

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

JONATHAN HEILER HERNANDEZ PRIETO

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS ENZIMAS ACIL-COA TIOESTERASE 6
DE *Homo Sapiens*, ÁLCOOL DESIDROGENASE DE *Naegleria gruberi* E
GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Paracoccidioides lutzii*

PONTA GROSSA
2022

JONATHAN HEILER HERNANDEZ PRIETO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS ENZIMAS ACIL-COA TIOESTERASE 6
DE *Homo Sapiens*, ÁLCOOL DESIDROGENASE DE *Naegleria gruberi* E
GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Paracoccidioides lutzii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, para a obtenção do título de Mestre em Química Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane Paula Martini

**PONTA GROSSA
2022**

H557 Hernández Prieto, Jonathan Heiler
 Caracterização estrutural das enzimas acil-coa tioesterase 6 de *Homo Sapiens*, álcool desidrogenase de *Naegleria gruberi* e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Paracoccidiodides lutzii* / Jonathan Heiler Hernández Prieto. Ponta Grossa, 2022.
 123 f.

 Dissertação (Mestrado em Química - Área de Concentração: Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek.

 Coorientadora: Profa. Dra. Viviane Paula Martini.

 1. Acil-coa tioesterase 6 humana. 2. Álcool desidrogenase de naegleria gruberi. 3. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de paracocci. 4. Ácido d-galactônico. 5. Paracoccidiodomocose. I. Iulek, Jorge. II. Martini, Viviane Paula. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. IV.T.

 CDD: 540



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

TERMO

TERMO DE APROVAÇÃO

JONATHAN HEILER HERNANDEZ PRIETO

**“CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS ENZIMAS ACETIL-COA TIOESTERASE 6 DE *Homo sapiens*,
ÁLCOOL DESIDROGENASE DE *Naegleria gruberi* E GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE
Paracoccidioides lutzii”**

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

Orientador Prof. Dr. Jorge Iulek

UEPG/PR

Profa. Dra. Beatriz Gomes Guimarães

FIOCRUZ/PR

Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana

UEPG/PR

Ponta Grossa, 14 de novembro de 2022



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Iulek, Professor(a)**, em 18/11/2022, às 21:53, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Beatriz Gomes Guimarães, Usuário Externo**, em 19/11/2022, às 10:05, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Adriano Goncalves Viana, Professor(a)**, em 21/11/2022, às 11:55, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **1218074** e o código CRC **A76CC938**.

*Dedico aos meus pais **Ana Prieto e Juan Hernández** por serem exemplos de humildade, honestidade e perseverança em minha vida.*

e

Às minhas irmãs pelo apoio e fonte de inspiração e ao meu irmão por ter me ajudado a começar minha vida profissional.

Amo vocês cada dia mais!

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e ao meu pai pelo carinho, o amor, os ensinamentos e apoio incondicional durante toda a minha vida. Às minhas irmãs e ao meu irmão que, através de seu inesgotável apoio, me guiaram para mais uma grande conquista.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Iulek por ter me convidado e me ajudado ao longo desta fase da minha vida e, especialmente, pelo acompanhamento para alcançar todos os meus objetivos.

À minha coorientadora Prof^ª. Dr^ª. Viviane Paula Martini pela orientação inicial durante todo esse trabalho associada à obtenção de proteínas recombinantes, pela troca de ideias e, sobretudo, pela amizade.

Aos meus três colegas de laboratório Sheila Boreiko, Rodrigo Robson Miranda e Renato Ferras Penteado pela iniciação ao laboratório L11 e instrução de operação dos equipamentos.

Aos meus dois amigos Sheila Boreiko e Rodrigo Robson Miranda por serem um apoio incondicional durante a minha estadia em Ponta Grossa.

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

Ao órgão financiador do projeto CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa, ao grupo de pesquisa de cristalografia de proteínas da UEPG e ao laboratório de purificação de proteínas da UEPG pela disponibilização de equipamentos e reagentes e, finalmente, ao LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) e LNBio pelo apoio para uso de suas instalações.

Enfim, a todas as pessoas que colaboraram de forma direta ou indireta para que este trabalho fosse realizado, ofereço um enorme agradecimento.

RESUMO

A caracterização estrutural de enzimas participantes de rotas metabólicas em organismos patogênicos ou de gêneros similares pode ajudar no planejamento de inibidores. Assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar as estruturas tridimensionais de Acil-CoA Tioesterase 6 humana, Álcool Desidrogenase de *Naegleria gruberi* e Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Paracoccidioides lutzii*. Ressalte-se que a primeira participa na regulação metabólica de lipídios nos humanos, a segunda participa da via de fermentação alcoólica do protozoário *Naegleria gruberi* e a terceira participa da via glicolítica de *Paracoccidioides lutzii*. Para a Acil-CoA Tioesterase 6 e a Álcool Desidrogenase foram feitos alguns testes de expressão e modelagens por homologia de suas estruturas. A Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase teve a sua estrutura resolvida experimentalmente por Cristalografia de Raios X a 2,02 Å de resolução, que foi depositada no PDB sob código 8DE5. Esta é a única GAPDH que possui o trecho hidrofílico HSSNN (resíduos 61-66), que apresenta uma rede de ligações de hidrogênio que possivelmente repercute na conformação do motivo *hairpin* no final deste trecho. Assim, especula-se que essa característica poderia auxiliar o desenho diferencial de inibidores. Além disso, a estrutura foi co-cristalizada com o seu cofator NAD⁺, com um íon sulfato e com ácido D-galactônico. Quanto ao último, esta é a primeira GAPDH a apresentá-lo e especula-se se não proveio da própria ação da GAPDH. Finalmente, comparações estruturais indicaram que ele se encontra no novo sítio Pi enquanto que o íon sulfato está no sítio Ps. Utilizou-se ainda a estrutura para fazer considerações sobre as diferenças encontradas em relação à enzima humana correspondente.

Palavras-chave: Acil-CoA Tioesterase 6 humana, Álcool Desidrogenase de *Naegleria Gruberi*, Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Paracoccidioides lutzii*, ácido D-galactônico, Paracoccidioidomicose.

ABSTRACT

The structural characterization of enzymes participating in metabolic pathways in pathogenic organisms or of similar genera can help the design of inhibitors. Thus, the present work aimed to characterize the three dimensional structures of human Acyl-CoA Thioesterase 6, Alcohol Dehydrogenase from *Naegleria gruberi* and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Paracoccidioides lutzii*. It should be noted that the first participates in the metabolic regulation of lipids in humans, the second participates in the alcoholic fermentation pathway of the protozoan *Naegleria gruberi* and the third participates in the glycolytic pathway of *Paracoccidioides lutzii*. For both Acyl-CoA Thioesterase 6 and Alcohol Dehydrogenase some expression tests were carried out and their structures were modeled by homology. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase had its structure solved experimentally by X-Ray Crystallography at 2.02 Å resolution, which was deposited in the PDB with code 8DE5. This is the only GAPDH that has the hydrophilic stretch HSSNN (residues 61-66), which presents a hydrogen bond network which possibly affects the hairpin motif conformation at the end of this stretch. Thus, this feature might assist the differential design of inhibitors. Furthermore, the structure was co-crystallized with its cofactor NAD⁺, with a sulfate ion and with D-galactonic acid. It is the first GAPDH to present a D-galactonic acid and it is speculated if this ligand came from the action of enzyme itself. Finally, structural comparisons indicated that D-galactonic acid is in the new Pi site and the sulfate ion is in the Ps site. The structure was also used to make considerations about differences to the corresponding human enzyme.

Keywords: Human Acyl-CoA Thioesterase 6, Alcohol Dehydrogenase from *Naegleria gruberi*, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Paracoccidioides lutzii*, D-galactonic acid, Paracoccidioidomycosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura Química da Coenzima A.....	22
Figura 2	- Esquema geral de reação catalisada por Acil-CoA Tioesterase.	23
Figura 3	- Algumas ACOTs depositadas no PDB.....	24
Figura 4	- Inibidores associados à β -oxidação.	25
Figura 5	- Acil-CoA Tioesterase 6 no metabolismo humano.	27
Figura 6	- Expert pool crystallizability class estabelecido no servidor XtalPred para <i>HsACOT6</i>	33
Figura 7	- Gráfico de Ramachandran para o melhor modelo da enzima <i>HsACOT6</i> produzido pelo Modeller.	35
Figura 8	- Estrutura da enzima <i>HsACOT6</i> obtida por modelagem por homologia no Modeller.	36
Figura 9	- Alinhamento da sequência de aminoácidos das enzimas <i>HsACOT2</i> (PDB ID: 3HLK) e <i>HsACOT4</i> (PDB ID: 3K2I) com <i>HsACOT6</i>	37
Figura 10	- Células de <i>Naegleria gruberi</i>	40
Figura 11	- Formas de <i>Naegleria gruberi</i>	40
Figura 12	- Esquema geral de reação catalisada por Álcool Desidrogenase.	41
Figura 13	- ADHs depositadas no PDB e usadas neste trabalho	43
Figura 14	- Esquema da via de fermentação alcoólica de <i>Naegleria gruberi</i>	44
Figura 15	- Inibidores contra a MAP	45
Figura 16	- Expert pool crystallizability class estabelecido no servidor XtalPred para <i>NgADH</i>	48
Figura 17	- Eletroforegrama SDS-PAGE 12% referente ao teste de expressão a 37 °C com 4 h de indução e 0,5 mmol L ⁻¹ de IPTG para a enzima <i>NgADH</i>	49
Figura 18	- Gráfico de Ramachandran para o melhor modelo da enzima <i>NgADH</i> produzido pelo	51
Figura 19	- Estrutura da enzima <i>NgADH</i> produzida por modelagem por homologia no Modeller.....	52
Figura 20	- Ligações de hidrogênio do ligante NAP com os resíduos do melhor modelo da enzima <i>NgADH</i>	54
Figura 21	- Ligações de hidrogênio do ligante ATR com os resíduos do melhor	

	modelo da enzima <i>NgADH</i>	56
Figura 22	- Alinhamento da sequência de aminoácidos das enzimas <i>TtADH</i> (PDB ID: 6C75) e <i>GtADH</i> (PDB ID: 3ZDR) com <i>NgADH</i>	58
Figura 23	- <i>Paracoccidioides lutzii</i>	60
Figura 24	- Inibidores contra PCM.....	63
Figura 25	- Esquema geral de reação catalisada por Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase GAPDH.....	64
Figura 26	- GAPDHs depositadas no PDB e usadas neste trabalho.	65
Figura 27	- Interações metabólicas na fase de micélio de <i>P. lutzii</i>	67
Figura 28	- Interações metabólicas na transição de micélio para levedura de <i>P. lutzii</i>	68
Figura 29	- Interações metabólicas na fase de levedura de <i>P. lutzii</i>	68
Figura 30	- Interações metabólicas gerais de <i>P. lutzii</i>	70
Figura 31	- Expert pool crystallizability class estabelecido no servidor XtalPred para <i>PIGAPDH</i>	78
Figura 32	- Eletroforegrama SDS-PAGE 12% referente ao teste de expressão a 37 °C com 16 h de indução e 0,5 mmol L ⁻¹ de IPTG para a enzima <i>PIGAPDH</i>	79
Figura 33	- Eletroforegrama SDS-PAGE 12% referente ao teste de expressão a 37 °C com 22 h de autoindução com lactose.	79
Figura 34	- (A) Cromatograma das frações eluídas durante a purificação da <i>PIGAPDH</i> por cromatografia de afinidade. (B) Eletroforegrama SDS-PAGE 12% das frações da cromatografia por afinidade.	80
Figura 35	- Cristais obtidos nos ensaios iniciais de cristalização.	82
Figura 36	- Cristais obtidos nos experimentos de cristalização.	84
Figura 37	- Cristais de <i>PIGAPDH</i> obtidos nos experimentos de co-cristalização.	85
Figura 38	- Cristais de <i>PIGAPDH</i> obtidos nos experimentos de co-cristalização no LNBio	87
Figura 39	- Alinhamento da sequência de aminoácidos da enzima <i>PIGAPDH</i> com a da proteína mais similar disponível no PDB (<i>CaGAPDH</i>).	91
Figura 40	- Gráfico de Ramachandran da estrutura da <i>PIGAPDH</i>	92
Figura 41	- Resíduo modelado na densidade eletrônica (1 σ) na região não permitida.	93

Figura 42	-	Qualidade do ajuste na densidade eletrônica (RSCC em azul e RSR em vermelho) por resíduo.....	94
Figura 43	-	Estrutura tridimensional da <i>PIGAPDH</i> e sua topologia	95
Figura 44	-	Alinhamento da sequência de aminoácidos de <i>PIGAPDH (Plut)</i> com as de outras GAPDHs.....	97
Figura 45	-	Modelos de superfície de <i>PIGAPDH</i>	98
Figura 46	-	Ligações de hidrogênio do íon sulfato.....	99
Figura 47	-	Ligações de hidrogênio do cofator NAD ⁺	100
Figura 48	-	Ligações de hidrogênio do ácido D-galactônico (GAA).....	101
Figura 49	-	Variabilidade sequencial de GAPDH.....	102
Figura 50	-	Trecho hidrofílico de <i>PIGAPDH</i>	104
Figura 51	-	Superposição entre <i>PIGAPDH</i> e <i>E. coli</i> PDB ID 7C5M.....	105
Figura 52	-	Densidade eletrônica (verde) indicando existência de um ligante (GAA).....	106
Figura 53	-	Densidade eletrônica (azul) do ligante ácido derivado de hexose (GAA) (roxo).....	106
Figura 54	-	Esquema geral de oxidação de Galactose.....	107
Figura 55	-	Uma hipótese de fonte do GAA na estrutura de <i>PIGADPH</i>	108
Figura 56	-	Superposição entre <i>PIGAPDH</i> e PDB IDs: 3CIF de <i>Cryptosporidium parvum</i> e 5JYA de <i>Streptococcus agalactiae</i>	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Dados das proteínas homólogas à enzima <i>HsACOT6</i> obtidos a partir de alinhamentos com ela	34
Tabela 2	-	Dados das proteínas homólogas à enzima <i>NgADH</i> obtidos a partir de alinhamentos com ela	50
Tabela 3	-	Condições em que se obtiveram cristais.....	82
Tabela 4	-	Condições em que se obtiveram cristais da <i>PIGAPDH</i>	84
Tabela 5	-	Condições em que se obtiveram cristais da <i>PIGAPDH</i>	85
Tabela 6	-	Condições em que se obtiveram cristais.....	86
Tabela 7	-	Estatísticas da coleta de dados e refinamento	90
Tabela 8	-	Valores de RSCC e RSR da <i>PIGAPDH</i>	93

LISTA DE SIGLAS

1,3-PGA	Ácido 1,3-bifosfoglicerílico
ABCD3	Membro 3 da subfamília D do cassete de ligação Trifosfato de Adenosina
Acil-PTAs	Proteínas Transportadoras de Acilo
ACOT	Acil-CoA tioesterase
ACOT5	Acil-CoA Tioesterase 5
ACOT8	Acil-CoA Tioesterase 8
ACOT12	Acil-CoA Tioesterase 12
ADH	Álcool Desidrogenase
ATR	2'-Monofosfoadenosina-5'-Difosfato
<i>Gt</i> ADH	Álcool Desidrogenase de <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>
<i>Tt</i> ADH	Álcool Desidrogenase de <i>Thermococcus thioeducens</i>
AMACR	α -metilacil-CoA racemasa
AmB	Anfotericina B
ATP	Trifosfato de adenosina
BATS	<i>Blast Automatic Targeting for Structures</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<i>Bm</i> GAPDH	GAPDH de <i>Brugia malayi</i>
CDC	Controle e a Prevenção de Doenças
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
CoA	Coenzima A
CoASH	Ácidos graxos e coenzima A
CRAT	Carnitina acetiltransferase
CROT	Carnitina octanoiltransferase
DMN-CoA	Dimetilnonanoil-CoA
DO	Densidade Óptica
DOPE	<i>Discrete Optimized Protein Energy</i>
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato

GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
<i>HsACOT6</i>	Acil-CoA Tioesterase 6 de <i>Homo sapiens</i>
IPTG	Isopropil β -d-1-tiogalactopiranosido
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
LA	Lúria-Bertani mais agar como meio sólido
LB	Lúria-Bertani
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MAP	Meningoencefalite Amebiana Primária
NAD ⁺	β -1,4-nicotinamida adeninodinucléotídeo - forma oxidada
NADH	β -1,4-nicotinamida adeninodinucléotídeo - forma reduzida
NADP ⁺	β -1,4-nicotinamida adeninodinucléotídeo fosfato
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
<i>NgADH</i>	Álcool Desidrogenase de <i>Naegleria gruberi</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
<i>PIGAPDH</i>	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de <i>Paracoccidioides lutzii</i>
PPAR α	Proliferador de peroxissoma
PTA	Proteínas Transportadoras de Acilo
RSCC	Valor coeficiente de correlação no espaço real
RSR	Valor residual no espaço real
RMSD	Desvio Quadrático Médio das Distâncias
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
TAG	Triglicerídeos
TE	Tioesterase
tRNA	ARN de transferência

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
OBJETIVO GERAL	21
CAPÍTULO 1 - ACIL-COA TIOESTERASE 6 DE <i>Homo sapiens</i> (HsACOT6) ...22	
1.1 INTRODUÇÃO	22
1.1.1 Acil-CoA Tioesterases; Aspectos Gerais.....	22
1.1.2 Acil-CoA Tioesterase 6 de <i>Homo sapiens</i>	26
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
1.3.1 Procedimentos Experimentais	28
1.3.1.1 Obtenção de clones contendo o gene da enzima <i>HsACOT6</i>	28
1.3.1.2 Transformação de bactérias tratadas por quimiocompetência	29
1.3.1.3 Expressão	30
1.3.2 Procedimentos Computacionais	31
1.3.2.1 Modelagem por Homologia com Modeller	31
1.3.2.2 Análise do modelo gerado por homologia com Modeller.....	32
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
1.4.1 Procedimentos Experimentais	32
1.4.1.1 Planejamento do vetor de expressão	32
1.4.1.2 Expressão	33
1.4.2 Procedimentos Computacionais.....	33
1.4.2.1 Modelagem por Homologia com Modeller	33
1.4.2.2 Análise do modelo gerado por homologia com Modeller.....	34
1.5 CONCLUSÕES	38
CAPÍTULO 2 – ÁLCOOL DESIDROGENASE DE <i>Naegleria gruberi</i> (NgADH) ..39	
2.1 INTRODUÇÃO	39
2.1.1 Meningoencefalite Amebiana Primária e a <i>Naegleria gruberi</i> : Aspectos Gerais.....	39
2.1.2 Álcool Desidrogenases: Aspectos Gerais	41
2.1.2.1 Álcool Desidrogenase de <i>Naegleria gruberi</i>	43

2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
2.3.1	Procedimentos Experimentais	46
2.3.1.1	Obtenção de clones contendo o gene da enzima <i>NgADH</i>	46
2.3.1.2	Transformação de bactérias tratadas por quimiocompetência	46
2.3.1.3	Expressão	46
2.3.2	Procedimentos Computacionais.....	47
2.3.2.1	Modelagem por Homologia com Modeller	47
2.3.2.2	Análise do modelo gerado por homologia com Modeller.....	47
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
2.4.1	Procedimentos Experimentais	47
2.4.1.1	Planejamento do vetor de expressão	47
2.4.1.2	Expressão	48
2.4.2	Procedimentos Computacionais.....	49
2.4.2.1	Modelagem por Homologia com Modeller	49
2.4.2.2	Análise do modelo gerado por homologia com Modeller.....	50
2.5	CONCLUSÕES	59
CAPÍTULO 3 – GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE		
<i>Paracoccidioides lutzii</i> (PIGAPDH).....		60
3.1	INTRODUÇÃO	60
3.1.1	Paracoccidioidomicose e <i>Paracoccidioides lutzii</i> : Aspectos Gerais.....	60
3.1.2	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases: Aspectos Gerais.....	64
3.1.2.1	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>Paracoccidioides lutzii</i>	66
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	71
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
3.3.1	Procedimentos Experimentais	71
3.3.1.1	Planejamento do vetor de expressão da enzima <i>PIGAPDH</i>	71
3.3.1.2	Transformação de bactérias tratadas por quimiocompetência	72
3.3.1.3	Expressão	72
3.3.1.4	Purificação por cromatografia de afinidade	72
3.3.1.5	Cristalização da <i>PIGAPDH</i>	73
3.3.1.6	Coleta de dados	74

3.3.2	Procedimentos Computacionais	75
3.3.2.1	Determinação da estrutura por difração de raios X	75
3.3.2.1.1	<i>Processamento das imagens</i>	75
3.3.2.1.2	<i>Faseamento inicial por substituição molecular</i>	75
3.3.2.1.3	<i>Modelagem e refinamento</i>	75
3.3.2.1.4	<i>Validação do modelo final</i>	76
3.3.2.2	Análises e comparações estruturais	76
3.3.2.2.1	<i>Topologia da Estrutura da PIGAPDH</i>	76
3.3.2.2.2	<i>Alinhamento das sequências de aminoácidos e análises da conservação de resíduos e de contatos das proteínas com os ligantes ácido D-galactônico, cofator NAD⁺ e íon sulfato</i>	76
3.3.2.2.3	<i>Análises e comparações dos sítios Ps, Pi, novo Pi e GAA entre estruturas de proteínas homólogas</i>	77
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.4.1	Procedimentos Experimentais	77
3.4.1.1	Planejamento do vetor de expressão da enzima PIGAPDH	77
3.4.1.2	Expressão	78
3.4.1.3	Purificação por cromatografia de afinidade	80
3.4.1.4	Cristalização da PIGAPDH	81
3.4.2	Procedimentos Computacionais	88
3.4.2.1	Determinação da estrutura por difração de raios X	88
3.4.2.1.1	<i>Coleta de dados e Processamento das imagens</i>	88
3.4.2.1.2	<i>Faseamento inicial por substituição molecular</i>	91
3.4.2.1.3	<i>Modelagem e refinamento</i>	91
3.4.2.1.4	<i>Validação do modelo final</i>	92
3.4.2.2	Análises e comparações estruturais	94
3.4.2.2.1	<i>Estrutura da PIGAPDH e Topologia</i>	94
3.4.2.2.2	<i>Alinhamento de sequências de aminoácidos e análise da conservação de resíduos e contatos de proteínas com os ligantes ácido D-galactônico, cofator NAD⁺ e íon sulfato</i>	96
3.4.2.2.3	<i>Análises e comparações entre estruturas de proteínas homólogas dos sítios: Ps, Pi, novo Pi, GAA de PIGAPDH</i>	104
3.5	CONCLUSÕES	110
	PERSPECTIVAS	111

REFÊRENCIAS.....	112
-------------------------	------------

INTRODUÇÃO GERAL

As proteínas podem ser definidas como polímeros de L-aminoácidos que representam unidades funcionais básicas e estruturais que se encontram em todas as formas de vida.

Nas proteínas, os aminoácidos sucessivos estão covalentemente ligados entre si num arranjo amino terminal a carboxi terminal através de ligações amida substituídas, chamadas ligações peptídicas. Cada molécula de proteína é composta por uma sequência exata de aminoácidos dispostos de maneira linear, com cadeias laterais diversificadas que distinguem cada aminoácido, derivada da combinação de 20 L-aminoácidos distintos. As moléculas de proteína têm a propriedade de adquirir uma conformação tridimensional própria e podem ter muitas modificações pós-traducionais, que contribuem para o tamanho, carga e função da proteína madura (ROSENBERG, 2005).

Assim, as proteínas têm inúmeras funções no organismo; de fato, são provavelmente as biomoléculas mais versáteis, como enzimas que catalisam quase todas as reações bioquímicas, como hormônios que medeiam a comunicação entre células, como proteínas de transporte, já que transferem pequenas moléculas, como anticorpos, que fazem parte do sistema imunológico, e como proteínas estruturais, que constroem tecidos como ossos, músculos e cabelos (VON DER SAAL, 2020).

Essa pluralidade funcional das proteínas é derivada da ordem na qual os diferentes L-aminoácidos estão conectados, ou seja, pela chamada estrutura primária de uma proteína, que é um arranjo linear de aminoácidos numa sequência definida. A chamada estrutura secundária está associada à relação estérica local entre os resíduos de aminoácidos. Já a estrutura terciária é a relação estérica de resíduos de aminoácidos colocados à distância numa cadeia polipeptídica. Finalmente, a chamada estrutura quaternária é o arranjo tridimensional de duas ou mais cadeias polipeptídicas dobradas. Assim, esses níveis organizacionais podem ter consonância e fazer algumas interferências, de acordo com a estrutura tridimensional adotada com base na estrutura primária (GUPTA, 2019).

A função de uma proteína é determinada por sua estrutura tridimensional. A cristalografia de proteínas é utilizada como a principal abordagem da biofísica para pesquisar a estrutura e função das proteínas, desvelando suas estruturas

tridimensionais; a partir destas informações, é possível avanços, por exemplo, na medicina molecular, onde uma proteína associada a uma doença específica pode ser considerada como um alvo terapêutico; deste modo, o estudo das posições de cada um de seus átomos e de suas interações e ligações ajuda a compreender profundamente sua função nas células, tecidos ou no corpo, e também como a proteína-alvo interage com um medicamento. Portanto, torna-se possível encontrar novos medicamentos ou entender a maneira de agir de medicamentos conhecidos e incrementar sua eficácia.

Até o presente momento, não há publicações da determinação experimental das estruturas tridimensionais da Acil-CoA Tioesterase 6 de *Homo sapiens*, que será denominada aqui como *HsACOT6*, Álcool Desidrogenase de *Naegleria gruberi*, que será denominada *NgADH*, e Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Paracoccidioides lutzii*, que será denominada *PIGAPDH*. Nesse sentido, estudos destas proteínas por Cristalografia de Raios X podem se tornar relevantes ao caracterizar experimentalmente suas estruturas tridimensionais, mesmo que estas proteínas possuam bastantes diferenças e sejam de diferentes organismos. Os genes codificantes destas proteínas já estavam disponíveis no laboratório e correspondem a projetos ali conduzidos, a saber, proteínas humanas em geral, proteínas do organismo modelo *N. gruberi* e GAPDHs de patógenos, respectivamente. Iniciando-se com 3 genes distintos há a possibilidade maior de que ao menos um deles possa ser produzido em boa quantidade e cristalize, provendo dados para avançar nas metodologias de determinação de estrutura 3D.

Modelos macromoleculares são usados na criação de vacinas e desenho moderno de medicamentos, quando as estruturas das proteínas são conhecidas mediante Cristalografia de Raios X. Essas estruturas também ajudam a entender como as máquinas moleculares funcionam e ilustram a base molecular da disfunção em doenças. Esta técnica não é suficientemente avançada para descrever o comportamento biológico dessas estruturas, portanto, é necessário apoiar esses dados experimentais com métodos biofísicos experimentais (FÖRSTER; SCHULZE-BRIESE, 2019; STUBBS, 2006).

As três enzimas são interessantes do ponto de vista da medicina molecular. A primeira, *HsACOT6*, de acordo com HUNT et al. (2006), é uma das tioesterases que formam um grupo de enzimas que catalisa a hidrólise de acil-CoAs para liberar ácidos graxos e a coenzima A (CoASH). Consequentemente, ela tem o potencial de

regular os níveis intracelulares de acil-CoAs, ácidos graxos livres e CoASH; além disso, também pode estar envolvida na regulação metabólica de lipídios que provocam desordens peroxissomais, tudo isto associado à doenças crônicas, como doença arterial coronariana, aterosclerose, dislipidemia, obesidade e diabetes.

A segunda, *NgADH*, é uma enzima relacionada à via de fermentação alcoólica do protozoário *Naegleria gruberi* que não é patogênico, ao contrário da espécie correlacionada, *Naegleria fowleri*, que causa a doença Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP) que em geral é fatal em humanos. Estudos efetuados com a enzima *NgADH* são de relevância já que se pode utilizar a estrutura dela como base para a enzima homóloga do protozoário patogênico *N. fowleri*, o que pode permitir estudos futuros de medicina molecular para tratamentos da doença MAP.

Finalmente, a terceira enzima, *PIGAPDH*, faz parte da via glicolítica do fungo dimórfico *Paracoccidioides lutzii*, que causa a doença Paracoccidioidomicose (PCM); esta enzima converte gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em ácido 1,3-bifosfoglicerílico (1,3-PGA), que acontece no citoplasma das células do fungo.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é caracterizar as enzimas Acil-coa Tioesterase 6 humana, Álcool Desidrogenase de *Naegleria Gruberi* e Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Paracoccidioides lutzii* e empregando-se técnicas e métodos da biologia estrutural.

Atualmente, no mundo todo cresce a demanda pelo conhecimento de estruturas proteicas em nível molecular. O presente trabalho compreende a modelagem por homologia da estruturas tridimensionais das enzimas Acil-CoA Tioesterase 6 de *Homo sapiens* e Álcool Desidrogenase de *Naegleria Gruberi*. Ademais, a elucidação experimental da estrutura tridimensional da enzima Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Paracoccidioides lutzii*.

Para melhor organização desta dissertação, ela foi dividida em 3 capítulos, tal que cada um deles compreende uma introdução, objetivos específicos, resultados e discussões e conclusões referentes a uma das enzimas estudadas.

Nos capítulos 1 e 2 são descritos os estudos da Acil-CoA Tioesterase 6 *Homo sapiens* e Álcool Desidrogenase de *Naegleria Gruberi*, que abrangem o desenvolvimento de protocolo de expressão e modelagem por homologia da estrutura, respectivamente.

No capítulo 3 é descrito o estudo da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Paracoccidioides lutzii*, que compreende o desenvolvimento de protocolo de

expressão, purificação, cristalização, determinação da estrutura tridimensional e análises estruturais gerais e comparativas com várias GAPDHs de diferentes espécies.

OBJETIVO GERAL

Caracterizar estruturalmente as enzimas *HsACOT6*, *NgADH* e *PIGAPDH*, no caso das duas últimas, para fomentar buscas posteriores de inibidores diferenciais a fim de prejudicar o metabolismo dos patógenos envolvidos nas doenças Meningoencefalite Amebiana Primária e Paracoccidioidomicose, respectivamente.

CAPÍTULO 1 - ACIL-COA TIOESTERASE 6 DE *Homo sapiens* (HsACOT6)

“A vida não é fácil para ninguém. Mas... O que importa? É necessário preservar e, acima de tudo, confiar em nós próprios. Temos de sentir que somos dotados para realizar uma determinada coisa e que temos de a alcançá-la, custe o que custar!”

Maria Salomea Skłodowska-Curie

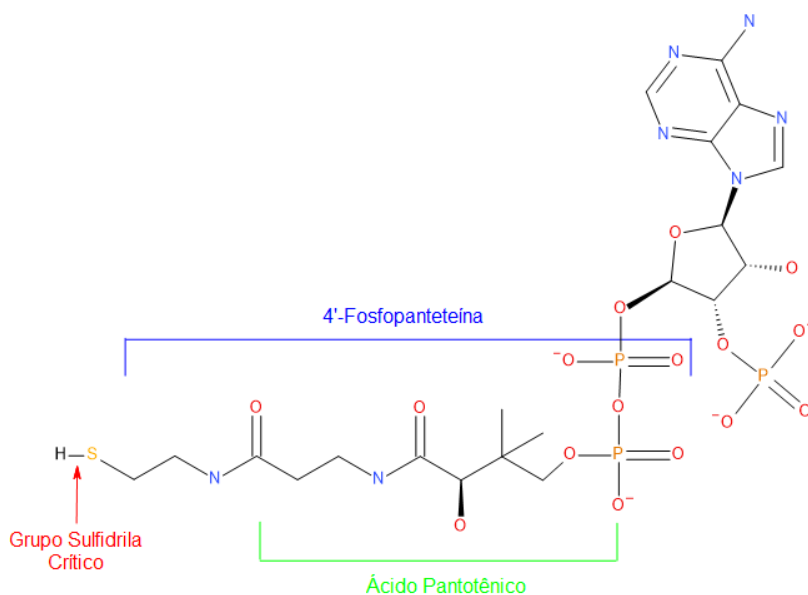
Prêmio Nobel em Química em 1911

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Acil-CoA Tioesterases; Aspectos Gerais

A Coenzima A (CoA) encontra-se nas células como CoA livre ou na forma de seu tioéster, acil-S-CoA. O grupo sulfidríla da coenzima é o sítio funcional que providencia as propriedades químicas/enzimáticas únicas. Em todas as reações de que participa, CoA serve para ativar grupos carboxila na forma de um tioéster acil-CoA derivado (R-CO-S-CoA) (LANE, 2013). Nesta forma, o grupo acila tem propriedades energéticas e mecanicistas favoráveis; sua estrutura pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura Química da Coenzima A



Legenda: Estrutura da Acil-S-CoA com suas partes: Grupo Sulfidríla Crítico, Ácido Pantotênico e 4'-Fosfopanteteína.

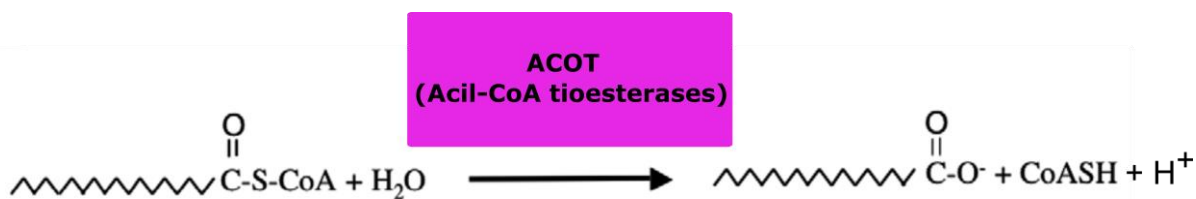
Fonte: O autor.

Energeticamente, os tioésteres de CoA têm alto potencial de transferência (ou seja, uma alta variação negativa de energia livre associada à quebra da ligação C-S do tioéster), o que facilita a condução da reação de transferência de acila na qual participa até sua conclusão. Mecanicamente, a química dos tioésteres de CoA facilita as reações no carbono carbonílico ($-\text{CH}_2-\text{*CO-S-CoA}$) ou no átomo de carbono α adjacente ($-\text{*CH}_2\text{-CO-S-CoA}$).

Estima-se que a maioria das Acil-CoA tioesterases (E.C. 3.1.2.2) executam uma vasta gama de importantes funções biológicas e estão presentes em todas as células vivas, catalisando a clivagem das ligações tioéster que se encontram em diversos substratos celulares (SWARBRICK et al., 2020).

Assim, as Acil-CoA tioesterases têm funções de ativação e desativação de ácidos graxos, e inclusive catalisam a hidrólise de tioésteres da CoA, obtendo moléculas de ácido livre mais CoASH (Figura 2).

Figura 2 - Esquema geral de reação catalisada por Acil-CoA Tioesterase.



Legenda: Acil-CoA tioesterase catalisando a hidrólise de tioéster de CoA.

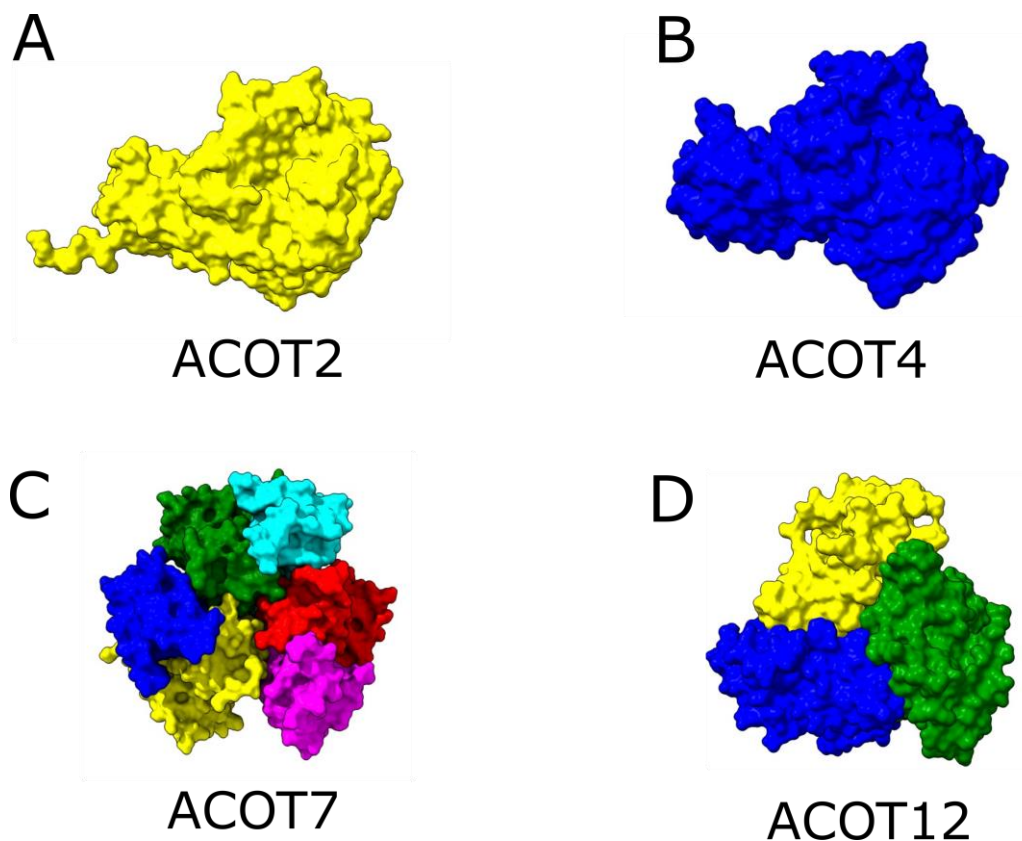
Fonte: (HUNT; ALEXSON, 2008)

As famílias de tioesterase (TE) TE1-13 e TE24-25 são ativas contra ligações sulfidríla dentro de acil-CoAs graxos, já a TE14-19 tem enzimas que clivam ligações entre proteínas transportadoras de Acil-PTAs (Proteínas Transportadoras de Acilo), TE20 e TE21 são hidrolases de proteína-acil e TE22-23 são glutationa-acil hidrolases. Estruturalmente, essas famílias compartilham enovelamento e estados de oligomerização comuns, que reúnem configurações de sítio ativo necessárias, porém, muitas vezes variadas (SWARBRICK et al., 2020).

As famílias TE4-15 e TE24-25 possuem um domínio de enovelamento de forma *hotdog* (CANTU; CHEN; REILLY, 2010), com domínios simples ou duplos dentro de sua estrutura primária que se autoassociam para formar complexos de ordem superior. Essas tioesterases de domínio *hotdog* são encontradas tanto em procariontes quanto em eucariontes. Algumas estruturas são apresentadas na

Figura 3.

Figura 3 - Algumas ACOTs depositadas no PDB.



Legenda: Acil-CoA tioesterases depositadas no PDB. A. ACOT2 - PDB ID: 3HLK, B. ACOT4 - PDB ID: 3K2I, C. ACOT7 - PDB ID: 2QQ2, D. ACOT12 - PDB ID: 3B7K todas de *Homo sapiens*. Figura criada com Chimera X.

Fonte: O autor.

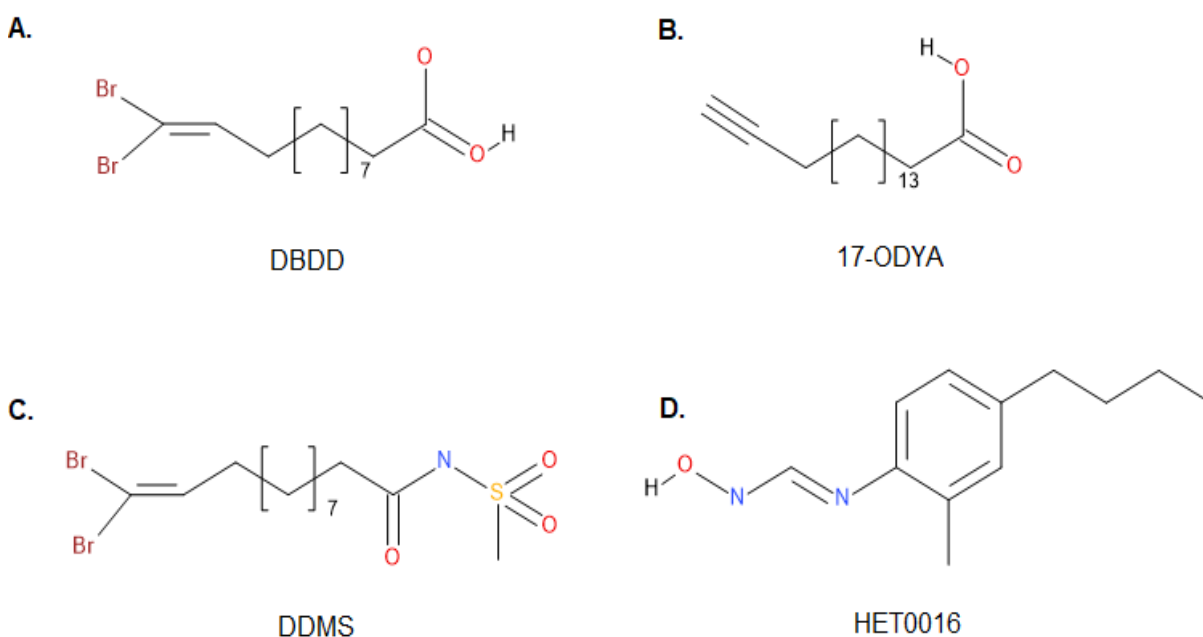
As Acil-CoA tioesterases podem desativar os ácidos graxos e os ésteres de CoA nas células, estes substratos iniciais e intermediários em diversas vias metabólicas celulares, afetando a homeostase, a quantidade de glicose e sua função na mitocôndria e algumas funções do peroxissoma, como a degradação parcial de vários ácidos (di) carboxílicos via β -oxidação. Como consequências destes processos podem-se resultar a supernutrição e a obesidade (ANDERSON; STAHL, 2013; COHEN, 2013; COOPER et al., 2015; HUNT; SIPONEN; ALEXSON, 2012).

Assim, contempla-se a relevância da atividade das enzimas Acil-CoA tioesterases nestes diversos processos do metabolismo, em que atuam como agentes intermediários na degradação e síntese de ácidos graxos. Do mesmo modo, cumprem papéis em outros processos, como: direcionamento e localização de

proteínas, transdução de sinal e efeitos reguladores sobre enzimas (HUNT; ALEXSON, 2002).

Alguns inibidores de proteínas associadas à β -oxidação de lipídeos, que envolve as ACOTs, foram determinados, sendo os análogos terminais de ácido graxo, como o Ácido 6,6 dibromohex-5-enoico (DBDD), desenvolvidos como inibidores competitivos e reversíveis. A introdução de um grupo sulfatado como o 6,6-dibromo-N-metilsulfonil-hex-5-enamida (DDMS) no lugar do ácido carboxílico aumentou a meia-vida do inibidor *in vivo*, eliminando o potencial de degradação rápida do inibidor via β -oxidação. O Ácido octadec-17-inóico (17-ODYA) emergiu como o inibidor mais popular usado em estudos *in vitro* e *in vivo* (EDSON; RETTIE, 2013). Além disso, formaminoximas relacionadas à N'-(4-butil-2-metil-fenil)-N-hidroxi-formamidina (HET0016) são uma classe mais recente de inibidores, os quais são mais potentes e seletivos do que os ácidos graxos substituídos terminalmente. O HET0016, que não se assemelha a substratos típicos de ácidos graxos, foi descoberto por um programa de desenvolvimento de drogas em busca de inibidores no tratamento da hipertensão renal (MIYATA et al., 2001; SATO et al., 2001). As estruturas destes inibidores são apresentadas na Figura 4.

Figura 4 - Inibidores associados à β -oxidação.



Legenda: Inibidores de proteínas associados à β -oxidação de lípídeos.

Fonte: O autor.

1.1.2 Acil-CoA Tioesterase 6 de *Homo sapiens*

A Acil-CoA Tioesterase 6 de *Homo sapiens* (*HsACOT6*) é uma enzima α/β hidrolase localizada nos peroxissomos da célula que hidrolisa especificamente os ésteres CoA dos ácidos graxos ramificados com metila, como o ácido fitânico e o ácido pristânico.

Assim, ela tem um papel fundamental na hidrólise de 2R-pristanoil-CoA em ácido 2R-pristânico fundamental. na transferência dos ácidos graxos ramificados que saem do peroxissomo e chegam até as mitocôndrias, posteriormente acontece a ativação do éster de CoA correspondente, será esterificado em triacilgliceróis no tecido adiposo branco ou opcionalmente, ser transportado ao fígado ou rim para metabolismo posterior (HUNT; ALEXSON, 2002; WESTIN; HUNT; ALEXSON, 2007).

Já no caso do ácido fitânico, de acordo com Hunt; Alexson (2008), seu precursor fitol é ingerido na dieta a partir de produtos lácteos, mas os mamíferos não podem aproveitar o fitol diretamente, demandando então a conversão dele em ácido fitânico (que ocorre no intestino ou em outros tecidos dos seres humanos como o fígado) e, então, produzir os tioésteres deste ácido.

No mesmo artigo, explicam que existem três vias prováveis para o metabolismo dos ácidos graxos ramificados com metila: i) a formação de ésteres de carnitina, que podem ser transferidos até as mitocôndrias para posterior oxidação; ii) conjugação glicina/taurina por aciltransferases (por exemplo, conjugação de ácidos biliares e ácidos graxos) para excreção no sangue ou na bile; iii) ou possivelmente a hidrólise dos ácidos livre pelas enzimas ACOTs para a excreção através da urina ou o transporte até as mitocôndrias.

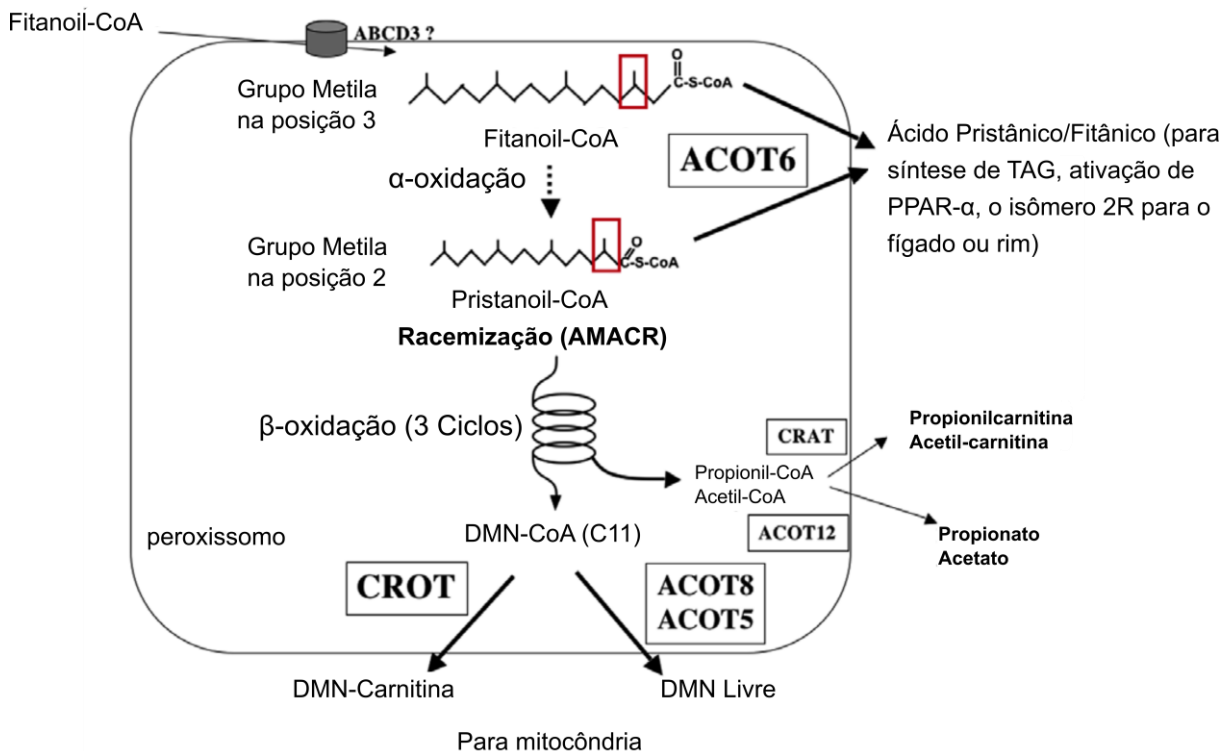
O fitanoil-CoA ingressa aos peroxissomos através do transportador Membro 3 da subfamília D do cassete de ligação Trifosfato de Adenosina (ATP) (ABCD3), sua oxidação em pristanoil-CoA resulta na conversão de um ácido graxo ramificado em 3-metil para um ramificado em 2-metil, considerando-o substrato para a β -oxidação. O pristanoil-CoA sofre varios ciclos na β -oxidação, resultando na produção de dimetilnonanoil-CoA (DMN-CoA), que pode ser esterificado em carnitina por carnitina octanoiltransferase (CROT) ou alternativamente hidrolisado no ácido livre por ACOT8 ou ACOT5 e oxidado nas mitocôndrias. Além disso, propionil-CoA e acetil-CoA são produzidos a partir da β -oxidação de ácidos graxos ramificados com metil, que serão substratos para carnitina acetiltransferase (CRAT) ou ACOT12

(HUNT; ALEXSON, 2008).

Presumivelmente, o acetato/propionato peroxissômico se equilibrará com o pool citosólico, enquanto a acetilcarnitina/propionilcarnitina será transportada para as mitocôndrias para posterior oxidação. *HsACOT6* pode hidrolisar pristanoil-CoA e fitanoil-CoA imediatamente no ácido livre, concedendo sua saída dos peroxissomos para o citosol, desta maneira podem ser reativados no éster CoA para a respectiva esterificação em triglicerídeos (TAG) (HUNT; ALEXSON, 2008).

No artigo de revisão mencionado anteriormente, Hunt & Alexson (2008) também explica que a enzima *HsACOT6* é ativa no tecido adiposo branco para hidrolisar o isômero 2R do pristilil-CoA em ácido pristânico, que pode ser exportado ao fígado para ser convertido no isômero 2S pela enzima α -metilacil-CoA racemasa (AMACR) e finalmente ser β -oxidado. Os ácidos pristânico e fitânico são ligantes para o receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR α) portanto, a enzima *HsACOT6* também pode funcionar no suprimento de ligantes para esse receptor nuclear, como observa-se nas seguintes vias ilustradas na Figura 5.

Figura 5 - Acil-CoA Tioesterase 6 no metabolismo humano.



Legenda: ACOT6 pode hidrolisar pristanoil-CoA e fitanoil-CoA diretamente ao ácido livre, permitindo sua saída dos peroxissomos para o citosol, onde podem ser reativados ao éster CoA para esterificação em triglicerídeos (TAG). O ácido pristânico e fitânico são ligantes para o PPAR α .
Fonte: (HUNT; ALEXSON, 2008).

Com respeito a doenças associadas ao metabolismo de que participa a enzima *HsACOT6*, a doença de Refsum deve-se a um defeito na enzima fitasanoil-CoA, esta enzima é necessária para a α -oxidação do ácido fitânico a ácido pristânico, levando em consideração que *HsACOT6* participa na formação desses ácidos. Os pacientes com doença de Refsum acumulam grandes quantidades de ácido fitânico no plasma e tecidos, os afetados são perfeitamente normais quando são bebês, não mostram defeitos no crescimento e no desenvolvimento, mas geralmente apresentam-se no final da infância com anosmia, declínio da capacidade visual e a perda progressiva da visão noturna. Após 10 a 15 anos, os pacientes podem desenvolver anormalidades adicionais, incluindo ataxia, surdez, ictiose, polineuropatia, fadiga e distúrbios da condução cardíaca. A prevalência da doença de Refsum no Reino Unido de 1 em um milhão e nos Estados Unidos é de 1 em 10 milhões (SCOTT; OLPIN, 2015; WANDERS, 2016; WATERHAM; WANDERS; LEROY, 1993).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar o estudo para obtenção dos clones contendo o gene da enzima *HsACOT6*;
- Incorporar a construção pET-28a/*HsACOT6* em bactérias;
- Determinar as condições de expressão e purificação;
- Encontrar as condições de cristalização;
- Em caso de insucesso na obtenção de cristais de qualidade, tentar resolver a estrutura por meio de modelagem por homologia.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Procedimentos Experimentais

1.3.1.1 Obtenção de clones contendo o gene da enzima *HsACOT6*

Executou-se um estudo para selecionar o plasmídeo e os sítios de restrição

para inserção do gene codificante de *HsACOT6*. Para tal fim, foi feita uma procura no PDB para corroborar em quais plasmídeos foram clonadas enzimas homólogas e também verificou-se que não existiam estruturas tridimensionais resolvidas ou depositadas para esta enzima.

A sequência de aminoácidos desta enzima foi submetida à análise pelo servidor XTAIPred (JAHANDIDEH; JAROSZEWSKI; GODZIK, 2014; SLABINSKI et al., 2007) que tem objetivo de verificar a probabilidade da proteína cristalizar usando os seguintes critérios:

- i) funciona se comparando vários recursos da proteína com as distribuições desses recursos no TargetDB (Banco de dados de registro de destino para projetos de genômica estrutural);
- ii) um resumo das características da proteína e previsões que indicam problemas que provavelmente serão encontrados durante a cristalização da proteína;
- iii) previsão de ligantes; e
- iv) listas de homólogos próximos de genomas microbianos completos que são mais propensos a cristalizar.

Assim, ao eleger o plasmídeo, o estudo que prosseguiu foi a seleção de enzimas de restrição que não clivassem a sequência de nucleotídeos do gene da *HsACOT6* e que fossem compassíveis com a região de múltipla clonagem do plasmídeo; esse procedimento foi efetivado com o auxílio do programa NEBcutter v.2.0 (VINCZE; POSFAI; ROBERTS, 2003).

Uma consideração complementar analisada foi a expressão de uma “his-tag” no N-terminal favorável para clivagem com a enzima trombina. Assim, deliberados os parâmetros necessários que constituem o vetor de expressão da *HsACOT6*, foi solicitada a construção do plasmídeo com o gene *HsACOT6* inserto, junto à empresa GenScript USA Inc. (<https://www.genscript.com/>).

1.3.1.2 Transformação de bactérias tratadas por quimiocompetência

O plasmídeo pET-28a(+) recombinante, contém o gene codificante da enzima *HsACOT6* foi inserido em células de bactérias *E. coli* BL21-DE3, tratadas por

quimiocompetência. A técnica consiste basicamente na transformação bacteriana em que as células são submetidas a um choque térmico para produzir poros em suas membranas e permitir a inserção dos plasmídeos (SINGH et al., 2010).

As células tratadas por quimiocompetência foram armazenadas em ultrafreezer $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$, posteriormente foram descongeladas e mantidas em gelo para transformação. Adicionou-se $1\ \mu\text{L}$ da solução do plasmídeos diluída 1:10 que contém o gene codificante da enzima *HsACOT6* aos microtubos que continham as células; deixou-se em gelo por 10 min para permitir sua inserção mediante o choque térmico, em seguida, foram inoculadas em meio sólido suplementado com canamicina $30\ \mu\text{g mL}^{-1}$ e deixadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 h.

Com as colônias crescidas, realizou-se um pré-inóculo em 5 mL de meio Lúria-Bertani (LB) ou 2xYT: $16\ \text{g L}^{-1}$ de peptona, $10\ \text{g L}^{-1}$ de extrato de levedura e $5\ \text{g L}^{-1}$ de NaCl; suplementado com canamicina a uma concentração final de $30\ \mu\text{g mL}^{-1}$ em seguida, foram plaqueadas em meio sólido seletivo (LA) que é o mesmo meio LB que contém $15\ \text{g L}^{-1}$ de ágar contendo o antibiótico canamicina $30\ \mu\text{g mL}^{-1}$ e incubadas por 12 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. Finalmente, tomou-se as melhores colônias mantendo e se deizaram num inóculo de 5 mL a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 180 rpm por 16 h. As células foram armazenadas em 50% de glicerol à temperatura de $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso posterior.

1.3.1.3 Expressão

Para os experimentos de expressão da enzima *HsACOT6*, tomaram-se várias colônias aleatoriamente para um inóculo inicial de 5 mL de meio LB líquido, contendo o antibiótico canamicina numa concentração de $30\ \mu\text{g mL}^{-1}$, suplementado com $5\ \mu\text{L}$ de estoque de células, que foi incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 180 rpm por 6 h. O inóculo inicial foi diluído na proporção de 1:100 em um novo cultivo de 25 mL de meio LB contendo o antibiótico canamicina a $30\ \mu\text{g mL}^{-1}$ e mantido a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 180 rpm até atingir uma densidade óptica (DO) entre 0,4 e 0,6 a 600 nm.

Alcançada esta condição, as culturas de células foram induzidas com Isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de $0,5\ \text{mmol L}^{-1}$ e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 170 rpm. A fim de sistematizar os resultados foi observado cada ensaio de expressão por 4, 8 e 16 h. As culturas de células obtidas

em cada condição foram centrifugadas por 20 min a 6.000 rpm a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 10 mL de tampão de lise (20 mmol L⁻¹ Tris-HCl e 500 mmol L⁻¹ NaCl, pH 7,9). Posteriormente, este material foi submetido a quinze ciclos de 1 min de pulsos de sonicação em banho de gelo (30 seg a 40% de potência e 30 seg em gelo).

Após o rompimento celular, a amostra, referente a 10 mL de cultura, foi submetida a centrifugação a 15.000 rpm por 20 minutos a 10 °C. Para colocar as amostras no gel, alíquotas de 20 µL 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 180 V por 1 h. Subsequentemente, a eletroforese, o gel foi corado em solução de 10% (V/V) ácido acético glacial, 0,25% (m/V) azul de Comassie R-250 e 45% (V/V) de etanol por 15 min e descorado em solução de 57% (V/V) metanol e 3% (V/V) ácido acético por aproximadamente 30 min. A análise destes resultados foi realizada por SDS-PAGE (12 %) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

1.3.2 Procedimentos Computacionais

1.3.2.1 Modelagem por Homologia com Modeller

A busca por sequências similares à da enzima alvo foi realizada com a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) do NCBI. Os critérios de seleção foram estruturas com porcentagem de identidade > 25% e melhor resolução; ademais, foi usada a ferramenta *Blast Automatic Targeting for Structures* (BATS) na plataforma MHOLINE (CAPRILES et al., 2010), com critério de seleção índice 2. Os PDB's selecionados foram utilizados como arquivos de entrada para o programa Modeller (ESWAR et al., 2006).

Foram gerados 150 modelos em sua conformação de monomero, que foram avaliados em relação à pontuação *Discrete Optimized Protein Energy* (DOPE) (SHEN; SALI, 2006) e ao gráfico de Ramachandran com uso do programa Procheck (LASKOWSKI et al., 1993). O modelo selecionado foi o que apresentou menor valor do DOPE normalizado. Além disso, verificou-se que ele não apresenta os resíduos do sítio ativo nas regiões não permitidas do gráfico de Ramachandran.

1.3.2.2 Análise do modelo gerado por homologia com Modeller

O modelo obtido foi submetido à ferramenta PDBsum (LASKOWSKI, 2009) a fim de analisar sua estrutura secundária e topologia. Finalmente, representou-se modelo da proteína alvo em 3D com o programa UCSF Chimera X (PETTERSEN et al., 2021). As estruturas selecionadas mediante a ferramenta BATS foram sobrepostas com a utilização do programa MultiProt (SHATSKY; NUSSINOV; WOLFSON, 2004) e a sequência de aminoácidos das estruturas tridimensionais homólogas utilizadas foram alinhadas com o programa T-Coffee (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). A visualização do alinhamento se deu por meio do programa ALINE (BOND; SCHÜTTELKOPF, 2009), sendo as estruturas secundárias estimadas pelo programa DSSP (KABSCH; SANDER, 1983). O fundo do alinhamento foi colorido de acordo com a convenção de Alscript Calcons (BARTON, 1993).

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

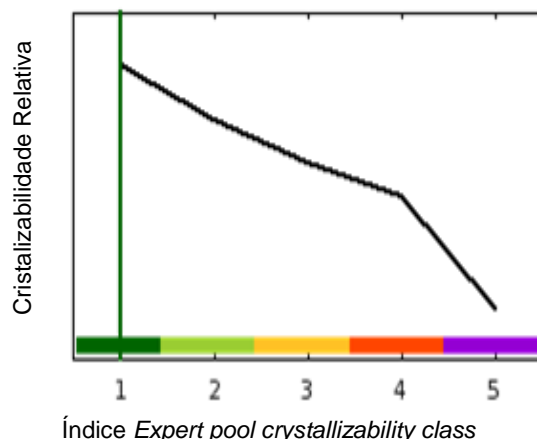
1.4.1 Procedimentos Experimentais

1.4.1.1 Planejamento do vetor de expressão

A partir do estudo para a síntese e inserção do gene da *HsACOT6*, fez-se o pedido da construção pET-28a(+)/*HsACOT6* com os sítios de restrição *NheI* e *XhoI*. Assim, um pequeno número de aminoácidos foi adicionado à sequência nativa para a expressão de uma “*his-tag*” no N-terminal e contendo um sítio para eventual corte desta cauda mediante hidrólise pela enzima trombina.

Finalmente, os resultados do servidor XTAIPred indicam que *HsACOT6* tem uma ótima probabilidade de cristalização pelo índice “*Expert pool crystallizability class*”, o que é apresentado na Figura 6.

Figura 6 - *Expert pool crystallizability class* estabelecido no servidor XtalPred para *HsACOT6*.



Legenda: Resultados obtidos no servidor XtalPred
 Fonte: O autor.

1.4.1.2 Expressão

A sequência de aminoácidos da enzima *HsACOT6* foi submetida à análise pelo servidor ProtParam (EXPASY Proteomics Server), que estimou a massa molecular de 22,99 kDa (207 resíduos de aminoácidos), mas com a inclusão de 6 resíduos de histidina e seus conectores (genes), provenientes do sistema de expressão, leva a uma massa molecular calculada total de 23,81 kDa (213 resíduos de aminoácidos).

Através da análise de eletroforese não foi possível observar uma banda de indicação de expressão realizada, a partir de testes de expressão iniciais a 37 °C com 3, 6 e 16 h de indução nas concentrações de IPTG de 0,10, 0,25, 0,50 e 1,00 mmol L⁻¹, comprando-se com bactérias não transformadas.

Assim, na sequência, foi realizado novo teste de expressão, agora usando-se indução com lactose no próprio meio de cultura (auto-indução) proposto por Studier (2005), à temperatura de 15 °C por 24 e 48 h. O gel de análise resultante foi inconclusivo, necessitando repetição.

1.4.2 Procedimentos Computacionais

1.4.2.1 Modelagem por Homologia com Modeller

Na ausência de dados experimentais para resolver a estrutura 3D da

HsACOT6, foi dada sequência ao trabalho de modelagem molecular por restrições espaciais.

Por meio da ferramenta BATS na plataforma MHOLINE (CAPRILES et al., 2010) foram selecionadas 2 estruturas de proteínas homólogas humanas identificadas como ACOTs. A Tabela 1 mostra os dados das estruturas selecionadas para construção dos modelos.

Tabela 1 - Dados das proteínas homólogas à enzima *HsACOT6* obtidos a partir de alinhamentos com ela.

PDB IDs	Resolução / Å	Proteína/Organismo	Similaridade (%)	Identidade (%)
3HLK	2,10	<i>ACOT2/Homo sapiens</i>	100,0	57,00
3K2I	2,40	<i>ACOT4/Homo sapiens</i>	100,0	54,11

Fonte: O autor.

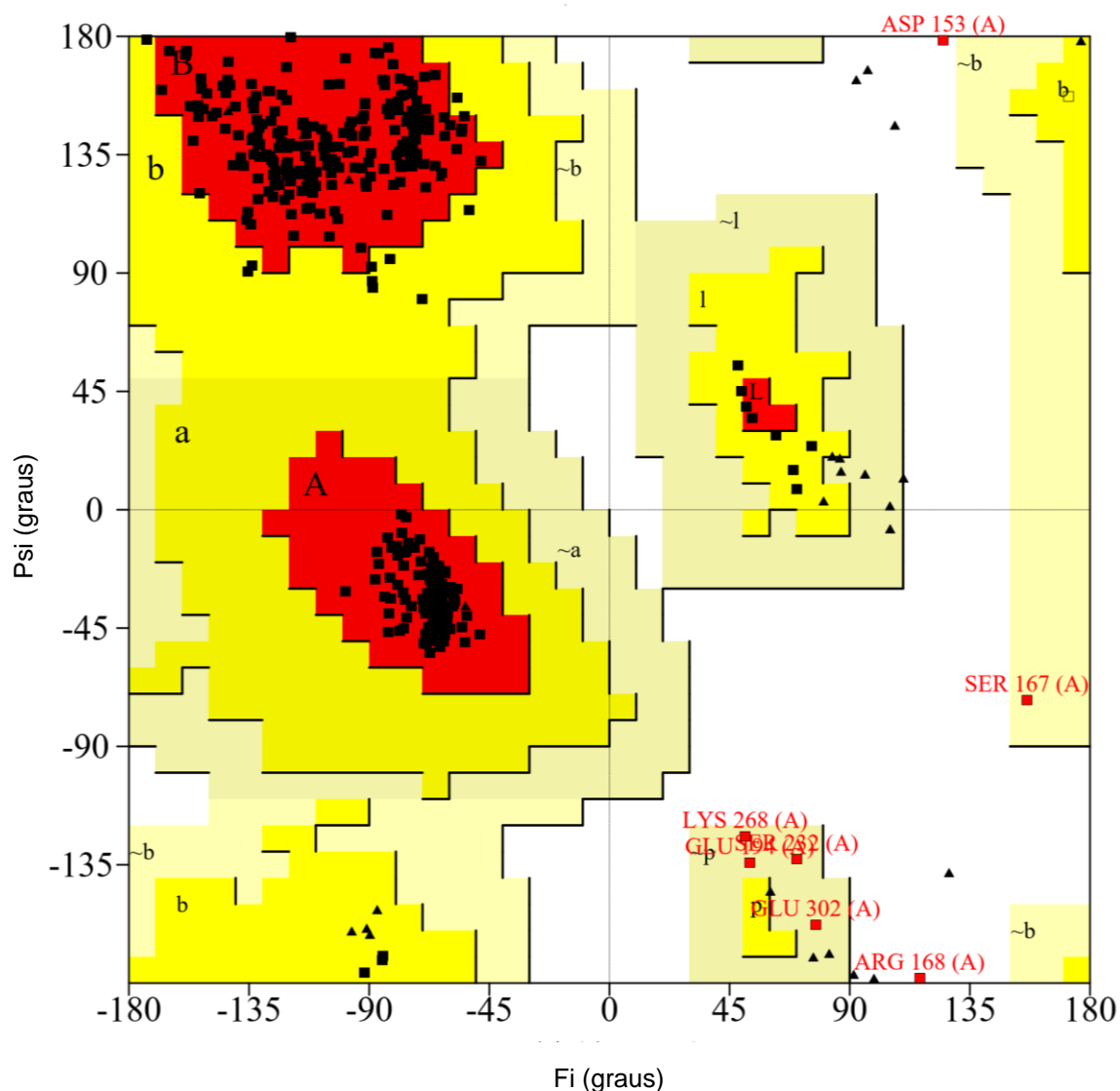
Ou seja, a porcentagem de identidade entre as proteínas homólogas usadas na modelagem e a alvo foi sempre superior a 25%, o que está de acordo com (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003), que apontam que as proteínas com cerca de 25% de identidade ou superior podem ser usadas para construir um modelo para a proteína alvo.

1.4.2.2 Análise do modelo gerado por homologia com Modeller

O modelo gerado por homologia selecionado foi o de número 99 entre os 150 modelos gerados, o qual apresentou o menor valor para a função de energia DOPE (-1.12812), que indica maior estabilidade. Ademais, foi verificado que os resíduos importantes para catálise e interação com o substrato não estivessem nas regiões não permitidas no gráfico de Ramachandran.

O gráfico de Ramachandran (Figura 7) indica que 92,7% dos aminoácidos estão nas regiões mais favoráveis, 5,3% nas regiões adicionalmente permitidas, 1,4% nas regiões generosamente permitidas e 0,6% nas regiões não permitidas.

Figura 7 - Gráfico de Ramachandran para o melhor modelo da enzima *HsACOT6* produzido pelo Modeller.

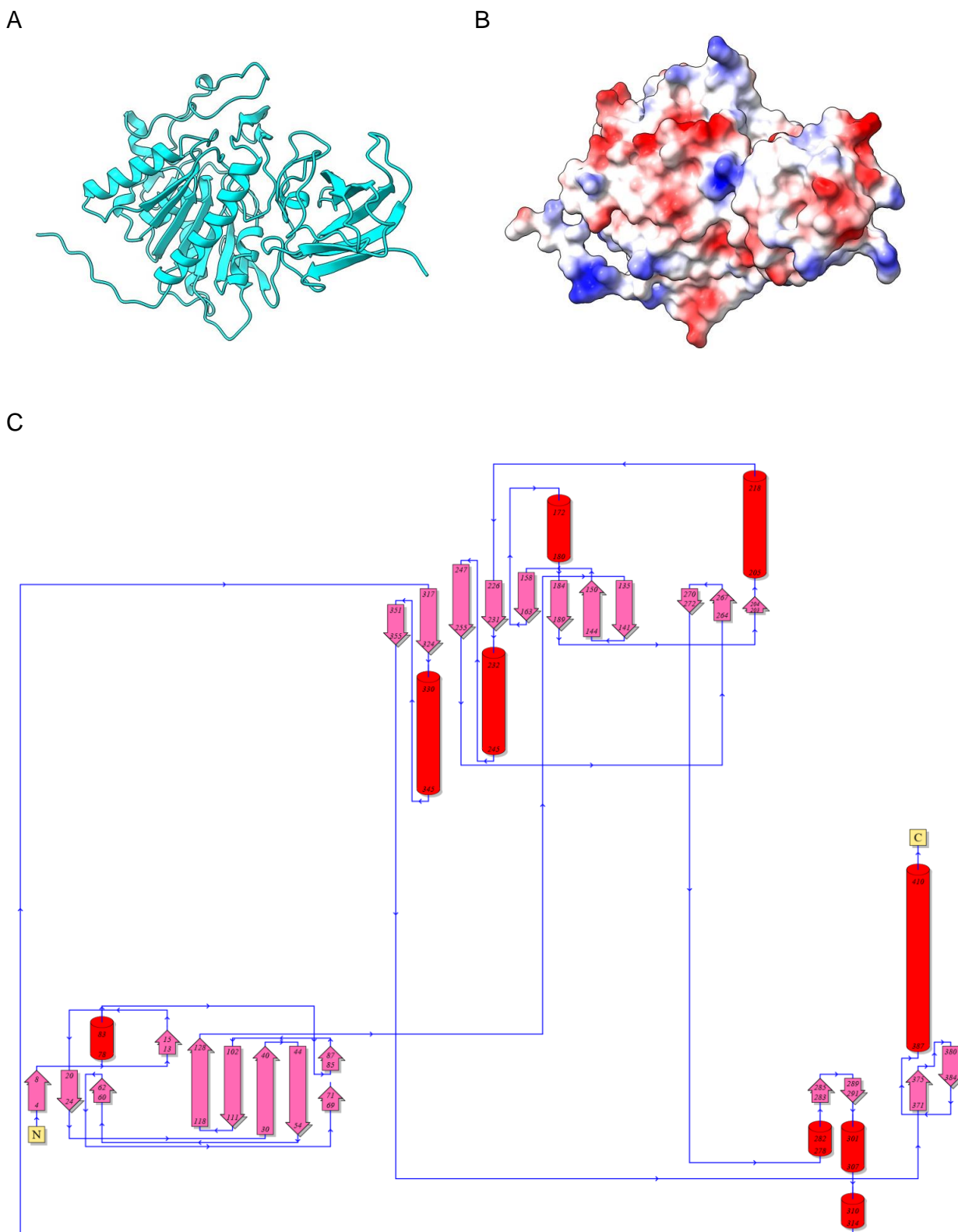


Legenda: As glicinas são representadas por triângulos e os demais aminoácidos por quadrados. As áreas em vermelho são chamadas de regiões muito favoráveis, em amarelo, adicionalmente permitidas, em bege, generosamente permitidas, e em branco, não permitidas. Figura gerada pelo programa Procheck.

Fonte: O autor.

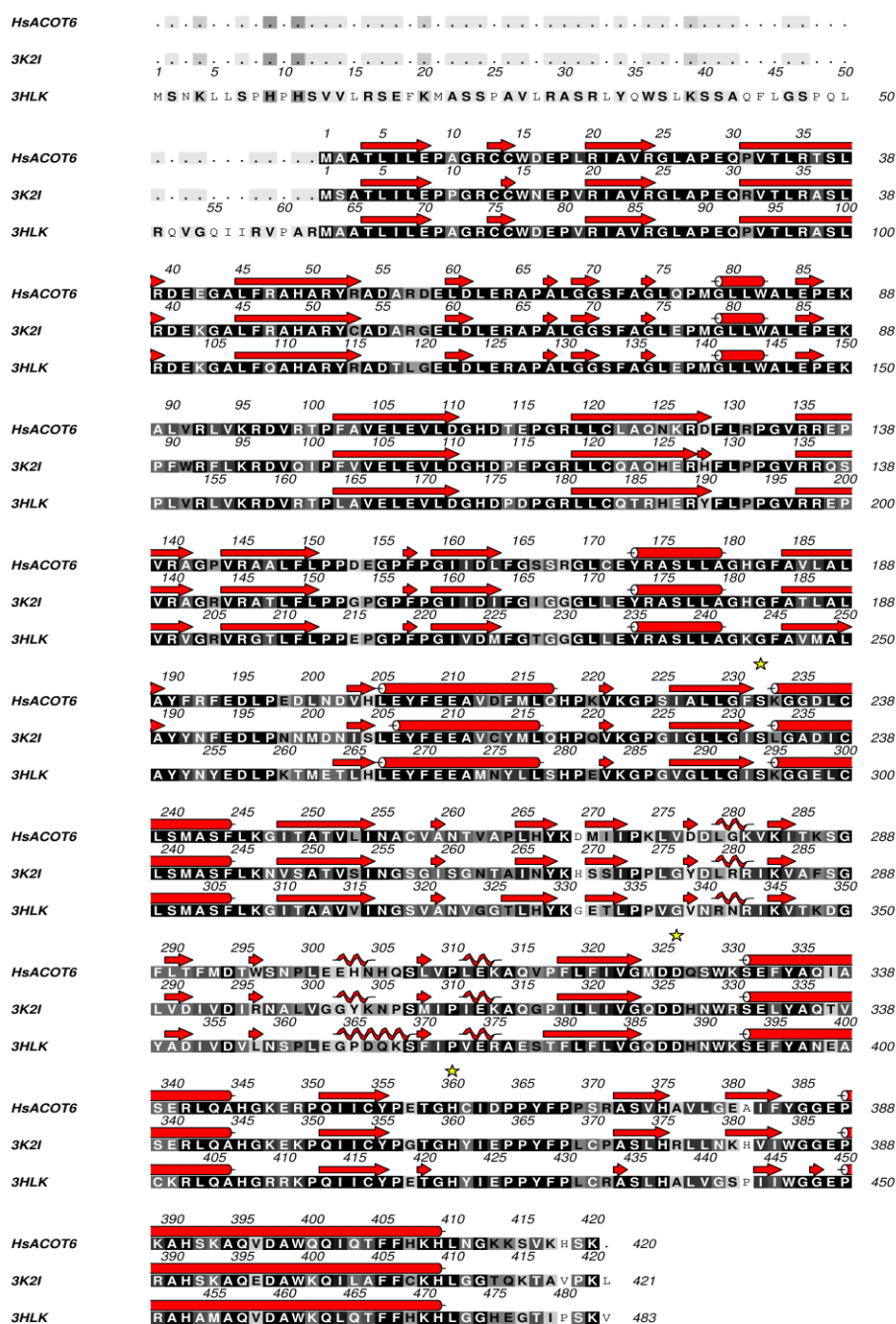
O modelo final da *HsACOT6* é um monômero e está apresentado em forma de fita e superfície eletrostática (Figura 8-A e 8-B); sua estrutura secundária compreende 29,5% dos resíduos em hélices- α , 50,6% em fitas- β e 2,9% em “loops” ou alças (Figura 8-C).

Figura 8 - Estrutura da enzima *HsACOT6* obtida por modelagem por homologia no Modeller.



O alinhamento entre as sequências dos moldes e do modelo está apresentado na Figura 9 e, por meio da comparação sequencial, pode-se verificar que os resíduos do sítio ativo da *HsACOT6* são S232, D326, H360.

Figura 9 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das enzimas *HsACOT2* (PDB ID: 3HLK) e *HsACOT4* (PDB ID: 3K2I) com *HsACOT6*.



Legenda: Alinhamento da sequência de aminoácidos de *HsACOT6*. Setas vermelhas representam fitas β , cilindros vermelhos representam hélices α , espirais vermelhas representam hélices 3_{10} ou π e as estrelas amarelas indicam os resíduos do sítio ativo.

Fonte: O autor.

1.5 CONCLUSÕES

- A metodologia utilizada nas etapas de transformação e expressão não pôde ser corretamente avaliada devido às análises inconclusivas na produção da enzima *HsACOT6*, porém, o trabalho contribuiu para indicar algumas dificuldades na expressão da enzima *HsACOT6*, colocando os resultados agora apresentados como ponto de partida para trabalhos posteriores;
- A enzima *HsACOT6* teve sua estrutura modelada computacionalmente, entretanto, ainda destaca-se a importância da estrutura 3D ser obtida experimentalmente;
- O modelo gerado pelo programa Modeller demonstra que o mesmo é uma ferramenta da bioinformática que pode apoiar dados experimentais posteriores que sejam obtidos da enzima *HsACOT6*.

CAPÍTULO 2 – ÁLCOOL DESIDROGENASE DE *Naegleria gruberi* (NgADH)

“Uma grande vantagem da análise de raios X como método de análise de estrutura química é o seu poder de mostrar alguma estrutura totalmente inesperada e surpreendente, ao mesmo tempo, com total certeza.”

Dorothy Mary Crowfoot Hodgkin

Prêmio Nobel em Química em 1964

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Meningoencefalite Amebiana Primária e a *Naegleria gruberi*: Aspectos Gerais

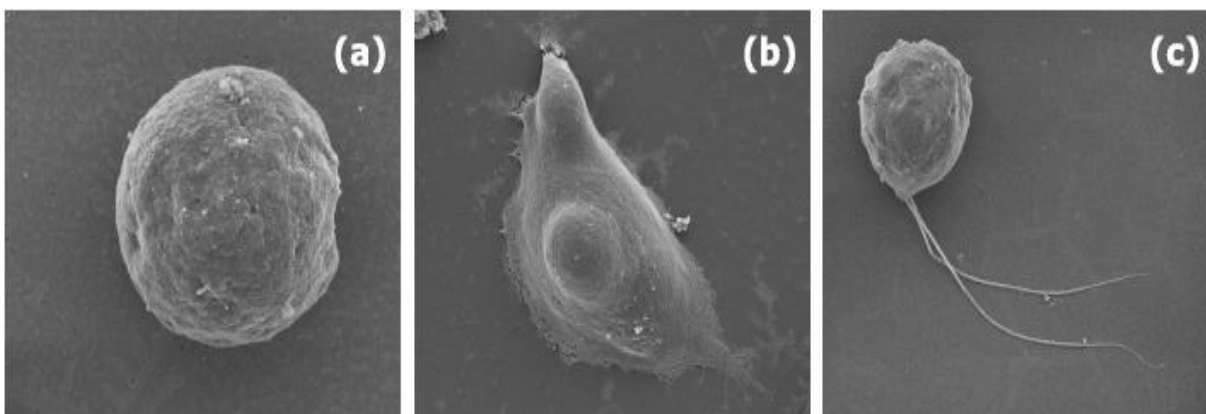
N. gruberi não é um microorganismo patogênico para humanos, não obstante, o gênero *Naegleria* compreende o microorganismo *N. fowleri*, que tem um habitat similar ao de *N. gruberi* e pode ocasionar a doença fatal em humanos chamada Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP).

De acordo com o Centro para o Controle e a Prevenção de Doenças (CDC) (2019), os sintomas iniciais podem incluir náusea ou vômito, dor de cabeça e febre. Os sintomas vindouros são: rigidez no pescoço, confusão, falta de atenção, perda de equilíbrio, convulsões e alucinações. Após o início dos sintomas, a doença progride rapidamente e geralmente causa morte em cerca de 5 dias a 18 dias.

Para Fulton (1993) *Naegleria gruberi* é um microorganismo pertencente ao reino protista, heterotrófico, que frequentemente habita ambientes aeróbicos e microaeróbicos em corpos de água doce e solos úmidos.

Sua forma principal é a ameboide, que mostra locomoção similar à da lesma e mitose semelhante à de muitos protistas, na qual o fuso está organizado dentro do núcleo, os centríolos estão ausentes e o envelope nuclear e o nucléolo permanecem intactos durante toda a divisão (Figuras 10); adicionalmente apresentam as formas cística e flagelada. (Figura 11).

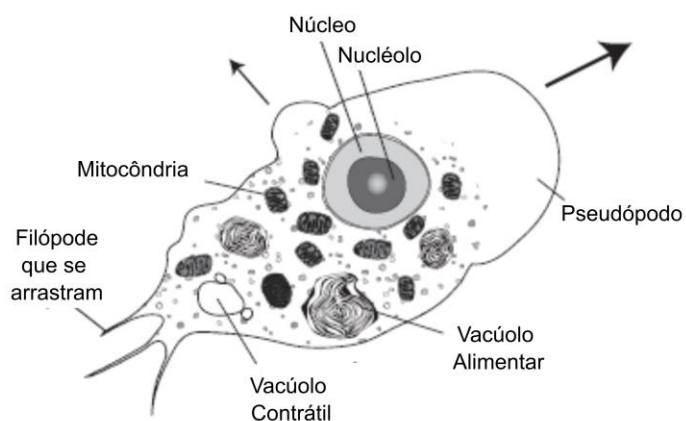
Figura 10 - Células de *Naegleria gruberi*



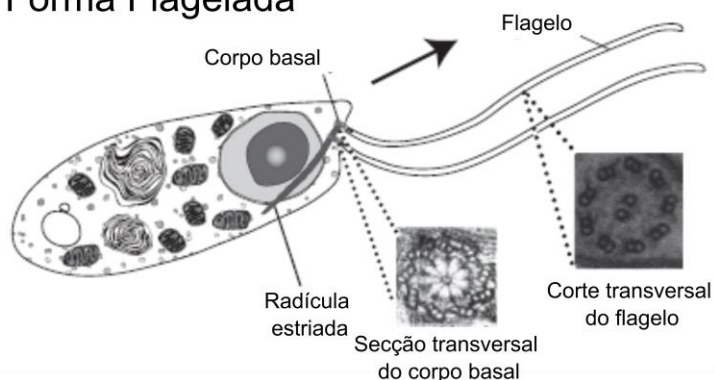
Legenda: (a) encistada, (b) ameboide e (c) flagelada.
Fonte: (BELLINI et al., 2018)

Figura 11 - Formas de *Naegleria gruberi*.

Forma Ameboide



Forma Flagelada



Legenda: Estruturas (partes) das formas Ameboide e Flagelada de *Naegleria gruberi*.
Fonte: (FRITZ-LAYLIN et al., 2010).

Recentemente, foram caracterizadas e identificadas as estruturas dos proteassomas de *N. gruberi* e *N. fowleri* por Guzmán-Téllez et al. (2020) mediante

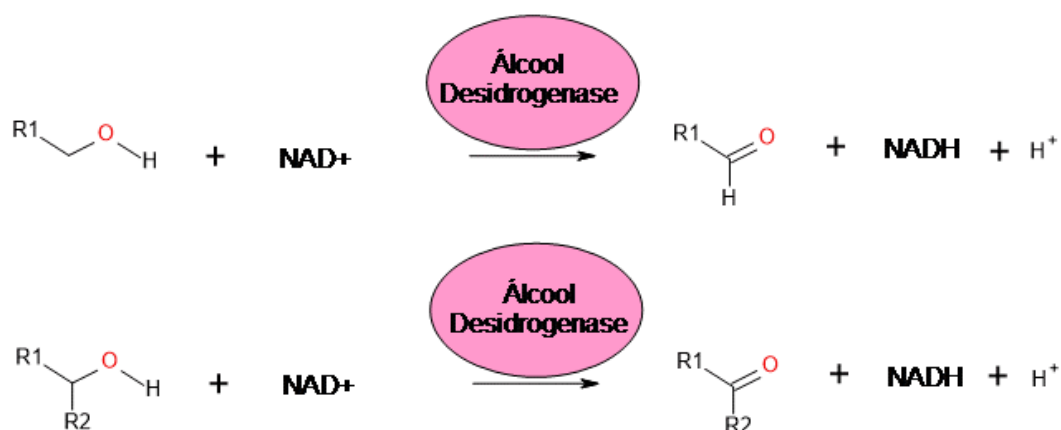
estudos de bioinformática, confirmados experimentalmente com ensaios de *Western* e *dot blot*, além de ensaios de microscopia de imunofluorescência. Os proteassomas têm relevância porque são complexos multi-catalíticos e são consideradas a estrutura mais importante responsável pela degradação de proteínas intracelulares. Além disso, está relacionada à manutenção da homeostase celular e, em microorganismos patogênicos e à modulação da virulência.

Finalmente, é importante ressaltar a informação genômica determinada por Opperdoes; De Jonckheere; Tielens (2011) de *N. gruberi* que também faculta a oportunidade de determinar futuros alvos de drogas através de estudos factíveis que possam atuar frente à MAP causada pelo patógeno oportunista relacionado *N. fowleri*.

2.1.2 Álcool Desidrogenases: Aspectos Gerais

As Álcool Desidrogenases (ADHs) (EC 1.1.1.1) são enzimas classificadas como oxidorreduzases que atuam sobre um álcool primário ou secundário para formar aldeídos ou cetonas, respectivamente, e utilizam os cofatores de nicotinamida, β -1,4-nicotinamida adeninodinucleotídeo (NAD^+) ou β -1,4-nicotinamida adeninodinucleotídeo fosfato (NADP^+) como receptores de elétrons. O mecanismo para a reação é mostrado na Figura 13. As ADHs geralmente se encontram presentes em plantas, leveduras, mamíferos, fungos e bactérias, entre outros, sendo produzidas como homodímeros ou homotetrâmeros, com uma massa de monômero de aproximadamente 40 kDa (GOLDBERG et al., 2007; REID; FEWSON, 1994).

Figura 12 - Esquema geral de reação catalisada por Álcool Desidrogenase.



Fonte: O autor, adaptada de BRENDA (2020).

Existem três tipos de ADHs com base no tamanho do substrato, as de cadeia curta, média e longa, descritas a seguir. A maioria das ADHs para cadeia curta possuem um resíduo Tirosina (Y) catalítico cujo grupo hidroxila doa ou aceita um próton do substrato. Um resíduo Lisina (K) adjacente e o anel de nicotinamida de NADP⁺ diminuem o pKa do grupo hidroxila do resíduo Y para facilitar seu papel como um aceitador-doador de prótons. Quando o resíduo Y extrai um próton do substrato, um ânion hidreto é transferido do substrato para o cofator oxidado (KAVANAGH et al., 2008; SELLÉS VIDAL et al., 2018).

As ADHs para cadeia média usam um mecanismo catalítico baseado em Y, como nas de cadeia curta, mas precisam de zinco como cofator. Baker et al. (2009) explica que nestas enzimas, o íon Zn²⁺ é coordenado, na ausência do substrato, por uma molécula de água, dois resíduos Cisteínas (C) e um de Histidina (H), adotando uma geometria tetraédrica. Depois que o substrato álcool se liga à enzima, ele desloca esta molécula de água da camada de coordenação e transfere um próton para o solvente, formando um intermediário alcóxido que é estabilizado pelo íon Zn²⁺ catalítico. Este alcóxido transfere um íon hidreto para o cofator oxidado e entra em colapso para um aldeído ou cetona.

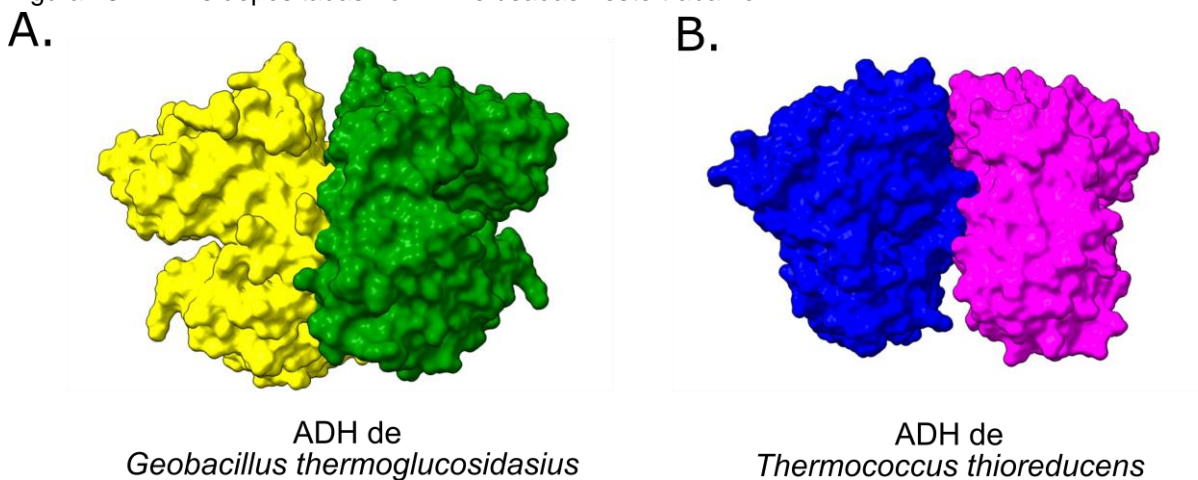
As ADHs para cadeia longa constituem um grupo heterogêneo que difere no mecanismo catalítico e nos cofatores adicionais necessários (Fe²⁺, Zn²⁺, ambos ou nenhum metal). Algumas dessas ADHs empregam um terceiro mecanismo catalítico no qual um resíduo K aceita um próton do substrato e o doa a uma molécula de solvente. A versatilidade do resíduo K para atuar como base é incrementada por uma ligação de hidrogênio com um resíduo Asparagina (N), dessa maneira, um hidreto é então transferido do substrato para o cofator oxidado (KAVANAGH et al., 2002; LIU et al., 2009).

Nas enzimas que contêm um íon Fe²⁺, há regularmente coordenação deste por um resíduo de Ácido Aspártico (D) e três histidinas (H), dispostos em uma geometria tetraédrica. O mecanismo catalítico ocorre por interação do substrato com o íon Fe²⁺, o que facilita a transferência de um grupo hidreto para o NAD⁺ (GAONALÓPEZ; JULIÁN-SÁNCHEZ; RIVEROS-ROSAS, 2016; MOON et al., 2011).

Cabiscol; Aguilar; Ros (1994) demonstraram que as ADHs dependentes de Fe²⁺, diferentemente das dependentes de Zn²⁺, são sensíveis à ativação do oxigênio devido a que as reações de oxidação catalisadas por Fe que podem ocorrer na presença do mesmo em condições anaeróbicas.

Algumas estruturas de enzimas ADHs resolvidas por métodos de Biologia Estrutural são apresentadas na Figura 13, como a ADH de *Geobacillus thermoglucosidasius*, que é um microrganismo termofílico usado na geração de biocombustíveis como o bioetanol (EXTANCE et al., 2013) e a ADH de *Thermococcus thio-reducens*, que é um arqueão hipertermofílico que é resistente a ampicilina, cloranfenicol, canamicina e gentamicina, mas sensível a tetraciclina e rifampicina (LARSON; JONES; MCPHERSON, 2019; PIKUTA et al., 2007).

Figura 13 - ADHs depositadas no PDB e usadas neste trabalho



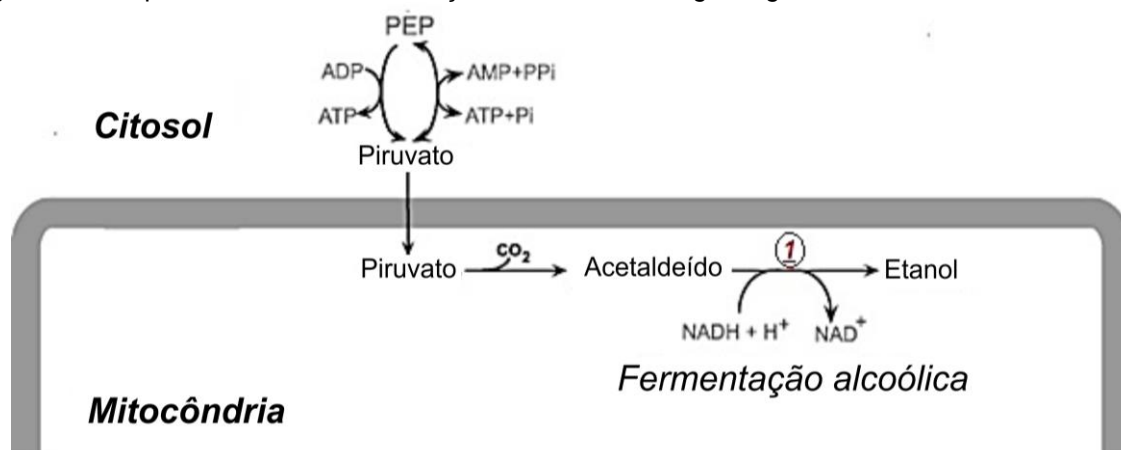
Legenda: Álcool Desidrogenases depositadas no PDB. A. *Gt*ADH - PDB ID: 3ZDR, B. *Tt*ADH - PDB ID: 6C75. Figura criada com Chimera X.

Fonte: O autor.

2.1.2.1 Álcool Desidrogenase de *Naegleria gruberi*

Até o presente não há estudos de caracterização estrutural da Álcool Desidrogenase de *N. gruberi* (*Ng*ADH). Em Opperdoes; De Jonckheere; Tielens (2011), embora a necessidade de mais evidências ou trabalhos experimentais, indica-se sua função como o apontado na Figura 14, em que se pode observar a via de fermentação alcoólica do protozoário *Naegleria gruberi*, que acontece quando uma molécula de piruvato ingressa na mitocôndria desde o citosol e é então sua transformação catalisada pela enzima piruvato descarboxilase a acetaldeído que, finalmente, é transformado pela enzima *Ng*ADH para etanol.

Figura 14 - Esquema da via de fermentação alcoólica de *Naegleria gruberi*



Fonte: O autor, baseado na pesquisa de Oppendoes; De Jonckheere; Tielens (2011)

Legenda: Via de fermentação alcoólica mostrando algumas etapas metabólicas. A ação da Álcool Desidrogenase na reação catalisada é indicada pelo número 1.

Neste trabalho o objetivo de estudo caracterizou-se as diferenças e semelhanças de ADHs de diversos organismos comparativamente a ADH de *N. gruberi* (NgADH), que atua em álcoois de cadeia longa.

A pesquisa de Bexkens et al. (2018) analisou a capacidade de crescimento com e sem oxigênio de *N. gruberi* cepa NEG-M e de outra cepa de *N. gruberi* nunca antes cultivada. Os autores estudaram suas capacidades metabólicas de energia das mitocôndrias de *N. gruberi* cepa NEG-M mostrando as preferências de substrato para seu crescimento e as vias de produção de ATP que emprega. Os trofozoítos de *N. gruberi* em crescimento têm um metabolismo energético estritamente aeróbio, com preferência por substrato para a oxidação de ácidos graxos.

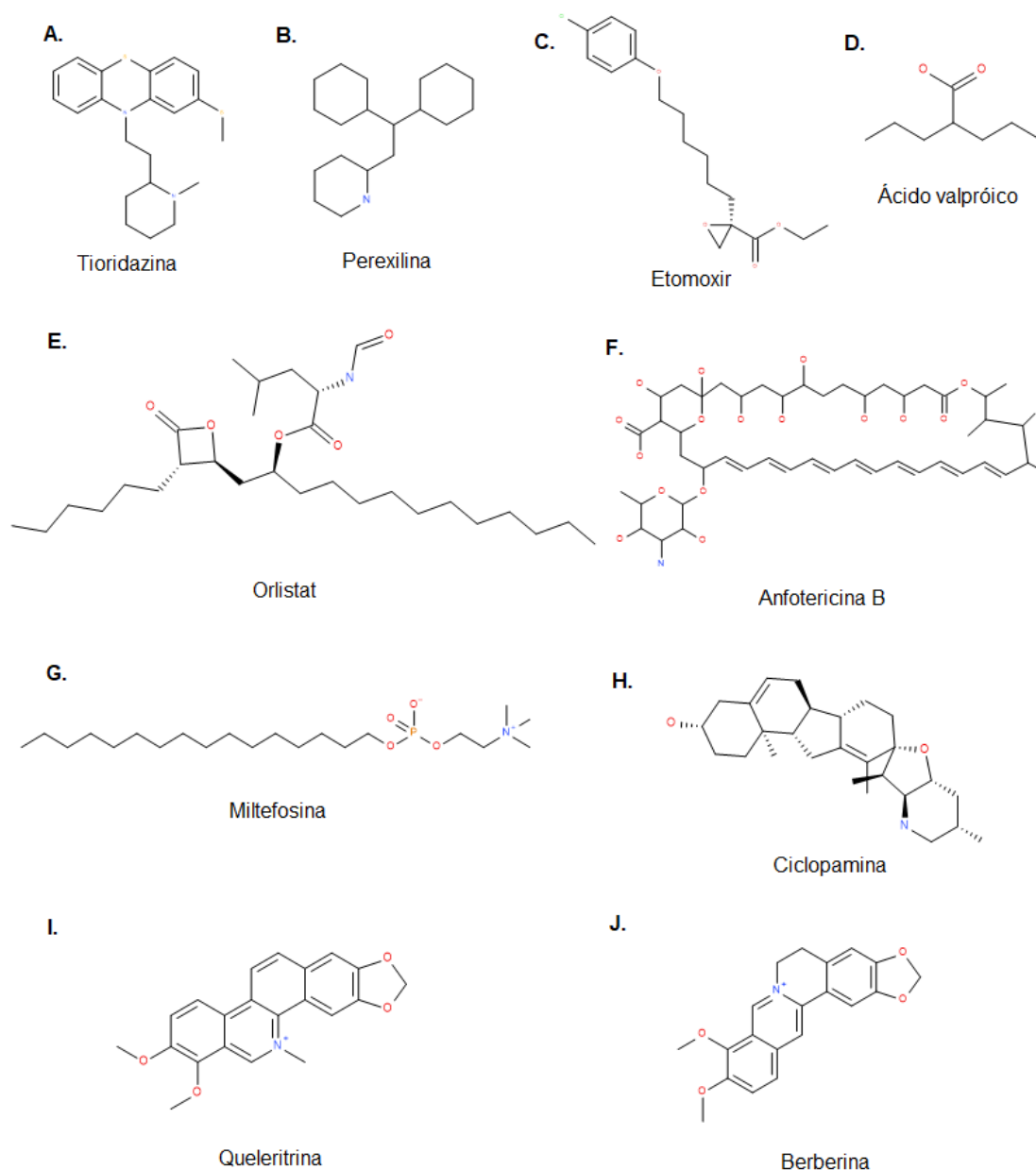
Uma pesquisa realizada por Sarink et al. (2020) verificou que a inibição da oxidação de ácidos graxos (FAO) impede o crescimento do parasita, levando a morte da amoeba. Eles constataram que alguns medicamentos podem ser usados para inibir o metabolismo dos ácidos graxos em diferentes partes da sua via metabólica. Todos esses medicamentos têm como alvo enzimas que estão presentes no genoma de *N. gruberi* e *N. fowleri*.

Como a preferência por ácidos graxos foi demonstrada em *N. gruberi*, primeiro determinaram os efeitos desses compostos em *N. gruberi*. Em seguida, testaram compostos promissores no patógeno real, *N. fowleri* e, finalmente acharam se haveria sinergia presente quando os compostos foram combinados em um ensaio cruzado.

Para indicar a importância de drogas para tratamento da MAP, citamos que

recentemente foram caracterizados alguns inibidores de proteínas contra a essa doença, inibidores classificados como Alcalóides, que detém o crescimento de *N. fowleri* (ABRAHAM; CHAUHAN; RAY, 2022). Na Figura 15 apresentam-se alguns desses inibidores descritos anteriormente.

Figura 15 - Inibidores contra a MAP



Fonte: O autor.

Legenda: Inibidores contra a MAP caracterizados em diversos trabalhos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar o estudo para obtenção dos clones contendo o gene da enzima *NgADH*;
- Incorporar a construção pET-15b/*NgADH* em bactérias;
- Determinar as condições de expressão e purificação;
- Encontrar as condições de cristalização;
- Em caso de insucesso na obtenção de cristais de qualidade, tentar resolver a estrutura por meio de modelagem por homologia.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Procedimentos Experimentais

2.3.1.1 Obtenção de clones contendo o gene da enzima *NgADH*

O procedimento para obtenção dos clones foi o citado no item 1.3.1.1 do capítulo 1, considerando-se as particularidades do gene da *NgADH*. Após a seleção dos sítios de restrição, encomendou-se a preparação do plasmídeo pET-15b com o inserto junto à empresa GenScript USA Inc. (<https://www.genscript.com/>).

2.3.1.2 Transformação de bactérias tratadas por quimiocompetência

O procedimento para transformação das bactérias tratadas por quimiocompetência foi o citado no item 1.3.1.2 do capítulo 1.

2.3.1.3 Expressão

Os experimentos de expressão foram os citados no item 1.3.1.3 do capítulo 1, com a mudança do que os testes foram realizados com ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e apenas a concentração de IPTG testada somente foi de 0,5 mmol L^{-1} e incubadas a 37 °C sob agitação de 180 rpm por 4 h.

2.3.2 Procedimentos Computacionais

2.3.2.1 Modelagem por Homologia com Modeller

O procedimento utilizado para a Modelagem por Homologia com Modeller foi o mesmo citado no item 1.3.2.1 do capítulo 1.

2.3.2.2 Análise do modelo gerado por homologia com Modeller

O modelo gerado por homologia com Modeller foi analisado como citado no item 1.3.2.2, com a adição de que se detalharam as ligações de hidrogênio dos ligantes com a proteína alvo em 2D com o programa LIGPLOT (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011) e 3D com o programa UCSF Chimera X (PETTERSEN et al., 2021).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

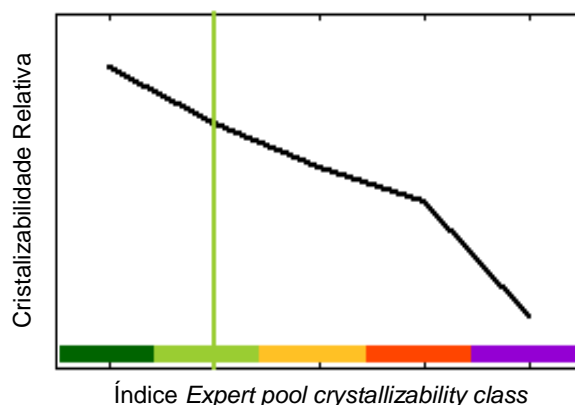
2.4.1 Procedimentos Experimentais

2.4.1.1 Planejamento do vetor de expressão

O gene da *NgADH* foi sintetizado pela empresa GenScript USA Inc. (<https://www.genscript.com/>) para construção do plasmídeo pET-15b/*NgADH* com os sítios de restrição *Bam*HI e *Nde*I.

Nesta construção, um pequeno número de aminoácidos fica adicionado à sequência nativa para expressar uma “his-tag” no N-terminal que contém um sítio para eventual corte mediante hidrólise pela enzima trombina. Os resultados do servidor XTAIPred indicam que *NgADH* tem uma probabilidade média de cristalização pela “*Expert pool crystallizability class*” apresentada na Figura 16.

Figura 16 - *Expert pool crystallizability class* estabelecido no servidor XtalPred para NgADH



Legenda: Resultados obtidos no servidor XtalPred
 Fonte: O autor.

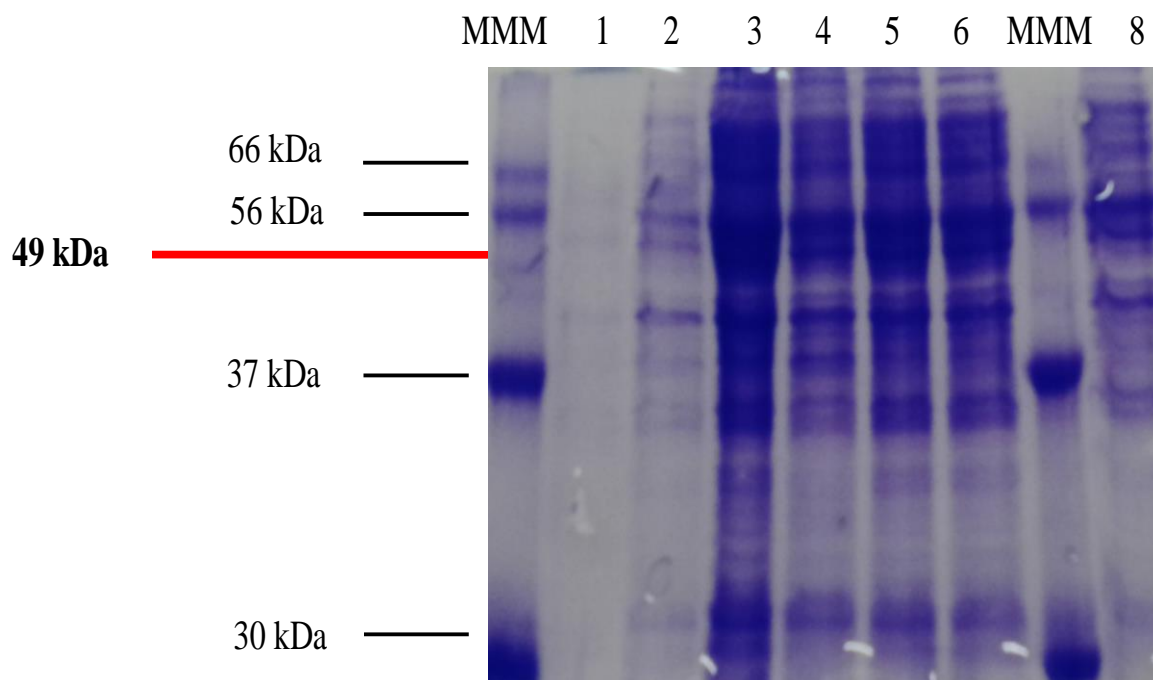
2.4.1.2 Expressão

A sequência de aminoácidos da enzima NgADH foi submetida à análise pelo servidor ProtParam (EXPASY Proteomics Server), que estimou a massa molecular de 48,58 kDa (453 resíduos de aminoácidos), que com a inclusão de 6 resíduos de histidina e seus conectores (genes), provenientes do sistema de clonagem, leva a uma massa molecular estimada de 49,40 kDa (459 resíduos de aminoácidos).

Foi realizado o teste de expressão em apenas uma condição: a temperatura de 37 °C, por 4 h de crescimento bacteriano e indução com IPTG a 0,5 mmol L⁻¹, sendo identificada a presença de uma banda de expressão no gel de poliacrilamida (Figura 17) SDS-PAGE (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) de 49,40 kDa (~ 49 kDa) que mostra concordância com o estimado pelo ProtParam, uma vez que ficaram com migração próxima da do marcador com massa molecular de 55,8 kDa. }

Entretanto, estudos posteriores serão necessários a fim de se distinguir a expressão desta proteína comparativamente à presença de outras proteínas presentes e características da própria *E. coli*.

Figura 17 - Eletroforegrama SDS-PAGE 12% referente ao teste de expressão a 37 °C com 4 h de indução e 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG para a enzima NgADH.



Legenda: i) raia MMM: Marcador de Massa Molecular; ii) raias 1,2, células (bactéria *E. coli* BL21-DE3) não transformada (controle): fração solúvel na primeira e fração precipitada na última; iii) raias 3,4,5,6,8, células transformadas: fração precipitada na primeira e fração solúvel nas três últimas.
Fonte: O autor.

2.4.2 Procedimentos Computacionais

2.4.2.1 Modelagem por Homologia com Modeller

Na ausência de dados experimentais para resolver a estrutura 3D da NgADH, foi dada sequência ao trabalho de modelagem molecular por restrições espaciais. Por meio da ferramenta BATS na plataforma MHOLINE (CAPRILES et al., 2010) com critério de seleção índice 2 foram selecionadas estruturas como moldes.

Assim, foram identificadas 2 proteínas homólogas identificadas como Álcool Desidrogenases. A Tabela 2 mostra os dados das estruturas selecionadas para construção dos modelos.

Tabela 2 - Dados das proteínas homólogas à enzima *NgADH* obtidos a partir de alinhamentos com ela

PDB IDs	Resolução (Å)	Proteína/Organismo	Similaridade (%)	Identidade (%)
3ZDR	2,50	ADH/ <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	86	31,85
6C75	2,40	ADH/ <i>Thermococcus thioreducens</i>	84	27,89

Fonte: O autor.

A porcentagem de identidade entre as proteínas homólogas usadas na modelagem e a alvo foi sempre superior a 25%. De acordo com (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003) as proteínas com cerca de 25% de identidade ou superior podem ser usadas para construir um modelo para a proteína alvo.

2.4.2.2 Análise do modelo gerado por homologia com Modeller

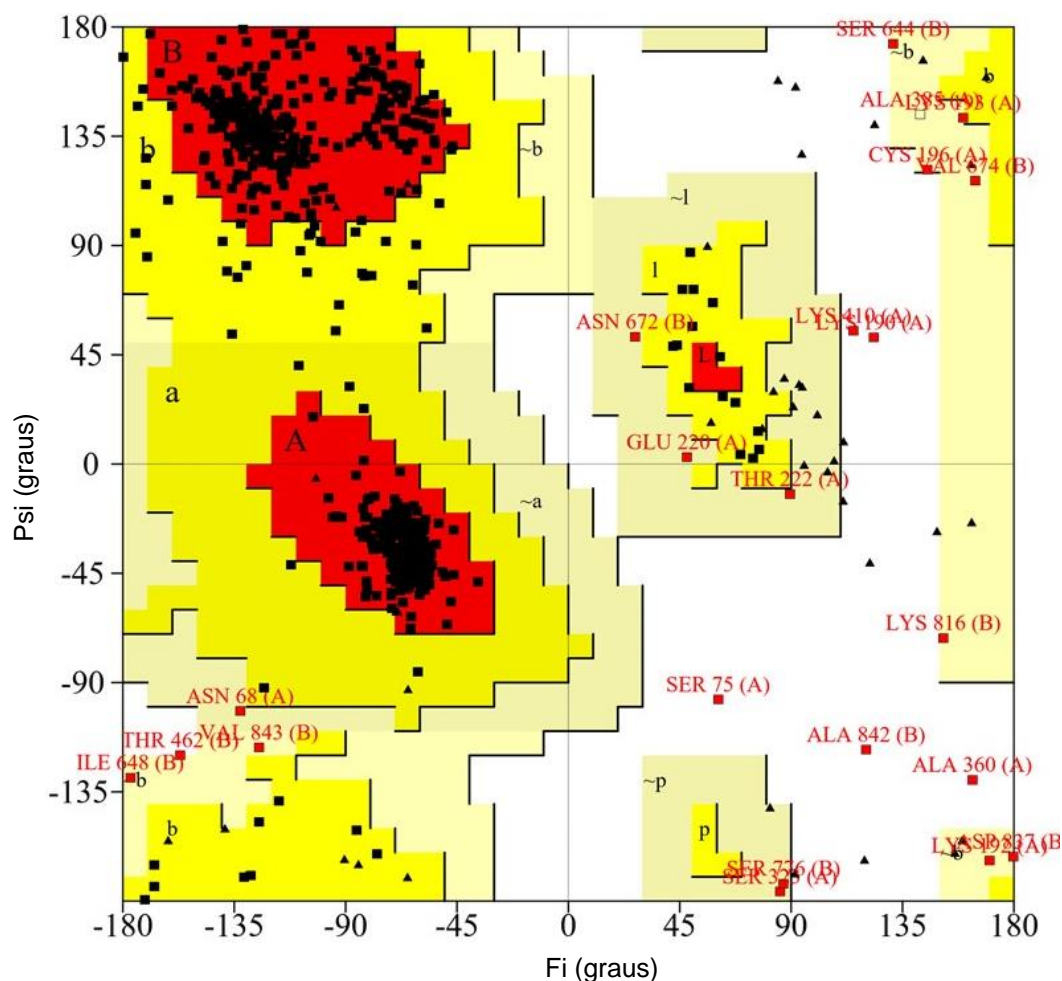
O modelo gerado por homologia selecionado, um dímero, foi o de número 129 entre 150 modelos gerados, ou seja, o que apresentou valor para a função de energia DOPE (0,62064) com menor energia e maior estabilidade.

Além disso, mantiveram-se os ligantes Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAP), que é o NADP⁺, e o 2'-Monofosfoadenosina-5'-Difosfato (ATR) da enzima Álcool Desidrogenase de *Thermococcus thioreducens* (*TtADH* – PDB ID: 6C75).

Ainda, foi verificado que os resíduos importantes para catálise e interação com o substrato não estivessem nas regiões não permitidas no gráfico de Ramachandran.

O gráfico de Ramachandran (Figura 18) indica que 89,3% dos aminoácidos estão em regiões mais favoráveis, 7,9% nas regiões adicionalmente permitidas, 2,0% nas regiões generosamente permitidas e 0,8% nas regiões não permitidas.

Figura 18 - Gráfico de Ramachandran para o melhor modelo da enzima NgADH produzido pelo Modeller.



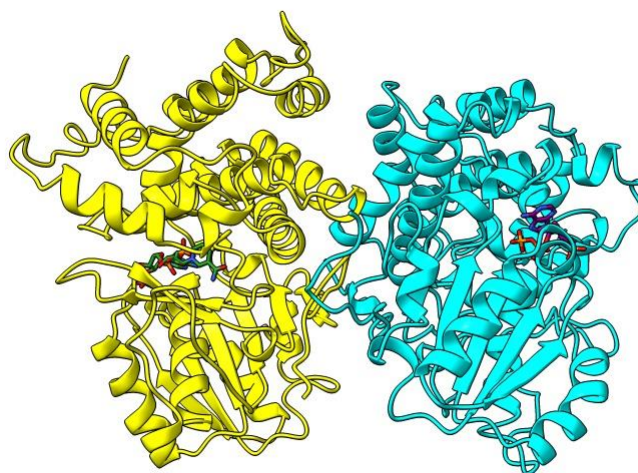
Legenda: As glicinas são representadas por triângulos e os demais aminoácidos por quadrados. As áreas em vermelho são chamadas de regiões muito favoráveis; em amarelo, adicionalmente permitidas; em bege, regiões generosamente permitidas, e em branco, regiões não permitidas. Figura gerada pelo programa Procheck.

Fonte: O autor

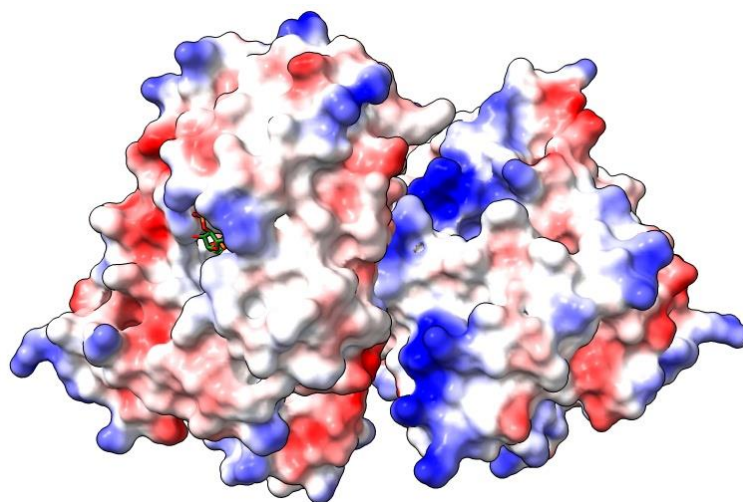
O modelo final da NgADH está apresentado em forma de fita e superfície eletrostática (Figura 19-A e 19-B), além do modelo de superfície com o ligante NAP (verde) na cadeia A e o ligante ATR (roxo) na cadeia B (Figura 19-C). A sua estrutura secundária compreende 40,4% dos resíduos em hélices- α , 8,8% em fitas- β e 50,8% em “loops” ou alças (Figura 19-D).

Figura 19 - Estrutura da enzima NgADH produzida por modelagem por homologia no Modeller.

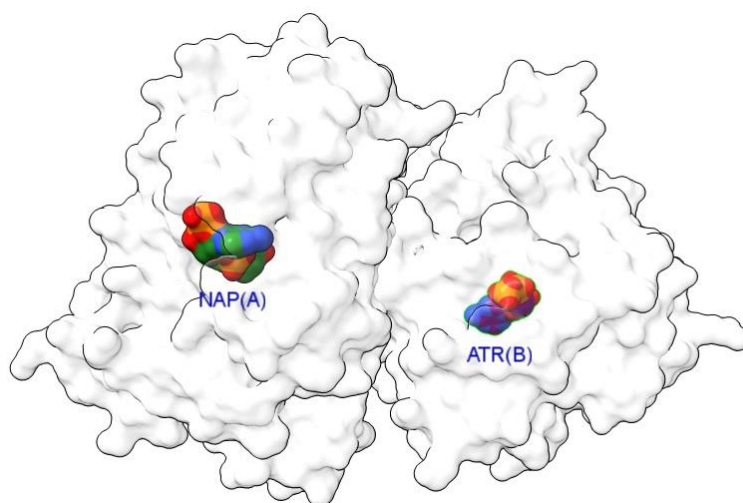
A



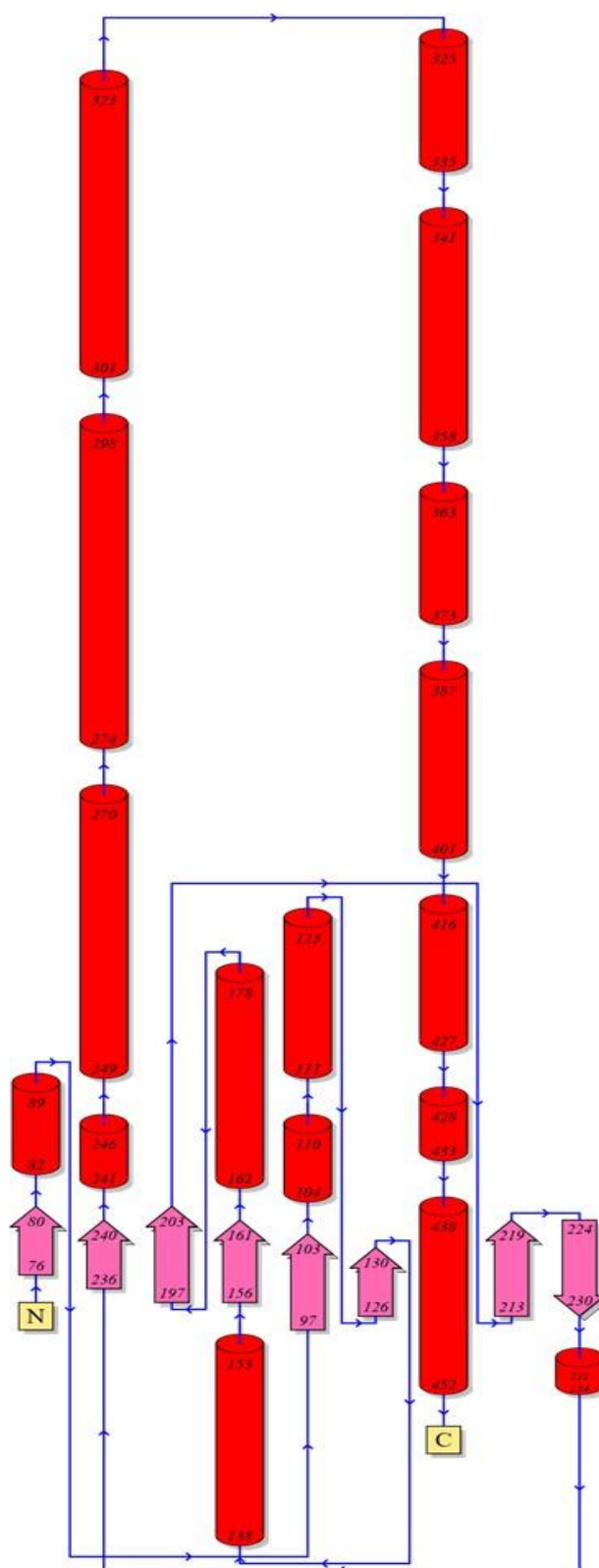
B



C



D

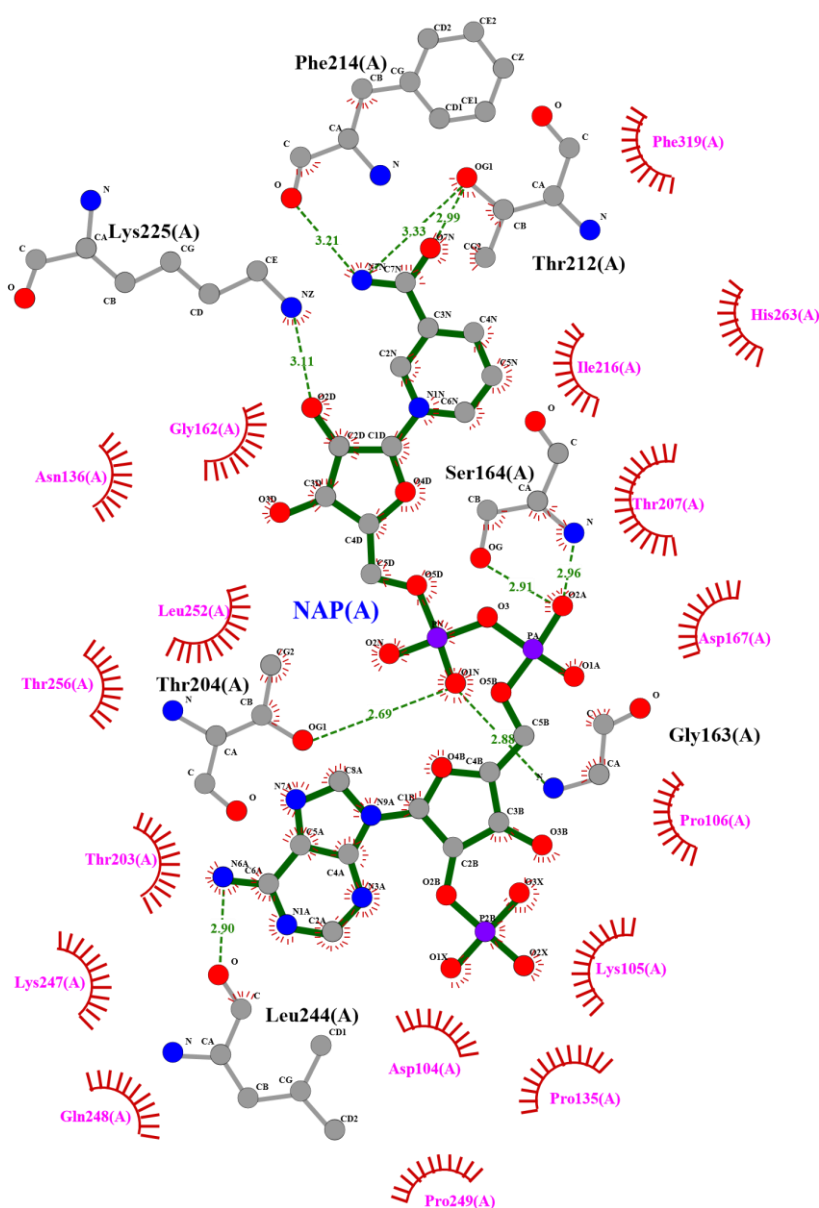


Legenda: A) Modelo de fita da NgADH. B) Modelo de superfície com potencial eletrostático da NgADH com coloração padrão para os resíduos, variando de vermelho para potencial negativo e azul para potencial positivo, passando por branco, neutro. C) Modelo de superfície em cor branca da NgADH, para realçar seus ligantes NAP em verde e ATR em roxo. D) Topologia de NgADH. Figuras geradas pelo programa UCSF Chimera X e plataforma PDBsum. Fonte: O autor.

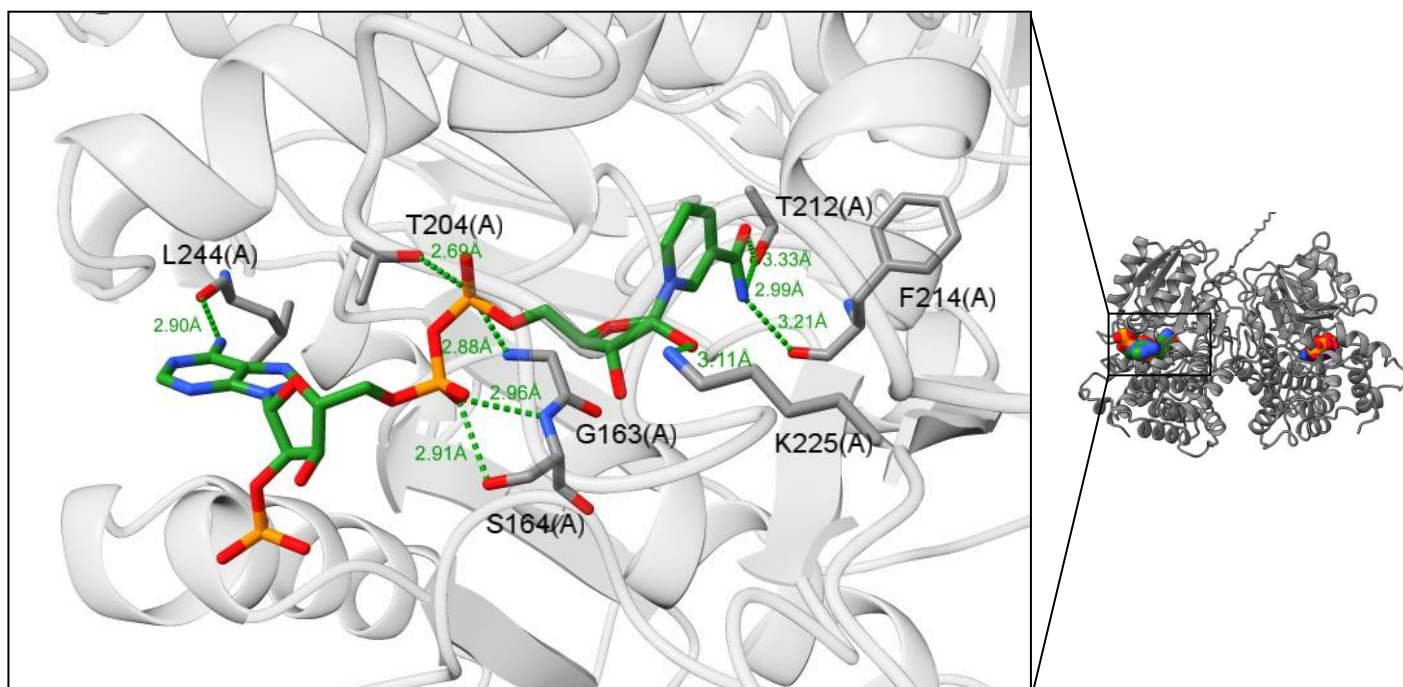
No tocante às ligações de hidrogênio do ligante NAP com a enzima *NgADH*, os aminoácidos G163, S164, T207, T212, F214, L244 são os envolvidos, o que se pode observar na (Figura 20-A) em 2D, obtida com o programa LIGPLOT (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011), e na (Figura 20-B) em 3D, obtida com o programa UCSF Chimera X (PETTERSEN et al., 2021).

Figura 20 - Ligações de hidrogênio do ligante NAP com os resíduos do melhor modelo da enzima *NgADH*.

A



B

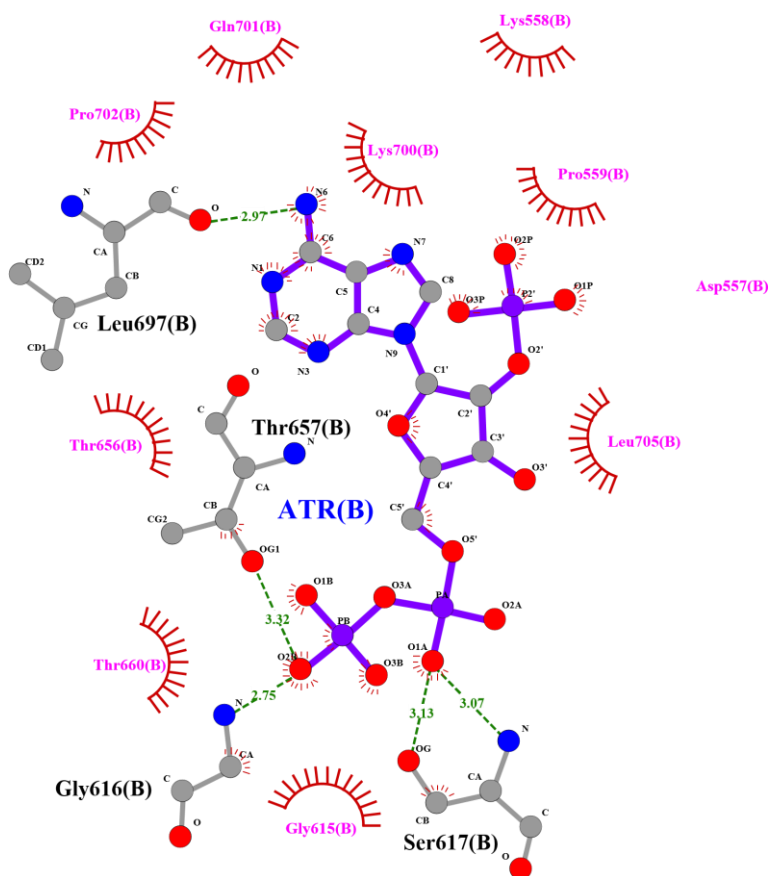


Legenda: A) Modelo 2D de ligações de hidrogênio de NAP com os resíduos da *NgADH*. B) Modelo 3D de ligações de hidrogênio de NAP com os resíduos da *NgADH*.
 Figuras geradas pelos programas LIGPLOT e UCSF Chimera X.
 Fonte: O autor

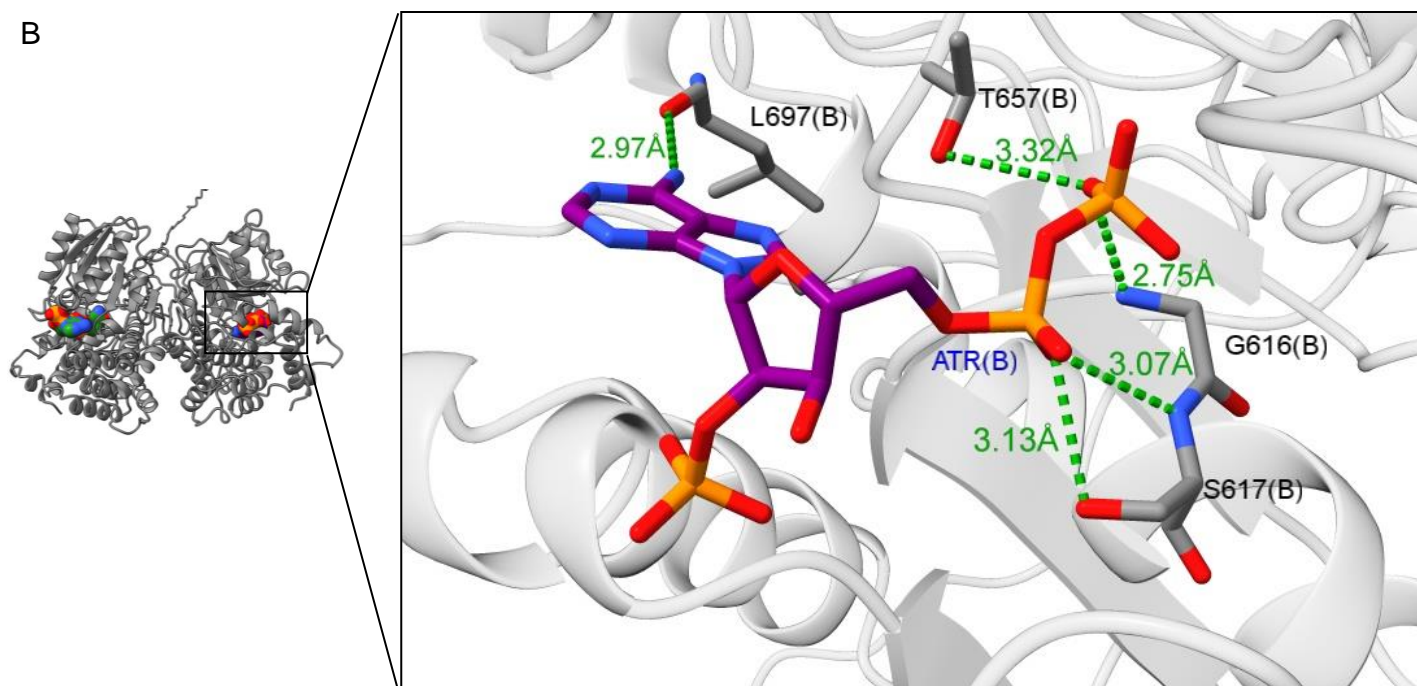
No tocante às ligações de hidrogênio do ligante ATR a enzima *NgADH*, os resíduos envolvidos são os G616, S617, T657, L697, que podem ser observar na (Figura 21-A) em 2D, obtida com o programa LIGPLOT (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011), em 3D na (Figura 21-B), obtida com o programa UCSF Chimera X (PETTERSEN et al., 2021) .

Figura 21 - Ligações de hidrogênio do ligante ATR com os resíduos do melhor modelo da enzima NgADH.

A



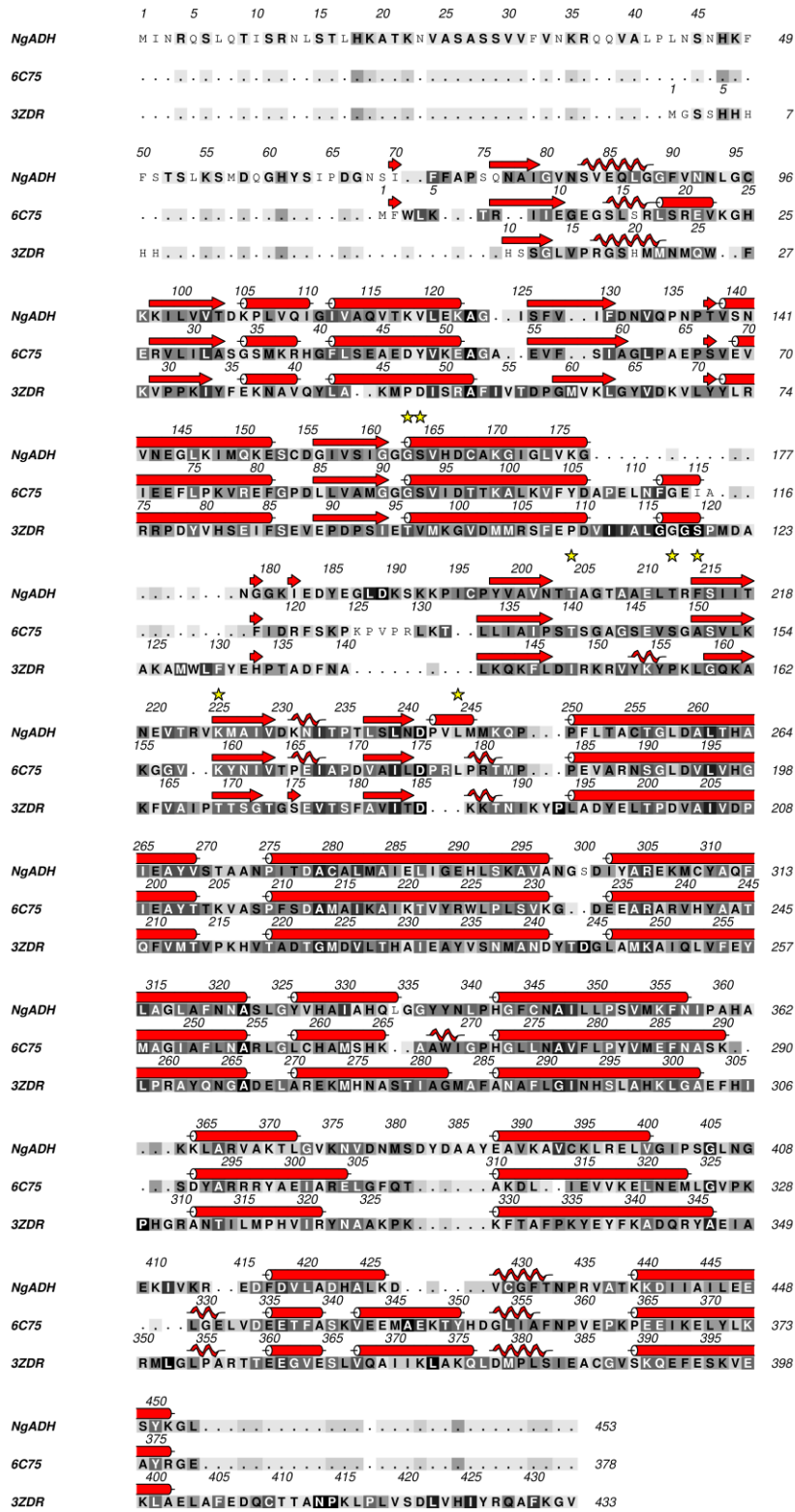
B



Legenda: A) Modelo 2D de ligações de hidrogênio de ATR com os resíduos da NgADH. B) Modelo 3D de ligações de hidrogênio de ATR com os resíduos da NgADH.
Figuras geradas pelos programas LIGPLOT e UCSF Chimera X.
Fonte: O autor

O alinhamento entre as sequências moldes com a do modelo está apresentado na Figura 22 e, por meio da comparação sequencial, pode-se verificar os resíduos do sítio ativo da *NgADH*: G163, S164, T207, T212, F214, L244.

Figura 22 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das enzimas *Tt*ADH (PDB ID: 6C75) e *Gt*ADH (PDB ID: 3ZDR) com *Ng*ADH.



Legenda: Alinhamento da sequência de aminoácidos de *Ng*ADH. Setas vermelhas representam fitas β , cilindros vermelhos representam hélices α , espirais vermelhas representam hélices 3_{10} ou π e as estrelas amarelas indicam os resíduos do sítio ativo.
Fonte: O autor.

2.5 CONCLUSÕES

- Testes de expressão da proteína *NgADH* foram inconclusivos em relação à sua produção; porém, este trabalho contribuiu em alguns aspectos para o entendimento da expressão da enzima *NgADH* de maneira heteróloga, colocando os resultados agora apresentados como ponto de partida para trabalhos posteriores;
- A enzima *NgADH* teve sua estrutura modelada computacionalmente, entretanto, destaca-se a importância da estrutura 3D a ser obtida por cristalografia de raios X, principalmente porque as proteínas homólogas apresentam identidade relativamente baixa;
- O modelo gerado pelo programa Modeller demonstra que o mesmo é uma ferramenta da bioinformática que pode apoiar dados experimentais posteriores que sejam obtidos da enzima *NgADH*.
- Os ligantes NAP e ATR possuem ligações de hidrogênio com resíduos do sítio ativo da enzima *NgADH*, que foram caracterizadas e apresentadas neste trabalho.

CAPÍTULO 3 – GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Paracoccidioides lutzii* (PIGAPDH)

"A ciência não é uma batalha contra outros cientistas,
é uma batalha contra a ignorância e o desconhecido."

Rodolfo Llinás Riascos

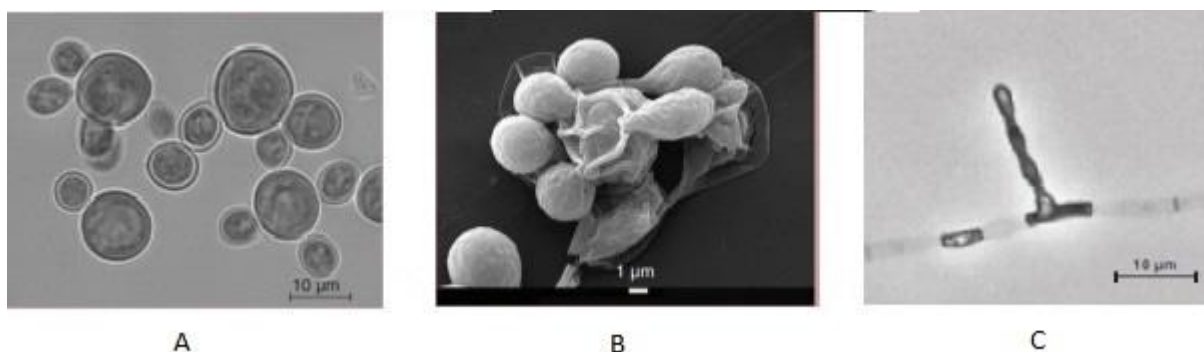
Prêmio Ralph W. Gerard de Neurociências em 2018

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Paracoccidioidomicose e *Paracoccidioides lutzii*: Aspectos Gerais

O artigo de Teixeira et al (2009) relata que o fungo designado Pb01 foi estudado amplamente e é filogeneticamente distinto de outras cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*, tendo sido, então, recentemente definido como uma nova espécie, *Paracoccidioides lutzii*. Ele é um patógeno fúngico termodimórfico da família Ajellomycetaceae, ordem Onygenales, pertencente ao gênero *Coccidioides* (outros gêneros são *Blastomyces* e *Histoplasma*). A espécie *P. lutzii* cresce como células de levedura a 37 °C ou em tecidos de mamíferos e como micélios, produzindo esporos infecciosos assexuados ou conídios (Figura 23) a 25 °C no solo (RESTREPO; MCEWEN; CASTAÑEDA, 2001; UNTEREINER et al., 2004).

Figura 23 - *Paracoccidioides lutzii*.



Legenda: A. Micrografia de Luz; B. Microscopia Eletrônica de Varredura e C. Conídios isolados mostrados por Micrografia de Luz

Fonte: (WILLIAMSON, 2017).

Normalmente *P. lutzii* é detectado em amostras de solo, em tocas de tatu e suas áreas de alimentação, encontradas principalmente em florestas das regiões sudeste e central do Brasil; nesta última, foram detectados em pastos e em um campo de horticultura. Os campos de horticultura apresentam matéria orgânica abundante e alta umidade, desde que sejam regados regularmente, além da adição de fertilizantes, o que pode levar a condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do fungo em sua fase micelial (BARROZO et al., 2010; HRYCYK et al., 2018).

Por outro lado, Teixeira et al. (2009), além de descobrir esta nova espécie, propuseram que *P. lutzii* é endêmico ao Centro-Oeste do Brasil, principalmente aos estados de Goiás e Mato Grosso.

Geralmente, habita áreas subtropicais e tropicais localizadas entre 500 e 1500 m acima do nível do mar e com temperaturas entre 17 e 24 °C. Este fungo é encontrado em regiões de vastas florestas com árvores nativas e atravessadas por rios, com verões chuvosos e invernos curtos, mas solos peculiarmente ácidos favorecem seu crescimento, como encontrado em diferentes áreas de cultivo de café, algodão e tabaco (BONIFAZ TRUJILLO, 2012).

É relevante observar que *P. brasiliensis* e *P. lutzii* diferem na capacidade de sobreviver *in vitro* por um período prolongado em condições de estresse, ou seja, com *déficit* hídrico, sendo que *P. lutzii* possui uma resistência notável a condições ambientais adversas; tem sido argumentado que este fungo é menos virulento ou produz menos conídios infecciosos do que *P. brasiliensis* (HRYCYK et al., 2018).

P. lutzii e *P. brasiliensis* são espécies de fungos responsáveis por uma das micoses mais importantes da América Latina, a paracoccidiodomicose (PCM). É um dos fungos que causa em humanos e raramente em animais, a doença PCM foi descrita pela primeira vez em 1908 por Adolpho Lutz (JOHNSON; LANG, 1977; LUTZ, 1945; RICCI et al., 2004; SILVA-VERGARA et al., 2000).

Griffiths, Colombo e Denning (2019) consideram que a paracoccidiodomicose (PCM) deve ser aceita como uma doença tropical negligenciada (fúngica), devido a que a PCM causa alta morbidade e afeta principalmente às pessoas que vivem em favelas urbanas ou trabalhadores rurais pobres, que encontram-se no momento mais produtivo de sua vida econômica e requerem tratamentos muito longos para se recuperar da doença. As sequelas pulmonares são frequentes, reduzindo a produtividade no trabalho e a qualidade de

vida de um grande número de pacientes.

Recentemente, o roteiro de 2021-30 da OMS para doenças tropicais negligenciadas nomeou, pela primeira vez, a PCM como uma das micoses graves; além disso, é considerado um problema de saúde pública no Brasil (MARTINEZ, 2010; WHO, 2004).

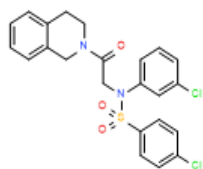
Supõe-se que a contaminação dos sujeitos é causada pela inalação de propágulos do meio ambiente, o que leva a uma infecção pulmonar primária e depois se dissemina afetando outros sistemas e órgãos do corpo. Na literatura, reportam-se duas formas da doença, que são distinguidas: a forma juvenil aguda (subaguda) e a forma adulta crônica. Nas duas situações, as lesões secundárias aparecem com frequência nas membranas mucosas, nódulos linfáticos, pele e glândulas adrenais (BRUMMER et al., 1993; FRANCO, 1987; MCEWEN et al., 1987).

É importante ressaltar a informação genômica de *P. lutzii* desvelada por Desjardins et al. (2011), que traz a oportunidade de determinar estruturas proteicas que podem ser futuros alvos de drogas, a partir de diversos estudos para tratar a PCM.

Assim, a pesquisa feita por De Oliveira et al. (2019), na qual desenvolveram uma estrutura quimiogenômica computacional, tal que se permitiu a priorização de 14 drogas anti-PCM, como por exemplo, a bifonazol, sertaconazol, entre outros, que são potenciais para validação experimental contra Paracoccidioides. Do mesmo modo, recentemente avaliou-se uma droga antifúngica computacionalmente categorizada como benzenosulfonamida (LIMA et al., 2021). Esses inibidores são apresentados na Figura 24.

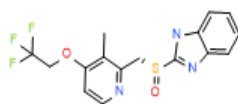
Figura 24 - Inibidores contra PCM.

A.



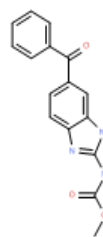
ZINC0896478

B.



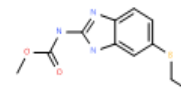
Dexlansoprazol

C.



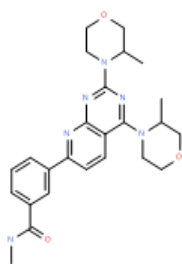
Mebendazol

D.



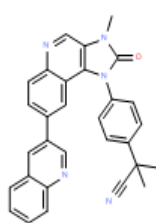
Albendazol

E.



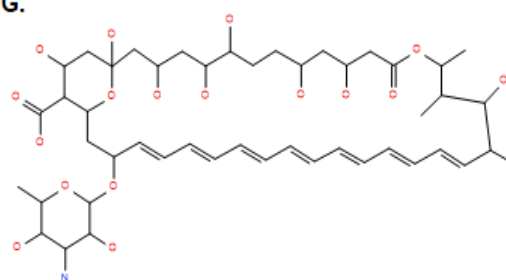
Visusertibe

F.



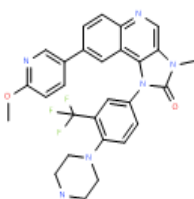
Dactolisibe

G.



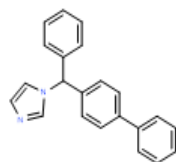
Anfotericina B

H.



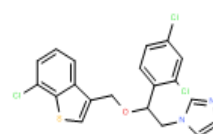
BGT-226

I.



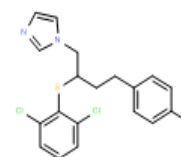
Bifonazol

J.



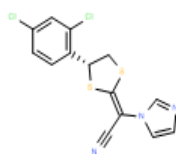
Sertaconazol

K.



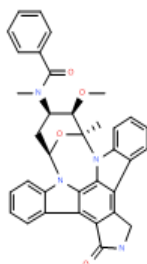
Butoconazol

L.



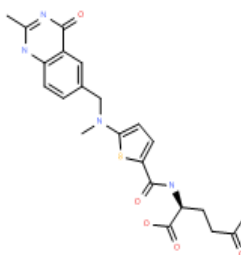
Luliconazol

M.



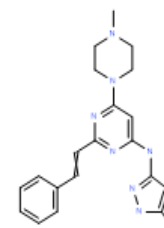
Midostaurina

N.



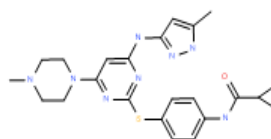
Raltitrexed

O.



ENMD-2076

P.



Tozasertib

Legenda: Inibidores contra a PCM testados em diversos trabalhos.
Fonte: O Autor.

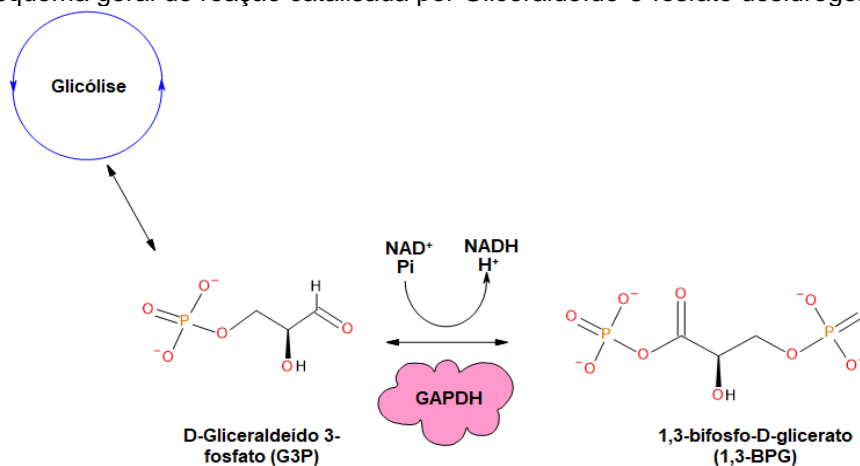
3.1.2 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases: Aspectos Gerais

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases (GAPDHs) (EC 1.2.1.12) são enzimas oxidorreduzidas essenciais para a glicólise, que é a principal via de degradação de carboidratos em organismos eucariotos. A enzima está localizada no citosol, na superfície mitocondrial e no núcleo, é na verdade participante de várias vias metabólicas importantes, como da primeira etapa da glicólise, do catabolismo da frutose, das vias da pentose fosfato e do metabolismo do glicerol; também está associada à respiração e às vias do glioxilato e do ácido tricarbóxico cítrico (FELIPE et al., 2005; TRISTAN et al., 2011).

A enzima GAPDH tem diversidade de funções que envolvem o reparo de DNA, reconhece sequências e características estruturais do tRNA, portanto, a enzima participa em sua exportação do núcleo, fusão proteica e transporte de membrana, da dinâmica do citoesqueleto dos microtúbulos e da morte celular apoptótica por translocação nuclear (HARA et al., 2005; KOSOVA; KHODYREVA; LAVRIK, 2017; KUMAGAI; SAKAI, 1983; LIAUD et al., 2000; SINGH; GREEN, 1993; TISDALE, 2001).

A enzima aqui proposta se encontra no citoplasma. Fundamentalmente existe como uma isoforma tetramérica composta por quatro subunidades idênticas de aproximadamente 37 kDa, cada uma com um único grupo tiol catalítico. GAPDH converte gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfo-D-glicerato, nas presenças de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e fosfato inorgânico, e medeia a formação de NADH e adenosina trifosfato (ATP). (Figura 25).

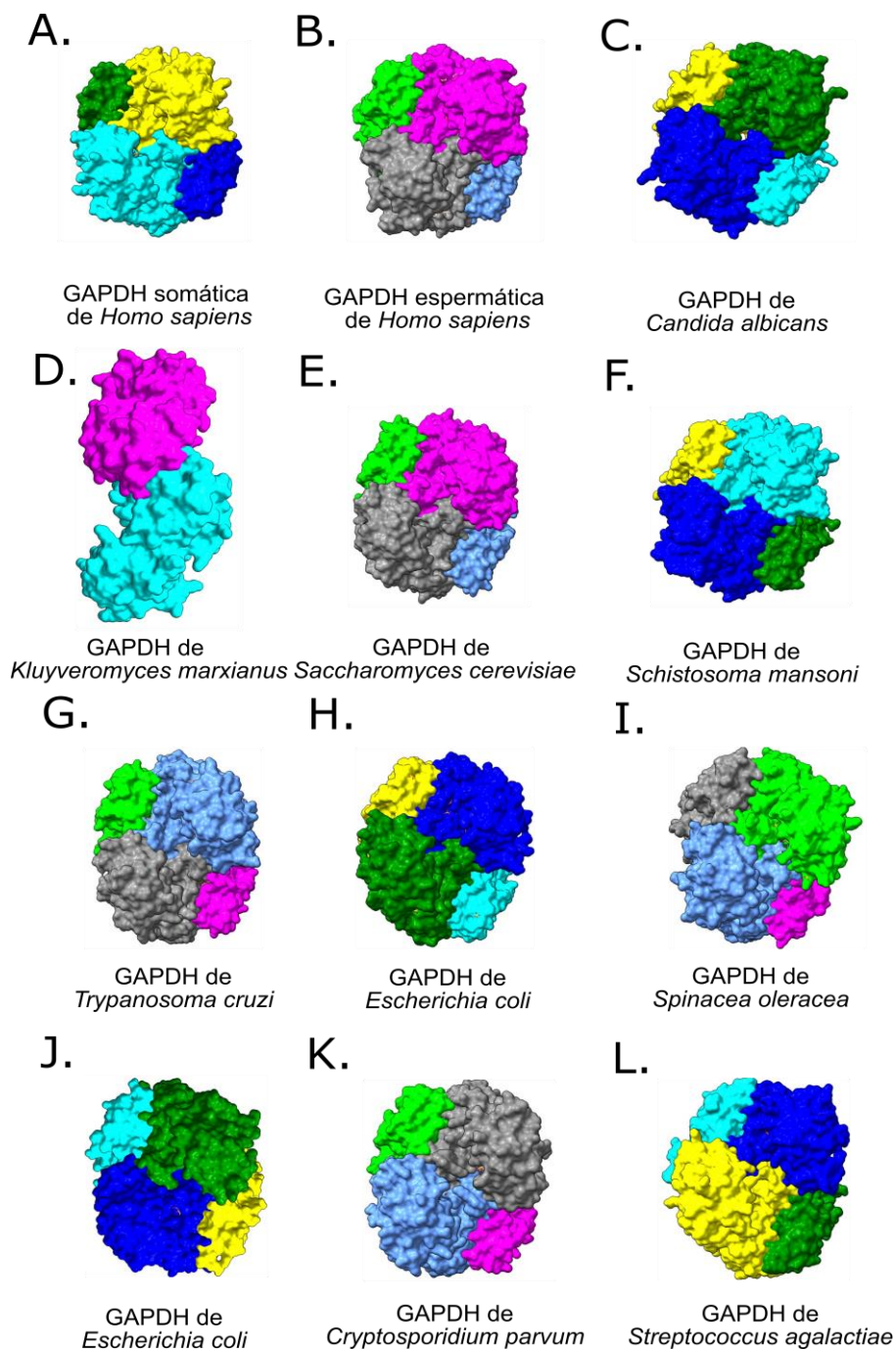
Figura 25 - Esquema geral de reação catalisada por Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase GAPDH.



Fonte: O autor, baseado em (TRISTAN et al., 2011).

Algumas GAPDHs que foram usadas nesta pesquisa envolvem diversidade de funcionalidades e pertencem a diferentes reinos da natureza, não obstante convárias características similares a *PI*GADPH, como apresenta-se na Figura 26.

Figura 26 - GAPDHs depositadas no PDB e usadas neste trabalho.



Legenda: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases depositadas no PDB. **A.** *Hs*GAPDH - PDB ID: 1U8F; **B.** *Hs*GAPDH - PDB ID: 3H9E; **C.** *Ca*GAPDH - PDB ID: 7U4S; **D.** *Km*GAPDH - PDB ID: 2I5P; **E.** *Sc*GAPDH - PDB ID: 4IQ8; **F.** *Sm*GAPDH - PDB ID: 7JH0; **G.** *Tc*GAPDH - PDB ID: 4LSM; **H.** *Ec*GAPDH - PDB ID: 1S7C; **I.** *So*GAPDH - PDB ID: 1RM4; **J.** *Ec*GAPDH - PDB ID: 7C5M; **K.** *Cp*GAPDH - PDB ID: 3CIF e **L.** *Sa*GAPDH - PDB ID: 5JYA. Figura criada com Chimera X.

Fonte: O autor.

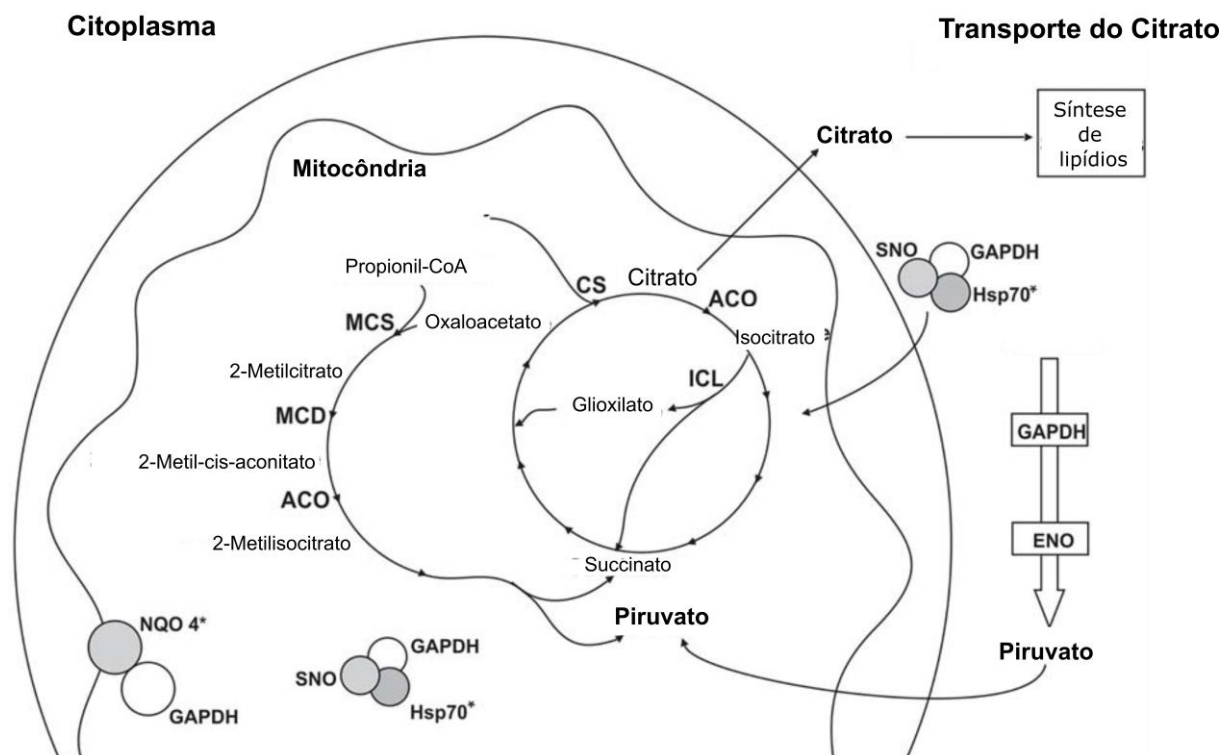
Finalmente, cabe mencionar que a enzima GAPDH de *P. lutzii* (*PIGAPDH*) é considerada uma enzima *moonlighting* que, em termos explicados por Jeffery (1999), descreve aquelas proteínas que têm múltiplas funções numa célula ou organismo e excluiu proteínas que são o resultado de fusões gênicas, proteínas homólogas, mas não idênticas, variantes de *splice*, proteínas cujas modificações pós-tradução podem variar e proteínas que têm uma única função, mas podem operar em locais diferentes ou utilizar diferentes substratos.

3.1.2.1 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Paracoccidioides lutzii*

Freitas e Silva et al. (2019) fizeram a caracterização do interactome da proteína Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Paracoccidioides lutzii* (*PIGAPDH*) de maneira experimental, em diferentes fases de *P. lutzii*. Nessa pesquisa, identificaram 207 proteínas que interagem com GAPDH. Entre essas interações, 30 (14,5%) ocorreram no micélio, 69 (33,3%) na transição micélio para levedura e 108 (52,2%) nas células de levedura, que participam tanto das vias como a glicólise quanto do ácido tricarboxílico cítrico. Ademais, nessa mesma pesquisa, obtiveram os seguintes resultados:

a) Na fase de micélio, ligaram-se 18 proteínas à *PIGAPDH*. Sua classificação biológica inclui metabolismo (28%), energia (28%), síntese de proteínas (11%), destino de proteínas (5%), resgate celular, defesa e virulência (5%), biogênese de componentes celulares (5%) e proteínas hipotéticas (18%) (Figura 27).

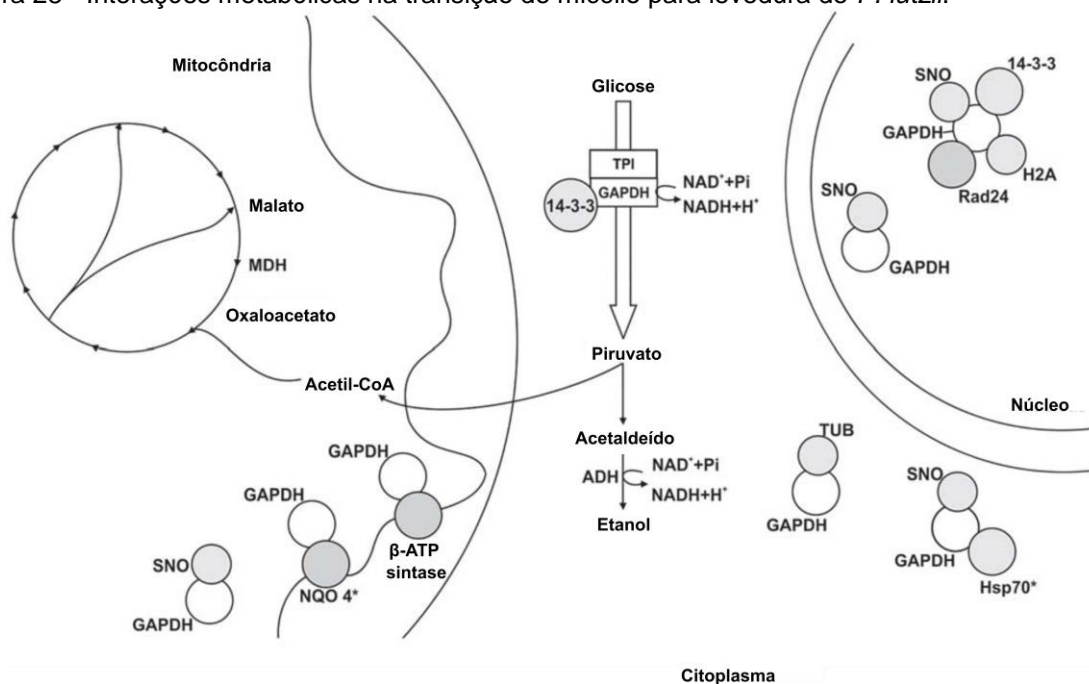
Figura 27 - Interações metabólicas na fase de micélio de *P. lutzii*.



Fonte: (FREITAS E SILVA et al., 2019)

b) Na transição de micélio para levedura, identificaram-se 54 proteínas interagindo com *PIGAPDH*. Elas estão relacionadas ao metabolismo (33%), energia (17%), ciclo celular e processamento de DNA (22%), destino da proteína (17%) e proteínas hipotéticas (11%). (Figura 28)

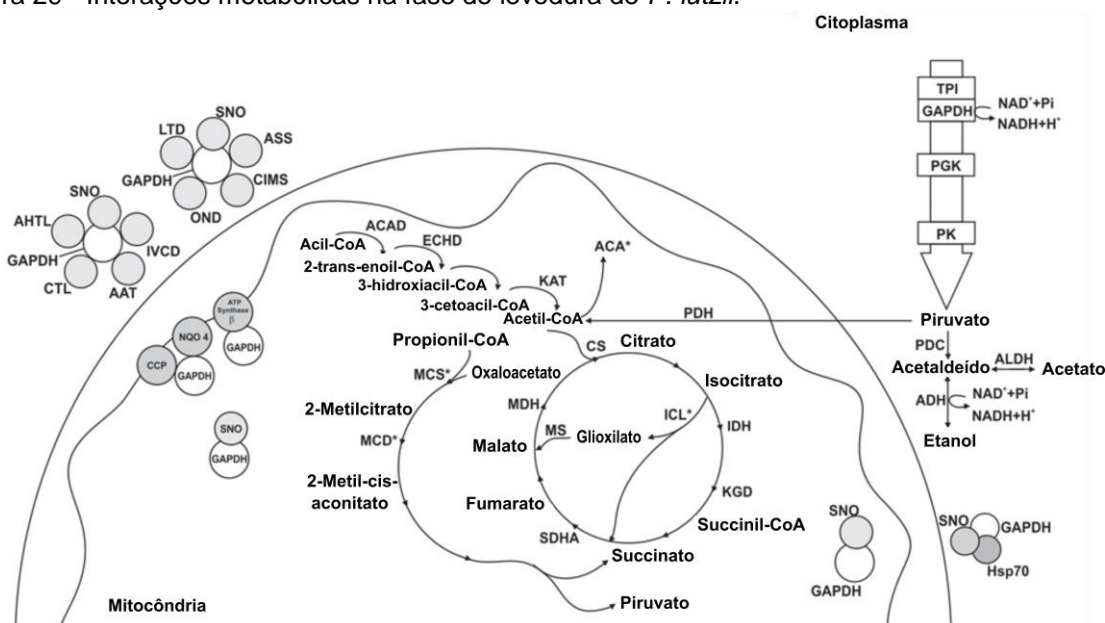
Figura 28 - Interações metabólicas na transição de micélio para levedura de *P. lutzii*.



Fonte: (FREITAS E SILVA et al., 2019)

c) Na fase de levedura, encontraram-se 26 proteínas que interagem P/GAPDH, relacionadas ao metabolismo (19%), energia (23%), ciclo celular e processamento de DNA (4%), síntese de proteínas (11%), proteína destino (12%), transporte celular (4%), transdução de sinal (4%) e proteínas hipotéticas (23%). (Figura 29)

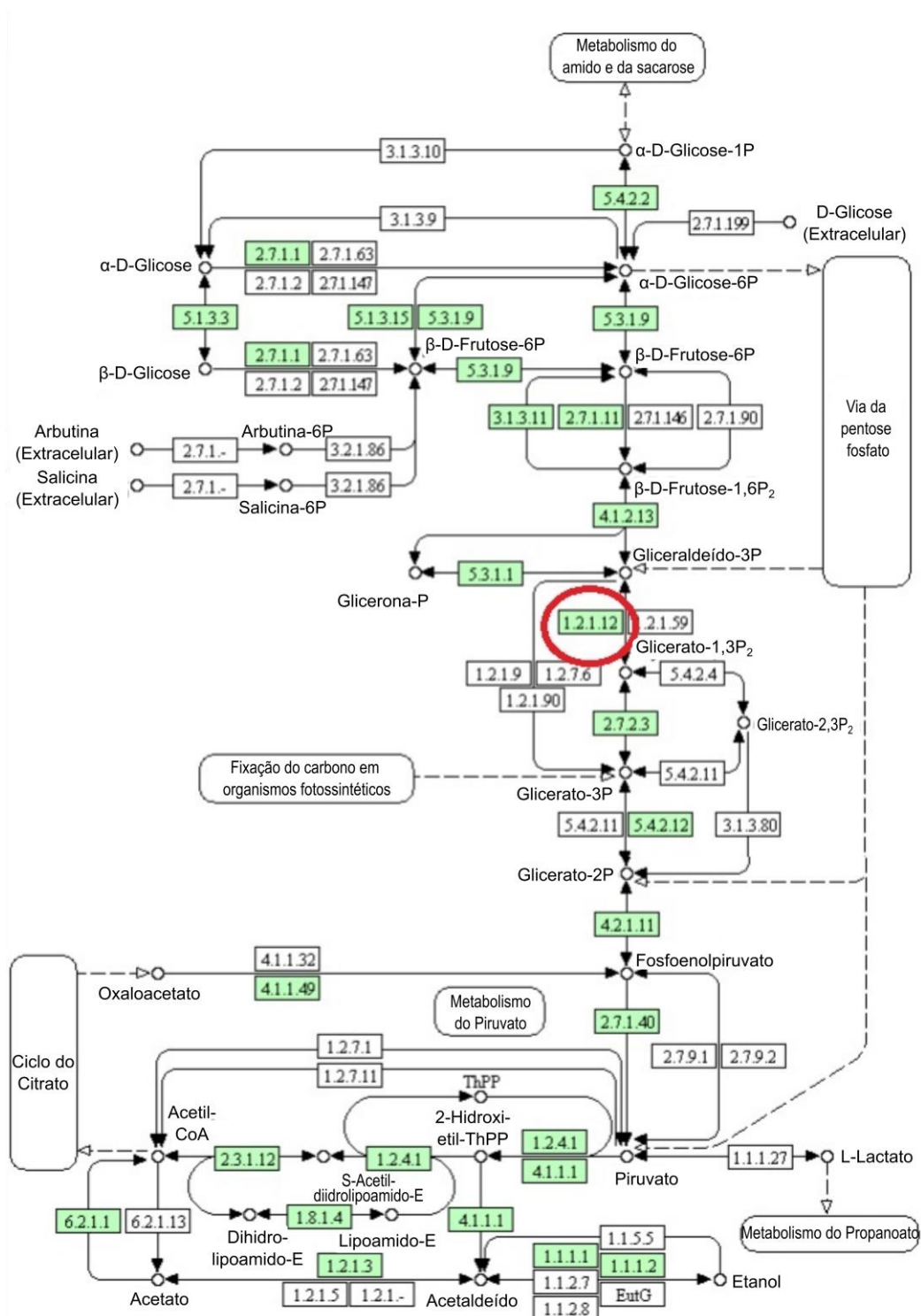
Figura 29 - Interações metabólicas na fase de levedura de *P. lutzii*.



Fonte: (FREITAS E SILVA et al., 2019)

São, segundo os autores, 207 proteínas que interagem com *PIGAPDH*, o que reflete seu amplo espectro de funcionalidade e a caracteriza como uma proteína de múltiplas funções (*moonlighting protein*). Ademais, interage com várias proteínas que envolvem diversos processos metabólicos, como sensibilidade aos níveis intracelulares de ATP e regulação de proteínas mitocondriais e nucleares.

Na pesquisa de Desjardins et al. (2011) foram desvendadas várias vias metabólicas de *P. lutzii*, que têm ao redor de 9.132 genes codificadores de proteínas, entre elas, *PIGAPDH* (EC 1.2.1.12). Na Figura 30 pode-se observar que ela participa da via glicolítica desse fungo patogênico.

Figura 30 - Interações metabólicas gerais de *P. lutzii*.

Fonte: (KANEHISA LABORATORIES, 2012)

Finalmente, o estudo estrutural da enzima *PIGAPDH* foi o objetivo deste trabalho, a fim de se encontrar diferenças e/ou semelhanças estruturais de GAPDHs de outros organismos patogênicos relacionados a doenças negligenciadas, de forma que o conhecimento dessa estrutura possa guiar o desenvolvimento de fármacos através do desenho racional baseado em estrutura.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Transformar, pela inserção da construção pET-28a/*P*GAPDH, células competentes de *E. coli*;
- Determinar as condições de expressão e purificação;
- Encontrar as condições de cristalização da *P*GAPDH com qualidade adequada para resolução da estrutura por difração de raios X;
- Refinar e validar a estrutura proteica obtida a partir de dados de difração de raios X;
- Estabelecer comparações estruturais com proteínas homólogas.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Procedimentos Experimentais

3.3.1.1 Planejamento do vetor de expressão da enzima *P*GAPDH

O gene que codifica *P*GAPDH (número de acesso UniProt Q8X1X3) (BATEMAN et al., 2021) foi sintetizado e inserido no vetor de expressão pET-28a(+) pela empresa Synbio Technologies (<https://www.synbiotech.com/>). Decidido o plasmídeo, o estudo continuou com a seleção das enzimas de restrição que não clivassem a sequência de nucleotídeos do gene e que fossem compatíveis com o sítio de clonagem múltipla do plasmídeo escolhido, apoiado pelo programa NEBcutter (versão 2.0) (VINCZE; POSFAI; ROBERTS, 2003).

Assim, utilizaram-se os sítios de restrição tal que a purificação da proteína de interesse foi facilitada já que foi produzida com uma sequência de cauda “his-tag” no N-terminal, que poderia, entretanto, ser posteriormente retirada a partir de clivagem com a enzima trombina.

A sequência de aminoácidos desta enzima foi submetida à análise pelo servidor XTAIPred (JAHANDIDEH; JAROSZEWSKI; GODZIK, 2014; SLABINSKI et al., 2007)..

3.3.1.2 Transformação de bactérias tratadas por quimiocompetência

O procedimento para transformação das bactérias tratadas por quimiocompetência foi o citado no item 1.3.1.2 do capítulo 1.

3.3.1.3 Expressão

Os experimentos de expressão foram os citados no item 1.3.1.3 do capítulo 1, com a adição de que os testes foram também realizados com o meio de cultura com lactose proposto por Studier (2005) que, por sua vez, não precisa de um agente indutor como IPTG. Esse de cultivo foi incubado a 37 °C sob agitação de 180 rpm por 22 h.

As culturas de células obtidas em cada teste de condição foram centrifugadas por 20 min a 6.000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 10 mL de tampão de lise (20 mmol L⁻¹ CHES, 200 mmol L⁻¹ NaCl e 20 mmol L⁻¹ Glicerol, pH 9,3). Posteriormente, este material foi submetido a quinze ciclos de 1 min de pulsos de sonicação em banho de gelo (30 s a 30% de potência ligado e 30 s desligado, em banho de gelo).

Após a ruptura celular, a amostra, referente a 20 mL de cultura, foi submetida a centrifugação a 15.000 rpm por 20 minutos a 10 °C. A análise dos resultados foi realizada por SDS-PAGE (12%) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) conforme descrito no item 1.3.1.2.

3.3.1.4 Purificação por cromatografia de afinidade

Para a purificação da proteína, o precipitado celular (*pellet*) de 800 mL de cultura celular autoinduzida com lactose foi ressuspensionado em 80 mL de tampão de lise (20 mmol L⁻¹ CHES, 200 mmol L⁻¹ NaCl e 20 mmol L⁻¹ Glicerol, pH 9,3) e submetido a quinze pulsos de sonicação (30 s a 30% de potência ligado e 30 s desligado, em banho de gelo). Após a ruptura das células, as quatro amostras, de 20 mL cada, foram submetidas à centrifugação por 20 min a 15.000 rpm e 10 °C. Ressalta-se que o tampão CHES mostrou-se essencial para a estabilidade da proteína em solução durante a concentração com o dispositivo Vivaspin ® 6 (GE Healthcare) (com limite de retenção para a membrana de 10 kDa).

A proteína foi então purificada por cromatografia de afinidade para níquel (Ni²⁺) que estava imobilizado em uma coluna de Sepharose (HisTrap ® FF crude, GE Life Sciences) com volume de 1 mL. A enzima recombinante foi eluída dentro de um gradiente de imidazol adicionado ao tampão de eluição (20 mmol L⁻¹ CHES, 200

mmol L⁻¹ NaCl e 20 mmol L⁻¹ Glicerol, pH 9,3). No gradiente, a concentração de imidazol variou de 0 a 500 mmol L⁻¹ em 10 volumes de coluna, e a cromatografia completa compreendeu 115 volumes de coluna. As frações coletadas foram de 1 mL por tubo sob fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Os resultados da purificação foram analisados por SDS-PAGE (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e com a ajuda do programa ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

3.3.1.5 Cristalização da *PIGAPDH*

A concentração da enzima, diretamente de uma série de corridas de cromatografia, variou entre 2-11 mg mL⁻¹ conforme quantificado pelo método de Bradford (1976), e, então, a enzima foi concentrada ou usada imediatamente para ensaios de cristalização, em alguns casos adicionada de cofator NAD⁺. Em geral, o uso do tampão CHES foi essencial para evitar a precipitação imediata de proteínas durante a concentração. Os ensaios seguintes foram montados:

i) Manualmente por difusão de vapor de gota suspensa (MCPHERSON; GAVIRA, 2014) na câmara de cristalização da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Assim, foram testados os kits comerciais de cristalização Morpheus, JCSG+ Suite, PGA Screen e MIDAS do fabricante Molecular Dimensions e Crystal Screen da Hampton Research. Para cada ensaio, misturaram-se 1,0, 1,5 e 2,0 µL de solução precipitante com 2,0, 1,5 e 1,0 µL de solução da enzima, para dar uma gota com volume total de 3,0 µL, que foram deixados equilibrar com 300 µL da solução do poço, mas, especificamente para o Morpheus, foram usados somente 52 µL da solução no poço. Algumas otimizações de ensaios de cristalização, como modificações de pH e concentração de precipitantes, também foram feitas (MCPHERSON; CUDNEY, 2014) nessas condições. Os ensaios foram mantidos a 18 °C e as inspeções para identificação dos cristais foram realizados a cada 24 h. No total, foram testadas 432 condições.

ii) No robô pipetador Mosquito (TTPLabTech) por difusão de vapor de gota sentada (MCPHERSON; GAVIRA, 2014) no Laboratório de Biologia Estrutural e Engenharia de Proteínas (LBEP) do Instituto Carlos Chagas (ICC)-Fiocruz

Curitiba. Foram utilizados os seguintes kits comerciais de cristalização: "Crystal Screen" e "JCSG+ Suite", dos fabricantes Hampton Research e Molecular Dimensions, respectivamente. Para estes ensaios, misturaram-se 150, 225, 300 nL de solução precipitante com 300, 225, 150 nL de solução da enzima, para dar uma gota com volume total de 450 nL, que foram deixados equilibrar com 50 μ L da solução do poço. Os ensaios de cristalização foram mantidos a 18 °C e as inspeções para identificação dos cristais foram realizados a cada 24 h. No total foram testadas 96 condições;

iii) No robô HoneyBee 963 (Digitallab) por difusão de vapor de gota sentada (MCPHERSON; GAVIRA, 2014) no LNBio (Laboratório Nacional de Biociências do Brasil). Foram utilizados os seguintes kits comerciais de cristalização: "Crystal Screen HT", "JCSG+ Suite", "PACT Suite", "Precipitant Synergy", "SaltRx HT" e "Wizard Screens I e II" dos fabricantes Hampton Research, Nextal/Qiagen, Nextal/Qiagen, Emerald BioSystems, Hampton Research e Emerald BioSystems, respectivamente. Para estes ensaios, misturaram-se 0,4 μ L de solução precipitante com 0,4 μ L de solução da enzima, para dar uma gota com volume total de 800 nL, que foram deixados equilibrar com 200 μ L da solução do poço. Os ensaios de cristalização foram mantidos a 4 e 18 °C e as inspeções para identificação dos cristais foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido pelo LNBio pelo analisador de imagens Rock Imager 1000 (Formulatrix). No total, foram testadas 552 condições em cada uma das temperaturas.

Para alguns dos ensaios de cristalização, a enzima foi concentrada por centrifugação a 7000 rpm em dispositivo Vivaspin® 6 (GE Healthcare) (com limite de retenção para a membrana de 10 kDa)

3.3.1.6 Coleta de dados

Os dados de difração de raios X foram coletados no comprimento de onda de 0,97718 Å a 100 K usando a fonte de radiação síncrotron (Sirius) na estação Manacá (CNPEM - LNLS), localizada em Campinas, Estado de São Paulo. O cristal foi retirado da gota com um *cryoloop* e resfriado diretamente em uma corrente de nitrogênio a 100 K uma vez que a condição de cristalização já era crioprotetora.

3.3.2 Procedimentos Computacionais

3.3.2.1 Determinação da estrutura por difração de raios X

3.3.2.1.1 *Processamento das imagens*

A indexação e integração foram realizadas com o pacote DIALS (BEILSTEN-EDMANDS et al., 2020), enquanto o escalonamento foi executado com o programa aimless do pacote CCP4 (WINN et al., 2011).

Após este procedimento, a ferramenta xtriage no programa PHENIX (ADAMS et al., 2011) foi utilizada para identificar eventuais patologias cristalinas.

3.3.2.1.2 *Faseamento inicial por substituição molecular*

Estruturas de proteínas homólogas para alinhamento e comparações estruturais foram selecionadas com base em uma pesquisa com a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Um critério empregado foi selecionar estruturas representativas de cada reino de seres vivos, maior resolução, cobertura e porcentagem de identidade, com preferência de organismos parasitas, mas incluindo todos os fungos. Depois da seleção de uma destas estruturas homólogas para a substituição molecular, a sequência desta e da *PIGAPDH* foram alinhadas com o programa T-Coffee (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000) com o modo *default*. O alinhamento gerado foi usado como entrada no programa Chainsaw (STEIN, 2008) com o modo "maxi", de tal maneira que se conservasse o número máximo de átomos comuns aos resíduos da estrutura alvo e do modelo. Para estabelecer as funções de rotação e translação, utilizou-se o programa Phaser (MCCOY et al., 2007).

3.3.2.1.3 *Modelagem e refinamento*

Nos procedimentos para a modelagem e refinamento, a estrutura da *PIGAPDH* foi inicialmente submetida ao programa *Phenix.autobuild* (AFONINE; GROSSE-KUNSTLEVE; ADAMS, 2005), o qual empregou fatores de estrutura e dados de incertezas obtidas do modelo de partida resultante da substituição

molecular.

Para completar e refinar as posições atômicas do modelo obtido por difração de raios X, utilizou-se um processo interativo com os Programas *Phenix.refine* (AFONINE; GROSSE-KUNSTLEVE; ADAMS, 2005) e COOT *Crystallographic Object-Oriented Toolkit* (EMSLEY; COWTAN, 2004). Os mapas empregados para visualização foram Fourier diferença mFo-DFc e densidade eletrônica 2mFo-DFc.

3.3.2.1.4 *Validação do modelo final*

Os programas usados para a validação da estrutura foram: Molprobit (CHEN et al., 2010), ValidationPDB (WESTBROOK et al., 2003), Whatcheck (HOOFT RW et al., 1996) e Procheck (LASKOWSKI et al., 1993). Finalmente, foi empregado o programa Mapman (KLEYWEGT; JONES, 1996) para o cálculo dos índices de ajuste na densidade eletrônica, RSR (valor residual no espaço real) e RSCC (valor do coeficiente de correlação no espaço real).

3.3.2.2 Análises e comparações estruturais

3.3.2.2.1 *Topologia da Estrutura da PIGAPDH*

A estrutura da PIGAPDH foi submetida ao servidor Pro-Origami (STIVALA et al., 2011) para produzir a imagem da topologia com os elementos da estrutura secundária.

3.3.2.2.2 *Alinhamento das sequências de aminoácidos e análises da conservação de resíduos e de contatos das proteínas com os ligantes ácido D-galactônico, cofator NAD⁺ e íon sulfato*

As ligações de hidrogênio do ligante Ácido D-Galactônico GAA (Código de 3 letras do PDB: J0M), cofator NAD⁺ (Código de 3 letras do PDB: NAD) e íon sulfato (Código de 3 letras do PDB: SO4) foram representadas com o programa LIGPLOT (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011) em 2D e UCSF Chimera X (PETTERSEN et al., 2021) e PyMOL (DELANO, 2002) em 3D.

Estruturas de proteínas homólogas para alinhamento e comparações

estruturais foram selecionadas com base em uma pesquisa com a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Os critérios empregados foram selecionar estruturas representativas de cada reino de seres vivos, considerar maior resolução, cobertura e porcentagem de identidade, focalizar organismos parasitas e incluir todos os fungos. O alinhamento entre as sequências foi obtido com o programa T-Coffee (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000) e teve pequenas modificações manuais. Foi visualizado com o programa ALINE (BOND; SCHÜTTELKOPF, 2009), no qual os elementos da estrutura secundária foram representados conforme calculados pelo programa DSSP (KABSCH; SANDER, 1983). A conservação dos resíduos foi colorida de acordo com a convenção de Alscript Calcons (BARTON, 1993).

Finalmente, o servidor web ConSurf (ASHKENAZY et al., 2016) foi usado para mapear na estrutura *PIGAPDH* a conservação de sequências entre todas as de GAPDHs disponíveis até o momento (286) no banco UNIPROT (BATEMAN et al., 2021). O servidor scorecons foi usado para apontar posições nas quais as sequências de resíduos são exclusivas de *PIGAPDH* (VALDAR, 2002).

3.3.2.2.3 *Análises e comparações dos sítios Ps, Pi, novo Pi e GAA entre estruturas de proteínas homólogas*

A superposição foi realizada com o programa MultiProt (SHATSKY; NUSSINOV; WOLFSON, 2004).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

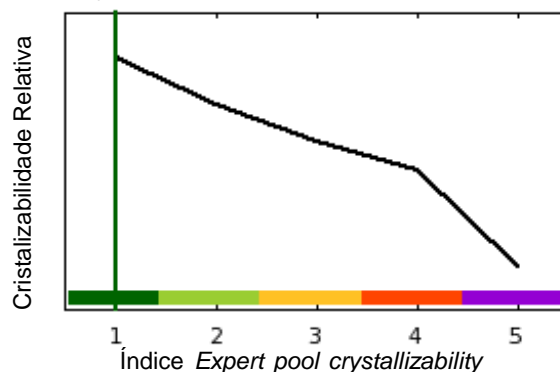
3.4.1 Procedimentos Experimentais

3.4.1.1 Planejamento do vetor de expressão da enzima *PIGAPDH*

Os sítios de restrição *NheI* e *XhoI* foram indicados para a inserção do gene alvo de *PIGAPDH* no plasmídeo pET-28a(+). Esse planejamento permitiu que na sequência inicial da proteína clonada fosse adicionado um pequeno número de aminoácidos na região N-terminal, a chamada cauda “his-tag”, que pode ser excisada após a expressão da proteína mediante hidrólise pela enzima trombina.

Estudos computacionais relacionados com a probabilidade de cristalização da proteína pelo servidor XTalPred (SLABINSKI et al., 2007) mostraram que *PIGAPDH* tem uma ótima probabilidade de cristalização com valor um (1) numa escala de um até cinco (1-5) pelo "*Expert pool crystallizability class*" apresentada na Figura 31.

Figura 31 - *Expert pool crystallizability class* estabelecido no servidor XtalPred para *PIGAPDH*



Legenda: Resultados obtidos no servidor XtalPred
Fonte: O autor.

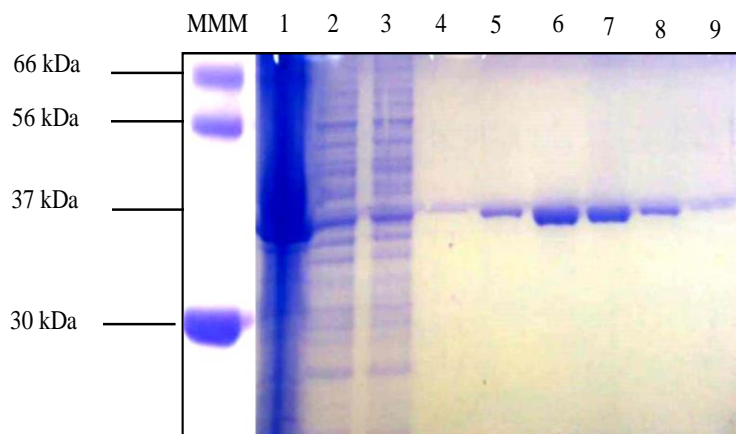
3.4.1.2 Expressão

A sequência de aminoácidos da enzima *PIGAPDH* produzida foi submetida à análise do servidor ProtParam (EXPASY Proteomics Server) (GASTEIGER et al., 2005), que calculou a massa molecular de 36,47 kDa (338 resíduos de aminoácidos), mas com a inclusão de 6 resíduos de histidina e seus conectores (genes) da his-tag, calculou a massa molecular de 37,29 kDa (344 resíduos de aminoácidos).

Através da análise por SDS-PAGE (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), foi possível observar a banda de expressão, a partir dos testes a 37 °C com 3, 6 e 16 h de indução nas concentrações de IPTG de 0,10, 0,25, 0,50 e 1,00 mmol L⁻¹. A banda identificada tem em torno de 37 kDa, compatível com o resultado calculado no ProtParam (GASTEIGER et al., 2005). Na sequência, foi realizado novo teste de expressão, agora usando a indução com lactose no próprio meio de cultura (auto-indução) (STUDIER, 2005), à temperatura de 37 °C por 22 h. Deste ensaio, no gel foram observadas a diferença significativa na concentração de proteínas expressas especialmente nas bandas na altura dessa massa molecular ao se comparar bactérias transformadas e não transformadas. A análise eletroforética do experimento da expressão realizada a 37 °C por 16 h e induzida com 0,5 mmol L⁻¹ de

IPTG ilustra tal fato (Figura 32).

Figura 32 - Eletroforegrama SDS-PAGE 12% referente ao teste de expressão a 37 °C com 16 h de indução e 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG para a enzima *PIGAPDH*.

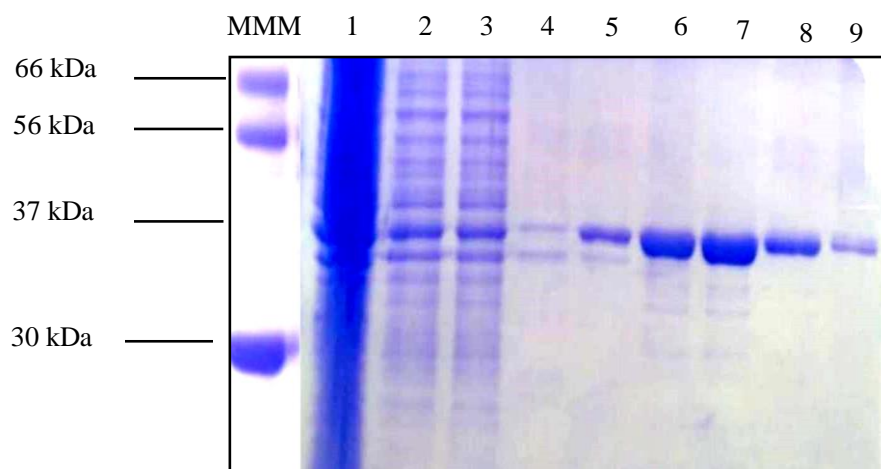


Legenda: MMM: Marcador de Massa Molecular; Raia 1: Células transformadas - fração precipitada; Raia 2,3: Células Transformadas- fração solúvel; Raia 4-9: Frações da cromatografia da proteína expressada.

Fonte: O autor.

A partir destes testes iniciais, foi possível concluir que houve a expressão da enzima *PIGAPDH*. Assim, após a otimização das condições de expressão, definiu-se que a melhor condição para expressar a proteína foi o meio com lactose e com canamicina a 30 µg mL⁻¹ a 37 °C por 22 h de indução (Figura 33).

Figura 33 - Eletroforegrama SDS-PAGE 12% referente ao teste de expressão a 37 °C com 22 h de autoindução com lactose.



Legenda: MMM: Marcador de Massa Molecular; Raia 1: Células transformadas - fração precipitada; Raia 2,3: Células Transformadas - fração solúvel; Raia 4-9: Frações da cromatografia da proteína expressada.

Fonte: O autor.

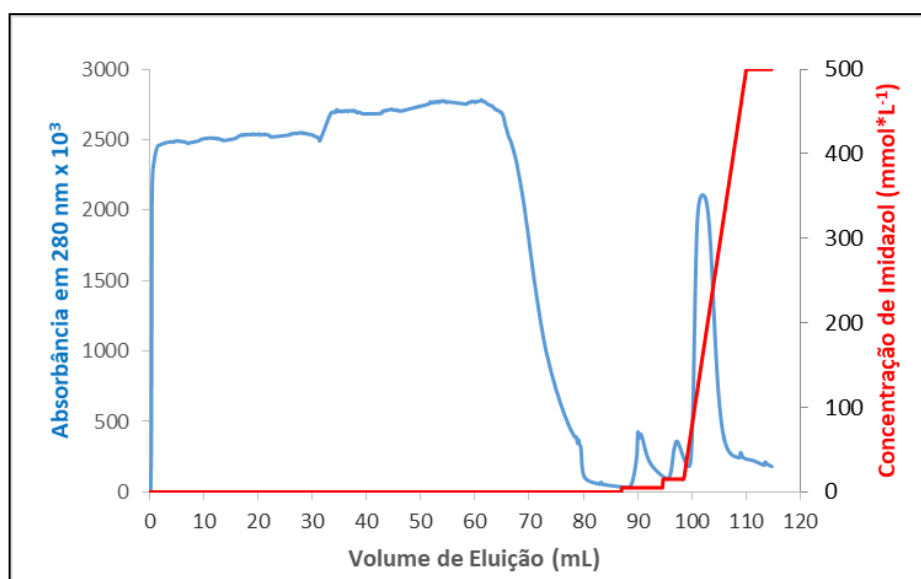
3.4.1.3 Purificação por cromatografia de afinidade

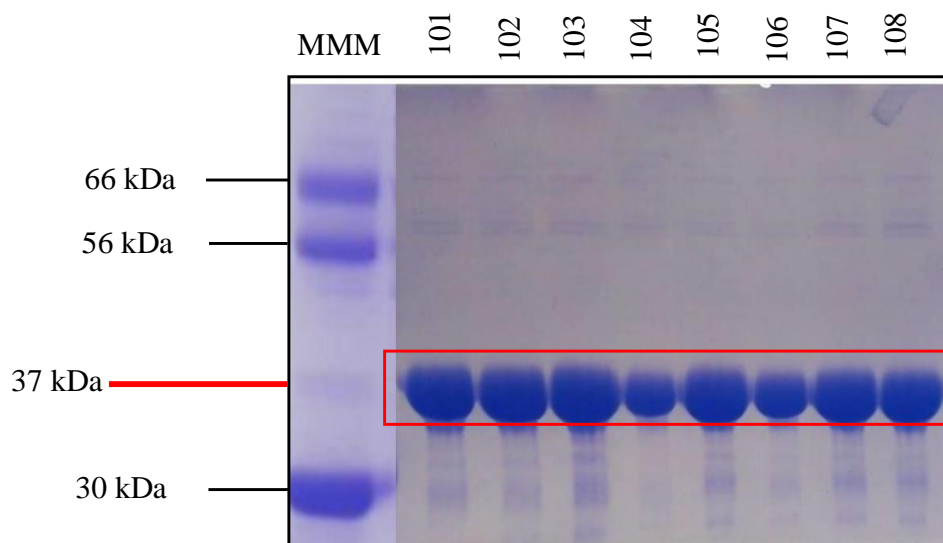
PIGAPDH foi purificada por cromatografia de afinidade; um resultado representativo é mostrado na (Figura 34-A) proveniente de (quatro) injeções diretas do sobrenadante da centrifugação, em que a proteína foi eluída durante um gradiente de imidazol (20 mmol L⁻¹ CHES, 200 mmol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ Glicerol e 500 mmol L⁻¹ de imidazol, pH 9,3) na concentração de 81 mmol L⁻¹ a 370 mmol L⁻¹. As análises de algumas frações resultantes estão na imagem do gel de eletroforese (Figura 34-B). O programa ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012) estimou cerca de 98% de pureza das frações 101 a 108; assim, a partir desta cromatografia, as frações com maior concentração, 103-105, foram direcionadas para ensaios de cristalização, sendo concentrada previamente, e levou aos melhores cristais difratores.

Ensaio anteriores, nos quais a lise celular e a cromatografia de afinidade subsequente foram realizadas com tampões Tris ou Fosfato, levaram à precipitação imediata de proteínas; finalmente, verificou-se que o tampão CHES com um pH 9,3 adicionado de glicerol a uma concentração de 20% estabiliza as proteínas em solução.

Figura 34 - (A) Cromatograma das frações eluídas durante a purificação da *PIGAPDH* por cromatografia de afinidade. (B) Eletroforegrama SDS-PAGE 12% das frações da cromatografia por afinidade.

A



B

Legenda: A) A linha azul representa a absorvância (mAU) enquanto que a vermelha representa a concentração de imidazol. B) MMM: Marcador de Massa Molecular; demais números acima das raias correspondem às frações obtidas na cromatografia, de 101 até 108. Foram aplicados 10 μ L de solução proteica por raia.

Fonte: O autor.

3.4.1.4 Cristalização da *PIGAPDH*

Inicialmente a *PIGAPDH* foi purificada com os tampões e aditivos i) 20 mmol L^{-1} Tris-HCl, 200 mmol L^{-1} NaCl, 10 mmol L^{-1} Glicerol e 500 mmol L^{-1} de imidazol pH 7,9 e ii) 20 mmol L^{-1} Na_2HPO_4 , 200 mmol L^{-1} NaCl, 10 mmol L^{-1} Glicerol e 500 mmol L^{-1} de imidazol, pH 6,2. A proteína precipitava em algumas horas após a purificação; procurou-se, assim, realizar alguns ensaios manuais de cristalização rapidamente, logo após a purificação. Desta maneira foram realizados ensaios de cristalização como os kits comerciais Crystal Screen, da Hampton Research®, e Morpheus Gorrec (2009), MIDAS e JCSG+ Suite, da Molecular Dimensions®, com a enzima *PIGAPDH* a 2,2 mg mL^{-1} .

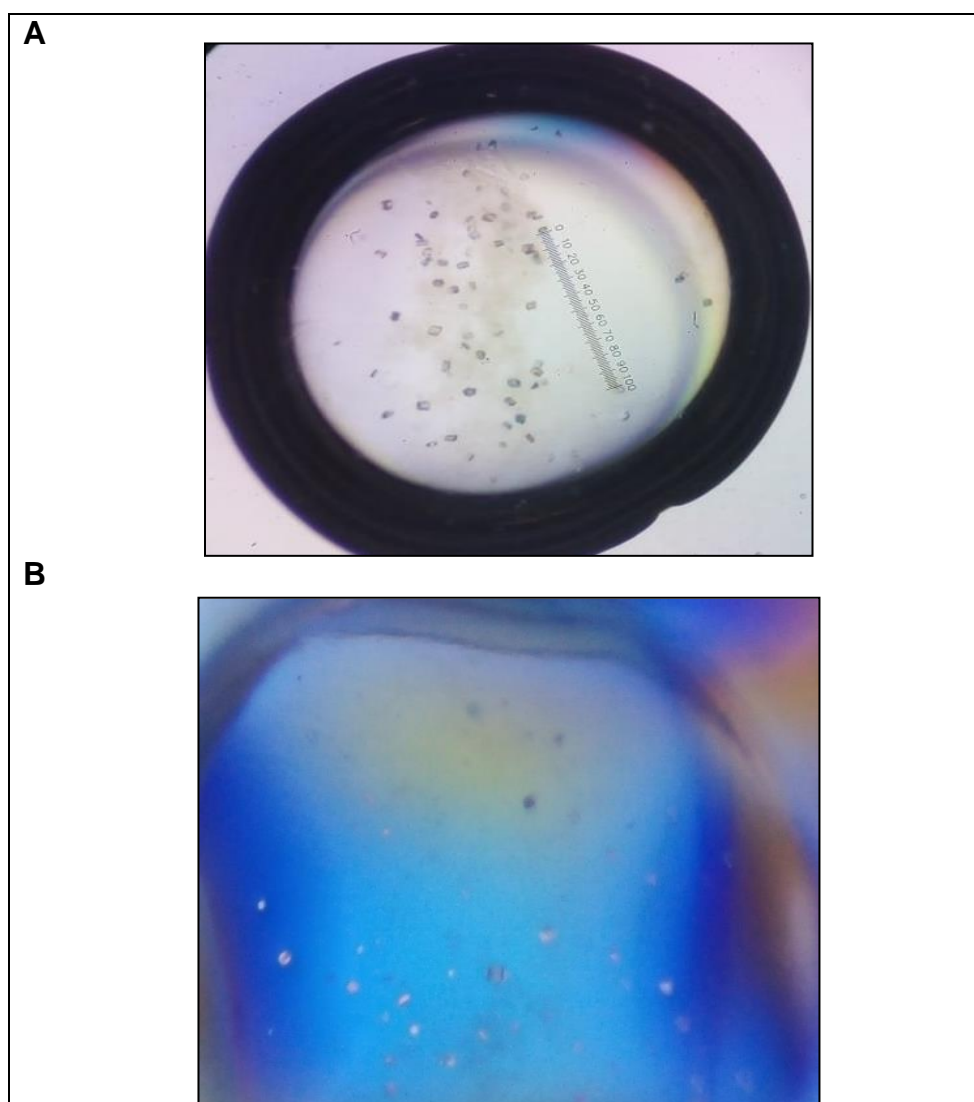
Foi observada a formação de cristais na condição 7 do kit Morpheus, na condição 79 do kit JCSG+ e na condição 16 do kit Crystal Screen (Tabela 3).

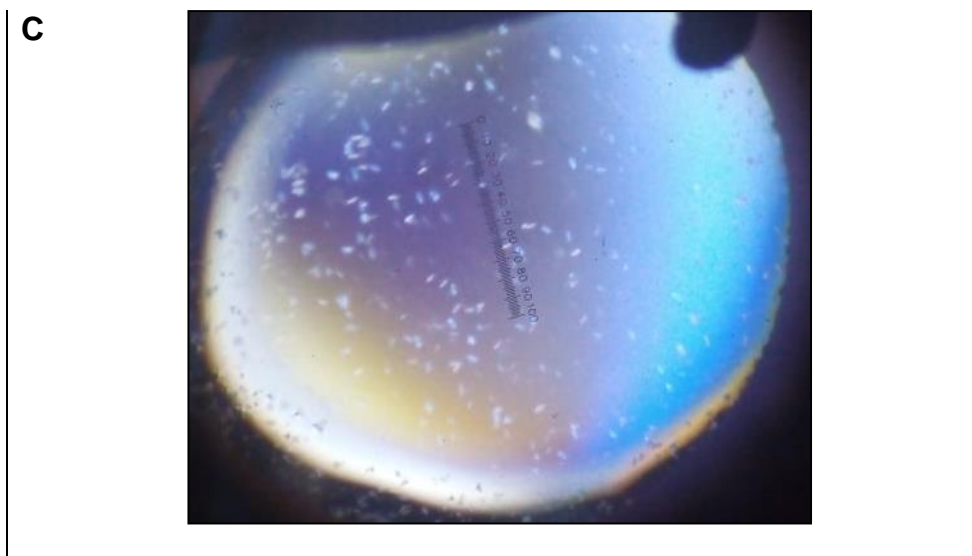
Tabela 3 - Condições em que se obtiveram cristais.

Número de Condição - Kit	Composição
7 - Kit Morpheus	0,06 M Cátions Divalentes, 0,1 M Solução Tampão 2 pH=7,5, 20% V/V Glicerol, 10% m/V PEG 4000.
79 - Kit JCSG+	10% V/V 2-propanol, 0,1 M cacodilato de sódio pH 6,5 0,2 M Acetato de zinco
16 - Kit Crystal Screen	0,1 M HEPES de Sódio pH 7,5, 1,5 M Sulfato de Lítio

Fonte: O autor.

Figura 35 - Cristais obtidos nos ensaios iniciais de cristalização.





Legenda: A) Cristais obtidos com o kit Morpheus – condição 7. B) Cristais obtidos com o kit JSCG+ – condição 79. C) Cristais obtidos com o kit Crystal Screen – condição 16. Fonte: O autor.

Foram selecionados 3 cristais representativos de cada uma das condições de cristalização mencionados na tabela 3 (Figura 35) e submetidos à estação experimental Manacá do síncrotron Sirius numa viagem feita para Campinas - SP em Julho de 2021. Entretanto, os cristais eram policristais de sal. Porém novos refinamentos ou otimizações variando o pH e concentração dos componentes dos cristais de acordo com os procedimentos planteados por McPherson e Cudney (2014) continuaram sendo feitos, mesmo antes de se saber que esses cristais eram de sais.

Adiante, frente ao insucesso desses experimentos e com o fim de aumentar a estabilidade da proteína por mais tempo devido à sua precipitação, cogitou-se mudar o tampão como teste de purificação, isto porque somente se fizeram ensaios de purificação com tampões abaixo do Ponto Isoelétrico (PI) da enzima *PIGAPDH*, estimado em 8,29 pelo servidor ProtParam (EXPASY Proteomics Server) (GASTEIGER et al., 2005). Dessa maneira, foram usados os tampões para cromatografia, de ligação: 20 mmol L⁻¹ CHES, 200 mmol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ Glicerol, pH 9,3, de eluição: 20 mmol L⁻¹ CHES, 200 mmol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ Glicerol e 500 mmol L⁻¹ de imidazol, pH 9,3. Assim, a enzima *PIGAPDH* foi obtida com sucesso e com maior estabilidade, o que permitiu concentrá-la por centrifugação a 7000 rpm em dispositivo Vivaspin ® 6 (GE Healthcare) até uma concentração de 8,2 mg mL⁻¹.

Logo, fizeram-se novos ensaios de cristalização, observando-se a formação

de cristais numa proporção 1:1 (1,5 μL de solução da enzima *PIGAPDH* e 1,5 μL de solução precipitante) em que se acrescentou 0,22 mM NAD^+ na condição 39 do kit Structure Screen (Tabela 4).

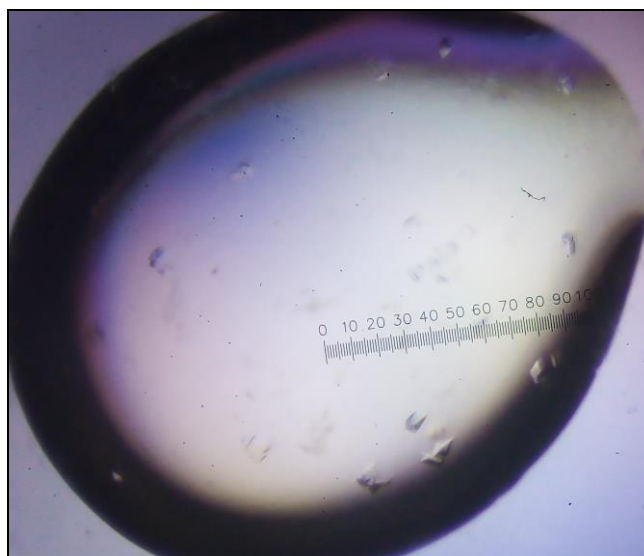
Tabela 4 - Condições em que se obtiveram cristais da *PIGAPDH*.

Número de Condição- Kit	Composição
39 - Kit Structure Screen	0,2 M Sulfato de Amônio, 0,1 M Acetato de Sódio pH 4,6, 30% W/V PEG 2000 MME

Fonte: O autor.

Foram submetidos 2 cristais representativos da condição de cristalização mencionada na tabela 4 (Figura 36) à estação experimental MANACÁ do síncrotron Sirius numa viagem feita para Campinas - SP em Novembro de 2021.

Figura 36 - Cristais obtidos nos experimentos de cristalização.



Legenda: Cristais obtidos com a utilização do kit Structure Screen – condição 39, citada na Tabela 4. Enzima *PIGAPDH* a 8,2 mg mL^{-1} .

Fonte: O autor.

Devido à aparência dos cristais, cogitou-se serem de sais, porém, eles cristais difrataram como de proteína e possibilitaram a coleta de um conjunto completo de dados de difração de raios X, embora inicialmente na resolução de 2,9 Å.

Mas, ainda antes da viagem para o síncrotron Sirius, aperfeiçoou-se o

método de purificação como descrito no item 3.4.1.4, tal que a enzima *PIGAPDH* foi concentrada por centrifugação a 7000 rpm em dispositivo Vivaspin ® 6 (GE Healthcare) atingindo uma concentração de 11 mg mL⁻¹. Logo, foram feitos os experimentos de cristalização automatizados no ICC-Fiocruz Curitiba e observou-se a formação de cristais numa proporção 2:1 (300 nL de solução da enzima *PIGAPDH* e 150 nL de solução precipitante) co-cristalizada com 0,30 mM NAD⁺ e com a mistura 0,30 Mm NAD⁺ e 0,30 mM Ácido Ascórbico (VC), na condição 45 do kit JSCG+, descrita na tabela abaixo (Tabela 5).

Tabela 5 - Condições em que se obtiveram cristais da *PIGAPDH*.

Número de Condição - Kit	Composição
45 - Kit JSCG+	0,2 M Sulfato de Amônio, 25,5 W/V PEG 4000

Fonte: O autor.

Foram selecionados 2 cristais representativos da condição de cristalização mencionada na Tabela 5 (Figura 37) e levados à estação experimental MANACÁ do síncrotron Sirius na mesma viagem feita para Campinas - SP em Novembro de 2021.

Figura 37 - Cristais de *PIGAPDH* obtidos nos experimentos de co-cristalização.



Legenda: A escala completa (100 divisões) corresponde a 1 mm. A seta indica o cristal usado para coleta de dados.

Fonte: O autor.

Esses cristais dos dois ensaios de co-cristalização difrataram e possibilitaram a coleta de conjuntos completos de dados de difração de raios X, sendo três que totalizam 10800 imagens somente o cofator NAD⁺.

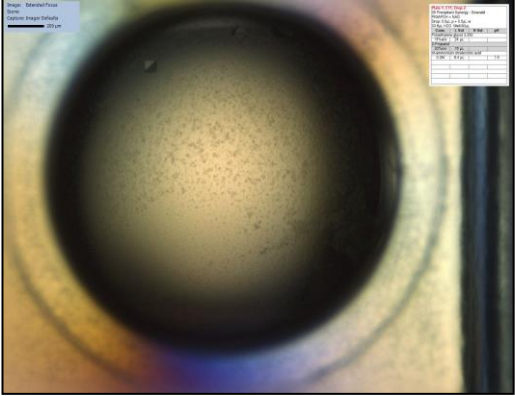
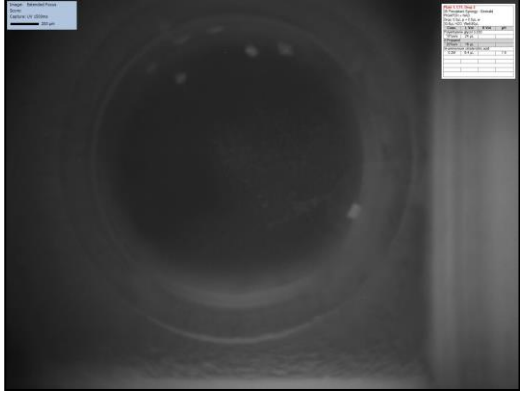
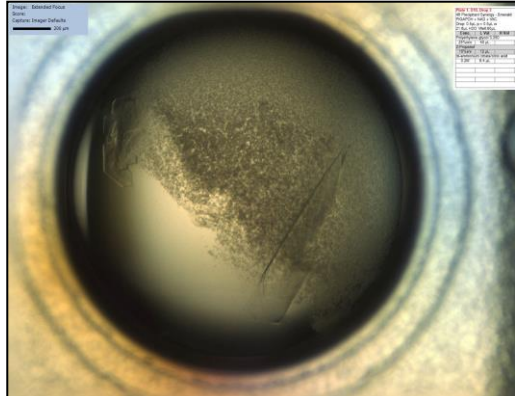
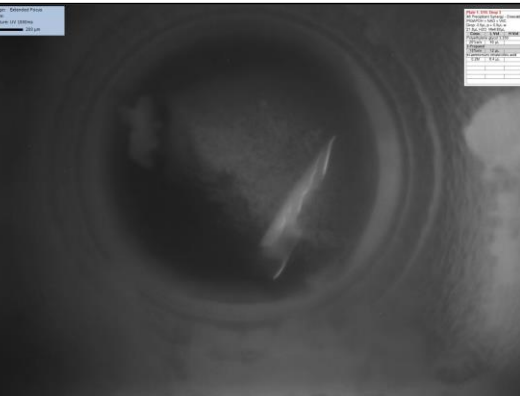
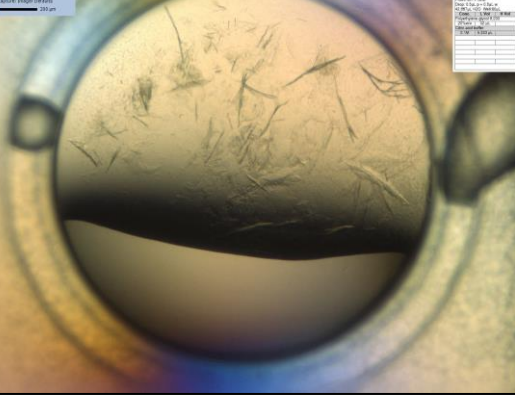

Buscando maior resolução e novos ligantes, neste caso, ácido ascórbico, de uma amostra da proteína numa concentração de 10 mg mL⁻¹ foram feitos os experimentos de cristalização automatizados no LNBio e observou-se a formação de cristais numa proporção 1:1 me dez condições diferentes (0,4 µL de solução da enzima *P/GAPDH* e 0,4 µL de solução precipitante), co-cristalizada com 0,28 mM NAD⁺ e com a mistura 0,28 mM NAD⁺ e 0,28 mM Ácido Ascórbico (VC). A composição destas condições descrevem-se na tabela abaixo (Tabela 6 e Figura 38).

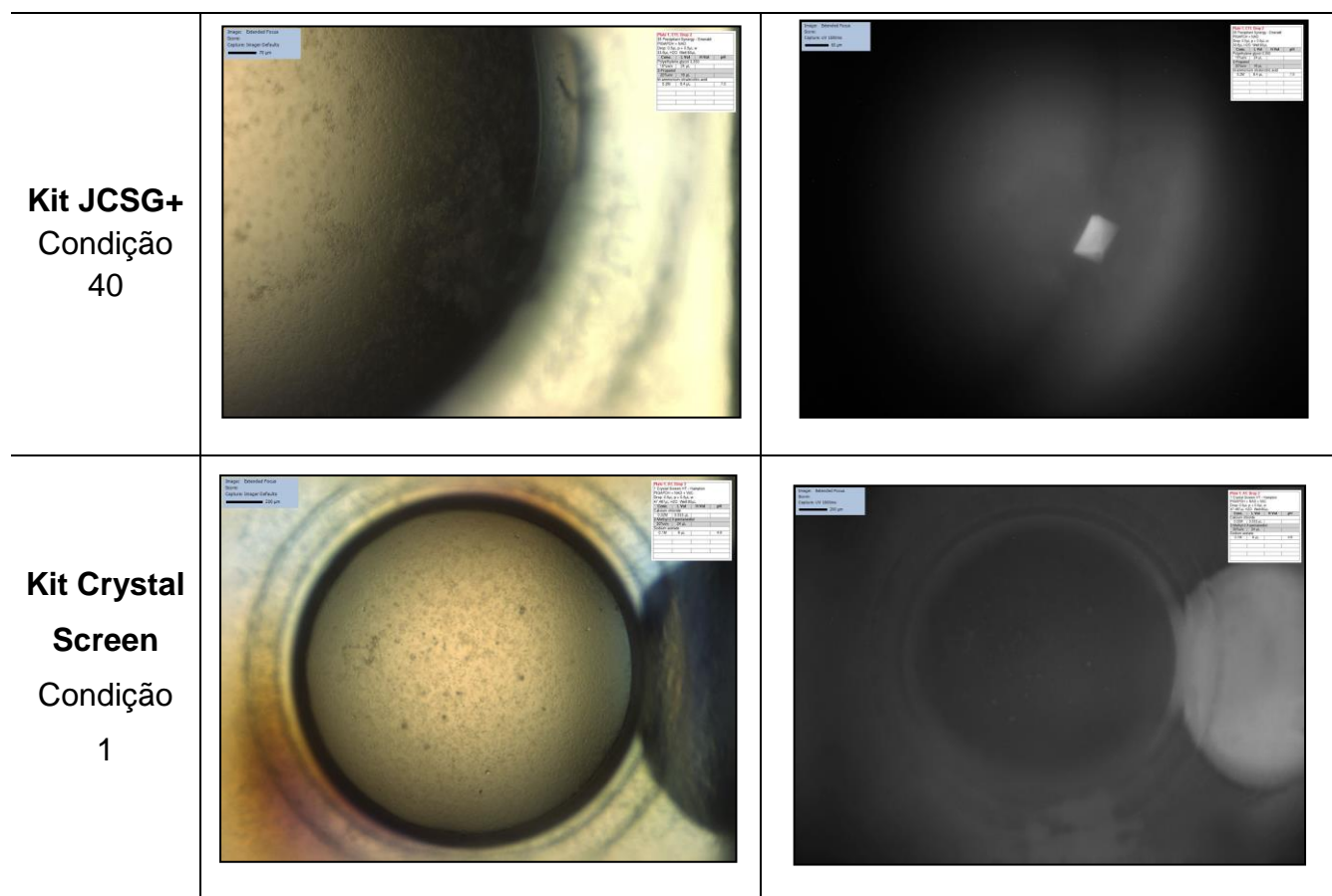
Tabela 6 - Condições em que se obtiveram cristais.

Número de Condição - Kit	Composição
Kit Synergy, Kit 5, 103	20% (V/V) Isopropanol, 0,2 M Citrato de amônio/ácido cítrico pH 7,5, 15% (W/V) PEG 3350
Kit Synergy, Kit 6, 136	15% (V/V) Isopropanol, 0,2 M Citrato de amônio/ácido cítrico pH 4,5, 25% (W/V) PEG 3350
Kit JCSG+, 21	0,1 M Citrato pH 5,0, 20 % W/V PEG 6000
Kit JCSG+, 40	0,2 M Sulfato de lítio, 0,1 M Acetato de sódio pH 4,5, 30% W/V PEG 8000
Kit Crystal Screen, 1	0,02 M Cloreto de cálcio dihidratado, 0,1 M de acetato de sódio tri-hidratado pH 4,6, 30% V/V (+/-) 2-Metil-2,4-pentanodiol

Fonte: O autor.

Figura 38 - Cristais de P/GAPDH obtidos nos experimentos de co-cristalização no LNBio

Kit e Número de Condição	Imagem Luz Visível dos Cristais	Imagem UV dos Cristais
Kit Synergy Condição Kit 5, 103		
Kit Synergy Kit 6, Condição 136		
Kit JCSG+ Condição 21		



Fonte: O autor.

3.4.2 Procedimentos Computacionais

3.4.2.1 Determinação da estrutura por difração de raios X

3.4.2.1.1 Coleta de dados e Processamento das imagens

Fizeram-se 3 coletas de 3600 imagens do mesmo cristal. Assim, 10.800 imagens de difração foram processadas à resolução de até 2,02 Å e indicaram o grupo de espaço como sendo $I4_122$, com parâmetros de cela $a = 118,71$, $b = 118,71$, $c = 158,30$ Å. O refinamento pode ser realizado para os índices finais de $R_{\text{work}} = 16,48\%$ e $R_{\text{free}} = 19,64\%$. A estrutura está depositada no PDB com código 8DE5. Estatísticas do processamento de dados, do refinamento e alguns parâmetros de validação da estrutura são mostrados na Tabela 7.

A unidade assimétrica contém um monômero de massa molecular total 37290 Da, conseqüentemente, o coeficiente de Matthews (MATTHEWS, 1968) calculado foi 3,69 Å³/Da, com teor de solvente de 66,64% estimado no servidor

(<https://www.ruppweb.org/mattprob/default.html>). Para o corte de resolução, foram levados em consideração os valores dos índices de completude, relação sinal/ruído $\langle I/\sigma(I) \rangle$, R_{merge} , R_{meas} e o coeficiente de correlação entre conjuntos de dados após o escalonamento ($CC_{1/2}$) (BEILSTEN-EDMANDS et al., 2020).

Tabela 7 - Estatísticas da coleta de dados e refinamento

Dados do cristal	
PDB ID	8DE5
Comprimento de Onda (Å)	0,97718
Faixa de resolução (Å)	83,94-2,02 (2,05-2,02 Å)
Grupo de espaço	$I 4_1 2 2$
Cela Unitária	
Dimensões da cela unitária <i>a, b, c</i> (Å)	118,71, 118,71, 158,30
Nº. total de reflexões	2.114.099 (48.250)
Nº. de reflexões únicas	37.329 (1,814)
Multiplicidade	56,6 (26,6)
Completeza (%)	100,0 (100,0)
Média [$\langle I/\sigma(I) \rangle$]	10,4 (1,1)
Wilson B-factor (Å)	35,362
R_{merge} (%)	60,6 (376,7)
R_{pim} (%)	7,4 (74,2)
$CC_{1/2}$ (%)	99,8 (37,2)
Refinamento	
R_{work} (%)	16,48
R_{free} (%)	19,64
Monômeros por Unidade Assimétrica	1
Número de Resíduos de Proteína	338
Número de átomos que não são de Hidrogênio	
Total	3.093
Macromoléculas	2.581
Solvente	414
Fator B médio	
Global (Å ²)	49,411
Macromolécula (Å ²)	46,782
Solvente (Å ²)	62,673
RMSD	
Comprimentos de ligação (Å)	0,003
Ângulos de ligação (°)	0,567
RSCC/RSR	
RSCC (Global da proteína)	0,9626
RSR global (Global da proteína)	0,1115
Gráfico de Ramachandran	
Favoráveis (%)	95,50
Adicionalmente permitidas (%)	4,20
Generosamente permitidas (%)	0,30

Legenda: Os valores entre parênteses correspondem à última faixa de resolução.

Fonte: O autor

3.4.2.1.2 Faseamento inicial por substituição molecular

A proteína selecionada para gerar o modelo para substituição molecular foi a GAPDH de *Candida albicans* (69,05% de identidade sequencial e 99,00% de similaridade), PDB ID: 7U4S (MIRANDA; SILVA; IULEK, 2022). O alinhamento usado como entrada para o programa *Chainsaw* (STEIN, 2008) está apresentando na Figura 39.

Figura 39 - Alinhamento da seqüência de aminoácidos da enzima *PIGAPDH* com a da proteína mais similar disponível no PDB (*CaGAPDH*).



Legenda: Barras magentas indicam resíduos que não foram modelados na estrutura correspondente, setas vermelhas representam fitas β , cilindros vermelhos representam hélices α e espirais vermelhas representam hélices 3_{10} ou π . Esta figura foi criada com o programa *ALINE* (BOND; SCHÜTTELKOPF, 2009) e o fundo do alinhamento foi colorido de acordo com a convenção de *Alscript Calcons* (BARTON, 1993).

Fonte: O autor

3.4.2.1.3 Modelagem e refinamento

Depois de se executar a substituição molecular, efetuou-se um refinamento de corpo rígido, seguido de um recozimento simulado (*Simulated annealing*) e vários ciclos de construção manual.

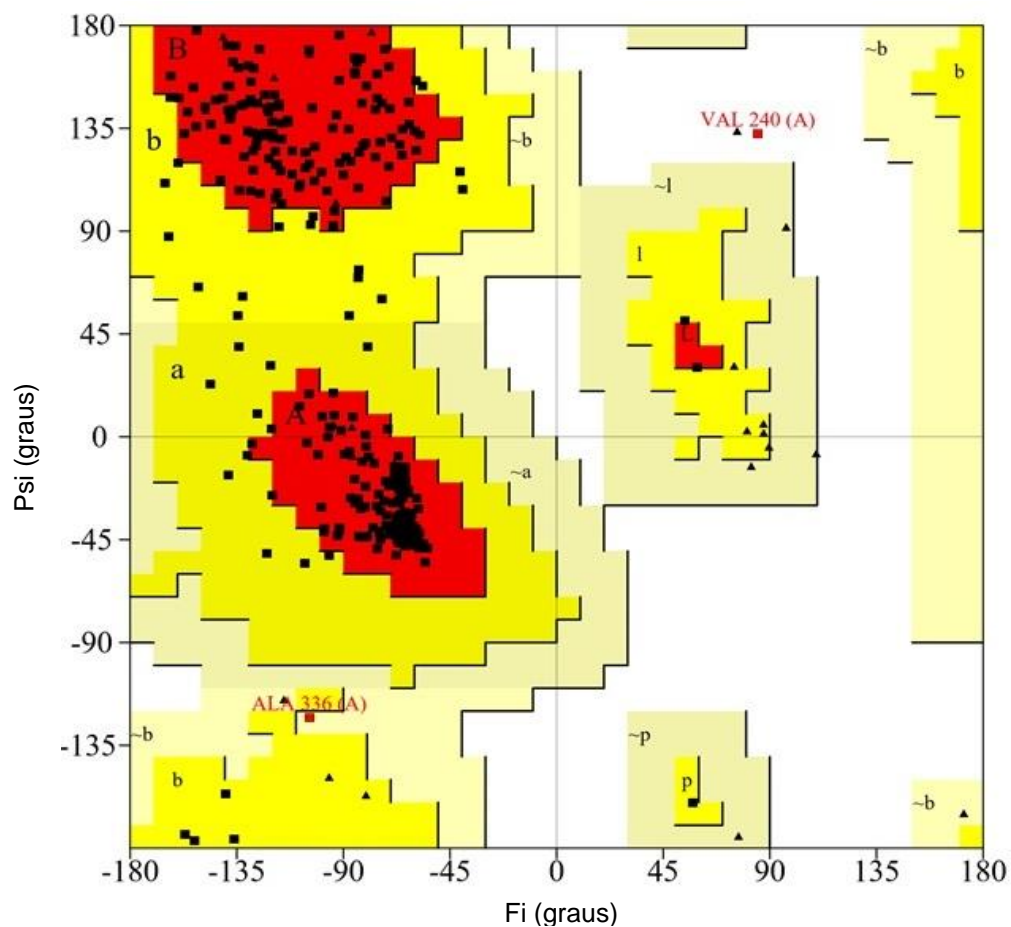
Ao longo da modelagem e refinamento, corroborou-se a qualidade da

densidade eletrônica da cadeia principal da estrutura. Ainda, no modelo final, apenas 15 resíduos não tiveram suas cadeias laterais completamente modeladas devido à ausência de densidade eletrônica convincente.

3.4.2.1.4 Validação do modelo final

O resultado do programa Procheck no tocante aos ângulos phi (ϕ) e psi (ψ) está representado no gráfico de Ramachandran (Figura 40). Dos 338 aminoácidos analisados, 88,1% estão nas regiões mais favoráveis, 11,2% nas regiões adicionalmente permitidas, 0,3% nas regiões generosamente permitidas e 0,3% nas regiões não permitidas.

Figura 40 - Gráfico de Ramachandran da estrutura da PIGAPDH.

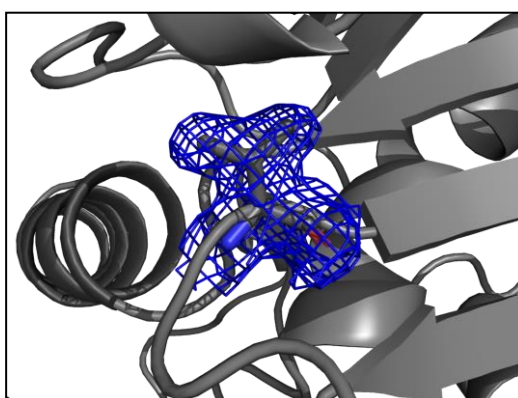


Legenda: As glicinas são representadas por triângulos e os demais aminoácidos por quadrados. As áreas em vermelho são chamadas de regiões muito favoráveis; em amarelo, adicionalmente permitidas; em bege, generosamente permitidas; e em branco, não permitidas. Figura gerada pelo programa Procheck.

Fonte: O autor.

V240 está nas regiões não permitidas e generosamente permitidas, respectivamente; no entanto, sua densidade eletrônica confirma sua conformação (Figura 41). V240 é um resíduo conservado em GAPDHs e é comumente encontrado nesta conformação. Além disso, duas maiores distorções de ligações peptídicas geralmente observadas em GAPDHs estão também presentes em *P*GAPDH, entre seus resíduos I178-H179 e N205-I206, com ângulos de torção de $-159,3^\circ$ e $154,4^\circ$, respectivamente.

Figura 41 - Resíduo modelado na densidade eletrônica (1σ) na região não permitida.



Legenda: V240 da *P*GAPDH

Fonte: O autor.

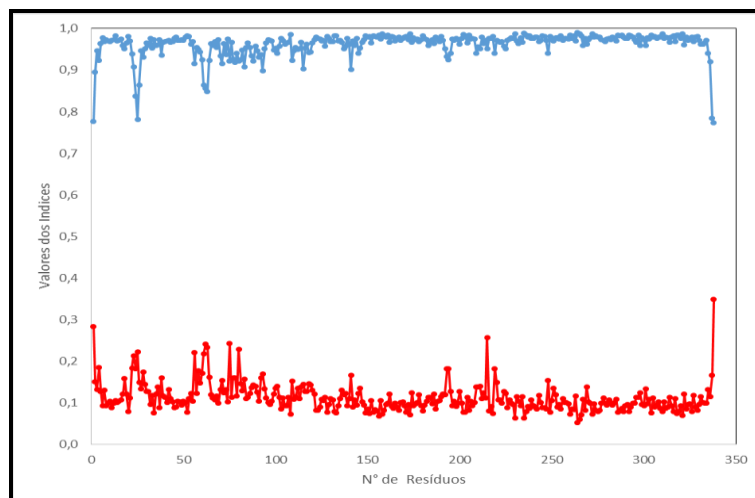
Para se verificar o ajuste da estrutura à densidade eletrônica, calcularam-se os índices RSCC e RSR global e por resíduos da *P*GAPDH, apresentados na Tabela 8 e Figura 42.

Tabela 8 - Valores de RSCC e RSR da *P*GAPDH.

Cadeia	RSCC	RSR
A	0,9626	0,1115

Fonte: O autor.

Figura 42 - Qualidade do ajuste na densidade eletrônica (RSCC em azul e RSR em vermelho) por resíduo.



Fonte: O autor.

Finalmente, a validação realizada pelo programa Molprobity (CHEN et al., 2010) foi específica para verificação da normalidade dos rotâmeros. Alguns deles (12) não estão apontados entre os mais comuns, mas foram devidamente verificados quanto às suas densidades eletrônicas.

3.4.2.2 Análises e comparações estruturais

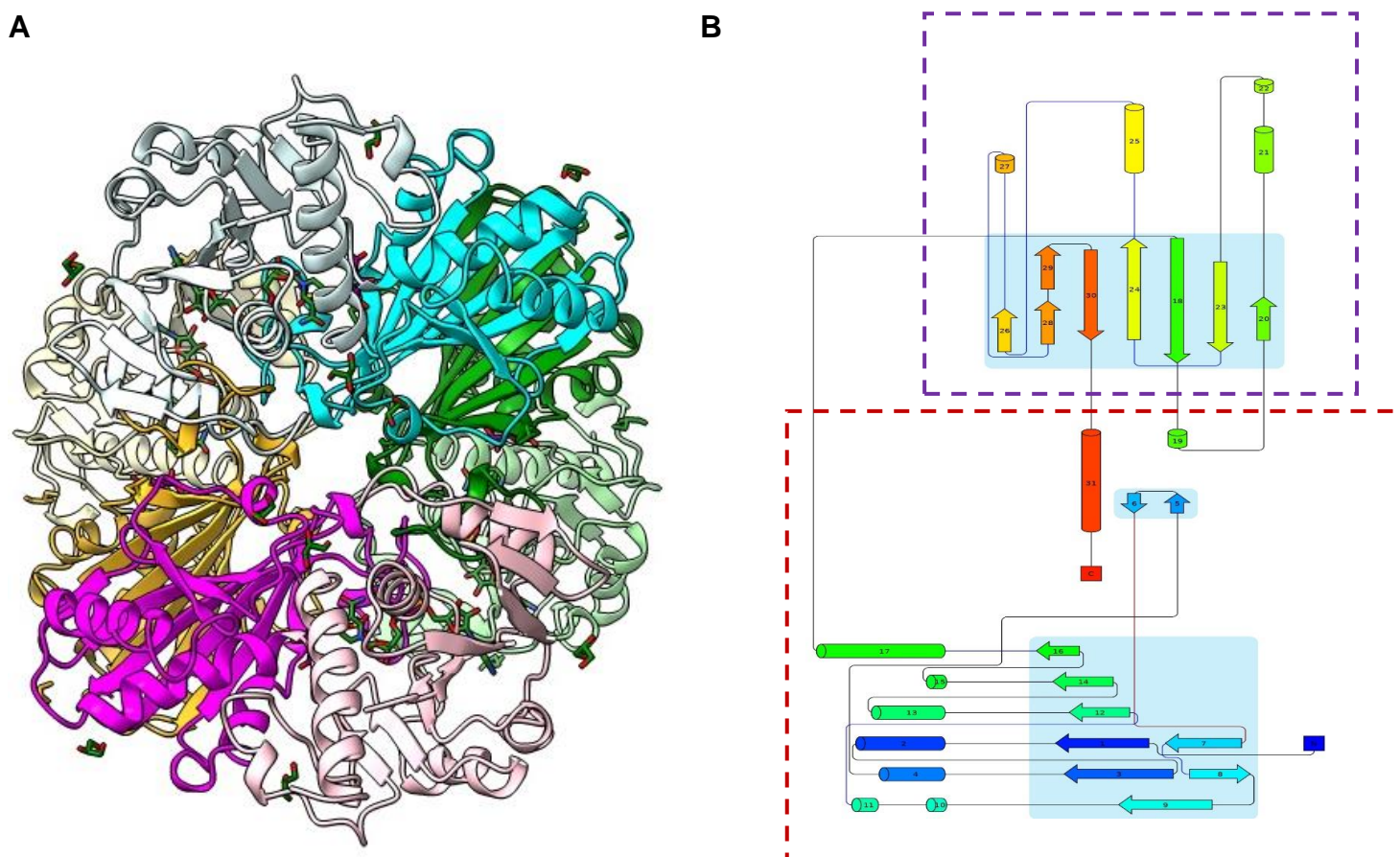
3.4.2.2.1 Estrutura da PIGAPDH e Topologia

Seidler (2013) explica que a enzima GAPDH é um tetrâmero em sua forma mais estável, cujos monômeros, para PIGAPDH, constituem com seus resíduos de aminoácidos 1–152 e 316–338 o domínio de interação com o NAD⁺ e 152–315 o domínio catalítico, de acordo com o resultado do alinhamento sequencial com a estrutura da GAPDH de *Homo sapiens* PDB ID: 1U8F (JENKINS; TANNER, 2006).

PIGAPDH cristalizou como um monômero na unidade assimétrica, mas biologicamente deve ser um tetrâmero com uma simetria interna 222, mostrado na (Fig. 43-A) gerada a partir com elementos de simetria do grupo de espaço. O chamado domínio catalítico apresenta-se ligado a um íon sulfato e a um ligante ácido galactônico (GAA) e o domínio NAD⁺ apresenta-se ligado ao cofator NAD⁺. A base de dados SCOP e a ferramenta PDBsum (LASKOWSKI, 2009) confirmam que PIGAPDH apresenta o típico enovelamento $\alpha+\beta$ (Fig. 43-B).

Observou-se que o resíduo catalítico C152 apresenta densidade eletrônica próxima seu SG. Vários testes foram realizados para obter o melhor ajuste à densidade eletrônica e o modelo final contém então dois átomos de oxigênio extras ligados ao SG, que, no entanto, tiveram suas ocupações refinadas independentemente para 63% e 49%. Vários estudos de estruturas de GAPDH relataram oxidação da cisteína catalítica (ANTONYUK et al., 2003; JENKINS; TANNER, 2006; SPARLA et al., 2004), explicada por sua facilidade de reagir com agentes oxidantes. No entanto, comparações entre estruturas de GAPDH mostram que, em geral, essa oxidação não influencia a posição do átomo de enxofre ou de outros resíduos adjacentes (ANTONYUK et al., 2003).

Figura 43 - Estrutura tridimensional da *PI*GAPDH e sua topologia



Legenda: (A) Estrutura tridimensional do tetrâmero de *PI*GAPDH. Cada monômero está em uma cor diferente, ciano, verde, magenta e dourado; os domínios de ligação NAD⁺ estão em um tom mais claro. As moléculas de NAD⁺ e glicerol (verde floresta), íons sulfato (amarelo) e ácido D-galactônico (roxo) são representadas por bastões. Esta figura e outras figuras de estrutura foram preparadas usando-se o programa UCSF Chimera X (PETTERSEN et al., 2021). (B) Topologia da *PI*GAPDH gerada pelo servidor Pro-Origami apresentada com o domínio catalítico compreendido por caixa roxa tracejada, e com o domínio NAD⁺ compreendido por caixa vermelha escura tracejada (STIVALA et al., 2011). As fitas β reunidas para formar folhas β são indicadas por um fundo azul claro.

Fonte: O Autor

3.4.2.2.2 Alinhamento de sequências de aminoácidos e análise da conservação de resíduos e contatos de proteínas com os ligantes ácido D-galactônico, cofator NAD⁺ e íon sulfato

O alinhamento sequencial de GAPDHs dos seguintes organismos selecionados, conforme descrito na seção Materiais e Métodos, é apresentado (Figura 45): *Homo sapiens*, *Hsa1* (isoforma somática) - PDB ID: 1U8F (JENKINS; TANNER, 2006); *Homo sapiens*, *Hsa2* (isoforma espermática) - PDB ID: 3H9E (CHAIKUAD et al., 2011); *Candida albicans*, *Calb* - PDB ID: 7U4S (MIRANDA; SILVA; IULEK, 2022); *Kluyveromyces marxianus*, *Kmar* - PDB ID: 2I5P (FERREIRA-DA-SILVA et al., 2006); *Saccharomyces cerevisiae*, *Scer* - PDB ID: 4IQ8 (LIU et al., 2012); *Schistosoma mansoni*, *Sman* - PDB ID: 7JH0 (BOREIKO; SILVA; IULEK, 2021); *Trypanosoma cruzi*, *Tcru* - PDB ID: 4LSM (EDWARDS; ABENDROTH, 2013); *Escherichia coli*, *Ecol* - PDB ID: 1S7C (SHIN et al., 2004) e *Spinacia oleracea*, *Sole* - PDB ID: 1RM4 (SPARLA et al., 2004).

A isoforma somática humana GAPDH (*Hsa1*) tem 68% de identidade com a isoforma espermática *Hsa2*, que possui uma inserção rica em prolina chamada a época como um novo domínio em seu N-terminal (CHAIKUAD et al., 2011; WELCH et al., 2013), assim, para *Hsa2*, a faixa de aminoácidos 2-71 e, também devido a uma inserção, a faixa de aminoácidos 2-62 de *Sole*, foram suprimidas para uma melhor visualização global do alinhamento. Normalmente, as estruturas de GAPDHs são semelhantes, com algumas diferenças em elementos de estrutura secundária e substituições de aminoácidos; os valores de RMSD entre monômeros de essas estrutura alinhadas superpostos variam entre 0,578-1,024 Å para um mínimo de 302 resíduos superpostos tal como se apresenta na Figura 44.

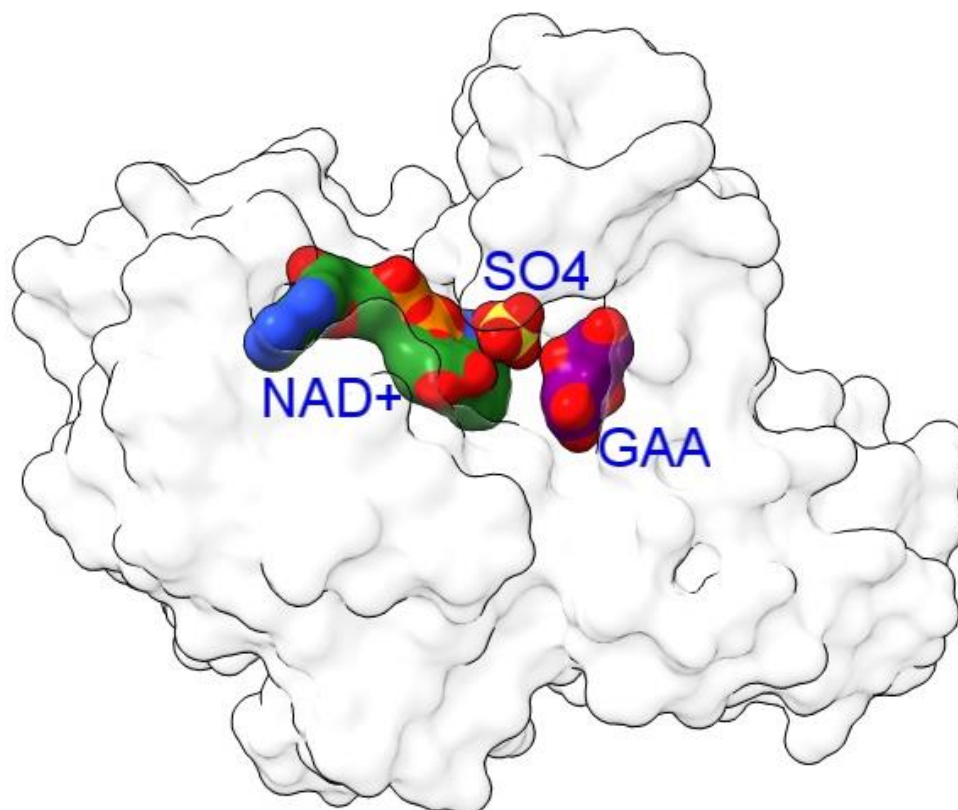
Figura 44 - Alinhamento da sequência de aminoácidos de *PIGAPDH (Plu)* com as de outras GAPDHs

Legenda: Barras magentas indicam resíduos que não foram modelados na estrutura correspondente, setas vermelhas representam fitas β , cilindros vermelhos representam hélices α e espirais vermelhas representam hélices 3_{10} ou π . Os resíduos 2-71 de *Hsa2* e 2-62 de *Sole* estão representados por um til (~). As estrelas coloridas indicam: verde, o trecho hidrofílico HSSSNN, azul claro e amarelo, resíduos associados a duas zonas de desenho diferencial de inibidores e, azul escuro, resíduos com alta variabilidade e considerados como resíduos hubs em sítios alostéricos. Esta figura foi criada com o programa ALINE (BOND; SCHÜTTELKOPF, 2009).

Fonte: O Autor.

O modelo final contém seis moléculas de glicerol (GOL) e, particularmente no sítio ativo, três ligantes adicionais (Figura 45): i) um íon sulfato (SO₄), que deve ter vindo das condições de cristalização e faz ligações de hidrogênio com os resíduos T182, T184, R234 (Figuras 46A e 46B), ii) uma molécula de cofator NAD⁺ (NAD⁺), que também deve ter vindo das condições de cristalização e faz ligações de hidrogênio com os resíduos R12, I13, R80, S122 e N316 (Figuras 47A e 47B), e iii) uma molécula de ácido D-galactônico (GAA, que tem PDB ID de 3 caracteres J0M), que faz ligações de hidrogênio com os resíduos S151, T153, S209, T211, R234 (Figuras 48A e 48B). Ligações de hidrogênio também estão presentes entre SO₄ e NAD⁺ e GAA, porém, não entre estes dois últimos. Os limites de distância e ângulo de corte usados para definir as ligações de hidrogênio foram 3,5 Å e 120°, respectivamente.

Figura 45 - Modelos de superfície de *PIGAPDH*

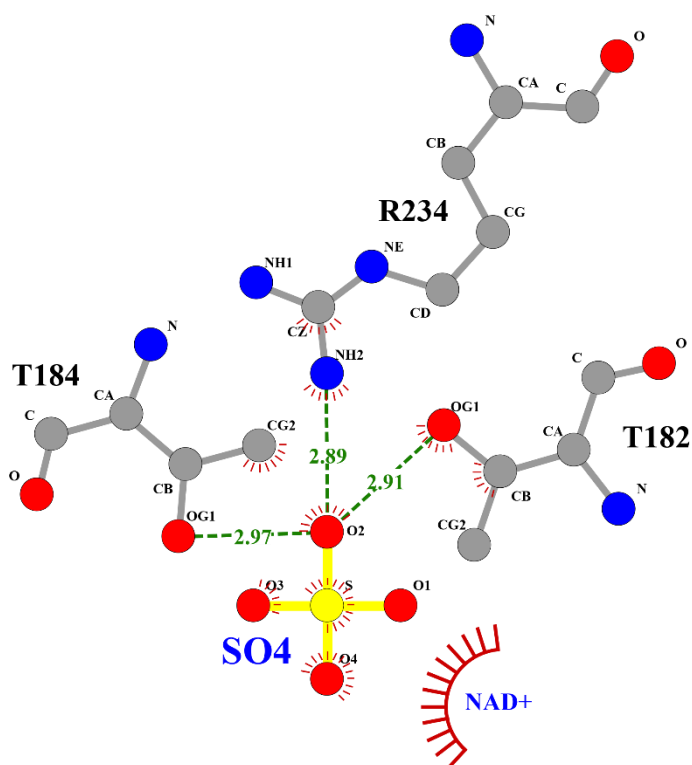


Legenda: Modelos de superfície para ligantes íon sulfato (amarelo - átomo de enxofre), cofator NAD⁺ (verde - átomos de carbono) e ácido D-galactônico (roxo - átomos de carbono), outros átomos com cores convencionais, e para um monômero de proteína (branco).

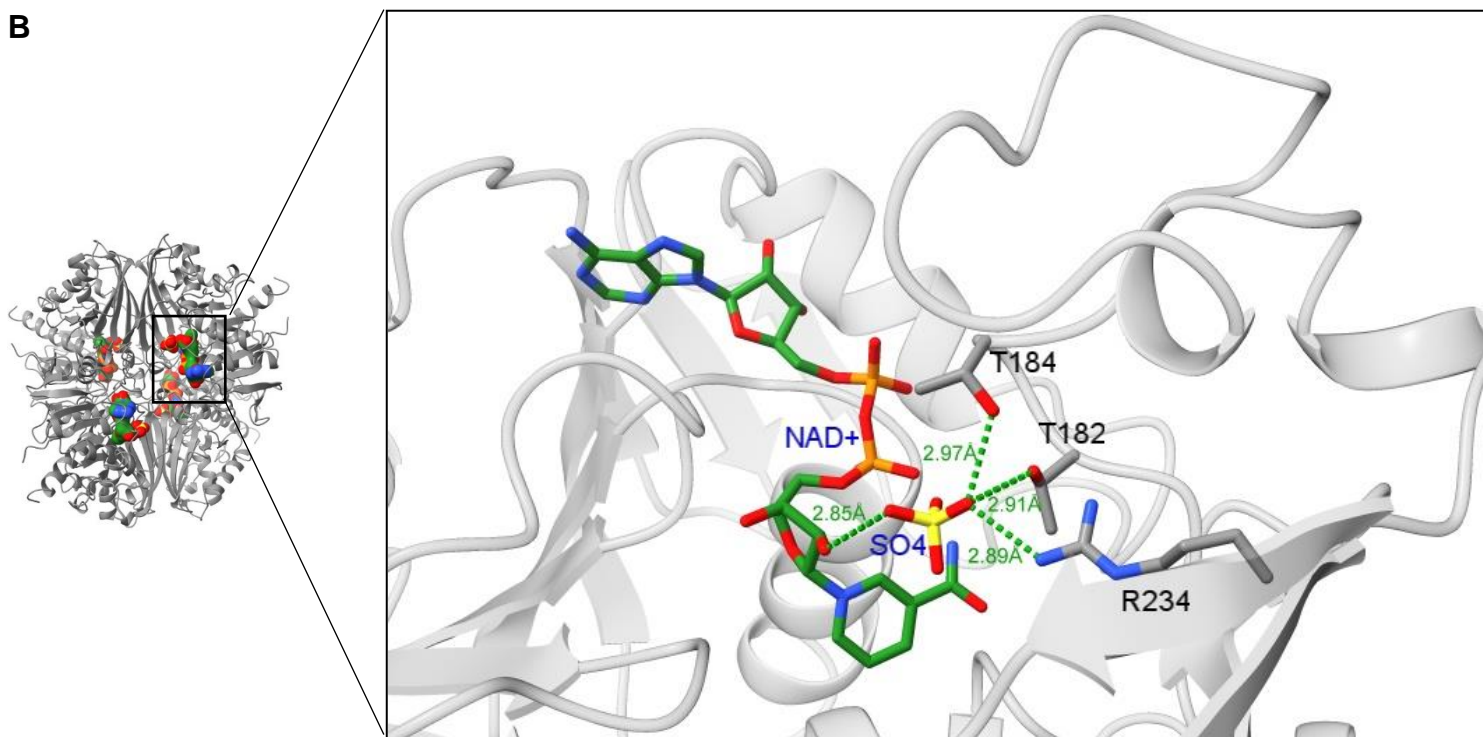
Fonte: O Autor.

Figura 46 - Ligações de hidrogênio do íon sulfato

A



B

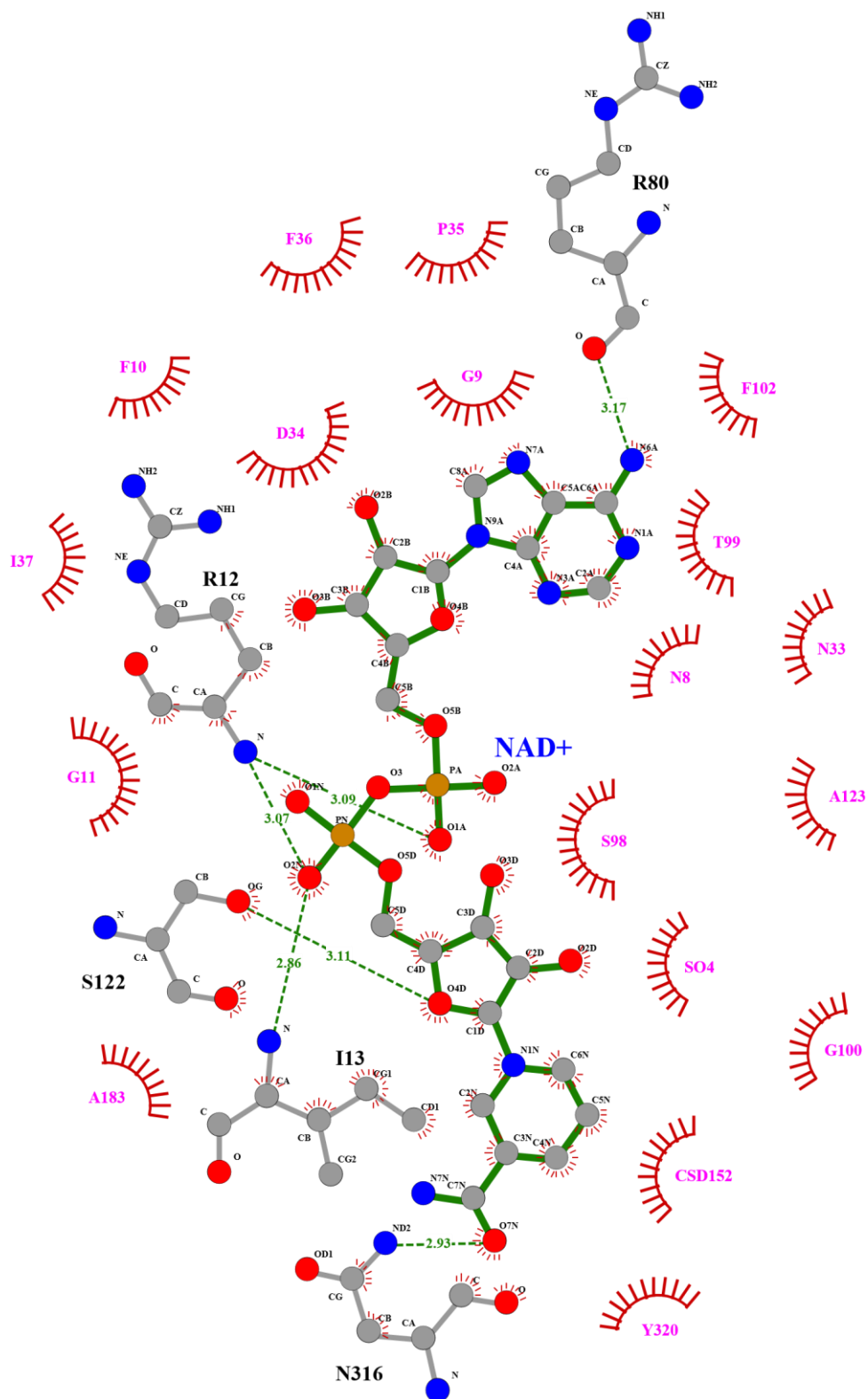


Legenda: (A) duas dimensões (2D) (Esta figura e outras figuras de estrutura foram preparadas usando o programa LIGPLOT (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011)) e (B) três dimensões (3D) (Esta figura e outras figuras de estrutura foram preparadas usando o programa UCSF Chimera X (PETTERSEN et al., 2021)).

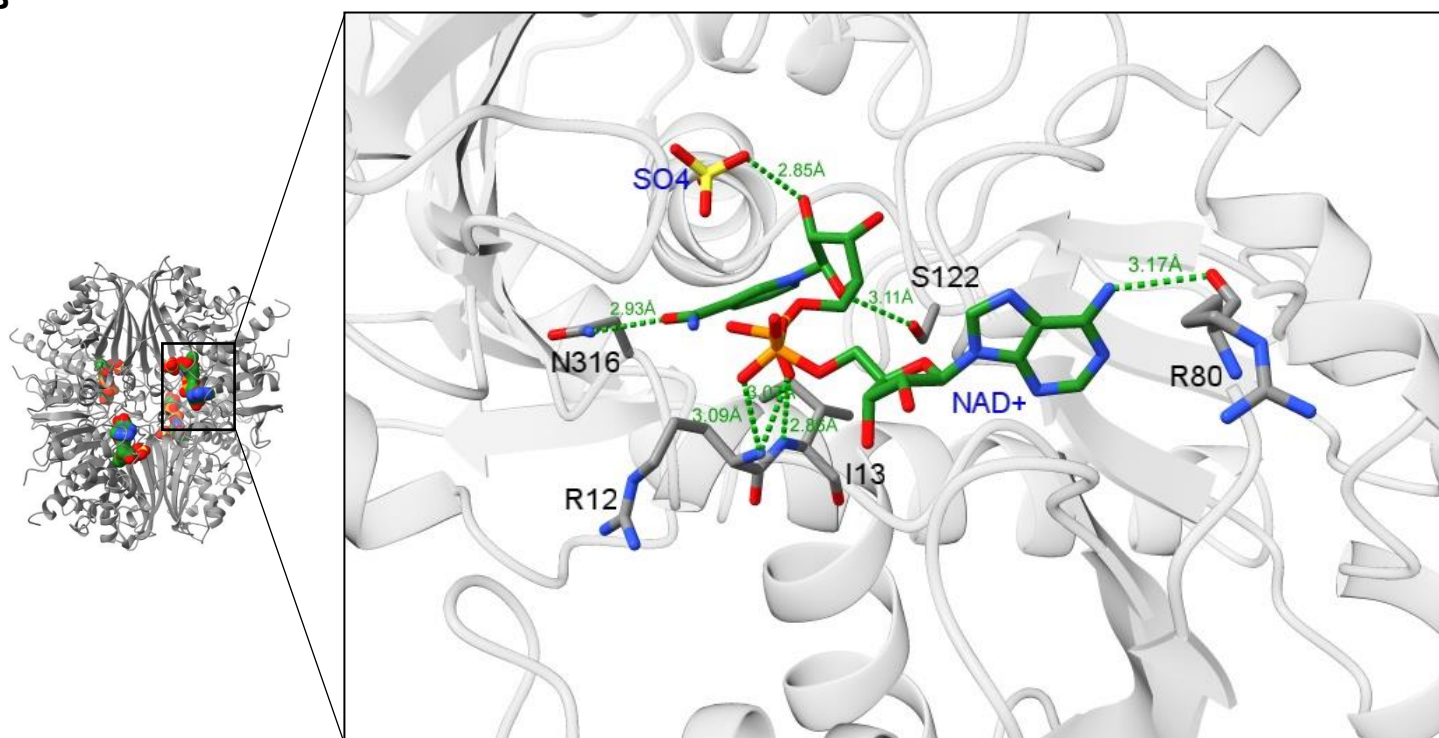
Fonte: O Autor.

Figura 47 - Ligações de hidrogênio do cofator NAD⁺

A



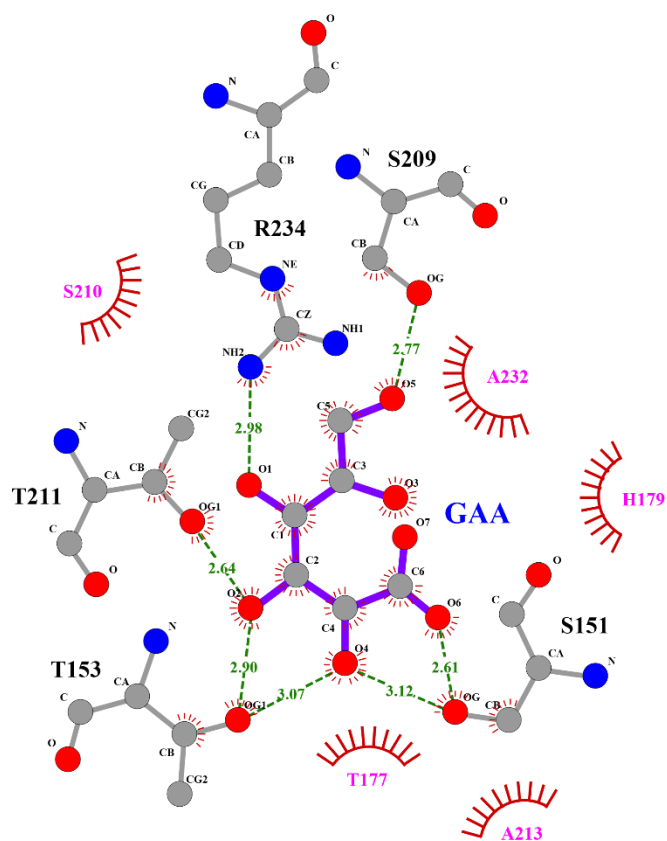
B

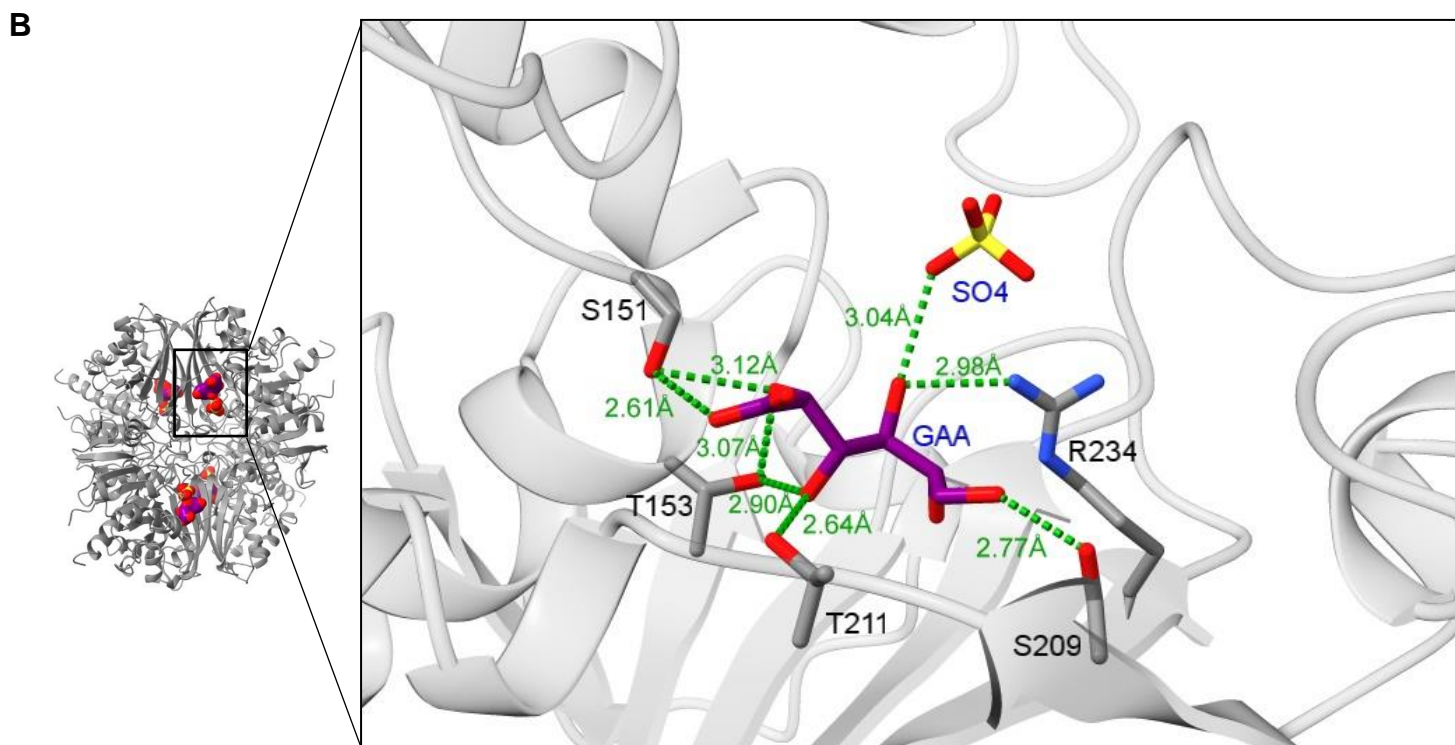


Legenda: (A) duas dimensões (2D) e (B) três dimensões (3D).

Figura 48 - Ligações de hidrogênio do ácido D-galactônico (GAA)

A

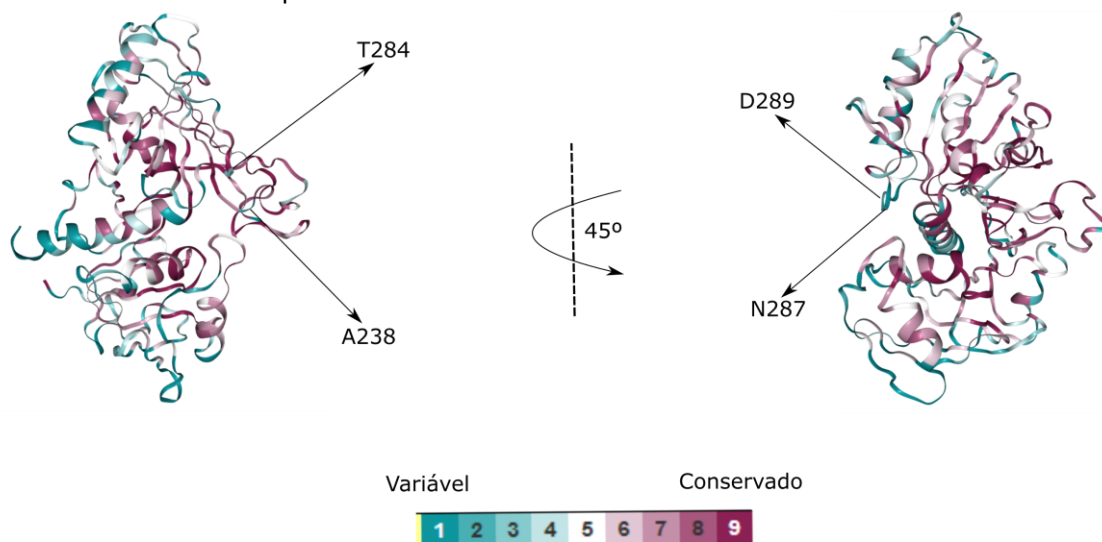




Legenda: (A) duas dimensões (2D) e (B) três dimensões (3D).

Atualmente, o banco de dados UNIPROT (BATEMAN et al., 2021) lista 286 seqüências GAPDHs conhecidas. Estas foram alinhadas com T-coffee e submetidas à bioferramenta Scorecons (VALDAR, 2002) e ao servidor web ConSurf (ASHKENAZY et al., 2016) para representar regiões de alta variabilidade (Figura 49).

Figura 49 - Variabilidade seqüencial de GAPDH



Legenda: Variabilidade e conservação de seqüência de GAPDH mapeadas na *P*GAPDH pelo servidor web ConSurf (ASHKENAZY et al., 2016). Ciano indica alta variabilidade, enquanto roxo indicam alta conservação. Os resíduos de *P*GAPDH A238, T284, N287 e D289 (alostéricos) são indicados.

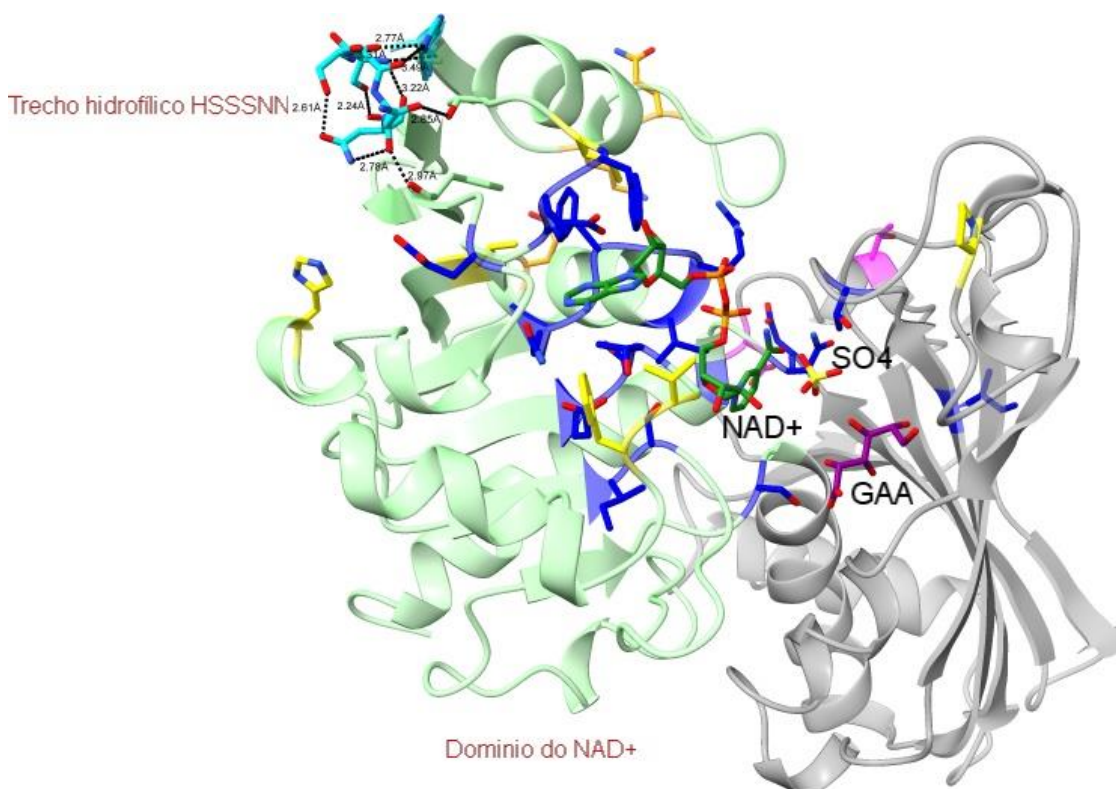
Fonte: O Autor.

Em relação a regiões apontadas como sítios alostéricos que também poderiam ser explorados para o desenho de inibidores (CELEBI et al., 2022), a *PIGAPDH* apresenta os resíduos A238 e N287 nestes sítios, mas, particularmente, difere da enzima humana (somática) (*Hsa1*) em duas posições: sua T284 e D289 substituem os resíduos de Serina, destacados na Figura 44. Assim, espera-se que a disponibilidade da estrutura experimental de *PIGAPDH* possa fomentar estudos futuros para o desenvolvimento de inibidores diferenciais em relação à estrutura enzimática humana.

Scorecons mostrou que *PIGAPDH* é a única a apresentar a sequência hidrofílica HSSSN (resíduos 61-66) que se situa, de fato, em uma região variável da proteína, tal que alguns dos resíduos de aminoácidos neste trecho em *PIGAPDH* também são quase únicos em sua posição.

Este trecho também é mais longo do que o normalmente presente em outras GAPDHs, mas não contém os resíduos de glicina normalmente presentes aí. Esta região, em *PIGAPDH*, apresenta várias ligações de hidrogênio entre si e também com outras partes da proteína. Entre si, pode-se destacar uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio da carbonila de S64 e a cadeia lateral no nitrogênio épsilon de H61, que também está próxima do oxigênio da carbonila de S63. Ainda, uma ligação de hidrogênio interna a este trecho, entre as cadeias laterais dos resíduos S63 e N66, deve contribuir para a conformação motivo *hairpin* no final deste trecho.

Esta região parece ser mantida no lugar devido às ligações de hidrogênio às Thr's circundantes, ou seja, entre S62 e T68 e entre N65 e T39. T39 está na fronteira com a alça que compreende os resíduos 35-37 que são mencionados para serem explorados para o projeto de inibidor diferencial (SURESH et al., 2001) devido à sua interação com a porção adenina de NAD⁺ (Figura 50).

Figura 50 - Trecho hidrofílico de *PIGAPDH*

Legenda: Trecho hidrofílico HSSSN de *PIGAPDH* (ciano), suas ligações de hidrogênio e posição relativa aos resíduos relevantes. As cores dos resíduos indicam, nas posições correspondentes de *PIGAPDH*: azul, interação com NAD⁺, amarelo, a ser explorado para desenho diferencial de inibidores (SURESH et al., 2001), magenta, sítios alostéricos (CELEBI et al., 2022), e laranja, importante para inibidores seletivos contra *Hsa1* (YADAV et al., 2017).

Fonte: O Autor.

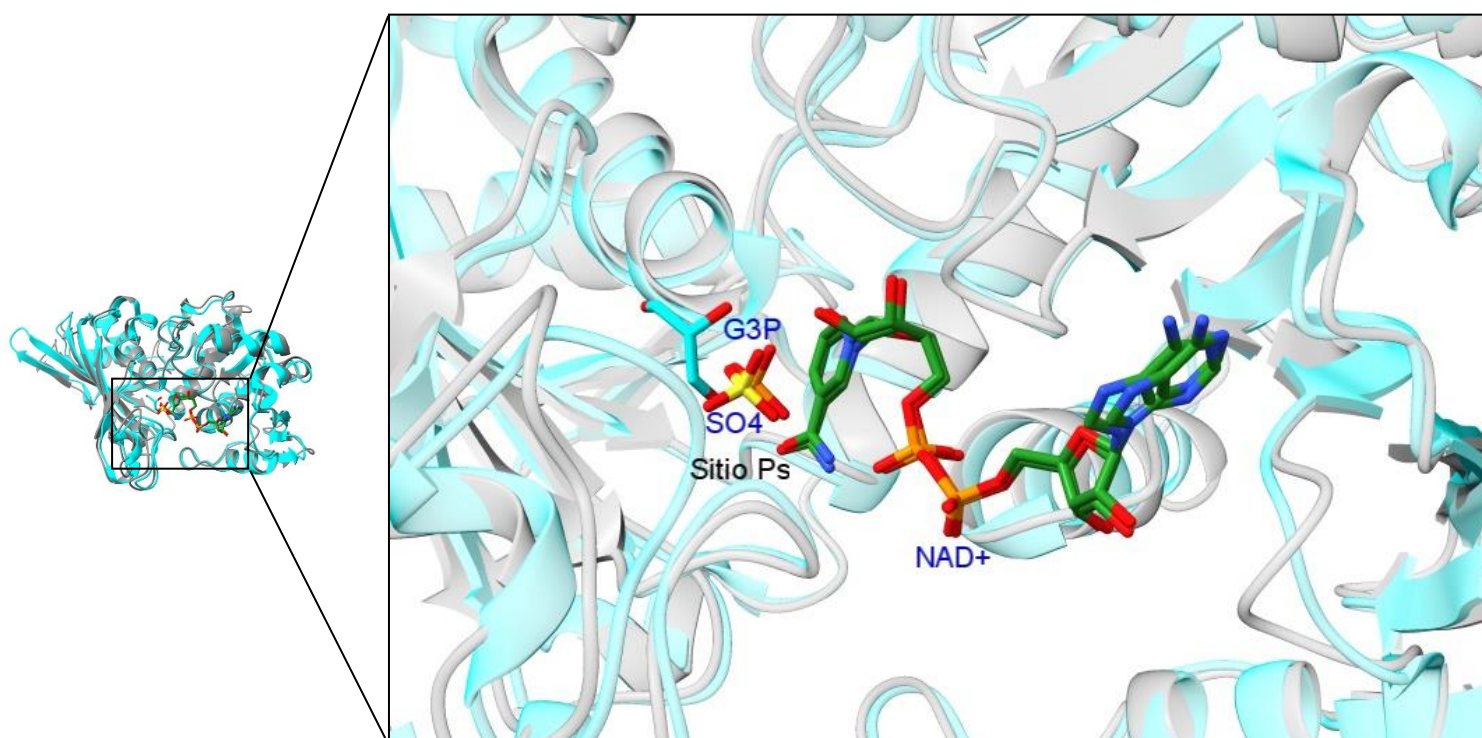
Por outro lado, Yadav e colaboradores (2017) identificaram no servidor web MetaPocket 2.0 (HUANG, 2009) um sítio de ligação na GAPDH humana ao qual mostraram que os inibidores poderiam se ligar; este sítio inclui os resíduos, na humana, N24, K55 e H57, que, para *PIGAPDH*, correspondem a E23, Q54 e K56, substituições que podem sugerir uma exploração adicional para obter inibição diferencial.

3.4.2.2.3 Análises e comparações entre estruturas de proteínas homólogas dos sítios: *Ps*, *Pi*, novo *Pi*, *GAA* de *PIGAPDH*

Em *PIGAPDH*, tanto o cofator NAD⁺ quanto o íon SO₄²⁻ estão em posições comumente encontradas e, portanto, suas interações com os resíduos ao redor. SO₄²⁻ deve vir da condição de cristalização ((NH₄)₂SO₄ a 0,2 mol L⁻¹) e foi refinado para uma ocupação de 0,72 aproximadamente na mesma posição do fosfato do

substrato (Ps) como na estrutura de *E. coli*, PDB ID: 7C5M (ZHANG et al., 2021), que, no entanto, têm seus resíduos catalíticos C150 e H177 mutados para Alanina. De fato, suas interações (descritas acima) correspondem àquelas descritas para os Ps por (DIDIERJEAN et al., 2003; OLSEN et al., 1976; SKARZŃSKI; MOODY; WONACOTT, 1987). Na Figura 51, é mostrada uma superposição desses dois ligantes em suas correspondentes estruturas.

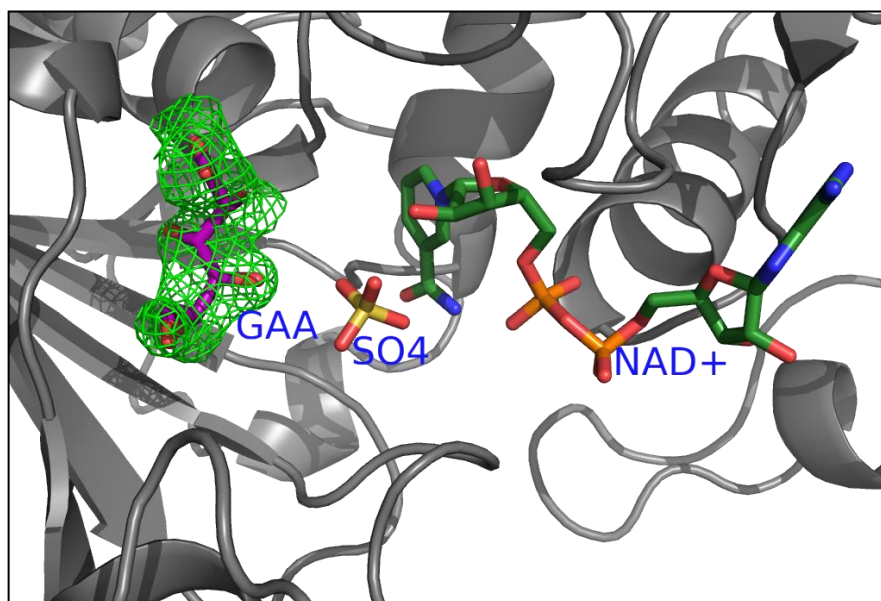
Figura 51 - Superposição entre *PIGAPDH* e *E. coli* PDB ID 7C5M



Legenda: Superposição entre *PIGAPDH* (cinza) e *E. coli* PDB ID: 7C5M (ciano), o íon sulfato da primeira está quase na mesma posição do Ps.
Fonte: O Autor.

A estrutura de *PIGAPDH* mostrou um ligante singular em seu sítio ativo durante os esforços de refinamento, uma alta densidade eletrônica foi observada (Figura 52). Inicialmente cogitava-se tratar do substrato G3P, porém, após vários ciclos de refinamento, concluiu-se que não se tratava deste ligante. Posteriormente, incluiu-se átomo a átomo de carbono numa cadeia linear e, do mesmo jeito, átomos de oxigênio como ramificações até se chegar na fórmula molecular $C_6H_{12}O_7$. Assim, avaliaram-se os isômeros correspondentes e qual ligante apresentava melhores valores de R_{work} e R_{free} , até que se encontrou que o ligante singular é ácido D-galactônico (GAA).

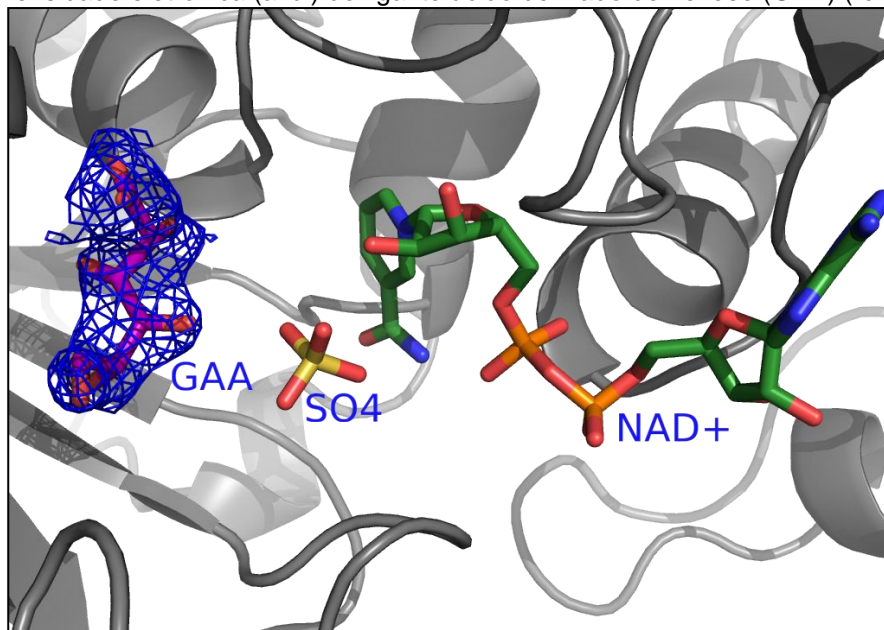
Figura 52 - Densidade eletrônica (verde) indicando existência de um ligante (GAA).



Legenda: O contorno é para o mapa mFo-DFc em $+3,0\sigma$, calculado omitindo-se o GAA (cuja posição refinada é mostrada para referência). Esta figura foi gerada em PyMOL (DELANO, 2002).
Fonte: O Autor.

Finalmente, uma boa concordância entre esta densidade e a estrutura de ácido D-galactônico (GAA), refinada para 0,88 de ocupação, foi obtida (RSCC 0,858 e RSR 0,258 no mapa de densidade eletrônica), como pode ser observado na Figura 53.

Figura 53 - Densidade eletrônica (azul) do ligante ácido derivado de hexose (GAA) (roxo).



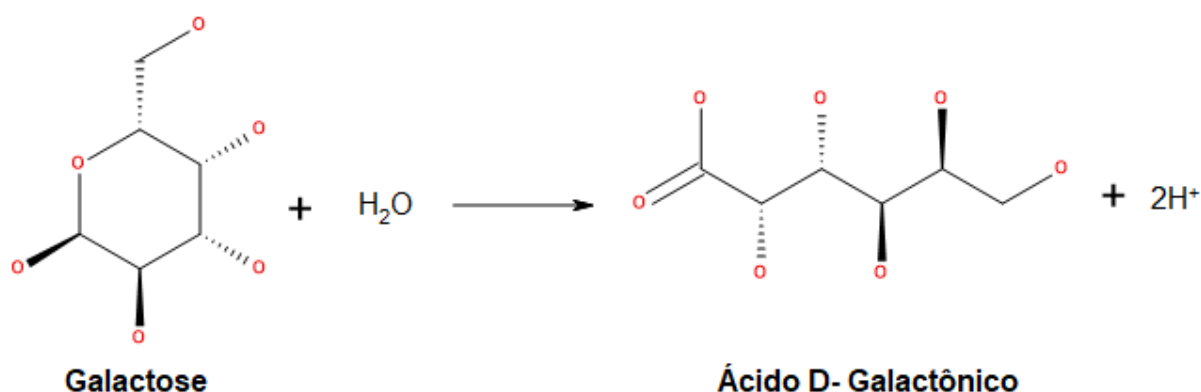
Legenda: O contorno é para 2mFo-DFc em $0,8\sigma$. Outros ligantes mostrados são íon sulfato (amarelo) e NAD⁺ (verde floresta) na estrutura *PIGAPDH* (cinza). Esta figura foi gerada em PyMOL (DELANO, 2002).

Fonte: O Autor.

Portanto, *PIGAPDH* é a primeira estrutura de GAPDH a ter um ácido derivado de hexose (GAA) no sítio ativo. Doravante, nomeamos este site como 'site GAA'. Esta molécula, GAA, é encontrada em apenas uma outra estrutura no RCSB, PDB ID: 6E9O (LEANO et al., 2019), que é da enzima Simportador de D-galactonato/H⁺ Transportador de D-galactonato de *Escherichia coli*, que obviamente é uma proteína que se liga naturalmente à GAA devido à sua função.

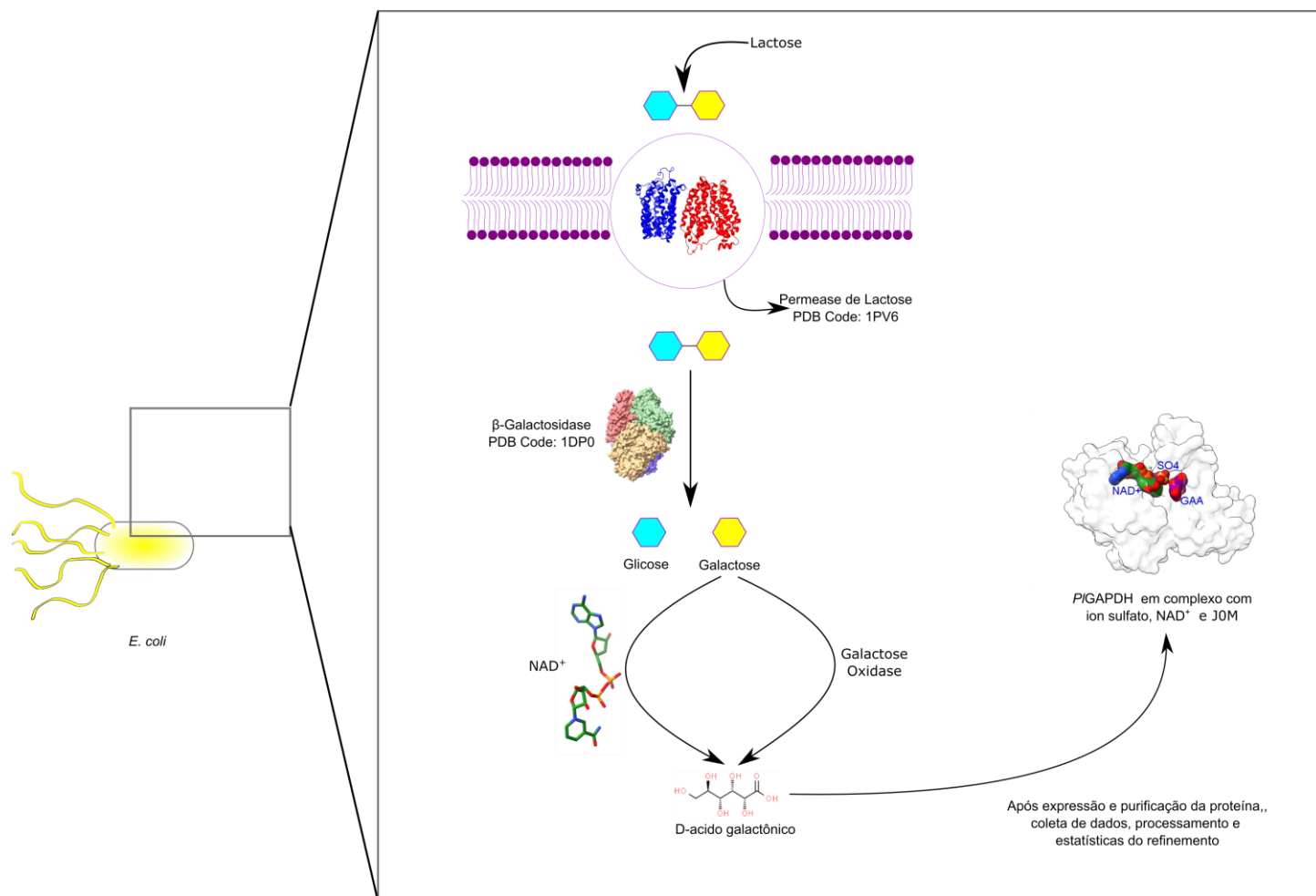
Algumas hipóteses para a presença desta molécula no sítio ativo são: i) a lactose usada na preparação do meio de cultura poderia conter uma pequena quantidade deste composto, ii) GAA foi produzido pelo metabolismo de *E. coli*, já que a bactéria permite passagem da lactose através de sua membrana celular com a ajuda da lactose permease (ABRAMSON et al., 2003) e então sua β -galactosidase (3.2.1.23) (JUERS et al., 2000) quebra a lactose em D-galactose e D-glicose. Então, a D-galactose é oxidada a ácido D-galactônico pela galactose oxidase (1.1.3.9) (Figura 54 e Figura 55) ou pela via de Leloir (HOLDEN; RAYMENT; THODEN, 2003) ou iii) pela ação da própria GAPDH, como já relatado que GAPDH pode atuar, embora com menor eficiência, sobre outros aldeídos, pelo menos trioses, (RACKER; KRIMSKY, 1952), embora levando a um produto final fosforilado. Se o GAA observado nesta estrutura veio da ação direta da *PIGAPDH*, ela pode apresentar uma atividade semelhante às GAPDHs não fosforilantes (ETTEMA et al., 2008; PIATTONI et al., 2010) e esta estrutura pode corresponder à primeira a mostrar um produto de uma reação catalisada por GAPDH sobre um substrato mais genérico.

Figura 54 - Esquema geral de oxidação de Galactose.



Fonte: O Autor.

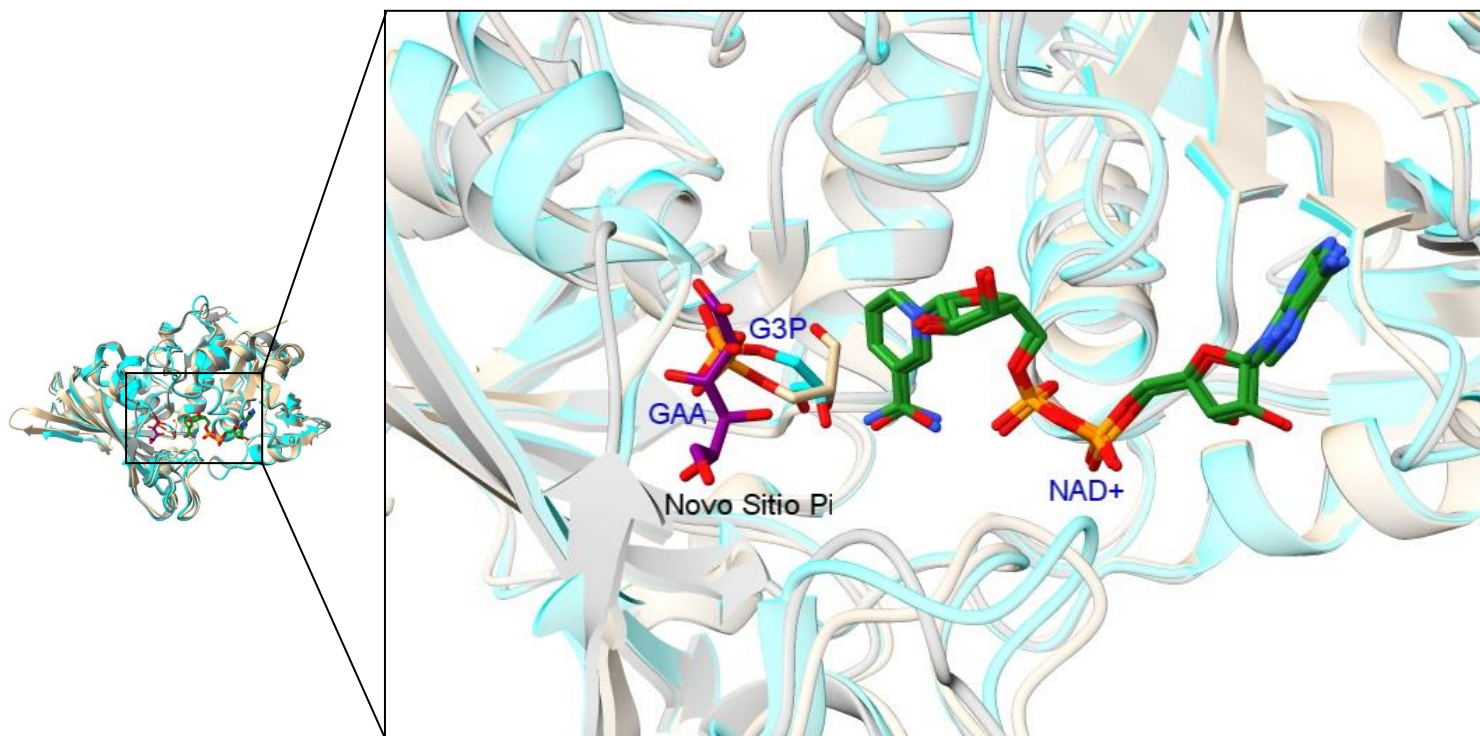
Figura 55 - Uma hipótese de fonte do GAA na estrutura de *PIGADPH*.



Fonte: O Autor.

O GAA apresenta parcialmente, principalmente em sua região carboxilato, as interações que o fosfato do substrato G3P tem com a proteína em PDB IDs: 3CIF de *Cryptosporidium parvum* (COOK; SENKOVICH; CHATTOPADHYAY, 2009) e 5JYA de *Streptococcus agalactiae* (SCHORMANN et al., 2016), que correspondem às do denominado novo sítio Pi, mostrado na Figura 56 (YUN et al., 2000), sítio proposto como o preferido pelo substrato fosfato para ligação inicial no sítio ativo (COOK; SENKOVICH; CHATTOPADHYAY, 2009), mas o GAA não interage com uma Glicina, ao invés, com uma Serina. Este 'sítio GAA' envolve os resíduos: S151, T153, S209, T211, R234 (Figura 48B). Estudos estruturais posteriores podem, portanto, revelar implicações deste sítio de ligação para a atividade enzimática.

Figura 56 - Superposição entre *PIGAPDH* e PDB IDs: 3CIF de *Cryptosporidium parvum* e 5JYA de *Streptococcus agalactiae*



Legenda: Superposição entre *PIGAPDH* (cinza) com PDB IDs: 3CIF de *Cryptosporidium parvum* (ciano) e 5JYA de *Streptococcus agalactiae* (tan); GAA da primeira ocupa aproximadamente a mesma posição do novo sítio Pi.
Fonte: O Autor.

3.5 CONCLUSÕES

- A metodologia utilizada nas etapas de expressão e purificação permitiu obter a enzima *PIGAPDH* de maneira satisfatória, provendo quantidade suficiente da enzima solúvel para realizar ensaios de cristalização;
- Um dos cristais obtidos no ICC forneceu um conjunto de imagens de difração de raios X que permitiu o refinamento da estrutura à resolução de 2,02 Å;
- A comparação da *PIGAPDH* com proteínas homólogas revelou ser ela a primeira GAPDH a estar em complexo com um Ácido Aldônico de Açúcar ou Ácido Derivado de Hexose (Ácido D-Galactônico GAA (Código de 3 letras do PDB: J0M));
- A comparação da *PIGAPDH* com proteínas homólogas revelou que os resíduos HSSNN (61-66) são únicos na GAPDH de *Paracoccidioides lutzii* e que poderiam ser considerados para o desenho diferencial de inibidores;
- A estrutura da *PIGAPDH* foi depositada no PDB (código: 8DE5) e, então, eventualmente poderá ser utilizada para o desenho de inibidores numa primeira etapa para desenvolver tratamentos para a paracoccidioidomicose;
- Este trabalho foi submetido a uma revista especializada e encontra-se, neste momento, sob revisão.

PERSPECTIVAS GERAIS

- Realizar novos ensaios de expressão das enzimas *HsACOT6* e *NgADH*, com diferentes meios de cultura;
- Realizar estudos enzimáticos da *PIGAPDH* com galactose e outras aldoses para verificar sua cinética de ação sobre esses substratos;
- Realizar estudos por redocagem molecular para a enzima *PIGAPDH* para verificar como se comporta o ligante ácido D-galactônico e comparar com a estrutura experimental;
- Utilizar a estrutura da *PIGAPDH* obtida experimentalmente na busca de inibidores diferenciais *in silico* explorando suas especificidades estruturais.

REFÊRENCIAS

- ABRAHAM, J.; CHAUHAN, N.; RAY, S. Virtual Screening of Alkaloid and Terpenoid Inhibitors of SMT Expressed in *Naegleria* sp . **Molecules**, v. 27, n. 5727, p. 1–26, 2022.
- ABRAMSON, J. et al. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. **Science**, v. 301, n. 5633, p. 610–615, 2003.
- ADAMS, P. D. et al. The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. **Methods**, v. 55, n. 1, p. 94–106, 2011.
- AFONINE, P. V. .; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W. .; ADAMS, P. D. The Phenix refinement framework. **CCP4 Newsletter on Protein Crystallography**, v. 45, p. 1–7, 2005.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- ANDERSON, C. M.; STAHL, A. SLC27 fatty acid transport proteins, **Molecular Aspects of Medicine**, Pergamon, , 1 abr. 2013.
- ANTONYUK, S. V. et al. The structure of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Alcaligenes xylooxidans* at 1.7 Å resolution. **Acta Crystallographica - Section D Biological Crystallography**, v. 59, n. 5, p. 835–842, 2003.
- ASHKENAZY, H. et al. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W344–W350, 2016.
- BAKER, P. J. et al. Active site dynamics in the zinc-dependent medium chain alcohol dehydrogenase superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 3, p. 779–784, 2009.
- BARROZO, L. V. et al. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. 2–5, 2010.
- BARTON, G. J. Alscript: A tool to format multiple sequence alignments. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 6, n. 1, p. 37–40, 1993.
- BATEMAN, A. et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D480–D489, 2021.
- BEILSTEN-EDMANDS, J. et al. Scaling diffraction data in the DIALS software package: Algorithms and new approaches for multi-crystal scaling. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. 76, p. 385–399, 2020.

BELLINI, N. K. et al. The therapeutic strategies against *Naegleria fowleri*. **Experimental Parasitology**, v. 187, p. 1–11, 2018.

BEXKENS, M. L. et al. Lipids Are the Preferred Substrate of the Protist *Naegleria gruberi*, Relative of a Human Brain Report Lipids Are the Preferred Substrate of the Protist *Naegleria gruberi*, Relative of a Human Brain Pathogen. **CellReports**, v. 25, n. 3, p. 537- 543.e3, 2018.

BOND, C. S.; SCHÜTTELKOPF, A. W. ALINE: A WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 65, n. 5, p. 510–512, 2009.

BONIFAZ TRUJILLO, A. **Micología Médica Básica**. 4th. ed. [s.l: s.n.].

BOREIKO, S.; SILVA, M.; IULEK, J. Structure determination and analyses of the GAPDH from the parasite *Schistosoma mansoni*, the first one from a platyhelminth. **Biochimie**, v. 184, p. 18–25, 2021.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Chemistry**, n. 72, p. 248–254, 1976.

BRENDA. **Alcohol dehydrogenase**. Disponível em: <<https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.1.1.1>>. Acesso em: 21 jul. 2020.

BRUMMER, E. et al. Paracoccidioidomycosis: an Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89–117, 1993.

CABISCOL, E.; AGUILAR, J.; ROS, J. Metal-catalyzed oxidation of Fe²⁺ dehydrogenases. Consensus target sequence between propanediol oxidoreductase of *Escherichia coli* and alcohol dehydrogenase II of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 9, p. 6592–6597, 1994.

CANTU, D. C.; CHEN, Y.; REILLY, P. J. Thioesterases: A new perspective based on their primary and tertiary structures. **Protein Science**, v. 19, n. 7, p. 1281–1295, 2010.

CAPRILES, P. V. S. Z. et al. Structural modelling and comparative analysis of homologous, analogous and specific proteins from *Trypanosoma cruzi* versus *Homo sapiens*: Putative drug targets for chagas' disease treatment. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, 2010.

CDC. **What are the symptoms of naegleria fowleri infection?** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/general.html>>. Acesso em: 16 jul. 2020.

CELEBI, M. et al. Potential allosteric sites captured in glycolytic enzymes via residue-based network models: Phosphofructokinase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and pyruvate kinase. **Biophysical Chemistry**, v. 280, n. September 2021, p. 106701, 2022.

CHAIKUAD, A. et al. Structure and kinetic characterization of human sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDS. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 2, p. 401–409, 2011.

CHEN, V. B. et al. MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2010.

COHEN, D. E. New players on the metabolic stage: How do you like them ACOTS? **Adipocyte**, v. 2, n. 1, p. 3–6, 2013.

COOK, W. J.; SENKOVICH, O.; CHATTOPADHYAY, D. An unexpected phosphate binding site in Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase: Crystal structures of apo, holo and ternary complex of *Cryptosporidium parvum* enzyme. **BMC Structural Biology**, v. 9, p. 1–13, 2009.

COOPER, D. E. et al. Physiological consequences of compartmentalized acyl-CoA metabolism, **Journal of Biological Chemistry** American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., , 14 ago. 2015.

DE OLIVEIRA, A. A. et al. Drug repurposing for paracoccidioidomycosis through a computational chemogenomics framework. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JUN, 2019.

DELANO, W. L. PyMOL: An open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsletter on protein crystallography**, v. 40, p. 82–92, 2002.

DESJARDINS, C. A. et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 10, 2011.

DIDIERJEAN, C. et al. Crystal structure of two ternary complexes of phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* with NAD and D-glyceraldehyde 3-phosphate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 15, p. 12968–12976, 2003.

EDSON, K.; RETTIE, A. CYP4 Enzymes As Potential Drug Targets: Focus on Enzyme Multiplicity, Inducers and Inhibitors, and Therapeutic Modulation of 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (20-HETE) Synthase and Fatty Acid 969;- Hydroxylase Activities. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 1429–1440, 2013.

EDWARDS, T. E.; ABENDROTH, J. **Crystal structure of a glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*.**

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. 12 I, p. 2126–2132, 2004.

ESWAR, N. et al. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Protein Science**, v. 5, p. 291–2931, 2006.

ETTEMA, T. J. G. et al. The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN) of *Sulfolobus solfataricus*: A key-enzyme of the semi-phosphorylative branch of the Entner-Doudoroff pathway. **Extremophiles**, v. 12, n. 1, p. 75–88, 2008.

EXTANCE, J. et al. Structure of a bifunctional alcohol dehydrogenase involved in bioethanol generation in *Geobacillus thermoglucosidasius*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 69, n. 10, p. 2104–2115, 2013.

FELIPE, M. S. S. et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 26, p. 24706–24714, 2005.

FERREIRA-DA-SILVA, F. et al. The crystal and solution structures of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reveal different quaternary structures. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33433–33440, 2006.

FÖRSTER, A.; SCHULZE-BRIESE, C. A shared vision for macromolecular crystallography over the next five years. **Structural Dynamics**, v. 6, n. 6, p. 064302, 2019.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 25, n. 1, p. 5–18, 1987.

FREITAS E SILVA, K. S. et al. Interactome of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Points to the Existence of Metabolons in *Paracoccidioides lutzii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JULY, p. 1–16, 2019.

FRITZ-LAYLIN, L. K. et al. The Genome of *Naegleria gruberi* Illuminates Early Eukaryotic Versatility. **Cell**, v. 140, n. 5, p. 631–642, 2010.

FULTON, C. *Naegleria*: A Research Partner For Cell and Developmental Biology. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 520–532, 1993.

GAONA-LÓPEZ, C.; JULIÁN-SÁNCHEZ, A.; RIVEROS-ROSAS, H. Diversity and evolutionary analysis of iron-containing (Type-III) alcohol dehydrogenases in eukaryotes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, 2016.

GASTEIGER, E. et al. The Proteomics Protocols Handbook. **The Proteomics Protocols Handbook**, p. 571–608, 2005.

GOLDBERG, K. et al. Biocatalytic ketone reduction - A powerful tool for the production of chiral alcohols - Part I: Processes with isolated enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 2, p. 237–248, 2007.

GORREC, F. The MORPHEUS protein crystallization screen. **Journal of Applied Crystallography**, v. 42, n. 6, p. 1035–1042, 2009.

GRIFFITHS, J.; COLOMBO, A. L.; DENNING, D. W. The case for paracoccidioidomycosis to be accepted as a neglected tropical (Fungal) disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. 1–10, 2019.

GUPTA, A. Introduction to Biochemistry. In: **Comprehensive Biochemistry for Dentistry**. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 1–2.

GUZMÁN-TÉLLEZ, P. et al. *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* 20S proteasome: identification and characterization. **European Journal of Cell Biology**, v. 99, n. 5, 2020.

HARA, M. R. et al. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 7, p. 665–674, 2005.

HOLDEN, H. M.; RAYMENT, I.; THODEN, J. B. Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 45, p. 43885–43888, 2003.

HOOFT RW et al. Errors in Protein structures. **Nature**, v. 381, n. 6580, p. 272, 1996.

HRYCYK, M. F. et al. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Medical mycology**, v. 56, n. 8, p. 950–962, 2018.

HUANG, B. Metapocket: A meta approach to improve protein ligand binding site prediction. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 13, n. 4, p. 325–330, 2009.

HUNT, M. C. et al. Analysis of the mouse and human acyl-CoA thioesterase (ACOT) gene clusters shows that convergent, functional evolution results in a reduced number of human peroxisomal ACOTs 1. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 11, p. 1855–1864, 1 set. 2006.

HUNT, M. C.; ALEXSON, S. E. H. The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism, **Progress in Lipid Research**, Pergamon, 1 mar. 2002.

HUNT, M. C.; ALEXSON, S. E. H. Novel functions of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases as auxiliary enzymes in peroxisomal lipid metabolism. **Progress in Lipid Research**, v. 47, n. 6, p. 405–421, 2008.

HUNT, M. C.; SIPONEN, M. I.; ALEXSON, S. E. H. The emerging role of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases in regulating peroxisomal lipid metabolism, **Biochimica et Biophysica Acta**, Molecular Basis of Disease, Elsevier, 1 set. 2012.

JAHANDIDEH, S.; JAROSZEWSKI, L.; GODZIK, A. Improving the chances of successful protein structure determination with a random forest classifier. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 70, n. 3, p. 627–635, 2014.

JEFFERY, C. J. Moonlighting proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 8–11, 1999.

JENKINS, J. L.; TANNER, J. J. High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. D62, n. 3, p. 290–301, 2006.

JOHNSON, W. D.; LANG, C. M. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Veterinary Pathology**, v. 14, n. 4, p. 368–371, 1977.

JUERS, D. H. et al. High resolution refinement of beta-galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for alpha-complementation. **Protein Science**, v. 9, n. 9, p. 1685–1699, 2000.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. **Biopolymers**, v. 22, p. 2577–2637, 1983.

KANEHISA LABORATORIES. **KEGG PATHWAY: Glycolysis / Gluconeogenesis - *Paracoccidioides lutzii* Pb01**. Disponível em: <https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?pbl00010>. Acesso em: 19 ago. 2020.

KAVANAGH, K. L. et al. Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase binary and ternary complexes: Specificity and catalytic mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 45, p. 43433–43442, 2002.

KAVANAGH, K. L. et al. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: The SDR superfamily: Functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 24, p. 3895–3906, 2008.

KLEYWEGT, G. J.; JONES, T. A. xDIMAPMAN and xDATAMAN - Programs for reformatting, analysis and manipulation of biomacromolecular electron-density maps and reflection data sets. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. D52, n. 4, p. 826–828, 1996.

KOSOVA, A. A.; KHODYREVA, S. N.; LAVRIK, O. I. Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in DNA repair. **Biochemistry (Moscow)**, v. 82, n. 6, p. 643–654, 2017.

KUMAGAI, H.; SAKAI, H. A porcine brain protein (35K protein) which bundles microtubules and its identification as glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. **Journal of Biochemistry**, v. 93, n. 5, p. 1259–1269, 1983.

LANE, M. D. Coenzyme A. **Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition**, p. 539–541, 2013.

LARSON, S. B.; JONES, J. A.; MCPHERSON, A. The structure of an iron-containing alcohol dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon in two chemical states. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 75, n. 4, p. 217–226, 2019.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LASKOWSKI, R. A. PDBsum new things. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. D355–D359, 2009.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 2011.

LEANO, J. B. et al. Structures suggest a mechanism for energy coupling by a family of organic anion transporters. **PLoS Biology**, v. 17, n. 5, p. 1–25, 2019.

LIAUD, M. F. et al. Compartment-specific isoforms of TPI and GAPDH are imported into diatom mitochondria as a fusion protein: Evidence in favor of a mitochondrial origin of the eukaryotic glycolytic pathway. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 2, p. 213–223, 2000.

LIMA, R. M. et al. A structure-based approach for the discovery of inhibitors against methylcitrate synthase of *Paracoccidioides lutzii* A structure-based approach for the discovery of inhibitors against methylcitrate. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–13, 2021.

LIU, Q. et al. Preliminary crystallographic analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 from *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 68, n. 8, p. 978–980, 2012.

LIU, X. et al. Two novel metal-independent long-chain alkyl alcohol dehydrogenases from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 2078–2085, 2009.

LUTZ, A. **Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil . Contribuição ao conhecimento das** Adolpho Lutz - **Obra Completa**, 1945.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 480, 2010.

MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. **Journal of Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 491–497, 1968.

MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658–674, 2007.

MCEWEN, J. G. et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **Medical Mycology**, v. 25, n. 3, p. 165–175, 1987.

MCPHERSON, A.; CUDNEY, B. Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 70, p. 1445–1467, 2014.

MCPHERSON, A.; GAVIRA, J. A. Introduction to protein crystallization. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 70, n. 1, p. 2–20, 2014.

MIRANDA, R. R.; SILVA, M.; IULEK, J. Expression, purification, crystallization and structure of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Candida albicans*, main causative agent of candidiasis. **Chemical Data Collections**, v. 39, n. March, p. 100860, 2022.

MIYATA, N. et al. HET0016, a potent and selective inhibitor of 20-HETE synthesizing enzyme. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, p. 325–329, 2001.

MOON, J. H. et al. Structures of iron-dependent alcohol dehydrogenase 2 from *Zymomonas mobilis* ZM4 with and without NAD⁺ cofactor. **Journal of Molecular Biology**, v. 407, n. 3, p. 413–424, 2011.

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.

OLSEN, K. W. et al. Anion binding sites in the active center of d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Journal of Molecular Biology**, v. 107, n. 4, p. 571–576, 1976.

OPPERDOES, F. R.; DE JONCKHEERE, J. F.; TIELENS, A. G. M. *Naegleria gruberi* metabolism. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 9, p. 915–924, 2011.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, n. 1, p. 70–82, 2021.

PIATTONI, C. V. et al. Heterologous expression of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana*. **Biochimie**, v. 92, n. 7, p. 909–913, 2010.

PIKUTA, E. V. et al. *Thermococcus thio-reducens* sp. nov., a novel hyperthermophilic, obligately sulfur-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 1612–1618, 2007.

RACKER, E.; KRIMSKY, I. The mechanism of oxidation of aldehydes by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **The Journal of biological chemistry**, v. 198, n. 2, p. 731–743, 1952.

REID, M. F.; FEWSON, C. A. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 13–56, 1994.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: How far from solving the riddle? **Medical Mycology**, v. 39, n. 3, p. 233–241, 2001.

RICCI, G. et al. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 42, n. 4, p. 379–383, 2004.

ROSENBERG, I. M. **Protein analysis and purification: Benchtop techniques: Second edition**. [s.l.] Birkhauser Boston, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. [s.l.: s.n.]. v. 1

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. DE. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003.

SARINK, M. J. et al. Inhibition of fatty acid oxidation as a new target to treat Primary Amoebic Meningoencephalitis by repurposing two well-known drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 8, p. 1–10, 2020.

SATO, M. et al. Discovery of a N'-hydroxyphenylformamidine derivative HET0016 as a potent and selective 20-HETE synthase inhibitor. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 23, p. 2993–2995, 2001.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SCHORMANN, N. et al. Crystal structures of group B *streptococcus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Apo-form, binary and ternary complexes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–15, 2016.

SCOTT, C.; OLPIN, S. Peroxisomal disorders. **Paediatrics and Child Health (United Kingdom)**, v. 25, n. 3, p. 119–122, 2015.

SEIDLER, N. W. **GAPDH: Biological Properties and Diversity**. [s.l.: s.n.]. v. 985

SELLÉS VIDAL, L. et al. Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1866, n. 2, p. 327–347, 2018.

SHATSKY, M.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. A method for simultaneous alignment of multiple protein structures. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 56, n. 1, p. 143–156, 2004.

SHEN, M.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, v. 15, n. 11, p. 2507–2524, 2006.

SHIN, D. H. et al. **Crystal structure of MES buffer bound form of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*.**

SILVA-VERGARA, M. L. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**, v. 38, n. 3, p. 193–199, 2000.

SINGH, M. et al. Plasmid DNA Transformation in *Escherichia Coli*: Effect of Heat Shock Temperature , Duration , and Cold Incubation of CaCl₂ Treated Cells. **Shock**, v. 6, n. 4, p. 561–568, 2010.

SINGH, R.; GREEN, M. R. Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Science**, v. 259, n. 5093, p. 365–368, 1993.

SKARZŃSKI, T.; MOODY, P. C. E.; WONACOTT, A. J. Structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 193, n. 1, p. 171–187, 1987.

SLABINSKI, L. et al. XtalPred: A web server for prediction of protein crystallizability. **Bioinformatics**, v. 23, n. 24, p. 3403–3405, 2007.

SPARLA, F. et al. Coenzyme site-directed mutants of photosynthetic A4-GAPDH show selectively reduced NADPH-dependent catalysis, similar to regulatory AB-GAPDH inhibited by oxidized thioredoxin. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, n. 5, p. 1025–1037, 2004.

STEIN, N. CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. p. 641–643, 2008.

STIVALA, A. et al. Automatic generation of protein structure cartoons with pro-origami. **Bioinformatics**, v. 27, n. 23, p. 3315–3316, 2011.

STUBBS, M. T. **Protein crystallography**. [s.l.] Elsevier Inc., 2006. v. 3

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein expression and purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.

SURESH, S. et al. Conformational changes in *Leishmania mexicana* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by designed inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, n. 2, p. 423–435, 2001.

SWARBRICK, C. M. D. et al. Structure, function, and regulation of thioesterases. **Progress in Lipid Research**, v. 79, n. April, p. 101036, 2020.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 273–283, 2009.

TISDALE, E. J. Thyroid hormone stimulates acetyl-CoA carboxylase- α transcription in hepatocytes by modulating the composition of nuclear receptor complexes bound to a thyroid hormone response element. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 2, p. 974–983, 2001.

TRISTAN, C. et al. The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. **Cellular Signalling**, v. 23, n. 2, p. 317–323, 2011.

UNTEREINER, W. A. et al. The *Ajellomycetaceae*, a new family of vertebrate-associated *Onygenales*. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812–821, 2004.

VALDAR, W. S. J. Scoring residue conservation. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 48, n. 2, p. 227–241, 2002.

VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R. J. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3688–3691, 2003.

VON DER SAAL, K. **Biochemie**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2020.

WANDERS, R. J. A. Peroxisomal diseases. **The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology**, n. December 2015, p. 869–872, 2016.

WATERHAM, H. R.; WANDERS, R. J.; LEROY, B. P. Adult Refsum Disease. **GeneReviews®**, 1993.

WELCH, J. et al. Human Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase-2 Gene Is Expressed Specifically in Spermatogenic Cells. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 2, p. 328–338, 2013.

WESTBROOK, J. et al. Validation of Protein Structures for Protein Data Bank. **Methods in Enzymology**, v. 374, n. 1974, p. 370–385, 2003.

WESTIN, M. A. K.; HUNT, M. C.; ALEXSON, S. E. H. Peroxisomes contain a specific phytanoyl-CoA/pristanoyl-CoA thioesterase acting as a novel auxiliary enzyme in α - and β -oxidation of methyl-branched fatty acids in mouse. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 37, p. 26707–26716, 2007.

WHO. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: A road map for neglected tropical diseases 2021–2030. **WHO (World Health Organization)**, n. 5, p. 6–9, 2004.

WILLIAMSON, G. The hodge theory of the decomposition theorem [after M. A. de Cataldo and L. Migliorini]. **Asterisque**, v. 2017, n. 390, p. 335–367, 2017.

WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 235–242, 2011.

YADAV, S. et al. Molecular docking studies of 3-bromopyruvate and its derivatives to metabolic regulatory enzymes: Implication in designing of novel anticancer therapeutic strategies. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–15, 2017.

YUN, M. et al. Structural analysis of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*: Direct evidence of substrate binding and cofactor-induced conformational changes. **Biochemistry**, v. 39, n. 35, p. 10702–10710, 2000.

ZHANG, L. et al. Novel structures of type 1 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* provide new insights into the mechanism of generation of 1,3-bisphosphoglyceric acid. **Biomolecules**, v. 11, n. 1565, p. 1–19, 2021.