- Filtro de seringa, modelo K18-230 (*Kasvi*);
- Membrana de diálise, porosidade de 14 kDa (*Spectrapor*).

### 4.2 EQUIPAMENTOS

- Agitador orbital, modelo 430-RBP (*Nova Ética*);
- Aparelho de espalhamento dinâmico de luz, modelo DynaPro MS/X (*Wyatt*);
- Autoclave vertical, modelo AV-75 (*Phoenix*);
- Autoclave horizontal, modelo MK3000 12L III (*Odontobrás*);
- Balança analítica, modelo AS 60/220/C/2 (*Radwag*);
- Câmara de biossegurança, modelo Bioseg 06 (*Veco*);
- Centrífuga refrigerada, modelo HIMAC (*HITACHI CR21GII*);
- Cromatógrafo líquido, modelo ÄKTApurifier™ UPC 10 (*GE Healthcare*);
- Difrátômetro da estação W01B-MX2 do LNLS, detector PILATUS 2M, (*Rigaku*);
- Difrátômetro, modelo D8 VENTURE (*Bruker*);
- Espectrofotômetro, modelo Cary50 Conc (*Varian*);
- Espectropolarímetro, modelo J-810 (*Jasco*);
- Sistema de eletroforese vertical, modelo PowerPac Basic (*Bio-Rad*);
- Sonicador, modelo VCX750 (*Sonics & Materials INC*);
- Ultrafreezer -86 °C, modelo NU-9668GC (*Nuare*).

### 4.3 MEIOS DE CULTIVO E ADITIVOS

Os meios de cultivo utilizados foram preparados segundo (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

- 2xYT: 16 g L<sup>-1</sup> de peptona, 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 5 g L<sup>-1</sup> de NaCl;
- Canamicina: concentração estoque de 30 mg mL<sup>-1</sup>;

- Isopropiltio- $\beta$ -D-galactosídeo (IPTG): concentração estoque de  $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ ;
- LB: triptona  $10 \text{ g L}^{-1}$ , extrato de levedura  $5 \text{ g L}^{-1}$  e NaCl  $10 \text{ g L}^{-1}$ ;
- Tetraciclina: concentração estoque de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  em etanol 70% (m/V).

#### 4.4 SOLUÇÕES

- Solução de azul de *Comassie*: 10% (V/V) ácido acético glacial, 0,25% (m/V) azul de *Comassie* R-250 e 45% (V/V) etanol;
- Solução de Bradford: 1% (m/V) azul de *Coomassie* R-250, 4,5% (V/V) etanol, 8,5% (V/V) ácido fosfórico. Após dissolução, o corante foi filtrado através de papel de filtro qualitativo;
- Solução descorante: 57% (V/V) metanol e 3% (V/V) ácido acético;
- Tampão de amostra 2X para gel SDS-PAGE:  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl pH 6,8, 4% (m/V) SDS, 0,2% (m/V) azul de bromofenol e 20% (V/V) glicerol, 0,2% (m/V)  $\beta$ -mercaptoetanol;
- Tampão de ligação:  $500 \text{ mmol L}^{-1}$  NaCl,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl pH 7,9 e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  imidazol;
- Tampão de lavagem:  $500 \text{ mmol L}^{-1}$  NaCl,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl pH 7,9 e  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  de imidazol;
- Tampão de eluição:  $500 \text{ mmol L}^{-1}$  NaCl,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl pH 7,9 e  $500 \text{ mmol L}^{-1}$  de imidazol.

#### 4.5 BASE DE DADOS

- *Class, Architecture, Topology and Homology Protein Structure Database* (CATH) (<http://www.cath.info>). Acesso em 19 de março 2015, disponível em versão 3.1;
- *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Acesso em 20 de março 2015;
- *Pictorial database of 3D structures in the Protein Data Bank* (PDBsum) (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>). Acesso em 21 de março 2015;
- *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Acesso em 17 de março 2015, disponível em versão 3.5;
- *Universal Protein Resource* (UniProt) (<http://www.uniprot.org/>). Acesso em 21 de março 2015.

#### 4.6 PROGRAMAS E SITES ACESSADOS

- ALINE, (BOND; SCHÜTTELKOPF, 2009);
- Accelerys Draw 4.1 (<http://accelrys.com/resource-center/downloads/>);
- Alscript Calcons, (BARTON, 1993);
- *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), (PARK *et al.*, 2012) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>);
- CDPro, (SREERAMA; WOODY, 2000) (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html>);
- Chainsaw, (STEIN, 2008);
- *Crystallographic Object-Oriented Toolkit* (COOT), (EMSLEY; COWTAN, 2004);
- *Diffraction Anisotropy Server*, (STRONG *et al.*, 2006) (<http://services.mbi.ucla.edu/anisoscale/>);
- DSSP, (KABSCH; SANDER, 1983);
- *Dynamics*<sup>TM</sup> (<http://www.wyatt.com/products/software/dynamics.html>);
- Mapman, (KLEYWEGT; JONES, 1996);
- MolProbity, (CHEN *et al.*, 2010);
- Multiprot, (SHATSKY; NUSSINOV; WOLFSON, 2002) (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/MultiProt/>);
- Ncont, (*COLLABORATIVE COMPUTACIONAL PROJECT, NUMBER N° 4 - PACOTE CCP4*, 1994);
- Phaser, (McCOY, *et al.*, 2007);
- Phenix, (AFONINE *et al.*, 2012);
- Procheck, (LASKOWSKI *et al.*, 1993);
- PyMOL, (DELANO, 2002);
- T-Coffee, (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000) (<http://tcoffee.crg.cat/>);
- *X-ray Detector Software* (XDS), (KABSCH, 2010).

#### 4.7 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

##### 4.7.1 Clonagem da enzima TcHAL

Através da colaboração com a Universidade de São Paulo (USP), Departamento de Parasitologia, na pessoa do Prof. Dr. Ariel Mariano Silber, foram disponibilizados clones da

bactéria *Escherichia coli* cepa BL21-DE3 portadores do plasmídeo recombinante pET-28a(+) contendo o gene codificante da enzima TcHAL (pET-28a+)/TcHAL). Essa construção possibilita expressar a enzima de interesse com um acréscimo de seis resíduos de histidina na região N-terminal.

Os clones foram propagados em inóculos de 5 mL de meio de cultura LB líquido, contendo os antibióticos canamicina e tetraciclina nas concentrações finais de 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. A multiplicação bacteriana foi obtida pela incubação a 37 °C sob agitação de 240 rpm por 16 h até atingir a saturação da cultura.

Alíquotas de 1 mL do inóculo saturado contendo 20% (V/V) de glicerol foram estocadas a -4 °C para posterior utilização.

#### 4.7.2 Expressão da proteína recombinante TcHAL

Um inóculo inicial de 5 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos canamicina 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e tetraciclina 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , suplementado com 10  $\mu\text{L}$  de estoque de células descrito no item anterior, foi incubado a 37 °C sob agitação de 240 rpm por 16 h. O inóculo inicial foi diluído na proporção de 1:100 em um novo cultivo de 1 L com o meio de cultura 2xYT contendo os antibióticos 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  canamicina e 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tetraciclina e mantido a 37 °C sob agitação de 240 rpm até atingir uma densidade óptica (DO) entre 0,5 e 0,6 a 600 nm. Atingida esta condição, as culturas de células foram induzidas com Isopropiltio- $\beta$ -D-galactosídeo (IPTG) na concentração final de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> e incubadas a 25 °C sob agitação de 150 rpm por 16 h. As culturas assim obtidas foram centrifugadas a 3800 g por 30 min à 4°C. O meio de cultura foi descartado e as células foram armazenadas a -86 °C.

#### 4.7.3 Extração da TcHAL

As células contidas em 1 L de cultura para expressão da proteína recombinante foram ressuspendidas em 40 mL de tampão de ligação (proporção de 10 mL de meio para 400  $\mu\text{L}$  de tampão). No passo seguinte, as células foram submetidas à lise por sonicação em 5 ciclos de 30 s e intervalos de descanso em gelo de 30 s entre cada ciclo. Após o rompimento celular, a amostra foi submetida a centrifugação a 15000 g por 10 min a 4 °C.

#### 4.7.4 Purificação da *TcHAL* por cromatografia de afinidade

A fração contendo as proteínas solúveis, em tampão de ligação, correspondente a 1 L de cultura bacteriana, foi utilizada para purificação por cromatografia de afinidade em resina com níquel. Uma coluna cromatográfica agarose-níquel de 1 mL foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (VC) com tampão de ligação (fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, mantido em todas as etapas). Alíquota de 10 mL do extrato protéico foi injetada na coluna e posteriormente eluídas gradualmente com 30 VC do mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna. O segundo passo de eluição foi realizado através da aplicação de 10 VC com o tampão de lavagem com concentração de imidazol de 60 mmol L<sup>-1</sup>, para a retirada das proteínas com interação fraca ou inespecífica. A proteína *TcHAL* foi eluída em gradiente composto pelos tampões de lavagem e de eluição em que a concentração de imidazol variou de 60 mmol L<sup>-1</sup> a 500 mmol L<sup>-1</sup> por 20 VC.

O grau de pureza da proteína nas frações eluídas da coluna foi avaliada visualmente por SDS-PAGE, método adaptado de Sambrook; Russel, (2001). Para aplicação em SDS-PAGE, alíquotas de 20 µL das frações eluídas foram diluídas em tampão de amostra na proporção 1:1 e desnaturadas por aquecimento a 98 °C durante 5 min. A eletroforese foi conduzida sob tensão de 160 V por 1 h. Após a eletroforese, o gel foi corado por 15 min e descorado por aproximadamente 30 min conforme soluções descritas no item 4.4.

#### 4.7.5 Quantificação da *TcHAL*

A quantificação da concentração da *TcHAL* foi realizada por espectroscopia no UV a 595 nm através do método descrito por Bradford (1976). O padrão utilizado para as curvas de calibração foi a soro albumina bovina (BSA 0,2 mg mL<sup>-1</sup>). As curvas de calibração foram feitas com concentrações de BSA entre 0,002 e 0,02 mg mL<sup>-1</sup>. Os ensaios foram realizados em triplicata e, quando necessário, as amostras foram diluídas para que os valores de absorbância obtidos ficassem próximo do ponto médio da curva de calibração.

#### 4.7.6 Avaliação da atividade enzimática da *TcHAL*

A verificação da atividade da *TcHAL* ocorreu por meio de ensaio espectrofotométrico, monitorando-se a conversão de L-histidina a urocanato. Os ensaios foram realizados em comprimento de onda fixo de 277 nm, acompanhando-se a catálise por 5 min à temperatura de 28 °C. Cada experimento independente foi realizado em cubeta de



quartzo em volume de 3 mL, mantendo as concentrações finais de: 0,9 mmol L<sup>-1</sup> de L-histidina; 16 mmol L<sup>-1</sup> de tampão Tris-HCl pH 9,0; 0,01 mmol L<sup>-1</sup> de MnCl<sub>2</sub> e 0,2 mmol L<sup>-1</sup> de glutatona reduzida. A reação foi iniciada pela adição de 480 µL da solução da enzima TcHAL a 20 µg mL<sup>-1</sup> em tampão Tris-HCl 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,9, NaCl 250 mmol L<sup>-1</sup>. O controle da reação (branco) foi obtido pela substituição do volume correspondente à solução contendo a TcHAL por volume equivalente de tampão Tris-HCl 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,9, com as demais condições experimentais mantidas.

#### 4.7.7 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A análise por DLS da proteína TcHAL foi realizada no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) utilizando-se o equipamento DynaPro (*Protein Solutions*). Para o experimento, utilizaram-se aproximadamente 70 µL de enzima a 0,2 mg mL<sup>-1</sup> em tampão Tris-HCl 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,9, NaCl 250 mmol L<sup>-1</sup>. Antes das medidas, a amostra foi centrifugada a 14000 g por 15 min a 4 °C e aplicada cuidadosamente dentro de uma cubeta de quartzo evitando-se a formação de bolhas de ar. As medidas foram realizadas em coleta de 25 aquisições por 20 s a 18 °C.

O programa usado para o cálculo do raio hidrodinâmico foi o *Dynamics*<sup>TM</sup> versão 6.12.0.3.

#### 4.7.8 Dicroísmo circular (CD)

As medidas foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-810 no LNBio, com aproximadamente 150 µL de enzima a 0,2 mg mL<sup>-1</sup> em tampão Tris-HCl 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,9, NaCl 250 mmol L<sup>-1</sup> e comprimentos de onda de 200 a 260 nm, intervalo de 1 nm, a 20 °C, utilizando-se cubeta de quartzo retangular de caminho óptico de 1 mm. Para o espectro, promediaram-se os valores de várias medidas nas mesmas condições. O CD também foi utilizado para avaliar a estabilidade térmica da enzima por meio de experimento de desnaturação em temperaturas entre 10 e 100 °C, fazendo-se a medida em passos de 1 °C. Após atingir a temperatura máxima do ensaio, a amostra foi resfriada à 10 °C, com medidas no mesmo passo anterior. O comportamento da enzima no experimento de desnaturação foi avaliado em comprimento de onda fixo de 222 nm, mantendo-se as demais condições experimentais. Contudo, para esta avaliação, dispõe-se de apenas uma medida para cada ponto experimental.

Para as estimativas das proporções de estrutura secundária, a partir do conjunto de dados obtidos no CD, foi utilizado o pacote *CDPro software package*, que reúne os três programas: SELCON3, CONTINLL e CDSSTR. Esses programas permitem estimar a percentagem de estrutura secundária ao comparar os dados experimentais com espectros de um grupo de 43 proteínas de referência (SREERAMA; WOODY, 2000). Para isso, converteram-se os dados de CD para elipticidade molar média por resíduo ( $\Delta\epsilon_{porresi}$ ).

Com o propósito de possibilitar uma melhor visualização do fenômeno, uma curva de predição foi realizada por meio do modelo Boltzmann sigmóide (análise de regressão não linear),  $Y = \text{bottom} [\theta] + [(\text{top} [\theta] - \text{bottom} [\theta]) / (1 + \exp(X50 - X) / b)]$ , onde *bottom* e *top*  $[\theta]$  correspondem aos valores máximo e mínimo, respectivamente, de elipticidade molar, *X50* é a temperatura na qual a elipticidade molar é a média entre *top* e *bottom* e *b* representa a inclinação da curva ou a dispersão da distribuição dos valores de elipticidade molar correspondentes a cada temperatura.

#### 4.7.9 Cristalização da enzima TcHAL

Para os ensaios de cristalização, a enzima foi concentrada a 10,0 mg mL<sup>-1</sup> por centrifugação à 3000 g em dispositivo Vivaspin 6, conforme quantificação feita pelo método de Bradford (1976). O método de cristalização utilizado foi a difusão de vapor por gota suspensa (MCPHERSON, 1999). Os experimentos foram conduzidos de forma manual na câmara de cristalização da UEPG em placas de 24 poços. Nestes experimentos, misturaram-se 3 µL de solução precipitante com 3 µL de solução da enzima, que foram deixados equilibrar com 500 µL da solução do poço. Os ensaios de cristalização foram mantidos a 18 °C. Foram utilizados os *kits* comerciais de cristalização: Morpheus, JCSG, Structure Screen, Clear Strategy Screen, PGA Screen e MIDAS, do fabricante Molecular Dimensions. No total foram testadas 528 condições.

#### 4.7.10 Coleta de dados de difração de raios X

Cristais obtidos em condições crioprotetoras na câmara de cristalização da UEPG foram submetidos ao difratômetro no Laboratório de Química Inorgânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Experimentos de difração dos cristais foram realizados em N<sub>2</sub> a 100 K, em comprimento de onda de 1,54 Å, detector CMOS-PHOTON 100. Os cristais

ficaram à distância de 240 mm do detector e para cada imagem oscilaram  $1,0^\circ$  com tempo de exposição de 5 ou 10 min.

Cristais obtidos subsequentemente foram selecionados com base no tamanho e submetidos a uma solução de agente crioprotetor, que consistiu do precipitante original contendo 20% (V/V) de etilenoglicol, e, em seguida, foram então colocados em uma corrente de  $N_2$  a 100 K. Os experimentos de difração de raios X foram realizados na estação W01B-MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em comprimento de onda de  $1,46 \text{ \AA}$ , detector PILATUS 2M. Os cristais ficaram à distância de 200 mm do detector e para cada imagem oscilaram  $0,5^\circ$  com tempo de exposição de 20 s, sendo normalmente duas imagens coletadas, uma a  $0^\circ$  e outra a  $90^\circ$ . A coleta foi realizada com rotação total de  $180^\circ$ .

## 4.8 PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS

### 4.8.1 Processamento das imagens de difração

Foram processados dois conjuntos de imagens obtidos na estação W01B-MX2. O pacote utilizado para indexação, integração e escalonamento das imagens foi o *X-ray Detector Software* (XDS), com auxílio dos *scripts* elaborados pelo Prof. Dr. Jorge Iulek. Estudos para corte de resolução foram realizados bem como, para o cristal HAL\_jcsg\_85\_0gAc, de exclusão de dados devido a anisotropia através do servidor *Diffraction Anisotropy Server*.

### 4.8.2 Resolução da estrutura por substituição molecular

Realizou-se uma busca pela ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponível no site do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) para identificar quais estruturas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) apresentaram "E-value" abaixo de 0,01 no BLAST, maiores percentagens de identidade e cobertura com a proteína TcHAL. Para a preparação do modelo para substituição molecular foi utilizado o programa Chainsaw e para encontrar a rotação e translação da molécula foi utilizado o programa Phaser.

### 4.8.3 Refinamento

A estrutura da TcHAL foi inicialmente submetida ao programa automatizado Phenix autobuild, que utilizou fatores de estrutura e dados de incertezas obtidas do modelo de partida resultante da substituição molecular. Em seguida o modelo foi refinado em um processo

interativo com os programas Phenix refine e *Crystallographic Object-Oriented Toolkit* (COOT). Os mapas utilizados para visualização de densidade eletrônica foram Fourier diferença mFo-DFc e densidade eletrônica 2mFo-DFc sem completar dados faltantes para evitar tendenciosidades, ponderados de acordo com Read (1986).

#### 4.8.4 Validação

Na validação do modelo foram utilizados os programas Procheck, Mapman e MolProbity.

#### 4.8.5 Análises estruturais

##### 4.8.5.1 Enovelamento global

A estrutura da HAL\_jcsg\_71\_90gPc inicialmente foi submetida à ferramenta *Class, Architecture, Topology and Homology Protein Structure Database* (CATH) para identificação da família de proteína à qual pertence. Em seguida, a estrutura foi analisada pela ferramenta PDBsum para obtenção do diagrama de topologia e também para verificação das áreas de contato entre os monômeros.

##### 4.8.5.2 Sítio ativo

O sítio ativo foi determinado de maneira indireta através da análise comparativa com estruturas de proteínas homólogas depositadas no PDB. As estruturas tridimensionais das proteínas homólogas à TcHAL foram selecionadas a partir de uma busca no PDB feita com a ferramenta BLAST, disponível no site do NCBI. O critério utilizado para seleção das estruturas homólogas foi a presença de ligantes em sua estrutura.

A partir do programa Ncont do pacote *Collaborative Computational Project* N<sup>o</sup>.4 (CCP4), foram analisados os contatos do ligante durante o procedimento de modelagem até 4 Å. Em seguida, realizou-se um alinhamento com o programa computacional T-Coffee para identificar os resíduos equivalentes dos sítios ativos da estrutura 3UNV e HAL\_jcsg\_71\_90gPc e também uma sobreposição destes sítios ativos com o programa Multiprot.

#### 4.8.6 Comparações estruturais

##### 4.8.6.1 Sobreposição com similares

As estruturas tridimensionais das proteínas foram selecionadas no PDB através da ferramenta BLAST disponível no site do NCBI. Os critérios de seleção foram as estruturas homólogas que apresentaram "E-value" abaixo de 0,01 no BLAST, maiores percentagens de identidades e coberturas com a proteína *TcHAL*. A partir das estruturas sobrepostas pelo programa MultiProt, efetuou-se um alinhamento de sequências através do programa T-Coffee.

##### 4.8.6.2 Ligantes das homólogas da *TcHAL* disponíveis no PDB

As estruturas tridimensionais das proteínas homólogas a *TcHAL* foram selecionadas a partir de uma busca no PDB feita com a ferramenta BLAST disponível no site do NCBI. O critério utilizado para seleção das homólogas foram as estruturas que apresentaram "E-value" abaixo de 0,01 no BLAST e presença de ligantes em sua estrutura. As estruturas dos ligantes foram organizados por semelhança às estruturas do substrato L-histidina e do produto urocanato (Tabela 8).

##### 4.8.6.3 Alinhamento de sequências da *TcHAL* e HAL humana

A etapa inicial foi buscar a sequência de aminoácidos da HAL humana através do banco de dados do *Universal Protein Resource* (UniProt). Em seguida, realizou-se um alinhamento entre as duas sequências pelo programa T-Coffee, a fim de possibilitar uma comparação, sobretudo, dos resíduos existentes na cavidade dos sítios ativos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

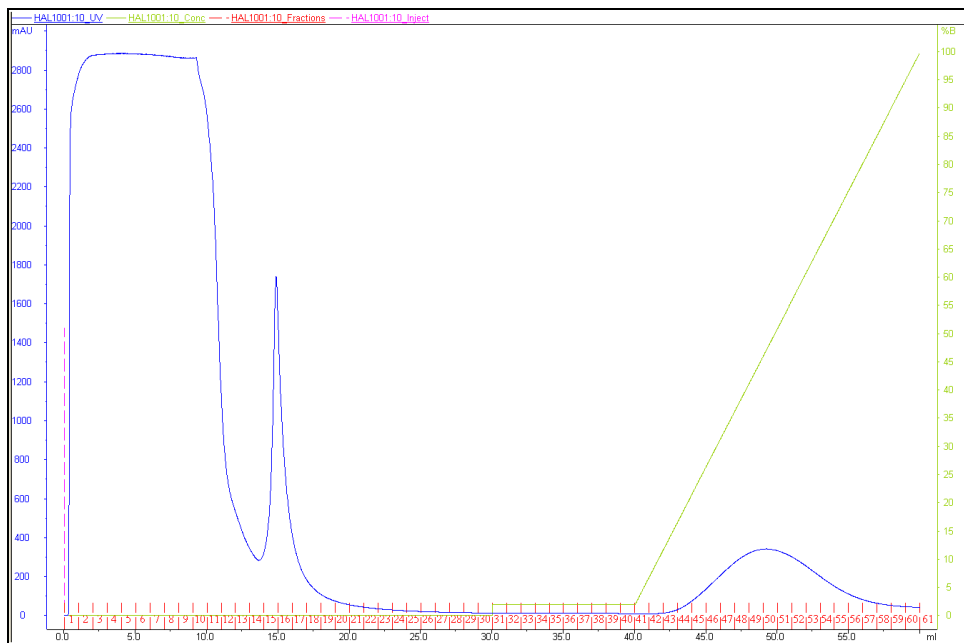
### 5.1 PARTE EXPERIMENTAL

#### 5.1.1 Obtenção da enzima TcHAL

##### 5.1.1.1 Expressão e purificação por cromatografia de afinidade

A expressão da enzima recombinante foi confirmada na fração solúvel pela análise de SDS-PAGE. A fração solúvel foi submetida à cromatografia de afinidade em resina contendo níquel imobilizado. O perfil cromatográfico apresentou dois picos logo após a injeção, com máximos correspondentes a mais de 2882 e a 1740 mAU (miliunidades de absorvância a 280 nm), durante o processo de lavagem da resina com 60 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol. Após essa retirada da maioria dos contaminantes, durante o gradiente de imidazol (60 mmol L<sup>-1</sup> a 500 mmol L<sup>-1</sup>) observou-se a formação de um terceiro pico com máximo de absorvância de 333 mAU, referente à enzima de interesse que foi eluída de 95 mmol L<sup>-1</sup> a 412 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol (Figura 5).

Figura 5. Cromatograma das frações eluídas (representadas em vermelho) durante a purificação da TcHAL por cromatografia de afinidade. A linha rosa tracejada representa a posição do início da injeção do extrato protéico. A linha azul representa a miliabsorbância enquanto que a verde relaciona-se, de forma não proporcional, à concentração de imidazol, que foi 5 mmol L<sup>-1</sup> para as frações 31 a 40, 60 mmol L<sup>-1</sup> para as frações 31 a 40 e aumentada linearmente de 60 a 500 mmol L<sup>-1</sup> para as frações 41 a 60.



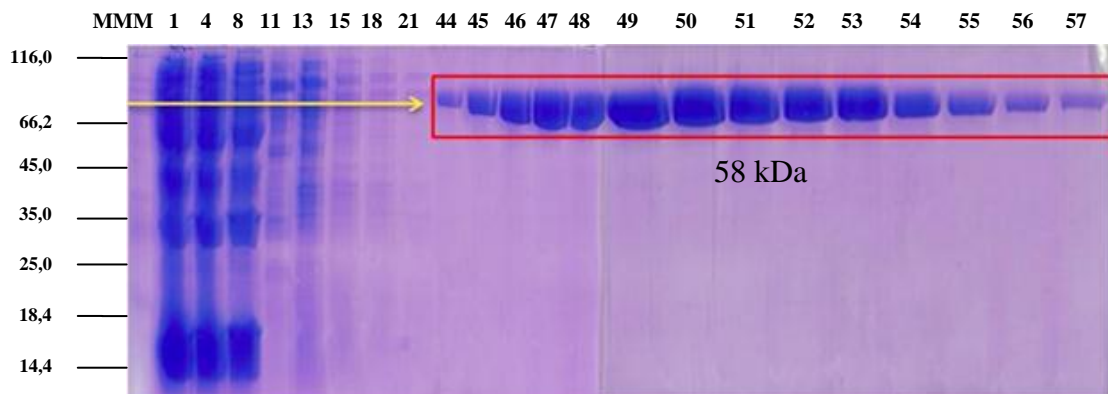
Fonte: O Autor.

A figura do gel das frações (Figura 6), observaram-se as proteínas contaminantes correspondentes as frações 1 a 43, que foram descartadas. Nas frações 44 a 57 (terceiro pico do cromatograma) foi observada a presença da proteína *Tc*HAL purificada (58kDa), evidenciando a eficiência do protocolo de purificação utilizado. Assim, esta única etapa cromatográfica foi suficiente para a purificação da enzima de interesse, sendo estimado pelo método de Bradford, (1976) um rendimento de 13 mg de proteína pura por litro de meio de cultura.

O padrão eletroforético foi utilizado como referência para junção das frações purificadas, dessa forma, as frações 44 a 57 foram reunidas e submetidas a diálise para retirada de imidazol (em passo de 50 mmol L<sup>-1</sup>). A solução protéica dialisada em baixas concentrações de imidazol não se apresentou estável, ocorrendo a precipitação da proteína. Novo lote de proteína foi purificado, conforme descrito anteriormente, porém, em virtude da precipitação optou-se em manter o imidazol para os posteriores procedimentos. Uma possível justificativa da solubilidade da proteína *Tc*HAL na presença do imidazol deve-se à semelhança desta molécula com o substrato L-histidina.

O alto grau de pureza da amostra é crucial para a etapa de cristalização de proteínas (DRENTH, 1999). Em geral, considera-se um grau de pureza da amostra protéica entre 90-95% como satisfatório para o início dos ensaios de cristalização (<http://www.structbio.missouri.edu/crystallography-tips.php>). Para otimizações de condições é recomendado um grau de pureza ainda maior, entre 95-99%. Contaminações podem interferir no processo de nucleação e na obtenção de cristais adequados (BENVENUTI; MANGANI, 2007).

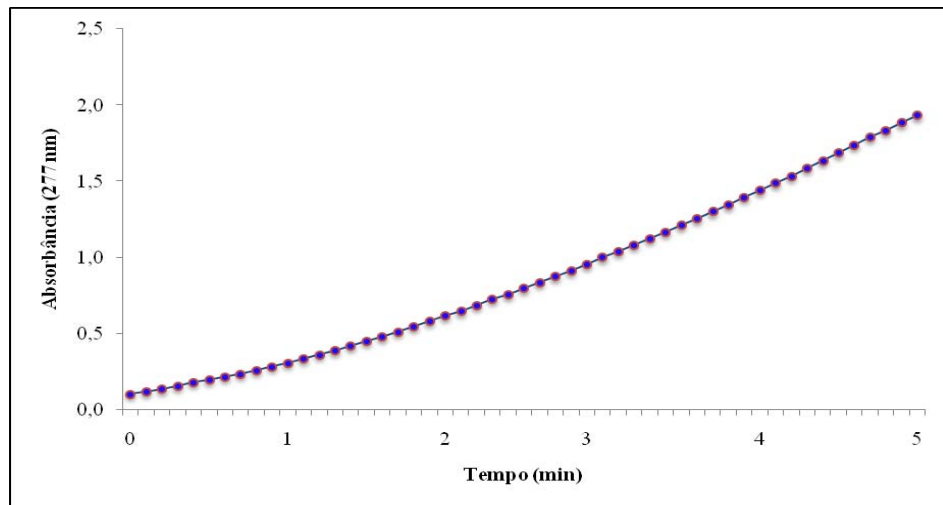
Figura 6. Figura do gel em SDS-PAGE 12% das frações da cromatografia de afinidade. Raia MMM contém os marcadores de massa molecular (kDa): 116,0-66,2 - 45,0-35,0 - 25,0-18,4 - 14,4. 15 µL de solução de proteína foram injetadas por raia. A linha em vermelho destaca as bandas da *Tc*HAL purificada (58 kDa).



### 5.1.1.2 Atividade enzimática

A Figura 7 mostra aumento de absorvância ao longo do tempo relacionado à formação de urocanato. As absorvâncias mostradas foram subtraídas das absorvâncias de ensaio em que a enzima estava ausente, que por sinal ficaram próximas a zero.

Figura 7. Teste de atividade enzimática da *TcHAL*. A linha azul representa o aumento da absorvância, evidenciando a atividade enzimática.



Fonte: O Autor.

### 5.1.1.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A análise por DLS da enzima *TcHAL* foi conclusiva e permitiu estimar a dispersão oligomérica da proteína em solução. Os resultados revelaram que a amostra encontrava-se majoritariamente monodispersa, com um índice de polidispersividade em torno de 10%. Em geral, considera-se uma amostra homogênea (monodispersa) com valor menor de 15% de polidispersão (BERGFORS, 2009). A monodispersão aumenta a probabilidade de nucleação e formação de cristais (ZULAUF; D'ARCY, 1992).

### 5.1.1.4 Dicroísmo circular (CD) da *TcHAL*

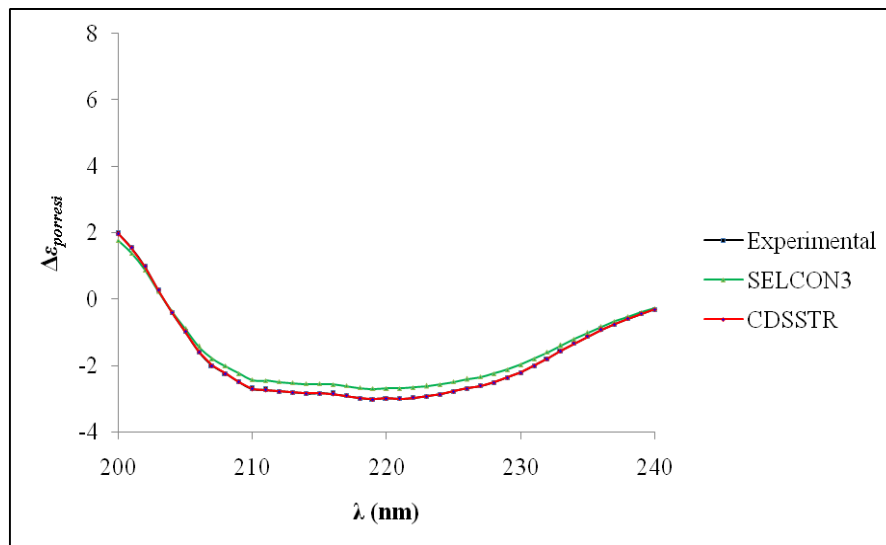
#### 5.1.1.4.1 Estimativa da composição de estruturas secundárias e estabilidade térmica da *TcHAL*

A espectroscopia de CD foi utilizada para estimar a quantidade de estruturas secundárias. O gráfico representado na Figura 8 permite identificar que a enzima *TcHAL*



apresenta mínimos em cerca de 210 e 222 nm. O mínimo próximo a 222 nm é atribuída a estruturas helicoidais (BEROVA; NAKANISHI; WOODY, 2000). Desta forma, observa-se um espectro característico de proteína composta majoritariamente por hélices- $\alpha$ . Vale destacar que os resultados obtidos pelo programa CONTINLL não estão apresentados neste estudo de CD devido à instabilidade do algoritmo que não convergiu com os resultados experimentais.

Figura 8. Espectro de dicroísmo circular da enzima *TcHAL*. A legenda mostra o perfil experimental e aqueles obtidos a partir de modelos com os programas SELCON3 e CDSSTR para quantidade de estruturas secundárias.



Fonte: O Autor.

A média da desconvolução do espectro pelos dois programas utilizados indicou que a enzima *TcHAL* é constituída de cerca de 36,2% hélices- $\alpha$  regular, 20,7% de hélices- $\alpha$  desordenadas, 3,6% de fitas- $\beta$  regular, 8,1% de fitas- $\beta$  desordenadas, voltas 14,6% e desordenadas de 17,7%, como pode ser visto na Tabela 1. Hélice- $\alpha$  é a estrutura secundária mais estável (LEHNINGER, 2011), em média, 33% dos resíduos em proteínas globulares ocorrem nessa estrutura (BEROVA; NAKANISHI; WOODY, 2000). Somando-se as percentagens estimadas de hélices- $\alpha$  regulares e desordenadas acima citadas, observa-se a predominância deste elemento de estrutura secundária, perfazendo um total de 56,9%. Esse valor, quando comparado com as estruturas homólogas depositadas no PDB sob os códigos 1GKM e 3KDY, que têm % de hélices- $\alpha$  calculadas pelo programa DSSP de 55% e 52%, respectivamente, realça a semelhança entre essas proteínas.

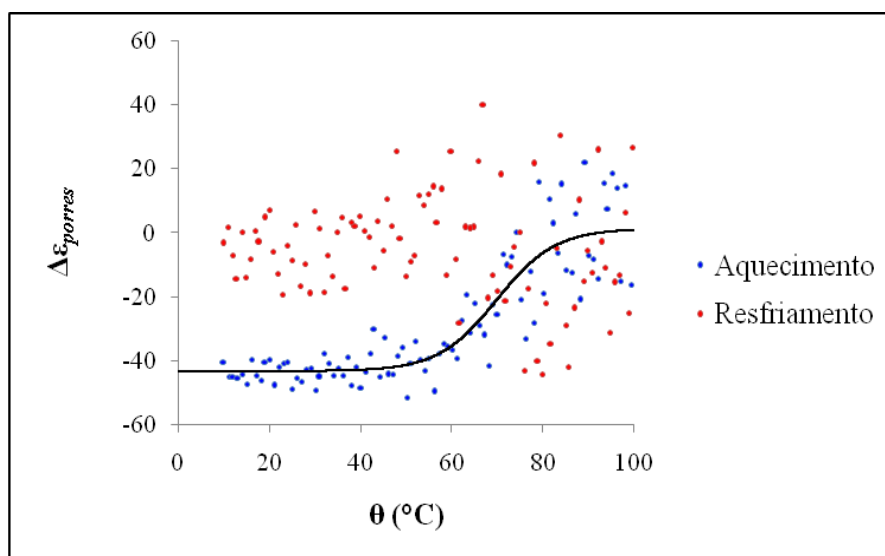
Tabela 1. Estimativas de estrutura secundária da enzima *Tc*HAL. Valores, médias e desvios padrão em percentagens obtidos a partir da desconvolução pelos programas utilizados (SELCON3 e CDSSTR).

ESTRUTURAS	SELCON3	CDSSTR	MÉDIA±DP
$\alpha$ -hélices (regular) (%)	36,5	35,9	36,2±0,3
$\alpha$ -hélices (desordenada) (%)	19,5	21,9	20,7±1,2
Fitas $\beta$ (regular) (%)	2,70	4,50	3,6±0,9
Fitas $\beta$ (desordenada) (%)	3,10	13,2	8,1±5,0
Voltas (%)	17,3	12,0	14,6±2,6
Desordenada (%)	23,1	12,3	17,7±5,4

Fonte: O Autor.

O estudo de estabilidade térmica da *Tc*HAL por CD foi realizado com a elevação da temperatura da solução protéica de 10 a 100 °C. Embora a grande dispersão dos pontos pela falta de medidas múltiplas para promediação, pode-se desprender pelo gráfico da Figura 9 que quando atingiu aproximadamente 68 °C a proteína perdeu cerca de metade de sua estrutura secundária, aumentando assim as regiões desorganizadas, caracterizando a desnaturação da proteína. A desnaturação parece irreversível já que mesmo após o resfriamento até 10 °C não há recuperação do sinal.

Figura 9. Espectro de desnaturação térmica da enzima *Tc*HAL obtido pela técnica de dicroísmo circular. Monitoramento do mínimo em 222 nm com variação da temperatura durante o aquecimento (10 a 100 °C) com resfriamento (100 a 10 °C) subsequente.

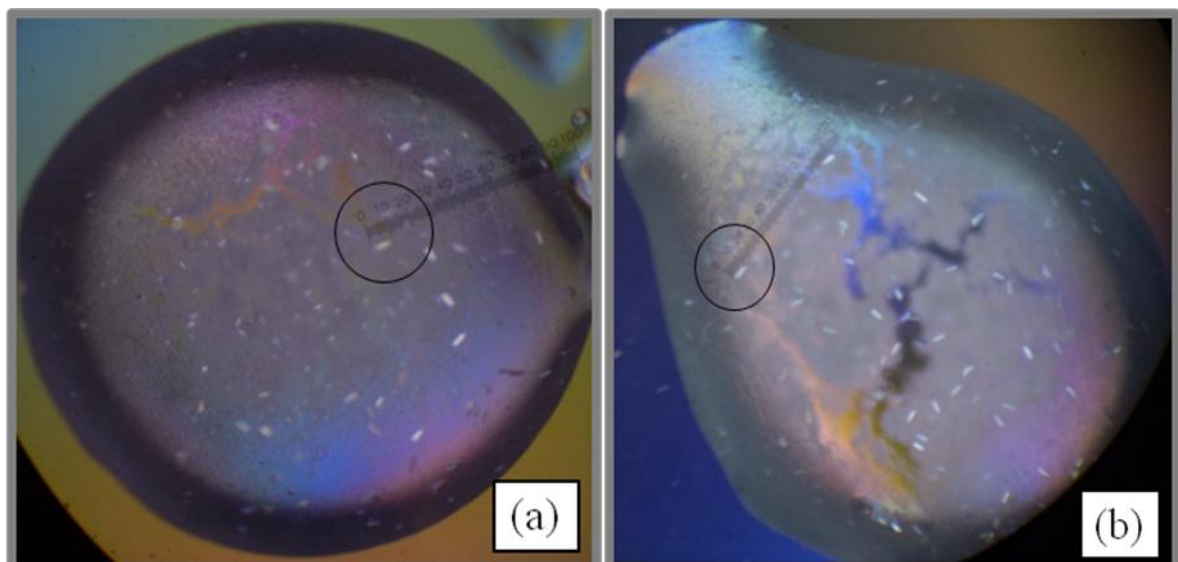


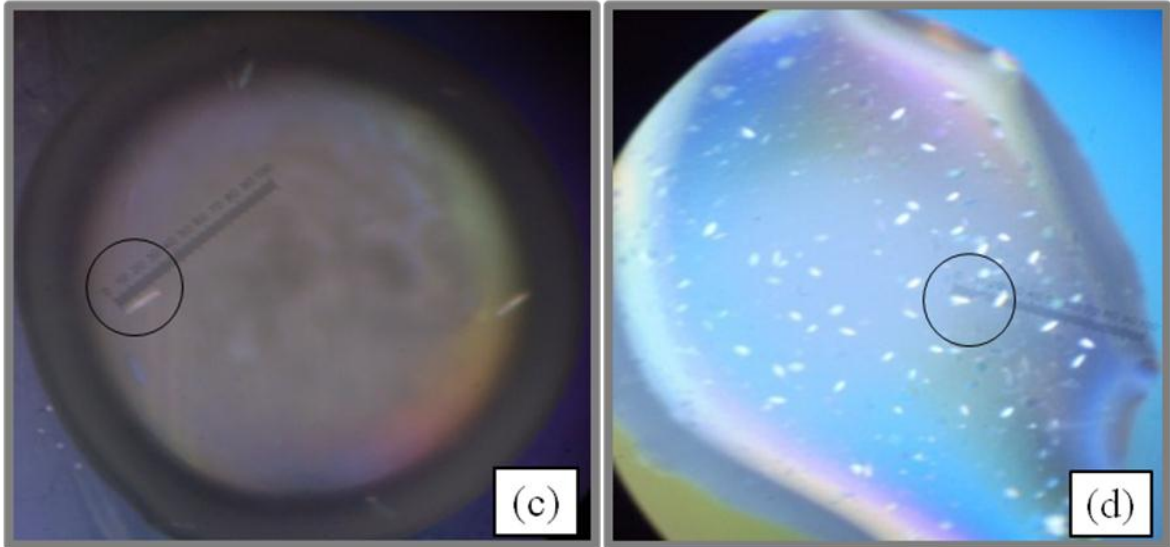
Fonte: O Autor.

### 5.1.1.5 Cristalização da TcHAL

Nos primeiros ensaios de cristalização realizados na UEPG, observou-se a formação de pequenos e numerosos cristais em três condições do *kit* Morpheus e em uma condição do *kit* JCSG. No caso do *kit* Morpheus, após 5 dias da realização do experimento, observou-se a formação de cristais nas seguintes condições: (a) 10% (m/V) de Polietileno Glicol (PEG) 8.000, 20% (V/V) de Etilenoglicol (EDO), 0,12 mol L<sup>-1</sup> de etilenoglicóis (Di-Tri-Tetra-Penta), 0,1 mol L<sup>-1</sup> de *Buffer System* 1 pH 6,5 (composto de imidazol e MES ácido); (b) 10% (m/V) de PEG 8.000, 20% (V/V) de etilenoglicóis, 0,12 mol L<sup>-1</sup> de monossacarídeos (D-Glucose; D-Manose; D-Galactose; L-Fucose; D-Xilose; N-Acetil-D-Glucosamina), 0,1 mol L<sup>-1</sup> de *Buffer System* 1 pH 6,5; (c) 10% (m/V) de PEG 8.000, 20% (V/V) etilenoglicóis, 0,12 mol L<sup>-1</sup> de monossacarídeos, 0,1 mol L<sup>-1</sup> *Buffer System* 2 pH 7,5 (composto de HEPES sódico e MOPS ácido). Já no caso do *kit* JCSG, após 18 dias houve a formação de cristais na seguinte condição: (d) 0,8 mol L<sup>-1</sup> fosfato de sódio monobásico monohidratado, 0,8 mol L<sup>-1</sup> fosfato de potássio monobásico, 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão HEPES-Na, pH 7,5. Na Figura 10 estão representados os cristais obtidos em forma de agulha.

Figura 10. Cristais obtidos com a utilização do *kit* Morpheus e JCSG. Enzima TcHAL a 10,0 mg mL<sup>-1</sup>. Dimensões aproximadas dos maiores cristais de cada condição: (a) 80 μm × 15 μm; (b) 90 μm × 15 μm; (c) 220 μm × 22 μm e (d) 100 μm × 15 μm.



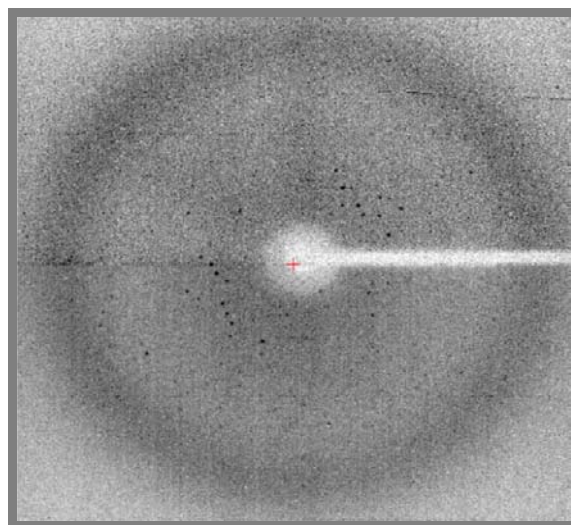


Fonte: O Autor.

Foram submetidos ao ensaio de difração os cristais destacados na Figura 10 (a, b, c e d). Também foram testados diversos outros cristais de cada condição. Todos os cristais analisados indicaram tratar-se cristais de proteína pela inexistência de reflexões nas imagens obtidas, com a exceção do caso comentado abaixo. Cristais de sal, em sua maioria, mesmo que pequenos ou com átomos não totalmente organizados, apresentam padrão de difração de raios X (<http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Crystals/shooting.html>).

O cristal em destaque na Figura 10 (c) apresentou um padrão de difração típico para proteínas com reflexões até aproximadamente 3,5 Å de resolução (Figura 11).

Figura 11. Melhor padrão de difração obtido a partir dos cristais crescidos em 10% (m/V) de PEG 8.000, 20% (V/V) etilenoglicóis, 0,12 mol L<sup>-1</sup> de monossacarídeos, 0,1 mol L<sup>-1</sup> *Buffer System 2* pH 7,5.

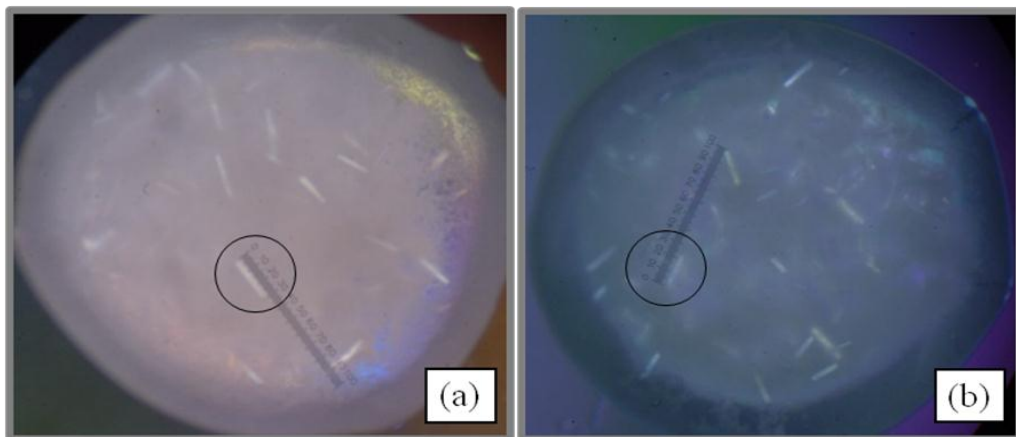


Fonte: O Autor.

Apesar da baixa resolução obtida, esses resultados preliminares permitiram determinar quais as condições mais favoráveis para cristalização da *TcHAL*. Portanto, estas condições foram refinadas com o uso da solução de proteína em três concentrações (5,0, 7,5 e 10,0 mg mL<sup>-1</sup>), da variação do pH (6,1, 6,3, 6,5, 6,7) e do agente precipitante (neste momento com composição alterada devido à indisponibilidade dos componentes, etilenoglicóis e monossacarídeos) em várias concentrações (18, 22, 26, 30, 34 e 38%). Após 3 dias da realização dos testes de refinamento, todavia, observou-se apenas a formação de precipitado amorfo e ausência de cristais.

A reprodutibilidade em experimentos de cristalização sofre influência de diversos fatores (Rupp, 2010), entre eles: grau de pureza da proteína, qualidade e teor mínimo dos reagentes utilizados, entre outros. Nesse contexto, uma possível explicação do insucesso na etapa de refinamento está relacionada à dificuldade de reproduzir as condições de cristalização iniciais com variações tênues de pH, concentração do agente precipitante e, particularmente neste caso, o fato de que nem todos os reagentes necessários para os experimentos de refinamento encontravam-se disponíveis. Assim, teve-se que realizar as substituições da solução de etilenoglicóis (Di-Tri-Tetra-Penta) por monotilenoglicol e da solução de monossacarídeos (D-Glucose; D-Manose; D-Galactose; L-Fucose; D-Xilose; N-Acetil-D-Glucosamina) por D-Glucose e D-Manose. Em meio aos ensaios de refinamento de cristalização, após 60 dias foram observados cristais em duas novas condições do *kit* JCSG: (a) 0,2 mol L<sup>-1</sup> de sulfato de lítio, 1,26 mol L<sup>-1</sup> sulfato de amônio, 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão tris pH 8,5; (b) 1 mol L<sup>-1</sup> ácido succínico, 1% (m/V) de PEG mme 2.000, 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão HEPES pH 7,0. Na Figura 12, estão representados os cristais obtidos, forma de bastões.

Figura 12. Cristais obtidos com a utilização do *kit* JCSG. Enzima *TcHAL* a 10,0 mg mL<sup>-1</sup>. Dimensões aproximadas dos maiores cristais de cada condição: (a) 300 µm × 40 µm e (b) 250 µm × 25 µm.



Fonte: O Autor.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DE ESTRUTURA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X

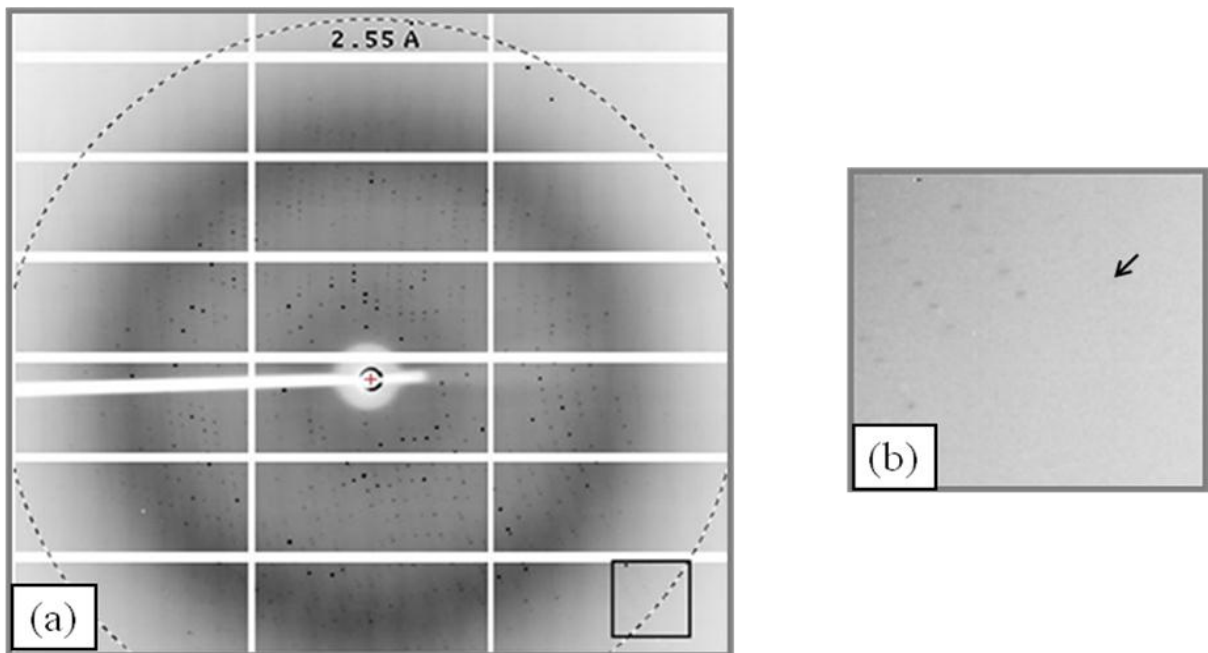
### 5.2.1 Coleta e processamento das imagens de difração

Foram processados dois conjuntos de imagens obtidos na linha de cristalografia de proteínas W01B-MX2 do LNLS. Estatísticas apresentadas na Tabela 2 em coluna correspondente foram obtidas a partir do processamento de dados de difração do cristal HAL\_jcsg\_71\_90gPc, em destaque na Figura 12 (b). A indexação e o processamento mostraram que o cristal pertence ao grupo de espaço  $P2_12_12_1$ , com as medidas de cela unitária  $a= 87,81$ ,  $b= 144,55$  e  $c= 173,76$  Å, correspondente a cristais de estrutura cristalina primitiva ortorrômbica.

O cristal HAL\_jcsg\_85\_0gAc apresentado na Figura 10 (d), também foi submetido a coleta de dados de difração. Suas estatísticas de processamento também são apresentadas na Tabela 2. Este cristal pertence também ao grupo de espaço  $P2_12_12_1$ , mas com as medidas de cela unitária  $a= 111,27$   $b= 121,47$  e  $c= 179,30$  Å. No processamento das imagens observou-se uma acentuada anisotropia (amplitude entre os 3 componentes principais de  $31,14$  Å<sup>2</sup>) e com pontos que difrataram a um limite máximo  $2,82$  Å de resolução.

Para resolução da estrutura tridimensional da *TcHAL*, foram utilizados os dados obtidos do cristal HAL\_jcsg\_71\_90gPc, difratados a um limite máximo  $2,55$  Å de resolução, decidido após amplo estudo por Karplus; Diederichs (2012), de forma que na última faixa de resolução  $\langle I/\sigma(I) \rangle = 2,0$  e  $CC_{1/2} = 73,2\%$ , além dos valores globais de mosaicidade =  $0,24^\circ$ , completude =  $98,6\%$  e multiplicidade =  $4,6$ . A Figura 13 (a) apresenta uma imagem do padrão de difração de raios X obtido para esse cristal. A circunferência à  $2,55$  Å indica o limite máximo de resolução em que se utilizaram os dados.

Figura 13. (a) Imagem de difração do cristal HAL\_jcsg\_71\_90gPc com pontos difratados à 2,55 Å de limite de resolução. (b) Ampliação da região da imagem de difração com a seta representando o ponto de reflexão coletado a 2,55 Å.



Fonte: O Autor.

A unidade assimétrica da *TcHAL* contém um tetrâmero de massa molecular 235,616 Da, conseqüentemente, o coeficiente de Mathews é  $2,38 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  (MATHEWS, 1968) e a percentagem em volume do solvente no cristal igual a 48,2%. Coletaram-se 390 imagens com rotação do cristal por  $0,5^\circ$  por imagem. A partir do conjunto de reflexões, aproximadamente 2,8% das reflexões (número total de 2.004) foram marcadas para serem utilizadas no cálculo de  $R_{free}$ .

Tabela 2. Dados estatísticos do processamento. Os valores entre parênteses correspondem à última faixa de resolução.

ÍNDICES CRISTALOGRAFICOS	HAL_jcsg_71_90gPc	HAL_jcsg_85_0gAc
N° de imagens	390	362
Grupo de espaço	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
a, b, c (Å)	87,81; 144,55;173,76	111,27; 121,47; 179,30
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90	90
Mosaicidade (°)	0,24	0,51
Faixa de resolução (Å)	111,13-2,55 (2,63-2,55)	27,97-2,82 (2,90-2,82)
N° total de reflexões	435251 (28864)	220281 (4221)
N° de reflexões únicas	72424 (6307)	47252 (956)
Completeza (%)	99,3 (98,6)	80,2 (22,2)
Multiplicidade	6,0 (4,6)	3,7 (1,0)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	11,9 (2,0)	7,5 (2,4)
$R_{\text{merge}}$ (%)	17,1 (83,6)	31,2 (81,2)
$R_{\text{meas}}$ (%)	19,0 (94,6)	35,1 (92,2)
CC <sub>1/2</sub> (%)	99,1 (73,2)	98,0 (70,3)
Porcentagem de solvente (%)	48,2	52,9
N° moléculas por unidade assimétrica	4	4
Coefficiente de Mathews (Å <sup>3</sup> Da <sup>-1</sup> )	2,38	2,61
Fator B do gráfico de Wilson plot (Å <sup>2</sup> )	39,49	61,24

Fonte: O Autor.

### 5.2.2 Substituição molecular

A estrutura de referência para substituição molecular foi a Histidina Amônio Liase de *Pseudomonas putida* de código no PDB 1GKM (BAEDEKER; SCHULZ, 2002), que apresenta 42% de identidade e 94% de cobertura. A Figura 14 mostra o alinhamento realizado pelo programa T-Coffee e representado no programa Aline. Para a estrutura HAL\_jcsg\_71\_90gPc, encontraram-se 4 soluções de função de rotação e translação (Tabela 3) cujo refinamento de corpo rígido resultou  $R_{\text{factor}}$  e  $R_{\text{free}}$  de 0,4739 e 0,4856.

Tabela 3. Soluções de rotação e translação encontradas pelo programa de substituição molecular Phaser para a estrutura HAL\_jcsg\_71\_90gPc.

Soluções	Ângulo de rotação ( $\alpha, \beta, \gamma$ )	Deslocamentos fracionários (x, y, z)
1°	259,71/ 134,02/ 349,23	0,013/ 0,017/ 0,117
2°	83,90/ 45,95/ 191,09	0,013/ 0,022/ 0,117
3°	264,47/ 130,48/ 172,26	0,007/ 0,020/ 0,116
4°	81,09/ 49,76/ 12,77	0,010/ 0,020/ 0,119

Fonte: O Autor.



Figura 14. Alinhamento da sequência de aminoácidos da enzima TcHAL com a proteína mais similar disponível no PDB, HAL de *Pseudomonas putida*. Em vermelho estão representadas as estruturas secundárias obtidas por meio do programa DSSP; em preto e tons de cinza está indicada a conservação dos resíduos de acordo com a convenção de Alscript Calcons.



Fonte: O Autor.

### 5.2.3 Refinamento da estrutura cristalográfica

Após a resolução da estrutura por substituição molecular, o modelo inicial foi melhorado pelo programa automatizado Phenix.autobuild. Em seguida, o modelo foi refinado num processo interativo alternando-se ciclos de construção manual, utilizando-se os programas Phenix.refine e COOT. Observou-se então que o intervalo de resíduos 265 a 284 está desordenado, situação semelhante à região correspondente à homóloga, como sugerido pelo alinhamento da Figura 14. Na região C-terminal observou-se uma densidade eletrônica alta onde foram adicionados os 4 últimos resíduos em todas as cadeias.

As moléculas de água foram introduzidas e avaliadas em relação à autenticidade pelos valores de fator B, pelos mapas de densidade eletrônica e ligações de hidrogênio.

Ao final do refinamento os valores de  $R_{\text{factor}}$  e  $R_{\text{free}}$  convergiram para 0,1921 e 0,2458, respectivamente. Como grupos para translação, libração e parafuso (TLS), após testes, decidiu-se usar um grupo por cadeia. Já quanto à simetria não cristalográfica (NCS), verificou-se que o uso limitado desta pode ser benéfico mas deve implicar na análise praticamente resíduo a resíduo dos átomos a serem incluídos, pois testes com abrangências automáticas tradicionais trouxeram prejuízos significativos à geometria, portanto, por enquanto não se incluíram estas restrições. A estatística final do refinamento está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Valores estatísticos de refinamento da estrutura HAL\_jcsg\_71\_90gPc.

	HAL_jcsg_71_90gPc
$R_{\text{factor}}$	0,1921
$R_{\text{free}}$	0,2458
rmsbl / Å	0,002
rmsba / °	0,649
rmscc / Å <sup>3</sup>	0,021
rsr global	0,1341
rsc global	0,9439
Fator B médio proteína / Å	36,17
Nº de resíduos	2.034
Nº de moléculas de água	1.187

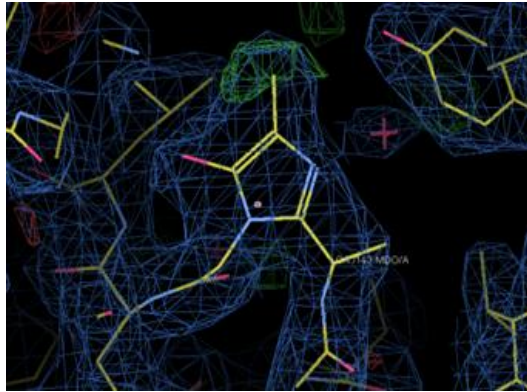
*rmsbl*: desvios quadráticos de comprimentos de ligação; *rmsba*: desvios médios quadráticos de ângulos de ligação; *rmscc*: desvios médios quadráticos de centros quirais; *rsr*: valor residual no espaço real; *rsc*: valor do coeficiente de correlação do espaço real.

Fonte: O Autor.

Durante o refinamento observou-se que como em estruturas homólogas depositadas no PDB, por exemplo, códigos 1GKM, 3KDY, 2O6Y e 3UNV, o segmento do tripeptídeo

Ala<sup>143</sup> - Ser<sup>144</sup> - Gly<sup>145</sup> é transformado em um resíduo modificado, 4-metilideno-5-imidazolona, cuja identificação por 3 letras no PDB é MDO, por um mecanismo de reação autocatalítico (SCHWEDE; RÉTEY; SCHULZ, 1999). Assim, estabeleceram-se as restrições geométricas respectivas e refinou-se com este resíduo modificado. A qualidade de ajuste do MDO<sup>143</sup> na densidade eletrônica da cadeia do monômero A pode ser observada na Figura 15.

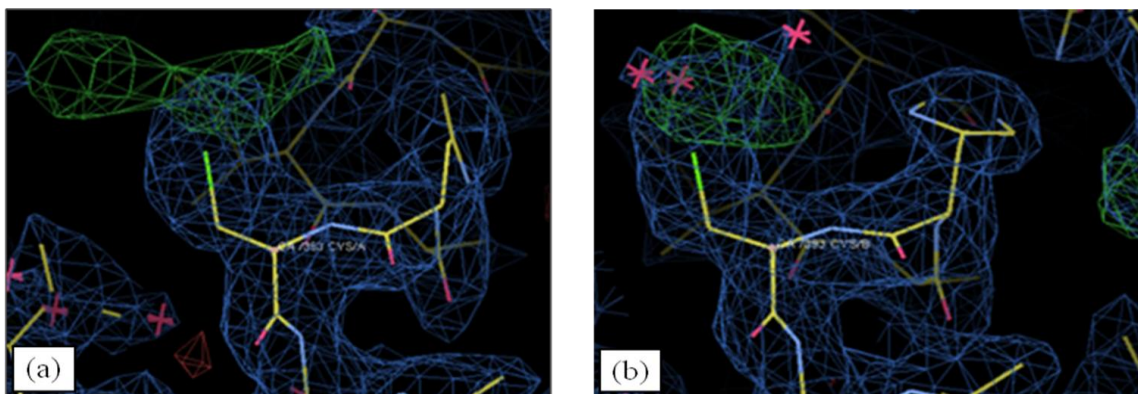
Figura 15. Qualidade de ajuste na densidade eletrônica para o resíduo modificado MDO<sup>143</sup> do monômero A. Figura produzida pelo programa COOT. Os mapas de densidade eletrônica (azul) foram desenhados com 1  $\sigma$  de contorno, mapas de Fourier diferença com contornos em + 3  $\sigma$  (verde) e -3  $\sigma$  (vermelho).

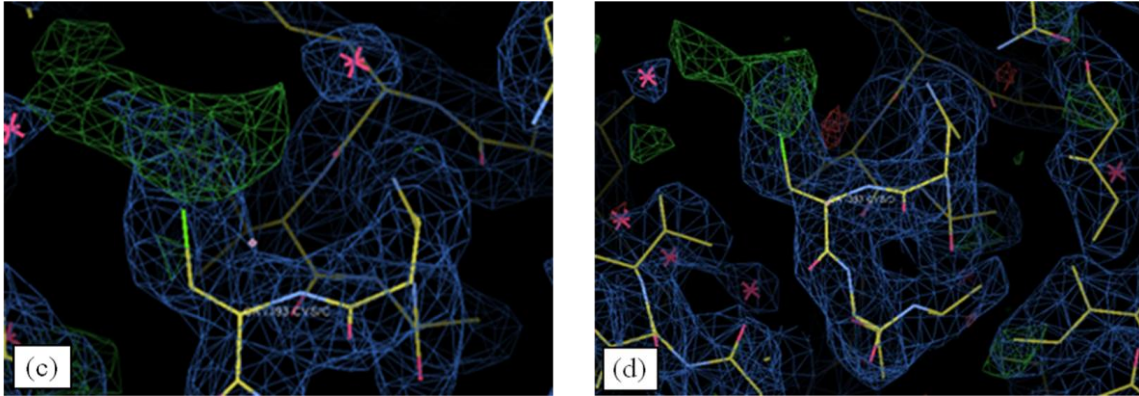


Fonte: O Autor.

Também observou-se que os resíduos de Cys<sup>393</sup> apresentam-se provavelmente modificados para todos os monômeros. Foram testadas nestas posições cisteínas oxidadas (CSO), mas não se obteve um ajuste adequado nos mapas de densidade eletrônica e Fourier diferença. Assim, optou-se em manter os resíduos de Cys<sup>393</sup> em todas as cadeias para posteriores análises mais completas das respectivas posições já que ainda não há uma solução óbvia. Estes resíduos podem ser visualizadas na Figura 16.

Figura 16. Qualidade de ajuste na densidade eletrônica para o resíduo da Cys<sup>393</sup>. As figuras estão apresentadas na seguinte ordem: monômeros a) A, b) B, c) C e d) D. Figuras produzidas pelo programa COOT. Os mapas de densidade eletrônica (azul) foram desenhados com 1  $\sigma$  de contorno, mapas de Fourier diferença com contornos em + 3  $\sigma$  (verde) e -3  $\sigma$  (vermelho).





Fonte: O Autor.

No modelo final, optou-se em deixar 29 aminoácidos com cadeias laterais não completas devido a ausência de densidade eletrônica. Também devido a esta, o modelo apresentou alguns intervalos entre segmentos de aminoácidos da cadeia principal, chamados *gaps*, que estão descritos a seguir: (a) monômero A: Phe<sup>60</sup> a Glu<sup>64</sup> e Ala<sup>419</sup>; (b) monômero B: Phe<sup>60</sup>, Gly<sup>61</sup>, Ser<sup>417</sup> e Ala<sup>418</sup>; (c) monômero C: Phe<sup>60</sup> e Phe<sup>63</sup>; (d) monômero D: Ala<sup>419</sup>. Ratificando, há o *gap* sequencial dos resíduos Ala<sup>143</sup>, Ser<sup>144</sup> e Gly<sup>145</sup>, que, todavia, são transformados no resíduo modificado MDO<sup>143</sup>.

Uma busca por íons utilizando-se ferramenta embutida no programa COOT apontou inexistência destes na estrutura.

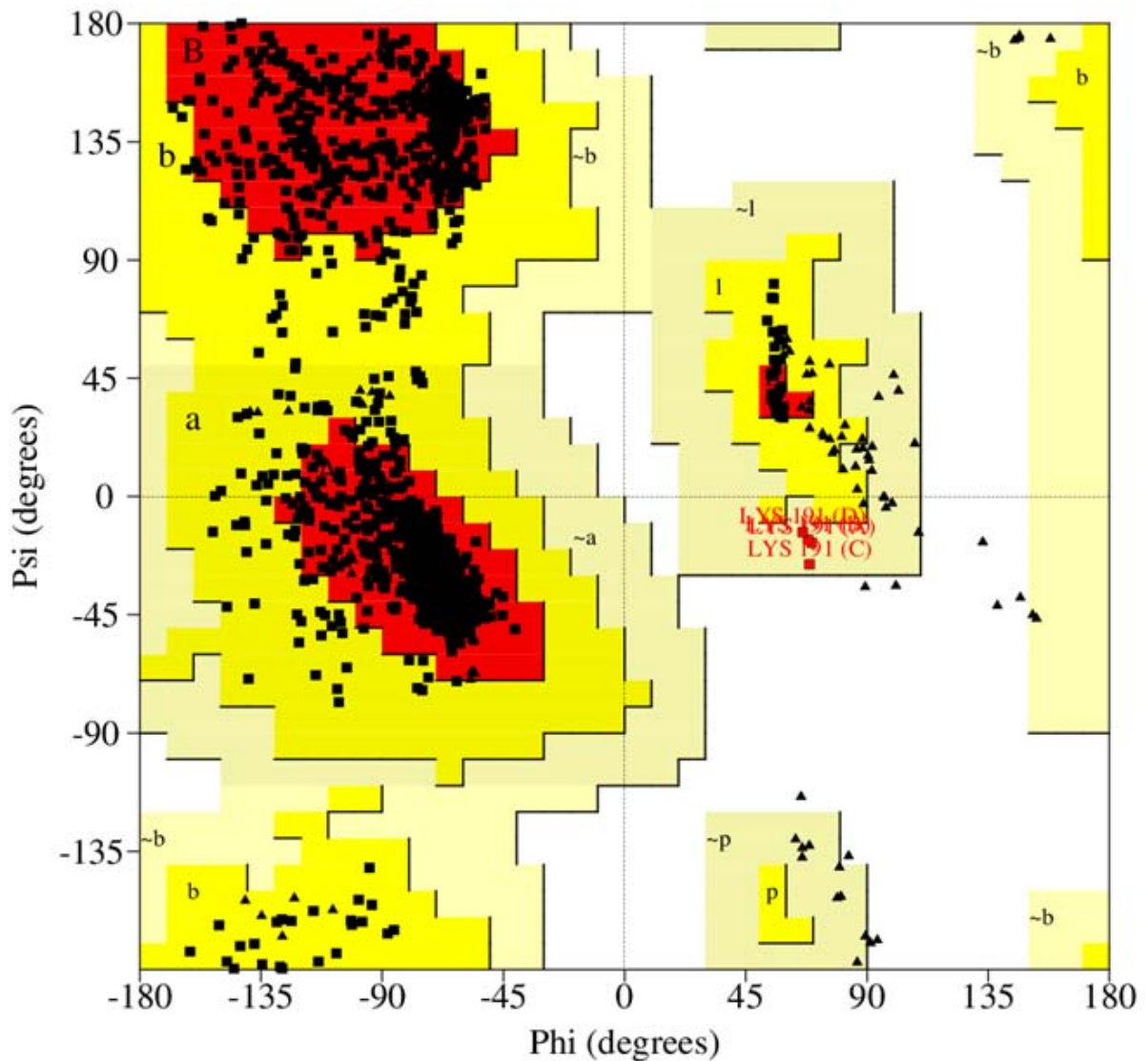
## 5.2.4 Validação da estrutura

### 5.2.4.1 Gráfico de Ramachandran

O resultado do programa Procheck para analisar a qualidade estereoquímica da estrutura no tocante aos ângulos *phi* ( $\phi$ ) e *psi* ( $\psi$ ) está no gráfico de Ramachandran (Figura 17). Dos 2.034 aminoácidos analisados, 90,9% estão em regiões mais favoráveis, 8,8% nas regiões adicionalmente permitidas, 0,2% nas regiões generosamente favoráveis. No tocante às Lys<sup>191</sup>, em destaque nas regiões generosamente favoráveis do gráfico, em todos os monômeros apresenta densidade eletrônica que corrobora a posição dos resíduos.



Figura 17. Gráfico de Ramachandran da estrutura HAL\_jcsg\_71\_90gPc. As glicinas são representadas por triângulos e os demais aminoácidos por quadrados. As áreas em vermelho são chamadas de regiões mais favoráveis; em amarelo de regiões favoráveis; em bege de regiões generosamente favoráveis e em branco de regiões desfavoráveis. Figura gerada por meio do programa Procheck.

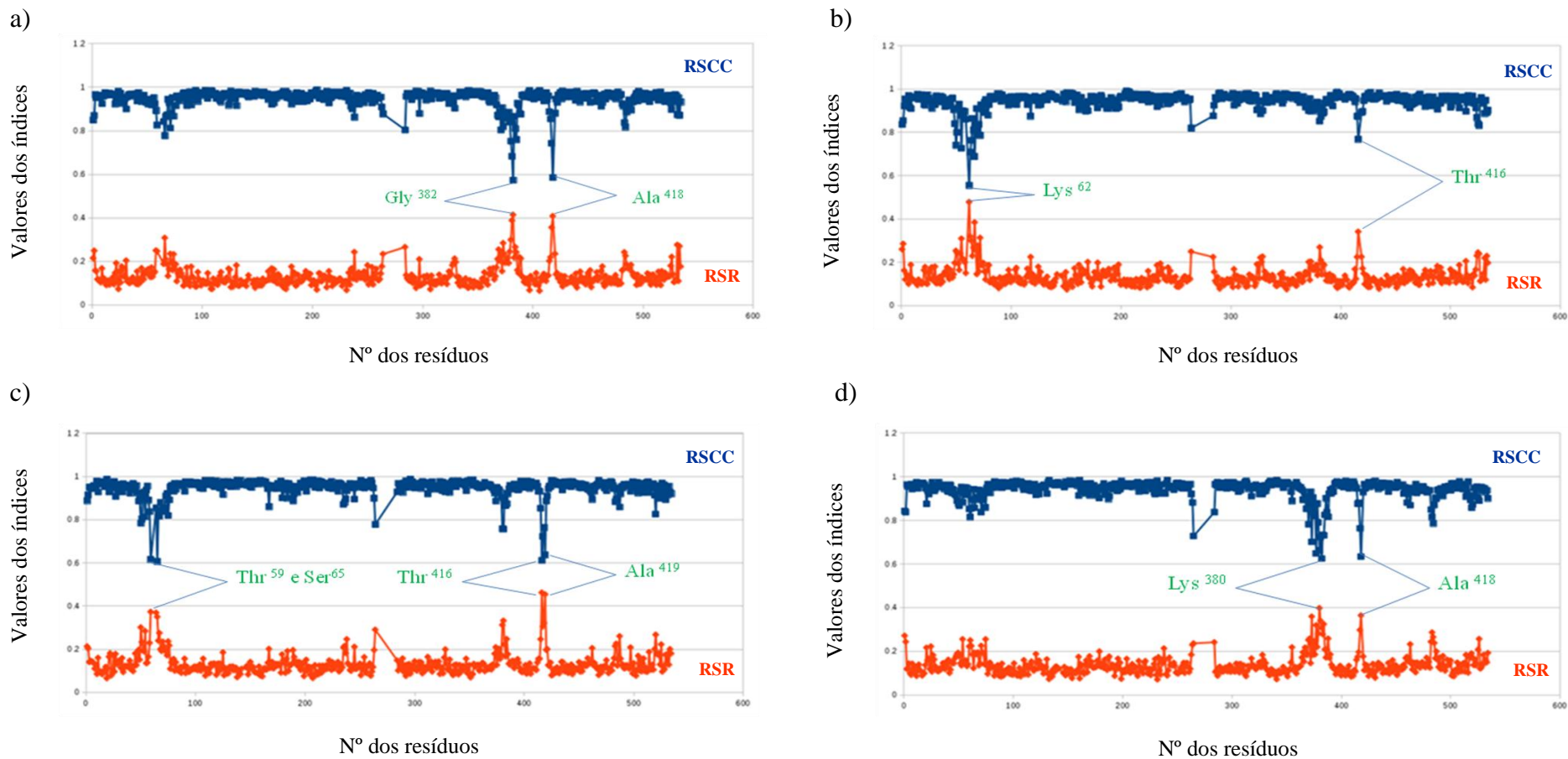


Fonte: O Autor.

#### 5.2.4.2 Coeficiente de correlação no espaço real (RSCC) e valor residual no espaço real (RSR).

Para ilustrar o ajuste da estrutura à densidade eletrônica, realizaram-se cálculos dos índices RSCC e RSR, para cada monômero e por resíduo, como mostram a Tabela 5 e os gráficos das Figuras 18 (a, b, c e d).

Figura 18. Qualidade do ajuste na densidade eletrônica representado em gráficos para a estrutura HAL\_jcsg\_71\_90gPc. Os gráficos estão apresentados na seguinte ordem: monômero (a) A, (b) B, (c) C e (d) D. As setas indicam alguns resíduos que se encontram em regiões de alta flexibilidade.



Fonte: O Autor.

Nos gráficos observam-se regiões onde os valores de RSCC apresentam-se baixos e RSR altos, relacionadas às regiões flexíveis da estrutura, onde se procurou fazer a melhor modelagem possível. Precisamente, entre os resíduos 58 a 66 para os monômeros B e C, a flexibilidade é ainda maior, o que determinou na maior parte dos casos a não modelá-los, variando-se em um ou três resíduos a mais ou a menos conforme a cadeia. Exceção apenas para o monômero D, para o qual, apesar ainda da flexibilidade, ao menos uma fraca continuidade da cadeia principal pode ser observada, que permitiu, então, modelagem.

Os resíduos 415 a 425 de todas as cadeias também correspondem a uma região flexível, dificultando a modelagem. Para esta região tentou-se um *annealing computacional*, fornecendo energia para permitir a mobilidade para uma possível melhoria de ajuste desses resíduos. Esta característica de flexibilidade também ocorre com os resíduos da Lys<sup>380</sup> e a Gly<sup>382</sup> respectivos a cadeia D e A. O diagrama de topologia apresentado na Figura 21 explicita os elementos de estrutura secundária e permite identificar que as regiões flexíveis da estrutura pertencem às regiões de *loop*.

Tabela 5. Valores globais de RSCC e RSR por cadeia.

Cadeia	HAL_jcsg_71_90gPc	
	RSCC	RSR
A	0,9464	0,1317
B	0,9432	0,1350
C	0,9459	0,1319
D	0,9403	0,1375
Todas as cadeias	0,9439	0,1341

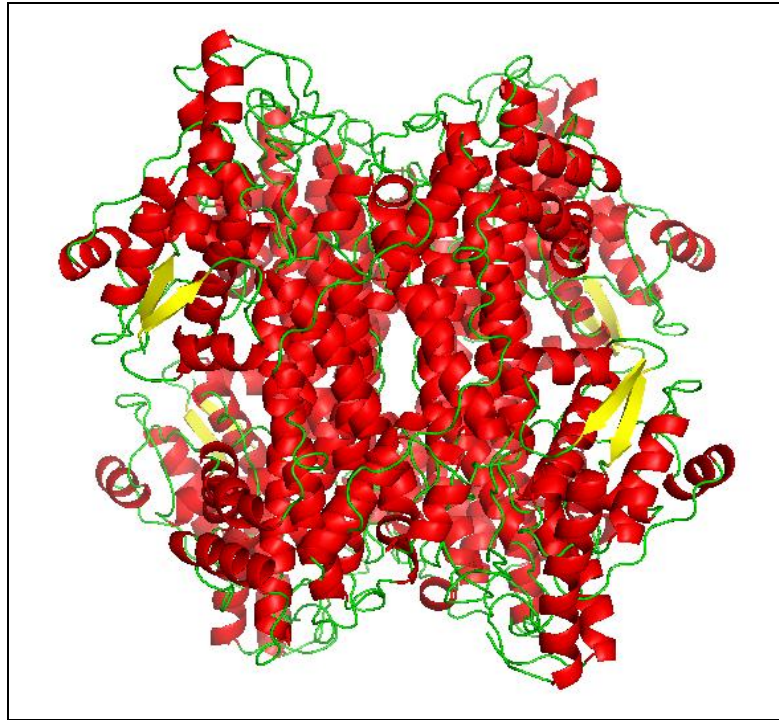
Fonte: O Autor.

#### 5.2.4.3 Avaliação da geometria dos rotâmeros

A validação realizada pelo programa Molprobity foi específica para verificação da geometria dos rotâmeros. De um total de 1.691 possíveis rotâmeros presentes na estrutura da HAL\_jcsg\_71\_90gPc, apenas 29 não estão entre os mais comuns, porém, estão ajustados na densidade eletrônica, o que confirma a posição em que foram refinados.

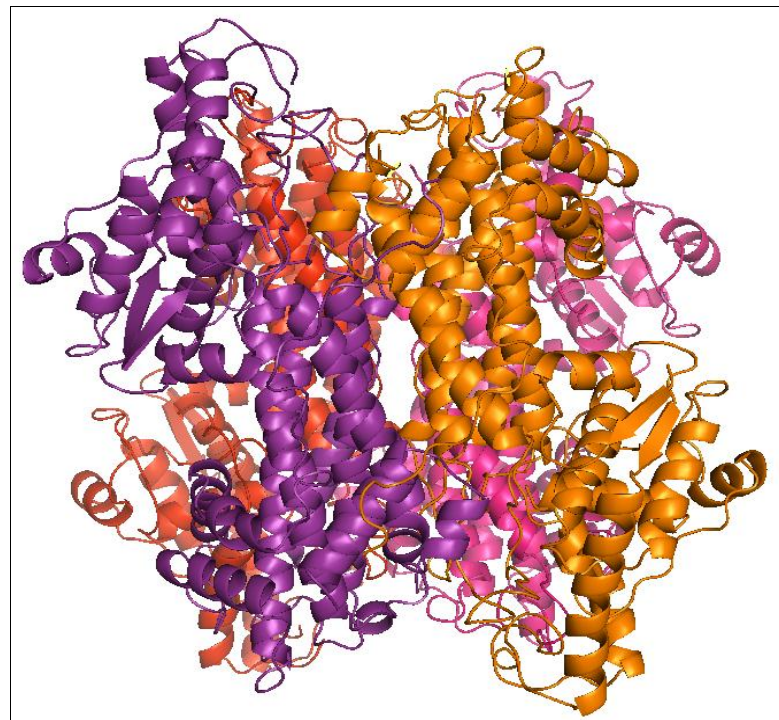
A estrutura refinada e validada do homotetrâmero na unidade assimétrica é representada nas figuras 19 e 20.

Figura 19. Estrutura tridimensional do homotetrâmero da HAL\_jcsg\_71\_90gPc. Em vermelho estão representadas as hélices- $\alpha$ , em setas amarelas as fitas- $\beta$  e em verde os *loops*. Figura produzida com o programa PyMOL.



Fonte: O Autor.

Figura 20. Estrutura tridimensional do homotetrâmero da HAL\_jcsg\_71\_90gPc. A orientação é a mesma da figura 19. Os monômeros estão coloridos da seguinte forma: A (violeta), B (vermelho), C (laranja) e D (rosa). Figura produzida com o programa PyMOL.



Fonte: O Autor.

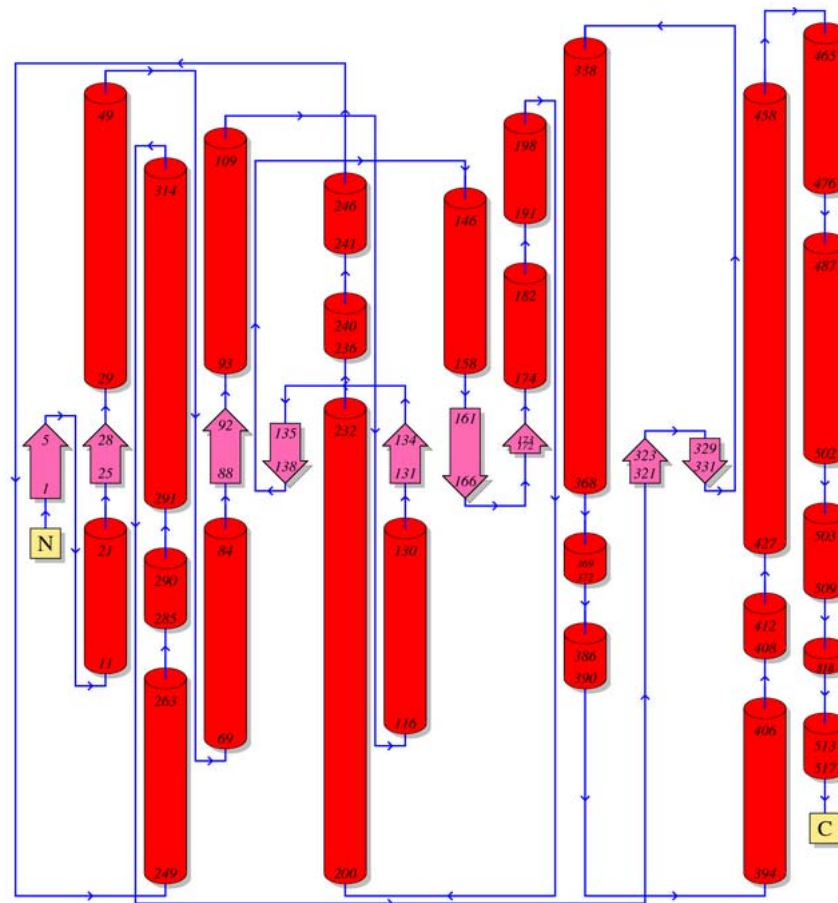


## 5.2.5 Análises estruturais

### 5.2.5.1 Enovelamento global

O uso da ferramenta do CATH indicou que a estrutura HAL\_jcsg\_71\_90gPc pertence à família de Fumarase/aspartase, como também para estrutura homóloga da HAL de *Pseudomonas putida* (BAEDEKER; SCHULZ, 2002). A Figura 21 mostra um diagrama de topologia que explicita os elementos de estrutura secundária, produzida pela ferramenta PDBsum para um monômero.

Figura 21. Diagrama de topologia para a estrutura HAL\_jcsg\_71\_90gPc. Em forma de bastão vermelho estão as hélices- $\alpha$ , em setas rosas as fitas- $\beta$  e em azul os *loops*. Figura gerada por meio da ferramenta PDBsum.



Fonte: O Autor.

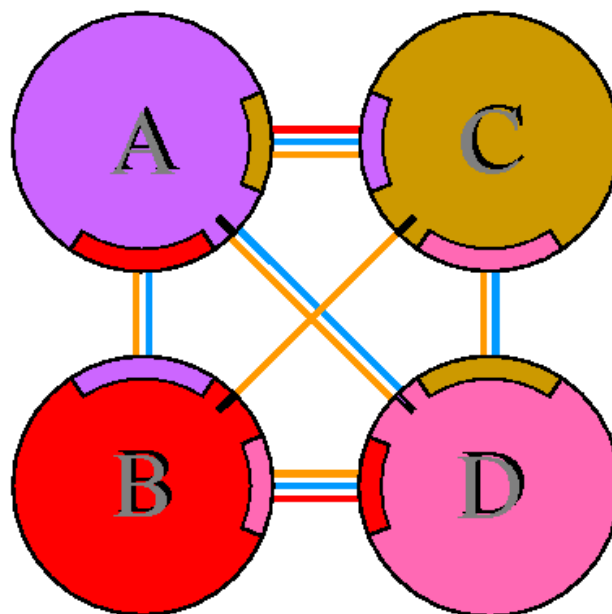
As áreas de superfície de contato entre os monômeros e número de resíduos que estão em contato são mostradas na Tabela 6, como obtido com o programa de PDBsum. A Figura 22, produzida com a ferramenta PDBsum, representa a quantidade de superfície de contato entre os monômeros.

Tabela 6. Resíduos e áreas de interface nas superfícies dos monômeros. A, B, C, e D correspondem aos monômeros do homotetrâmero. O símbolo ":" representa as inter-relações entre os monômeros, entre os resíduos e áreas de interface. Dados obtidos pela ferramenta do PDBsum.

Monômeros	HAL_jcsg_71_90gPc	
	Nº de resíduos	Área de interface / Å <sup>2</sup>
A : B	79 : 81	4095 : 4066
C : D	79 : 81	4115 : 4114
A : C	55 : 54	2768 : 2780
B : D	56 : 57	2800 : 2743
A : D	3 : 3	132 : 132
B : C	2 : 2	122 : 121

Fonte: O Autor.

Figura 22. Regiões de interface entre os monômeros do homotetrâmero. As áreas interfaciais entre os monômeros A, B, C e D estão representadas proporcionalmente de acordo com suas colorações principais, A, violeta, B, vermelho, C, laranja, e D, rosa. As linhas em vermelho representam as pontes salinas, azul as ligações de hidrogênio e em laranja os contatos não ligados. Figura obtida da ferramenta PDBsum.



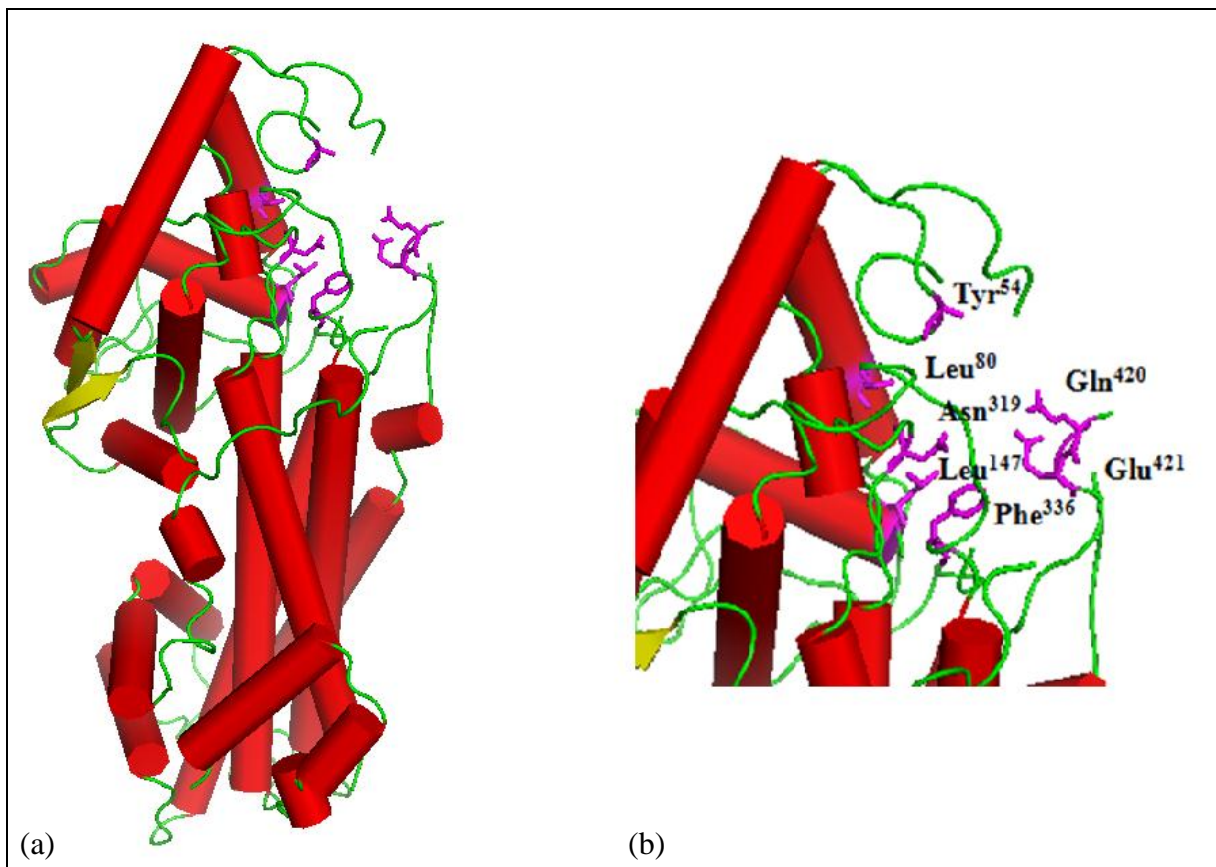
Fonte: O Autor.

#### 5.2.5.2 Sítio ativo

Com base nos critérios de seleção da ferramenta BLAST, foram indicadas 28 estruturas homólogas para a elaboração do inventário de ligantes para a estrutura HAL\_jcsg\_71\_90gPc, das quais apenas 8 possuíam ligantes em sua estrutura. Na Tabela 8 estão listados estes ligantes. As estruturas dos ligantes selecionados foram comparadas com a

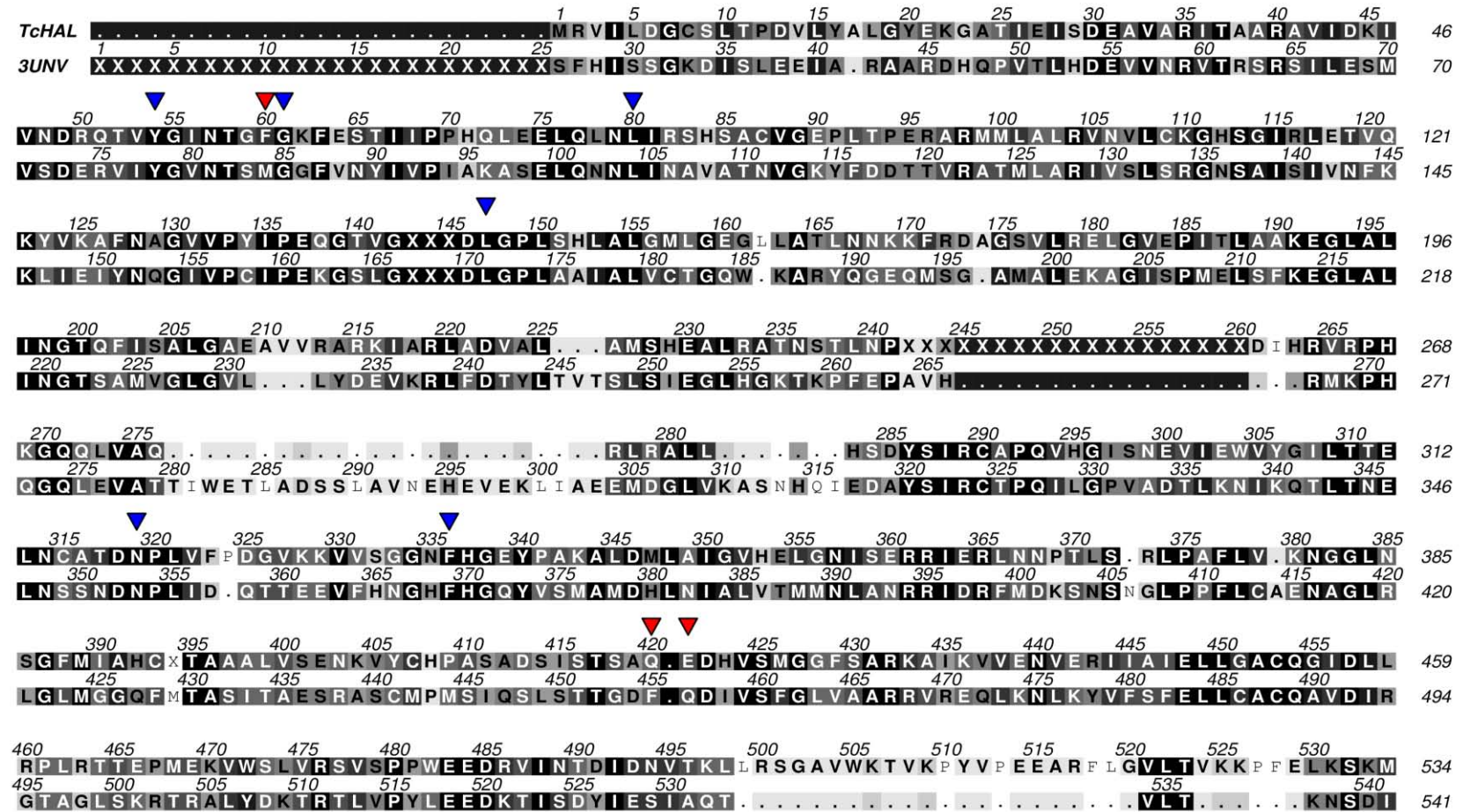
estrutura do substrato L-histidina e do produto urocanato. Nesse estudo, apenas o ligante (3S)-3-amino-3-fenil ácido propanóico (código PDB de 3 letras: SFE), da estrutura homóloga 3UNV, foi utilizado para efeitos de verificação de sítio ativo, por apresentar maior similaridade estrutural com a L-histidina. Por meio da análise dos contatos do ligante SFE na estrutura 3UNV, foi possível identificar os resíduos equivalentes à cavidade do sítio ativo na estrutura HAL\_jcsg\_71\_90gPc. Nesse procedimento, foi realizado o alinhamento dos resíduos (Figura 24) utilizando-se a sobreposição global entre as duas estruturas através do programa computacional T-Coffee. Foi possível identificar que os resíduos Tyr<sup>54</sup>, Phe<sup>60</sup>, Gly<sup>61</sup>, Leu<sup>80</sup>, Leu<sup>147</sup>, Asn<sup>319</sup>, Phe<sup>336</sup>, Gln<sup>420</sup> e Glu<sup>421</sup> correspondem à região catalítica da HAL\_jcsg\_71\_90gPc (Figura 23). A Figura 25 mostra a sobreposição de parte dos sítios ativos das proteínas homólogas.

Figura 23. Sítio ativo da estrutura da HAL\_jcsg\_71\_90gPc. (a) Representação do monômero D em forma de bastão, em vermelho estão as hélices- $\alpha$ , em setas amarelas as fitas- $\beta$ , em verde os *loops* e em roxo os resíduos pertencentes a esta cavidade. (b) Ampliação da região do sítio ativo. Figura produzida com o programa PyMOL.



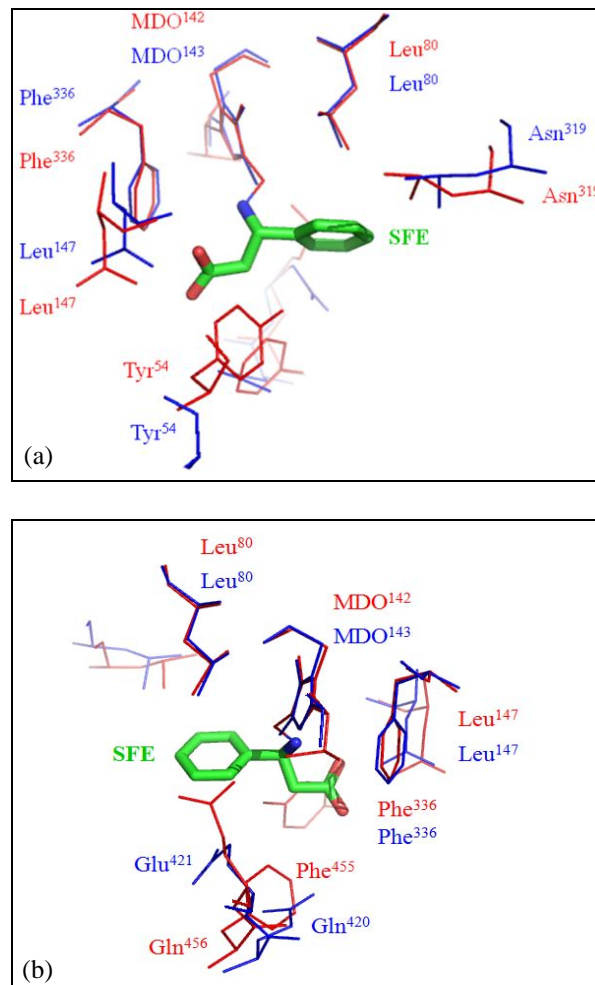
Fonte: O Autor.

Figura 24. Alinhamento da sequência de aminoácidos da HAL\_jcsg\_71\_90gPc com a da estrutura 3UNV. As marcações na coloração azul representam os resíduos idênticos e em vermelho os não idênticos do sítio ativo. Nas colorações em preto e tons de cinza está indicada a conservação dos resíduos de acordo com a convenção de Alscript Calcons.



Fonte: O Autor.

Figura 25. Sobreposição de parte dos resíduos da cavidade do sítio ativo do monômero D da HAL\_jcsg\_71\_90gPc com o monômero B da estrutura homóloga 3UNV. Na coloração azul os resíduos da estrutura HAL\_jcsg\_71\_90gPc, em vermelho da 3UNV e o ligante SFE em verde. A figura (b) corresponde a rotação de 180° em relação a figura (a). Figuras produzidas com o programa PyMOL.



Fonte: O Autor.

## 5.2.6 Comparações estruturais

### 5.2.6.1 Sobreposição com similares

Por meio da ferramenta BLAST, foram identificadas 28 proteínas homólogas com base no "E-value" abaixo de 0,01 no BLAST, sendo 12 de diferentes organismos. Com base na melhor percentagem de identidade, cobertura e resolução (Tabela 7), selecionaram-se as estruturas 1GKM, 3KDY e 3UNV para a sobreposição com a estrutura da HAL\_jcsg\_71\_90gPc. Na Figura 26 pode-se apreciar o enovelamento semelhante entre as estruturas sobrepostas.

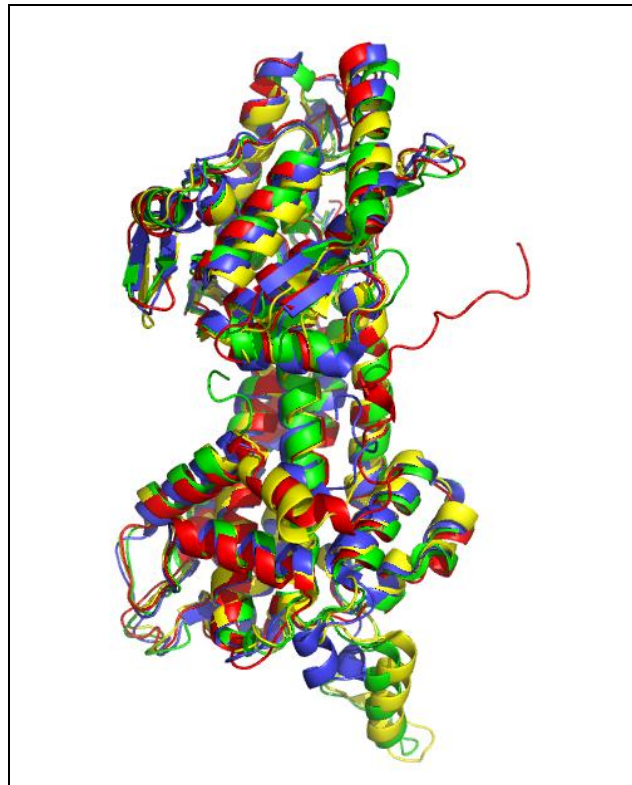


Tabela 7. Dados das proteínas homólogas à *Tc*HAL obtidos a partir de alinhamento feito com as sequências de aminoácidos das estruturas depositadas no PDB.

Código	Resolução (Å <sup>2</sup> )	Proteína/Organismo	Cobertura (%)	Identidade (%)
1GKM	1,00	Histidina amônio liase/ <i>Pseudomonas putida</i>	89	42
3KDY	2,20	Tirosina aminomutase/ <i>Streptomyces globisporus</i>	94	36
3UNV	1,54	Fenilalanina aminomutase/ <i>Pantoea agglomerans</i>	88	33

Fonte: O Autor.

Figura 26. Sobreposição do monômero D da HAL\_jcsg\_71\_90gPc com as estruturas de maior homologia. HAL\_jcsg\_71\_90gPc em vermelho, 1GKM em azul, 3KDY em amarelo e 3UNV em verde. Figuras produzidas com o programa PyMOL.



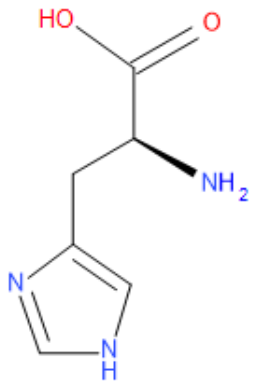
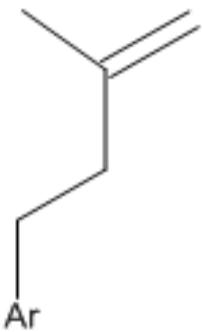
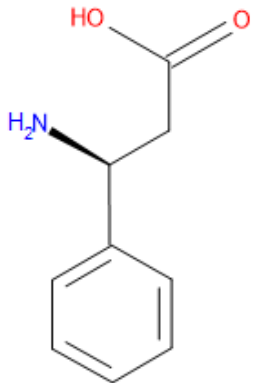
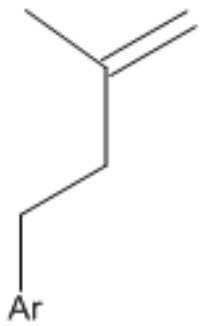
Fonte: O Autor.

#### 5.2.6.2 Ligantes das homólogas da *Tc*HAL disponíveis no PDB

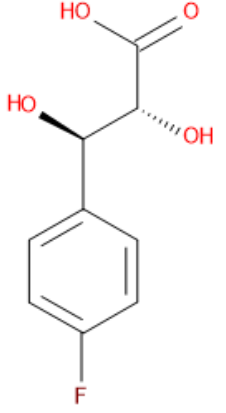
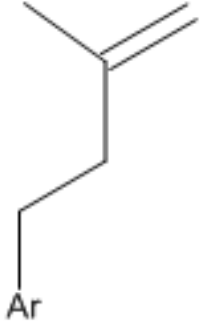
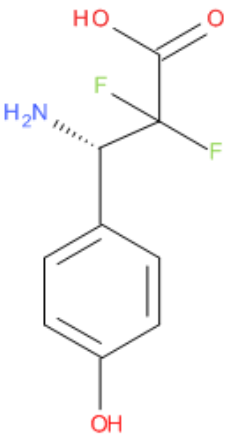
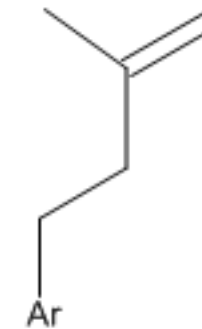
Das 28 proteínas homólogas à *Tc*HAL existentes no PDB, 8 estruturas apresentam ligantes. Na Tabela 8 estão representadas as estruturas moleculares dos 8 ligantes disponíveis.

Tabela 8. Representação das estruturas químicas de ligantes de proteínas homólogas.

(Continua)

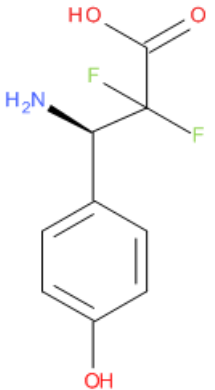
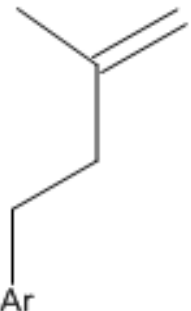
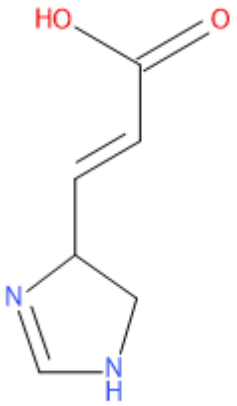
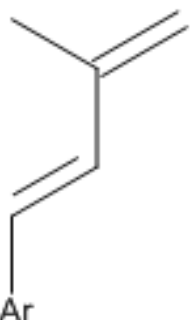
FÓRMULA ESTRUTURAL PLANA	FÓRMULA MOLECULAR NOME CIENTÍFICO (CÓDIGO DO LIGANTE)	ESTRUTURA BASE	ORGANISMO	ESTRUTURA COMPLEXADA PDB E ARTIGO
 <p>The image shows the chemical structure of L-histidine. It consists of an imidazole ring (blue) attached to a side chain. The side chain has a chiral center with an amino group (NH<sub>2</sub>, blue) and a carboxylic acid group (HO-C=O, red).</p>	<p><math>C_6H_9N_3O_2</math></p> <p>L-histidina/ Substrato</p>	 <p>The image shows the skeletal structure of the L-histidine side chain, highlighting the imidazole ring (blue) and the amino group (NH<sub>2</sub>, blue). The carboxylic acid group is represented by a double bond to an oxygen atom. The side chain is attached to an 'Ar' group.</p>	<p>-</p>	<p>-</p>
 <p>The image shows the chemical structure of (3S)-3-amino-3-phenylpropanoic acid. It features a phenyl ring (black) attached to a side chain. The side chain has a chiral center with an amino group (H<sub>2</sub>N, blue) and a carboxylic acid group (HO-C=O, red).</p>	<p><math>C_9H_{11}NO_2</math></p> <p>(3S)-3-amino-3-fenil ácido propanóico</p> <p>(PDB: SFE)</p>	 <p>The image shows the skeletal structure of the (3S)-3-amino-3-phenylpropanoic acid side chain, highlighting the phenyl ring (black) and the amino group (H<sub>2</sub>N, blue). The carboxylic acid group is represented by a double bond to an oxygen atom. The side chain is attached to an 'Ar' group.</p>	<p><i>Pantoea agglomerans</i></p>	<p>3UNV (STROM <i>et al.</i>, 2012)</p>

(Continuação)

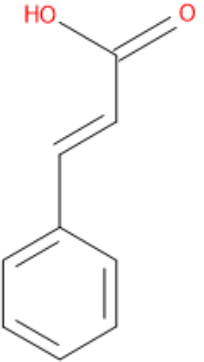
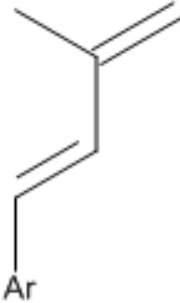
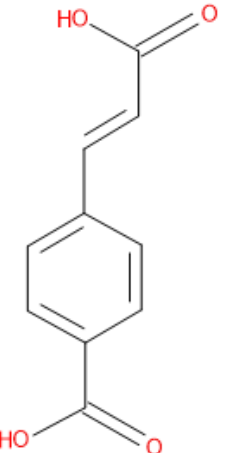
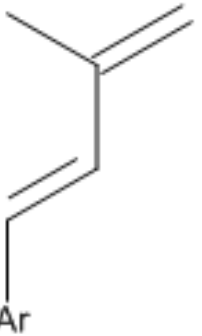
FÓRMULA ESTRUTURAL PLANA	FÓRMULA MOLECULAR NOME CIENTÍFICO (CÓDIGO DO LIGANTE)	ESTRUTURA BASE	ORGANISMO	ESTRUTURA COMPLEXADA PDB E ARTIGO
	<p><math>C_9 H_9 F O_4</math></p> <p>(2S,3S)-3-(4-fluorofenil)-2,3-dihidroxi ácido propanóico</p> <p>(PDB: 295)</p>		<p><i>Streptomyces globisporus</i></p>	<p>2RJR</p> <p>(MONTAVON <i>et al.</i>, 2008)</p>
	<p><math>C_9 H_9 F_2 N O_2</math></p> <p>(3S)-3-amino-2,2-difluoro-3-fenil ácido propanóico</p> <p>(PDB: BQ7)</p>		<p><i>Taxus wallichiana var. chinensis</i></p>	<p>4C5S</p> <p>(WYBENGA <i>et al.</i>, 2014)</p>



(Continuação)

FÓRMULA ESTRUTURAL PLANA	FÓRMULA MOLECULAR NOME CIENTÍFICO (CÓDIGO DO LIGANTE)	ESTRUTURA BASE	ORGANISMO	ESTRUTURA COMPLEXADA PDB E ARTIGO
	<p><math>C_9H_9F_2NO_3</math> (3R)-3-amino-2,2-difluoro-3-(4-hidroxi-fenil) ácido propanóico (PDB: 247)</p>		<p><i>Streptomyces globisporus</i></p>	<p>2QVE (MONTAVON <i>et al.</i>, 2008)</p>
	<p><math>C_6H_6N_2O_2</math> Urocanato/ Produto</p>		<p>-</p>	<p>-</p>

(Conclusão)

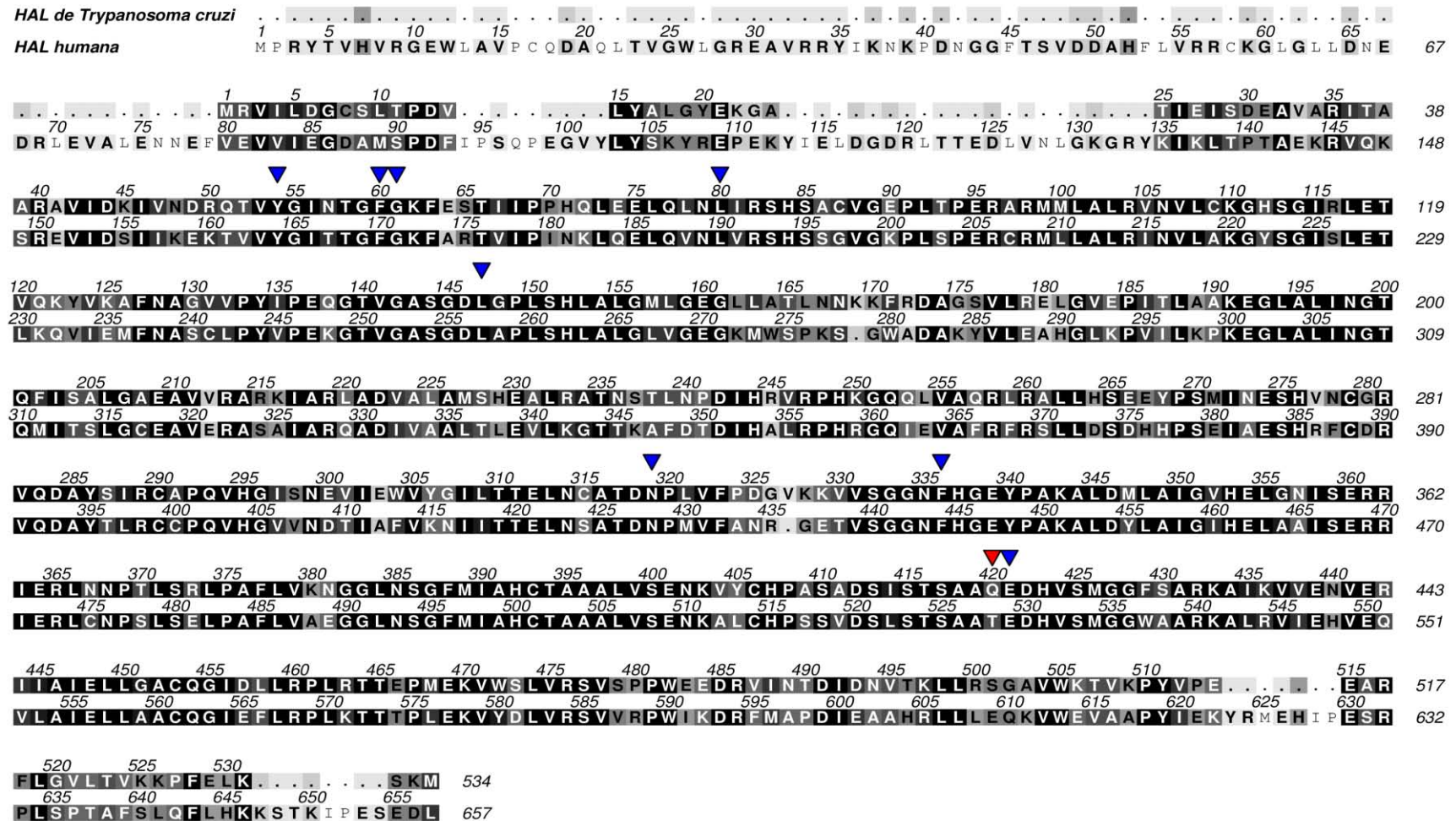
FÓRMULA ESTRUTURAL PLANA	FÓRMULA MOLECULAR NOME CIENTÍFICO (CÓDIGO DO LIGANTE)	ESTRUTURA BASE	ORGANISMO	ESTRUTURA COMPLEXADA PDB E ARTIGO
	$C_9 H_8 O_2$ Feniletileno ácido carboxílico (PDB: TCA)		<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	2O78 (LOUIE <i>et al.</i> , 2006)
	$C_{10} H_8 O_4$ 4- ácido carboxicinâmico (PDB: CIN)		<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1T6J (CALABRESE <i>et al.</i> , 2004)

### 5.2.6.3 Alinhamento de sequências da *Tc*HAL e HAL humana

A partir da sequência de aminoácidos foi realizado um alinhamento, onde é interessante destacar que os 79 primeiros resíduos da região N-terminal da HAL humana não apresentam resíduos correspondentes na região N-terminal da HAL de *Trypanosoma cruzi*. No entanto, as sequências alinhadas apresentaram significativas regiões conservadas, conforme representado na Figura 27. Este alinhamento permitiu comparar os resíduos da cavidade do sítio ativo das duas proteínas. De 9 resíduos, apenas 1 não é idêntico nas duas estruturas, Gln<sup>420</sup> → Thr<sup>528</sup>. A investigação de resíduos distintos tem uma elevada relevância no desenho racional de drogas. Essa diferença poderá, eventualmente, ser explorada na seleção e/ou planejamento de moléculas com maior afinidade à HAL de *Trypanosoma cruzi* em relação à sua homóloga humana.

O avanço no entendimento estrutural e bioquímico da *Tc*HAL proporcionado por este trabalho, somando-se a trabalhos futuros e à melhor caracterização deste alvo terapêutico, permitirão aprofundar estudos visando identificar ligantes com maior especificidade à *Tc*HAL.

Figura 27. Alinhamento da sequência de aminoácidos da *TcHAL* e da HAL humana. As marcações na coloração azul representam os resíduos idênticos e em vermelho os não idênticos do sítio ativo. Nas colorações em preto e tons de cinza está indicada a conservação dos resíduos de acordo com a convenção de Alscript Calcons.



Fonte: O Autor.

## 6 CONCLUSÕES

- Por meio da técnica de dicroísmo circular pode-se concluir que a enzima estudada apresenta maior quantidade de estruturas secundárias em hélices- $\alpha$  e a aproximadamente 68 °C a proteína perde cerca de metade de sua estrutura secundária.
- A estabilidade da enzima em solução concentrada é favorecida pela presença do imidazol.
- Os ensaios de cristalização permitiram a obtenção cristais com qualidade suficiente para coleta de dados de difração de raios X e resolução da estrutura.
- A estrutura cristalográfica da HAL\_jcsg\_71\_90gPc foi resolvida a 2,55 Å, sendo adequada para estudos estruturais e bioquímicos propostos.
- A TcHAL apresenta o resíduo modificado MDO, comum em amônio liases.
- A TcHAL tem enovelamento típico e semelhante às amônio liases. Há um resíduo distinto no sítio ativo em relação à homóloga humana.

## 7 TRABALHOS FUTUROS

- Terminar com detalhe resíduo a resíduo o refinamento da estrutura.
- Utilizar a estrutura obtida na busca de inibidores enzimáticos *in silico*, a partir de banco de dados de moléculas do ZINC (IRWIN *et al.*, 2012).
- Realizar ensaios de atividade inibitória *in vitro*.
- Realizar ensaios de co-cristalização com os inibidores selecionados *in silico* e/ou *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

AFONINE, P. V.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ECHOLS, N.; HEADD, J. J.; MORIARTY, N. W.; MUSTYAKIMOV, M.; TERWILLIGER, T. C.; URZHUMTSEV, A.; ZWART, P. H.; ADAMS, P. D. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. **Acta Crystallographica Section D**, D. 68, p. 352-367, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322595/pdf/d-68-00352.pdf> >.

ATWOOD, J. A.; WEATHERLY, D. B.; MINNING, T. A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F. R.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. The *Trypanosoma cruzi* Proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473-476, 2005. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/309/5733/473.abstract> >.

BAEDEKER, M.; SCHULZ, G. E. Structures of two histidine ammonia-lyase modifications and implications for the catalytic mechanism. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 1790-1797, 2002. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1432-1327.2002.02827.x/pdf>>.

BARTON, G. J. ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments. **Protein Engineering**, v. 6, n. 1, p. 37-40, 1993. Disponível em: < <http://peds.oxfordjournals.org/content/6/1/37.short> >.

BENVENUTI, M; MANGANI, S. Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography. **Nature Protocols**. v. 2, n. 7, p. 1633-1651, 2007. Disponível em: < <http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n7/pdf/nprot.2007.198.pdf> >.

BERGFORS, T. **Protein Crystallization**. 2. ed. La Jolla: International University Line, 2009.

BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. **Circular Dichroism: Principles and Applications**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2000.

BOIANI, M.; GONZALEZ, M. Imidazole and benzimidazole derivatives as chemotherapeutic agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 409-424, 2005. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/79735/article> >.

BOND, C. S.; SCHÜTTELKOPF, A. W. ALINE: a WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, D.65, n. 5, p. 510-512, 2009. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/19390156> >.

BOSCARDIN, S. B.; TORRECILHAS, A. C. T.; MANARIN, R.; REVELLI, S.; REY, E. G.; TONELLI, R. R.; SILBER, A. M. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 14, n. 6B, p. 1373-1384, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2010.01007.x/pdf>>.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976. Disponível em: <[http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford\\_assay.pdf](http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf)>.

CALABRESE, J. C.; JORDAN, D. B.; BOODHOO, A., SARIASLANI, S.; VANNELLI, T. Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis. **Biochemistry**, v. 43, p. 11403-11416, 2004.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 195-218, 1909. Disponível em: <[http://www.scielo.br/pdf/mioc/v1n2/tomo01\(f2\)\\_159-218.pdf](http://www.scielo.br/pdf/mioc/v1n2/tomo01(f2)_159-218.pdf)>.

CHEN, V. B.; BRYAN, W. A.; HEADD, D. A.; KEEDY, M. A.; IMMORMINO, M. R.; KAPRAL, G. J.; MURRAY, J. S.; RICHARDSON, D. C. MolProbity: all atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D**, D. 66, p. 12-21, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2803126/pdf/d-66-00012.pdf>>.

CHRISTIANSON, C. V.; MONTAVON, T. J.; VAN LANEN, S. G.; SHEN, B.; BRUNER, S. D. The structure of L-tyrosine 2,3-aminomutase from the C-1027 enediyne antitumor antibiotic biosynthetic pathway. **Biochemistry**, v. 46, p. 7205-7214, 2007.

COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER, N° 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 50, p. 760-763, 1994. Disponível em: <<http://www.ccp4.ac.uk/main.html>>.

COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, p. S6-S7, 2010. Disponível em: <[http://www.nature.com/nature/journal/v465/n7301\\_supp/full/nature09221.html](http://www.nature.com/nature/journal/v465/n7301_supp/full/nature09221.html)>.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. San Carlos: DeLano Scientific 2002.



DÍAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J. J. Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 44, n. 10, p. 880-881, 1988. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF01941187> >.

DRENTH, J. **Principles of Protein X-ray Crystallography**. 1. ed. New York: Springer-Verlag, 1999.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 2, n. 1, p. 19-51, 2007. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/77649/article> >.

ECKHART, L.; SCHMIDT, M.; MILDNER, M.; MLITZ, V.; ABTIN, A.; BALLAUN, C.; FISCHER, H.; MRASS, P.; TSCHACHLER, E. Histidase expression in human epidermal keratinocytes: regulation by differentiation status and all-trans retinoic acid. **Journal of Dermatological Science**, v. 50, p. 209-215, 2008. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923181108000133#> >.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. **Acta Crystallographica Section D**, p. 2126-2132, 2004.

IRWIN, J. J.; STERLING, T.; MYSINGER, M. M.; BOLSTAD, E. S.; COLEMAN, R. G. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. **Journal Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 7, p. 1757-1768, 2012. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/ipdf/10.1021/ci3001277> >.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, n. 12, p. 2577-2637, 1983. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/bip.360221211> >.

KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D**. D. 66, p. 125-132, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2815665/pdf/d-66-00125.pdf> >.

KARPLUS, P. A.; DIEDERICHS, K. Linking crystallographic model and data quality. **Science**, v. 336, n. 6084, p. 1030-1033, 2012. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/336/6084/1030.full.pdf> >.

KATONA, A.; TOSA, M. I.; PAIZS, C.; RÉTEY, J. Inhibition of Histidine Ammonia Lyase by Heteroaryl-alanines and Acrylates. **Chemistry and Biodiversity**, v. 3, p. 502-508, 2006. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200690053/pdf> >.

KLEE, C. B. Reversible Polymerization of Histidine Ammonia Lyase: The role of Sulfhydryl groups in the activity and polymeric state of the enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 12, p. 3143-3152, 1970. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/245/12/3143.full.pdf> >.

KLEYWEGT, G. J.; JONES, T. A. xdi MAPMAN and xdi DATAMAN - programs for reformatting, analysis and manipulation of biomacromolecular electron-density maps and reflection data sets. **Acta Crystallographica Section D**, v. 52, p. 826-828, 1996.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1107/S0021889892009944> >.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 3.ed. Porto Alegre: Sarvier, 2011.

LOUIE, G. V.; BOWMAN, M. E.; MOFFITT, M. C.; BAIGA, T. J.; MOORE, B. S.; NOEL, J. P. Structural Determinants and Modulation of Substrate Specificity in Phenylalanine-Tyrosine Ammonia-Lyases. **Chemistry and Biology**, v. 13, n. 12, p. 1327-1338, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2859959/pdf/nihms195155.pdf> >.

MATTHEWS, B. W. Solvent Content of Protein Crystals. **Journal of Molecular Biology**, v. 33, p. 491-497, 1968. Disponível em: < [http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/tutorials/Characterize/vm\\_all.pdf](http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/tutorials/Characterize/vm_all.pdf) >.

MAYA, J. D.; BOLLO, S.; VERGARA, L. J. N.; SQUELLA, J. A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PÉRIE, J.; CHAUVIÈRE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurans derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 999-1006, 2003. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295202016635#> >.

MAYA, J. D.; CASSELS, B.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 601-620, 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643306001735#> >.

MCCOY, A. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, p. 658-674, 2007. Disponível em: < <http://journals.iucr.org/j/issues/2007/04/00/he5368/he5368.pdf> >.

MCPHERSON, A. **Crystallization of biological macromolecules**. 1. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Annals of Tropical Medicine Parasitology**, v. 100, n. 8, p. 663-77, 2006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1179/136485906X112248> >.

MONTAVON, T. J.; CHRISTIANSON, C. V.; FESTIN, G. M.; SHEN, B.; BRUNER, S. D. Design and characterization of mechanism-based inhibitors for the tyrosine aminomutase SgTAM. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 10, p. 3099-3102, 2008.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of Molecular Biology**, v. 302, n. 1, p. 205-217, 2000. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283600940427> >.

OMS. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2013. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> >.

OMS. Control of Chagas Disease. 2002. Disponível em: < [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_905.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf) >.

OMS. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 2010. Disponível em: < [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf) >.

OMS. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 2011. Disponível em: < [http://www.who.int/neglected\\_diseases/2010report/WHO\\_NTD\\_report\\_update\\_2011.pdf](http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/WHO_NTD_report_update_2011.pdf) >.

PAES, L. S.; MANTILLA, B. S.; BARISON, M. J.; WRENGER, C.; SILBER, A. M. The Uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* Mitochondrion: Opportunities to Target New Drugs Against Chagas Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 17, p. 2074-2099, 2011. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/74882/article> >.

PARK, Y.; SHEETLIN, S.; MA, N.; MADDEN, T.; SPOUGE, J. New finite-size correction for local alignment score distributions. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-5-286> >.

PETHERICK, A. After years of neglect, Brazil takes aim at Chagas disease. **Nature America**, v. 17, n. 10, p. 1174, 2011. Disponível em: < <http://www.nature.com/nm/journal/v17/n10/pdf/nm1011-1174a.pdf> >.

RASSI JR., A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067361060061X> >.

READ, R. J. Sigmaa - Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. **Acta Crystallographica Section A**, v.42, p.140-149, 1986. Disponível em: < <http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Personal/randy/pubs/a25349r.pdf> >.

ROMANHA, A. J.; ALVES, R. O.; MURTA, S. M. F.; SILVA, J. S.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Experimental Chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* Infection: Essential Role of Endogenous Interferon- $\gamma$  in Mediating Parasitologic Cure. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 6, p. 823-828, 2002. Disponível em: < <http://jid.oxfordjournals.org/content/186/6/823.abstract> >.

RÖTHER, D.; POPPE, L.; VIERGUTZ, S.; LANGER, B.; RÉTEY, J. Characterization of the active site of histidine ammonia-lyase from *Pseudomonas putida*. **European Journal Biochemistry**, v. 268, p. 6011-6019, 2001. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.0014-2956.2001.02298.x/pdf> >.

RUPP, B. **Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology**. 1. ed. New York: Garland Science, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHWEDE, T. F.; RÉTEY, J.; SCHULZ, G. E. Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. **Biochemistry**, v. 38, 5355-5361, 1999.

SCRIVER, C. R., LEVY, H. L. Histidinemia. Part I: reconciling retrospective and prospective findings. **Journal Inherited Metabolic Disease**, v. 6, p. 51-53, 1983.

SHATSKY, M.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. MultiProt - A Multiple Protein Structural Alignment Algorithm. In: GUIGÓ, R. e GUSFIELD, D. (Ed.). **Algorithms in Bioinformatics**. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, v.2452, 2002. cap. 18, p.235-250. (Lecture Notes in Computer Science).

SILBER, A. M.; COLLI, W.; ULRICH, H.; ALVES, M. J.; PEREIRA, C. A. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. **Current Drug Targets Infectious Disorders**, v. 5, n. 1, p. 53-64, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777198>>.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269700948802>>.

STEIN, N. CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. **Journal of Applied Crystallography**, vol. 41, 641-643, 2008. Disponível em: <<http://journals.iucr.org/j/issues/2008/03/00/dd5033/dd5033.pdf>>.

STRONG, M.; SAWAYA, S.; WANG, S; PHILLIPS, M.; CASCIO, D.; EISENBERG, D. Toward the structural genomics of complexes: Crystal structure of a PE/PPE protein complex from *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA. v. 103, n. 65, p. 8060-8068, 2006.

TURRENS, J. F.; WATTS JR, B. P.; ZHONG, L.; DOCAMPO, R. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benzimidazole and anthelmintic imidazole derivatives. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 82, n. 1, p. 125-129, 1996. Disponível em: <<http://idc311-www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166685196027223>>.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472-481, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751901001539>>.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492203002411>>.

WYBENGA, G. G.; SZYMANSKI, W.; WU, B.; FERINGA, B. L.; JANSSEN, D. B.; DIJKSTRA, B. W. Structural Investigations into the Stereochemistry and Activity of a Phenylalanine-2,3-aminomutase from *Taxus chinensis*. **Biochemistry**, v. 53, n. 19, p. 3187-3198, 2014.

YOKO, K.; AKIHIKO, M.; KIYOFUMI, A. M. C. C.; SATOSHI, S. H. M.; MARIKO, S. Molecular characterization of histidinemia: identification of four missense mutations in the histidase gene. **Human Genetics**, v. 116, p. 340-346. 2005.

ZULAUF, M.; D' ARCY, D. Light scattering of proteins as a criterion for crystallization. **Journal of Crystal Growth**, v. 122, p. 102-106, 1992. Disponível em: < [http://ac.els-cdn.com/0022024892902328/1-s2.0-0022024892902328-main.pdf?\\_tid=385d582c-a18611e4-bee7-00000aacb362&acdnat=1421856037\\_c29c30bb171abb4a58c97f6b862f5077](http://ac.els-cdn.com/0022024892902328/1-s2.0-0022024892902328-main.pdf?_tid=385d582c-a18611e4-bee7-00000aacb362&acdnat=1421856037_c29c30bb171abb4a58c97f6b862f5077) >.