

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – DOUTORADO
UEL/UEPG/UNICENTRO

AGNES THIANE PEREIRA MACHADO

ESTUDOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS ALANINA RACEMASE
ISOFORMA LONGA DE *Trypanosoma cruzi* E GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO
DESIDROGENASE DE *Naegleria gruberi*

PONTA GROSSA
2017

AGNES THIANE PEREIRA MACHADO

ESTUDOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS ALANINA RACEMASE
ISOFORMA LONGA DE *Trypanosoma cruzi* E GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO
DESIDROGENASE DE *Naegleria gruberi*

Tese apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito do Programa de Pós-Graduação em Química, curso de Doutorado em Química - Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor.

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

PONTA GROSSA
2017

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

M149 Machado, Agnes Thiane Pereira
Estudos estruturais e funcionais das
proteínas alanina racemase isoforma longa
de Trypanosoma cruzi e
gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de
naegleria gruberi/ Agnes Thiane Pereira
Machado. Ponta Grossa, 2017.
112f.

Tese (Doutorado em Química - Área de
Concentração: Físico-Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa,
Universidade Estadual de Londrina e
Universidade Estadual do Centro Oeste.
Orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek.
Coorientador: Prof. Dr. Marcio Silva.

1.Alanina racemase isoforma longa.
2.Trypanosoma cruzi.
3.Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.
4.Naegleria gruberi. 5.Análise estrutural.
I.Iulek, Jorge. II. Silva, Marcio. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Universidade Estadual de Londrina.

CDD: 572.67

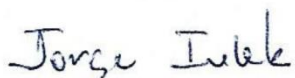
TERMO DE APROVAÇÃO

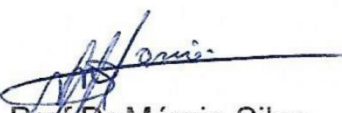
AGNES THIANE PEREIRA MACHADO

“ESTUDOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS ALANINA RACEMASE ISOFORMA LONGA DE *Trypanosoma cruzi* E GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Naegleria gruberi*”.

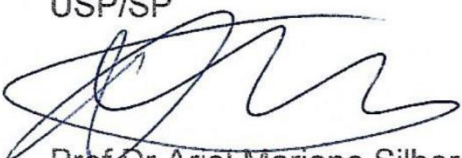
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:

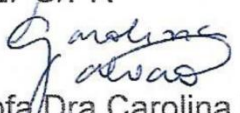

Prof Dr Jorge Iulek
UEPG/PR


Prof Dr Márcio Silva
UTFPR/PR


Prof Dr Otávio Henrique Thiemann
USP/SP


Prof Dr Ariel Mariano Silber
USP/SP


Profa Dra Romajana Picada Pereira
UEPG/PR


Profa Dra Carolina Weigert Galvão
UEPG/PR

Ponta Grossa, 22 de março de 2017.

Dedico este trabalho ao meu filho Gustavo e
ao meu esposo Tiago.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pelas bênçãos derramadas.

Ao Prof. Dr. Jorge Iulek, pela orientação neste doutorado, pelos ensinamentos, pela amizade, pelos bons conselhos e principalmente pela valiosa contribuição em minha formação científica e humana.

Ao Prof. Dr. Marcio Silva, pela coorientação em todo o trabalho experimental e auxílio na redação da tese.

À Prof^a. Dr^a. Viviane Paula Martini, pela amizade, compreensão e auxílio em vários experimentos.

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber, pela disponibilização do clone para expressar a proteína Alanina racemase isoforma longa de *Trypanosoma cruzi*.

Ao Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann, pela sugestão de projeto de trabalho com proteínas de *Naegleria gruberi*.

À Prof^a. Dr^a. Carolina Galvão e a todos os seus alunos, pela disponibilidade do laboratório e orientação nos experimentos de manipulação do DNA.

À Dra. Lisvane Paes, pelo auxílio e envio de material.

Ao Complexo de laboratório multiusuários da UEPG, pela infraestrutura, e aos funcionários, pela colaboração.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À UEPG, pelo espaço físico, e aos professores da coordenação do doutorado.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), pela infraestrutura e pelas análises de DLS e dicroísmo circular.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), à Universidade Estadual de São Carlos e à Universidade Federal do Paraná, pelos difratômetros de Raios X.

Aos colegas de laboratório que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização dessa pesquisa.

Ao IMBEQMeDI, pelos recursos financeiros que possibilitaram a compra de diversos equipamentos e reagentes.

Ao meu filho Gustavo e ao meu esposo Tiago, pelo carinho, companhia, amizade; minha gratidão eterna.

À minha Mãe Roseli, ao meu pai William, a meus avós Iolanda e Moisés, a meus irmãos Ariane e Wendell, ao compadre Adevir e a meus sogra Elisabete e sogro Tito, por estarem sempre rezando e torcendo pela realização deste trabalho.

À Cristiane Regina Zuconelli, pela constante amizade, ensinamentos de perseverança, honestidade e humildade.

À Michele Aparecida Besten, pela amizade, companhia e momentos de estudos.

A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo. (Albert Einstein)

RESUMO

O estudo da estrutura tridimensional de proteínas nos permite investigar as relações entre sequência de aminoácidos, estrutura e função, o que é importante principalmente para proteínas de organismos patogênicos ou mesmo pertencente ao gênero destes, que podem ser utilizadas como modelo estrutural. Neste contexto, o presente trabalho visa caracterizar estruturalmente as enzimas alanina racemase isoforma longa de *Trypanosoma cruzi* e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Naegleria gruberi*. A alanina racemase isoforma longa catalisa a conversão entre L e D-alanina em uma das vias metabólicas do *T. cruzi*, que é o agente etiológico da doença de Chagas. A análise por SDS-PAGE de amostras da expressão heteróloga dessa enzima em *Escherichia coli* BL21(DE3) GroEL revelou que a proteína está em maior proporção na fração insolúvel, por isso, foi necessário estabelecer um protocolo de recuperação seguido de um reenovelamento *in vitro*. Dados de ensaios enzimáticos e dicróismo circular revelaram o sucesso do protocolo de recuperação/reenovelamento, o que poderá no futuro contribuir para a busca de inibidores específicos. A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Naegleria gruberi* catalisa a sexta etapa da via glicolítica do organismo. A enzima NgGAPDH foi expressa em *E. coli* (DE3) usando-se o vetor pET-15b e então purificada em três passos de cromatografia, dois por afinidade a níquel e um por exclusão por tamanho. A caracterização enzimática foi realizada com a enzima sem a “his-tag”; a NgGAPDH apresentou maior atividade em pH 8,0, 25 °C e 10 mM de arsenato, e cooperatividade positiva frente aos substratos G3P e NAD⁺. Cristais de NgGAPDH sem a “his-tag” apareceram em 3 dias após montagem das gotas e o melhor difratou a 1,94 Å de resolução, pertencendo ao grupo espacial $P2_1$ com parâmetros de cela $a = 83,74$ Å, $b = 94,55$ Å, $c = 90,93$ Å e $\beta = 99,96$ °. A estrutura final refinada apresenta $R = 0,1652$ e $R_{free} = 0,2029$. O domínio catalítico formado pelos resíduos 134 a 313 é altamente conservado, como esperado, com exceção da Asn145, presente somente em NgGAPDH, enquanto que as demais GAPDHs apresentam Ser ou Thr na posição correspondente. Análises por dinâmica molecular revelaram que a Asn145 tem correlação de movimento com os resíduos Ala123, Thr125 e Pro126, pertencentes ao que se chamou de “bonded loop”. Ressalte-se que esta é a primeira GAPDH do filo Percolozoa que tem sua estrutura tridimensional determinada e parâmetros cinéticos estabelecidos, tal que se espera contribuir para o entendimento da evolução dessa classe de proteínas.

Palavras Chaves: Alanina racemase isoforma longa, *Trypanosoma cruzi*, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, *Naegleria gruberi*, análise estrutural, caracterização cinética.

ABSTRACT

Study of protein three-dimensional structures allow us to investigate the relations between amino acid sequence, structure and function, what is important chiefly for proteins from pathogenic organisms or ones that belong to the same genus of these, such that they can be used as a structural model. In this context, this work aims at the structural characterization of the enzymes alanine racemase long isoform from *Trypanosoma cruzi* and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Naegleria gruberi*. The long isoform of alanine racemase catalyzes the conversion between L and D-alanine which, in turn, is part of one of the metabolic pathways in *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease. The heterologous expression of this enzyme in *Escherichia coli* BL21 (DE3) GroEL was analyzed by SDS-PAGE, which revealed that the protein is in higher proportion in the insoluble fraction, thus it was necessary to establish a recovery protocol followed by an *in vitro* refolding. Data from enzymatic assays and circular dichroism revealed the success of the recovery/refolding protocol, which may in the future contribute to the search for specific inhibitors. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Naegleria gruberi* catalyzes the sixth step of the organism's glycolytic pathway. NgGAPDH enzyme was expressed in *E. coli* (DE3) using the pET-15b vector, and then purified by three chromatographic steps, two of nickel affinity and one of size exclusion. The enzymatic characterization was investigated with the enzyme without the his-tag; NgGAPDH presented higher activity at pH 8.0, 25 °C and 10 mM of arsenate, and positive cooperativity for substrates G3P and NAD⁺. His-tag depleted NgGAPDH crystals appeared in 3 days after drop settings, the best crystal diffracted to 1.94 Å resolution and belongs to space group $P2_1$ with cell parameters $a = 83.74$ Å, $b = 94.55$ Å, $c = 90.93$ Å, $\beta = 99.96^\circ$. The final refined structure presents $R = 0.1652$ and $R_{free} = 0.2029$. The catalytic domain formed by residues 134 to 313 is highly conserved, as expected, with the exception of Asn145, present only in NgGAPDH, while the other GAPDHs present either Ser or Thr on the corresponding position. Molecular dynamics analysis revealed that Asn145 has correlated motion with residues Ala123, Thr125 and Pro126 that belong to what was called "bonded loop". It should be emphasized that this is the first GAPDH from the phylum Percolozoa that has its three dimensional structure determined and kinetic parameters established, such that we expect to have contributed to the understanding of the evolution of this class of proteins.

Keywords: Alanine racemase long isoform, *Trypanosoma cruzi*, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Naegleria gruberi*, structural analysis, kinetic characterization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ciclo de vida do *T. cruzi*. 1) Tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes do inseto durante a picada; 2) Tripomastigotas metacíclicos penetram em várias células à partir do sítio da picada. Dentro das células, eles se transformam em amastigotas; 3) Amastigotas multiplicam-se por fissão binária nas células de tecidos infectados; 4) Amastigotas transformam-se em tripomastigota circulantes que rompem a célula e caem na corrente sanguíneo. Nessa fase os tripomastigotas podem infectar outras células e transformarem-se em amastigotas nos novos sítios de infecção. Manifestações clínicas podem surgir deste ciclo; 5) Inseto faz repasto sanguíneo e insere tripomastigotas circulantes; 6) Epimastigostas no intestino médio; 7) Multiplicação no intestino médio; 8) Tripomastigota metacíclicos. Os estágios 1, 5, 6, 7 e 8 ocorrem nos insetos e os estágios 2, 3 e 4 ocorrem em humanos.23
- Figura 2 - Mapa geográfico da distribuição da Doença de Chagas (2014).25
- Figura 3 - Estrutura química do Benzonidazol.....26
- Figura 4 - Estrutura tridimensional da alanina racemase de *Bacillus anthracis*, código PDB 2DV9. Em amarelo e em vermelho estão representados os monômeros A e B, respectivamente; a região do sítio ativo esta circulada em cada monômero e nelas estão destacados os resíduos Lys41 e o cofator PLP (PDB EPC).28
- Figura 5 - Mecanismo de ação da Alr. O mecanismo inicia-se com o ataque do par de elétrons do nitrogênio do grupo amino ao carbono insaturado do substrato do cofator. Este ataque promove a remoção do grupo Lys41-NH₂. Posteriormente, o oxigênio do alcóxido Tyr270' abstrai um próton ácido da estrutura do cofator, e o par de elétrons passa para a ligação entre o carbono e nitrogênio, formando a ligação C=N e transformando o alcóxido em Tyr270-OH. Na sequência, a dupla C=N do cofator que é nucleofílica ataca um próton do grupo Lys41-NH₃⁺, que é eletrofílico, promovendo a entrada de um hidrogênio no cofator e tornado à ligação simples, novamente. Isto ocorre simultaneamente à passagem do par de elétrons não ligantes para o anel da piridina em ressonância, que se estende até o outro nitrogênio, que fica com carga positiva. O ataque do nitrogênio do Lys 41-NH₂ ao carbono insaturado da ligação C=N do cofator promove simultaneamente a remoção da D-alanina. Finalmente, o nitrogênio da L-alanina ataca o carbono C=N do cofator. ..29
- Figura 6 - Estrutura química dos inibidores das Alr. (A) D-cicloserina. (B) O-carbamoil-D-serina. (C) β-cloroalanina. (D) β-fluoroalanina. (E) β,β,β-trifluoroalanina. (F) β-clorovinilglicina. (G) β-fluorovinilglicina.30

- Figura 7 - Mecanismo de ação do inibidor D-cicloserina. O mecanismo inicia-se com o ataque do par de elétrons do nitrogênio do grupo amino do inibidor ao carbono insaturado. Este ataque promove a remoção do grupo Lys-NH₂ e a formação da ligação covalente com o inibidor. Posteriormente, a dupla C=N do complexo, que é nucleofílico, ataca um próton do grupo Lys-NH₂, que é eletrofílico, promovendo a entrada de um hidrogênio e tornando a uma ligação simples. Em seguida, ocorre o ataque do par de elétrons do grupo Lys-NH₂ ao hidrogênio ligado ao inibidor e simultaneamente ocorre a formação da ligação dupla no anel do inibidor. 31
- Figura 8 - Mecanismo de ação dos compostos β-cloroalanina, β-fluoroalanina e trifluoroalanina. Os mecanismos A e B iniciam-se com o ataque do par de elétrons do nitrogênio do grupo Lys-NH₂ do inibidor ao carbono insaturado do substrato do cofator. Este ataque promove a remoção do grupo Lys-NH₂. Posteriormente, a dupla C=C, que é o nucleofílico, ataca o carbono da dupla C=N do complexo cofator-Lys-NH₂. 32
- Figura 9 - Esquema referente a construção do gene da *TcAlr*_longa no plasmídeo pET-19b... 34
- Figura 10 - SDS-PAGE (12%). Raia M: marcador de massa molar. Raias 1, 2, 3 e 4: frações sem indução, total, solúvel e insolúvel, respectivamente, referentes à expressão em *E. coli* BL21 (DE3) GroEL. Raias 5, 6, 7 e 8: frações sem indução, total, solúvel e insolúvel, respectivamente, referentes à expressão em *E. coli* BL21 *ArcticExpress*. 39
- Figura 11 - (A) Cromatograma referente à purificação por afinidade a níquel. (B) SDS-PAGE (12%), raia M corresponde ao marcador de massa molar e a numeração das demais raias refere-se às frações da purificação por níquel. (C) Cromatograma referente à purificação por exclusão por tamanho. (D) SDS-PAGE (12%), raia M corresponde ao marcador de massa molar e a numeração das demais raias refere-se às frações da purificação por exclusão por tamanho. 40
- Figura 12 - Análise do perfil de tamanho encontrado para as amostras de *TcAlr*_longa obtida por meio do espalhamento dinâmico de luz. Nos gráficos está representado o perfil de distribuição do tamanho em função da: (A) intensidade a 4 °C e (B) massa a 18 °C. R é o raio hidrodinâmico, Pd é a polidispersão, MM é a massa molar e Int é a intensidade. 41
- Figura 13 - SDS-PAGE (12%). Raia M: marcador de massa molar. Raia 1: amostra concentrada até 2 mg mL⁻¹ após a remoção da “his-tag”. 42
- Figura 14 - SDS-PAGE (12%) da cromatografia de afinidade em resina de níquel por gravidade. Raia M: marcador de massa molar. Raias 1: amostra antes da purificação. Raias 2-12: frações eluídas com 500 mM imidazol e em 2 M de ureia. 43

Figura 15 - Sequência de aminoácidos da <i>TcAlr_longa</i> com 388 aminoácidos, destaque para as 9 cisteínas.....	44
Figura 16 - Ensaio enzimático comparando as atividades de <i>TcAR_longa</i>	45
Figura 17 - (A) Espectro de CD da <i>TcAlr_longa</i> reenovelada. (B) Espectro de CD da <i>TcAlr_longa</i> reenovelada em várias temperaturas.....	46
Figura 18 - Alinhamento da sequência de aminoácidos entre as Alrs de <i>T. cruzi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. lavendulae</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>G. stearothermophilus</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>E. coli</i> , <i>O. oeni</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>B. anthracis</i> . Os resíduos estão coloridos de acordo com convenção de Alscript calcons. Em vermelho estão as fitas- β , em azul hélices- α e em verde hélices 3_{10} e π . O retângulo rosa vazado indica o resíduo que inicia a catálise e os retângulos azuis vazados indicam os demais resíduos do sítio ativo.....	48
Figura 19 - (A) Modelo por homologia da <i>TcAlr_longa</i> , em azul o monômero A, em verde o monômero B e em vermelho o cofator. (B) Interações entre o PLP e os resíduos da cadeia A.	50
Figura 20 - Gráfico de Ramachandran para o modelo por homologia da <i>TcAlr_longa</i> . Em vermelho, amarelo escuro, amarelo claro e branco estão representadas as regiões favoráveis, adicionalmente permitidas, generosamente permitidas e proibidas, respectivamente.....	50
Figura 21 - Topologia da estrutura de <i>TcAlr_longa</i> predita pelo banco de dados PDBsum. As fitas- β e hélices- α estão representadas em rosa e vermelho, respectivamente, as regiões N- e C- terminal estão ilustradas em amarelo claro.	51
Figura 22 - (A) Ciclo de vida da <i>N. gruberi</i> . (B) Forma ameboide. (C) Forma flagelada.	54
Figura 23 - Esquema do mecanismo de ação da GAPDH. (A) formação do hemiacetal; (B) oxidação do hemiacetal; (C) formação do 1,3-bifosfoglicerato (BPG).	56
Figura 24 - Representação da estrutura de GAPDH de <i>Homo sapiens</i> (código PDB 1ZNQ). A estrutura apresenta quatro monômero idênticos com massa molecular de 35 kDa, representados por cores distintas.....	57
Figura 25 - Inibidores de origem natural (A, B, C e D) e sintética (E e F) da enzima GAPDH de <i>T. cruzi</i> (PDB 3DMT).	58
Figura 26 - Esquema da construção do gene da <i>NgGAPDH</i> no plasmídeo de expressão pET-15b.	67
Figura 27 - SDS-PAGE (12%) referente à expressão heteróloga da <i>NgGAPDH</i> . Raia M: Marcador massa molar. Raia 1: Fração sem indução. Raia 2: Fração total. Raia 3:	

Fração solúvel. Raia 4: Fração insolúvel A posição após migração da <i>NgGAPDH</i> é indicada.	68
Figura 28 - (A) Cromatograma da purificação por afinidade a níquel. (B) SDS-PAGE (12%), raia M, marcador de massa molar, e a numeração das demais raias referem-se às frações da purificação por afinidade a níquel. (C) Cromatograma da purificação por exclusão por tamanho. (D) SDS-PAGE (12%), raia M, marcador de massa molar, e a numeração das raias referem-se às frações da purificação por exclusão por tamanho. (E) Cromatograma da purificação por afinidade a níquel após a clivagem da “his-tag”. (F) SDS-PAGE (12%), raia M, marcador de massa molar, e a numeração das demais raias referem-se às frações da purificação por afinidade a níquel após a clivagem da “his-tag”. A posição após migração da <i>NgGAPDH</i> é indicada.	70
Figura 29 - (A) Velocidades iniciais versus concentrações de arsenato, de 0,1-100 mM. (B) Velocidades iniciais versus diferentes valores de pH, de 6,0-10,0. (C) Velocidades iniciais versus diferentes temperaturas, de 10,0 - 40,0 °C. Os pontos são a média das triplicatas e as barras correspondem a +1 e -1 do desvio padrão.	71
Figura 30 - (A) Velocidades iniciais versus diferentes concentrações de G3P. (B) Velocidades iniciais versus diferentes concentrações de NAD^+ . Curvas sigmoidais ajustadas. ..	72
Figura 31 - Ensaio de cristalização da <i>NgGAPDH</i> . A escala total (100 divisões) corresponde a 1 mm. (A) Gota com precipitado. (B) Gota com cristais de proteínas.	73
Figura 32 - Cristais obtidas com o kit Pi-PEG. A escala total (100 divisões) corresponde a 1 mm e as setas indicam o cristal usado para a coleta dos dados. (A) cristal1. (B) cristal2.	74
Figura 33 - Alinhamento das sequências de aminoácidos de <i>NgGAPDH</i> e <i>OsGAPDH</i> . A coloração do fundo em preto e tons de cinza está de acordo com a convenção de Alscript Calcons.	76
Figura 34 - (A) Modelo final da <i>NgGAPDH</i> , cada monômero está representado por cor diferente. (B) Interações entre o NADH (código PDB NAI) e a proteína. (C) Interações entre o PEG (código PDB PGE) e a proteína. (D) Interações entre o íon Na^+ e a proteína. As ligações de hidrogênio estão representadas em verde. Contornos dos mapas: em azul <i>2mFo-DFc</i> a 1,0 σ , em verde e vermelho <i>mFo-DFc</i> a 3 σ	77
Figura 35 - (A), (B), (C) e (D) representam o N-terminal modelado dos monômeros A, B, C e D respectivamente. Contorno dos mapas: em azul <i>2mFo-DFc</i> a 1,0 σ , em verde e vermelho <i>mFo-DFc</i> a 3 σ	78
Figura 36 - (A) CME. (B) CSD. (C) OCS e CSD. Contorno dos mapas: em azul <i>2mFo-DFc</i> a 1,0 σ , em verde e vermelho <i>mFo-DFc</i> a 3 σ	78

- Figura 37 - Gráfico de Ramachandran da estrutura *Ng*GAPDH gerado pelo programa Procheck. Em vermelho, amarelo escuro, amarelo claro e branco estão representadas as regiões adicionalmente permitidas, generosamente permitidas e proibidas, respectivamente.....79
- Figura 38 - Qualidade do ajuste na densidade eletrônica por resíduo baseada no mapa $2mFo-DFc$. As linhas em azul e vermelho mostram os índices RSCC e RSR, respectivamente. (A), (B), (C) e (D) representam os monômeros A, B, C e D, respectivamente.....81
- Figura 39 - Topologia da estrutura de *Ng*GAPDH ilustrada pelo banco de dados PDBsum. Em vermelho e rosa estão representadas as fitas- β e hélices- α , respectivamente.82
- Figura 40 - (A) Representação do domínio “FedE/GAPDH domain-like” com arranjo $\alpha/\beta/\alpha/\beta$ (3) da classe $\alpha+\beta$, na qual as regiões de folhas e fitas estão separadas e apresentam folhas mistas do tipo 2134, na qual a fita 2 é paralela a 1. (B) Sobreposição entre o monômero A da *Ng*GAPDH (amarelo) e o monômero A da aspartato-semialdeído desidrogenase (código PDB 2R00). (C) Representação do monômero A da *Ng*GAPDH, em roxo o domínio do NADH que compreende os resíduo 1 ao 133 e 314 ao 333 e em azul o domínio do sítio ativo, que compreende os resíduos 134 ao 313.....84
- Figura 41 - (A) Superfície de potencial eletrostático da estrutura tetramérica da *Ng*GAPDH, em destaque a cavidade carregada negativamente formada pela interação entre os monômeros. (B) Superfície de potencial eletrostático do monômero A, em destaque a região carregada negativamente.85
- Figura 42 - Estrutura colorida pela sucessão de cores de arco-íris de acordo com os parâmetros de deslocamento atômico (azul, $12,91 \text{ \AA}^2$, e vermelho, $79,77 \text{ \AA}^2$). (A) Tetrâmero em duas orientações, giradas de 90° no eixo y. (B) Destaque para o cofator NADH e os resíduos Ileu34 e Met35, que pertencem ao domínio do cofator, e o resíduo Asn145, que pertence ao domínio catalítico.86
- Figura 43 - Alinhamento da sequência de aminoácidos entre as estruturas da GAPDHs de *N. gruberi* (Código PDB 5UR0), *T. cruzi* (Código PDB 4LSM), *T. brucei* (Código PDB 4P8R), *L. mexicana* (Código PDB 1GYF), *H. sapiens* (Código PDB 1ZNP), *O. sativa* (Código PDB 3E6A), *S. cerevisiae* (Código PDB 3PYM), *H. americanus* (Código PDB 1GPD) e *E. coli* (Código PDB 1GAD). Os retângulos cheios verdes apontam os aminoácidos que não foram modelados na estrutura cristalográfica, os retângulos vazados azuis indicam os resíduos que interagem com o cofator, os

- retângulos vazados em rosa destacam os resíduos catalíticos e o retângulo amarelo destaca o resíduo Asn do domínio catalítico.....87
- Figura 44 - Sobreposição da estrutura da GAPDH de *N. gruberi* (amarelo), *T. cruzi* (verde), *T. brucei* (vermelho), *L. mexicana* (azul), *H. sapiens* (rosa). (A) Destaque para as quatro regiões que interagem com o anel adenina do cofator. (B) Terceira região ampliada e em outra orientação, com destaque para a Met35 em *N. gruberi* (amarelo), Ser40 em *L. mexicana* (azul) e Phe40 em *H. sapiens* (rosa).89
- Figura 45 - Sobreposição das estruturas de GAPDH de *N. gruberi* (amarelo), *T. cruzi* (verde) (Código PDB 4LSM), *T. brucei* (vermelho) (Código PDB 4P8R), *L. mexicana* (azul) (Código PDB 1GYP), *H. sapiens* (rosa) (Código PDB 1ZNQ). As linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio formadas durante a dinâmica produtiva entre o átomo ND2 da Asn145 aos átomos O de Ala123, Thr125 e Pro126 e aos átomos OG1 de Thr12 e Thr127.90
- Figura 46 - Gráficos de correlação de movimento do resíduo 145 com o “bonded loop”, os retângulos delineados em preto destacam relações de interesse. (A) Asn145. (B) Ser145, a partir do rotâmetro “p”.92
- Figura 47 - Estrutura da NgGAPDH colorida de acordo com o perfil evolutivo de conservação dos aminoácidos. (A) Estrutura global com destaque para os sítios ativo e de ligação ao NADH. (B) Destaque para os resíduos Met35 e Ile34, que interagem com o cofator.94
- Figura 48 - Dendrograma das relações filogenéticas entre os organismos *E. coli*, *T. cruzi*, *T. brucei*, *M. musculus*, *H. americanus*, *P. versicolor*, *H. sapiens*, *B. taurus*, *S. scrofa*, *O. cuniculus*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *O. sativa*, *T. gondii*, *P. falciparum*, *N. gruberi*, *L. mexicana*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *A. aeolicus*, *T. maritima*, *T. aquaticus*, *T. thermophilus*, *G. stearothermophilus*, *T. elongatus*, *S. oleracea*, *B. henselae*, *B. pseudomallae* e *A. xylosoxidans*. Construído no website ConSurf, a escala representa valores probabilísticos que estimam a proximidade entre as estruturas.....95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Estimativas de estruturas secundárias obtidas pelos programas CONTINLL, SELCON3, CDSSTR.....	46
Tabela 2	- Lista de moldes para a modelagem por homologia.....	47
Tabela 3	- Porcentagem dos resíduos em cada região do gráfico de Ramachandran.....	51
Tabela 4	- Dados de coleta, resultados do processamento e estatísticas do refinamento. Valores correspondentes à última faixa de resolução estão entre parêntesis.	75
Tabela 5	- Número de resíduos, área de interface, quantidade de pontes salinas, quantidade de ligações de hidrogênio e quantidade de contatos sem ligação entre os monômeros para formar o tetrâmero.	79
Tabela 6	- Porcentagem dos resíduos em cada região do gráfico de Ramachandran.....	80
Tabela 7	- Valores globais de RSCC e RSR baseados no mapa $2mFo-DFc$ para a estrutura cristalográfica de NgGAPDH, relatados para cada monômero, bem como a média global.	81
Tabela 8	- Valores de RMSD entre Cas referentes às sobreposições das estruturas de NgGAPDH, <i>T. cruzi</i> (Código PDB 4LSM), <i>T. brucei</i> (Código PDB 4P8R), <i>L. mexicana</i> (Código PDB 1GYP), <i>H. sapiens</i> (Código PDB 1ZNQ), <i>O. sativa</i> (Código PDB 3E6A), <i>S. cerevisiae</i> (Código PDB 3PYM), <i>H. americanus</i> (Código PDB 1GPD) e <i>E. coli</i> (Código PDB 1GAD).	88
Tabela 9	- RMSD (Å) para os resíduos que pertencem ao “bonded loop” da estrutura NgGAPDH.....	91
Tabela 10	- Distâncias em Å entre átomos do domínio do cofator.	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

Alr	Alanina racemase
BGP	1,3-Bifosfoglicerato
BLAST	Basic local alignment Search Tool
BSA	Soro Albumina Bovina
CD	Dicroísmo circular
DOPE	Discrete optimized protein energy
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G3P	D-gliceraldeído-3-fosfato
<i>Ha</i> GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>Homarus americanus</i>
<i>Hs</i> GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>Homo sapiens</i>
IPTG	Isopropil- β -D-galactosídeo
<i>Lm</i> GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>Leishmania mexicana</i>
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
<i>n</i>	Coeficiente de Hill
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>Ng</i> GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>Naegleria gruberi</i>
<i>Os</i> GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>Oryza sativa</i>
PAM	Meningoencefalite Amebiana Primaria
PDB	Protein data bank
PGE	Trietileno glicol
PLP	Piridoxal 5' fosfato
RMSba	Desvio médio quadrático de ângulos de ligação
RMSbl	Desvio médio quadrático de comprimentos de ligação
RMScc	Desvio médio quadrático de restrições de centros quirais
RSCC	Valor do coeficiente de correlação do espaço real
RMSD	Desvio médio quadrático
RSR	Valor do residual no espaço real
<i>Sc</i> GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<i>Tb</i> GAPDH	Gliceraldeído-3-fsfato desidrogenase de <i>Typanosoma brucei</i>
<i>Tc</i> Alr_longa	Alanina racemase isoforma longa de <i>Trypanosoma cruzi</i>

*Tc*GAPDH

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	20
OBJETIVO GERAL	21
CAPÍTULO 1 - Alanina racemase isoforma longa de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcAlr_longa)	22
1.1 INTRODUÇÃO	23
1.1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
1.1.1.1 Doença de Chagas	24
1.1.2 Alanina racemase (Alr)	26
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
1.3.1 Obtenção do clone para expressão da TcAlr_longa	34
1.3.2 Expressão	34
1.3.3 Purificação em condições não desnaturantes	35
1.3.4 Dosagem de proteína	36
1.3.5 Espalhamento dinâmico de Luz (DLS)	36
1.3.6 Remoção da “his-tag”	36
1.3.7 Purificação em condições desnaturantes	36
1.3.8 Reenovelamento <i>in vitro</i>	37
1.3.9 Dicroísmo circular (CD).....	37
1.3.9 Ensaio enzimático	37
1.3.10 Modelagem por homologia	38
1.3.11 Análise do modelo gerado por homologia	38
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
1.4.1 Expressão e purificação da fração solúvel	39
1.4.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	40
1.4.3 Recuperação da TcAlr_longa a partir da fração insolúvel	42
1.4.4 Ensaio enzimático.....	44
1.4.5 Dicroísmo circular (CD).....	45
1.4.6 Modelagem por homologia	47
1.5 CONCLUSÕES.....	52
CAPÍTULO 2 - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>Naegleria gruberi</i> (NgGAPDH) ..	53
2.1 INTRODUÇÃO	54
2.1.1 <i>Naegleria gruberi</i>	54
2.1.2 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	55
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	61
2.3.1 Obtenção do Clone Contendo o Gene da NgGAPDH.....	61

2.3.2	Expressão	61
2.3.3	Purificação.....	61
2.3.4	Remoção da “his-tag”	62
2.3.5	Dosagem de proteína	62
2.3.6	Estudos cinéticos	62
2.3.7	Ensaio de cristalização.....	63
2.3.8	Coleta de Dados de Difração de Raios X.....	64
2.3.9	Processamento de Dados de Difração de Raios X	64
2.3.10	Substituição molecular	64
2.3.11	Refinamento da Estrutura.....	64
2.3.12	Validação da estrutura	65
2.3.13	Análises e comparações	65
2.3.14	Estudos por dinâmica molecular	65
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
2.4.1	Clonagem, Expressão e Purificação	67
2.4.2	Estudos cinéticos	70
2.4.3	Estudos estruturais.....	72
2.4.3.1	Cristalização	72
2.4.3.2	Determinação e descrição da estrutura.....	74
2.4.3.3	Validação do modelo final	79
2.4.3.4	Análises e comparações estruturais.....	82
2.4.3.4.1	Enovelamento da estrutura da NgGAPDH.....	82
2.4.3.4.2	Superfície de potencial eletrostático	84
2.4.3.4.3	Análise dos parâmetros de deslocamento atômico.....	85
2.4.3.4.4	Alinhamento e sobreposição das estruturas	86
2.4.3.4.5	Estudo por dinâmica molecular.....	90
2.4.3.4.5.1	Efeito da mutação N145S na flexibilidade do “bonded loop”	90
2.4.3.4.5.2	Comparação entre as formas holo e apo.....	92
2.4.3.4.6	Estudo evolutivo preliminar	93
2.5	CONCLUSÕES.....	96
PERSPECTIVAS.....		97
REFERÊNCIAS		98

Introdução geral

As proteínas são macromoléculas biológicas complexas capazes de executar de forma rápida e programada inúmeras tarefas essenciais à manutenção da vida (BRANDEN; TOOZE, 1998; MURAY, 2007). Elas são blocos de construção de todas as células em nossos corpos e em todos os seres vivos de todos os domínios. Embora a informação necessária para a vida continuar é codificada pela molécula de DNA, o processo dinâmico de manutenção da vida, replicação, defesa e reprodução é realizado por proteínas (MURAY, 2007).

Devido às inúmeras funções desempenhadas por essas macromoléculas biológicas, o estudo da sua sequência de aminoácidos, estrutura e função são importantes para busca de novas abordagens terapêuticas (GUIDO et al., 2010), principalmente para proteínas de organismos patogênicos ou de mesmo gênero destes, que podem ser utilizadas como modelo estrutural. Além disso, estruturas tridimensionais de proteínas têm contribuído para o estudo evolutivo das espécies porque sua estrutura quaternária é mais conservada ao longo do processo do que a sequência de aminoácidos (PASTORE; LESK, 1990; FLAHERTY et al., 1991; SCHNUCHE et al., 1993) e esta característica torna a estrutura das proteínas marcadores evolutivos melhores do que as sequências para reconhecer ancestrais (YANG; DOOLITTLE; BOURNE, 2005).

Neste contexto, o presente trabalho visa caracterizar a estrutura tridimensional e as características cinéticas de duas proteínas: a alanina racemase isoforma longa de *Trypanosoma cruzi* (TcAlr_longa), cuja função é a interconversão entre L e D-alanina (CONTI et al., 2011) em uma das vias metabólicas do microorganismo, e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Naegleria gruberi* (NgGAPDH), cuja função é catalisar a sexta etapa da via glicolítica (BAKER et al., 2014).

No capítulo 1 é descrito o estudo da proteína TcAlr_longa, que compreende expressão, purificação, reenovelamento *in vitro*, análise por dicroísmo circular, ensaio cinético e modelagem por homologia da estrutura.

No capítulo 2 é descrito o estudo da proteína NgGAPDH, que compreende desenvolvimento do protocolo de expressão, purificação, determinação dos parâmetros cinéticos, cristalização, determinação da estrutura tridimensional e realização de análises comparativas estruturais.

Objetivo geral

- Caracterizar a estrutura da proteína *TcAlr_longa*, por meio de dicroísmo circular e modelagem por homologia;
- Caracterizar a estrutura da *NgGAPDH* por meio de ensaios de cristalização e determinar seus parâmetros cinéticos por meio de ensaio enzimático.

CAPÍTULO 1

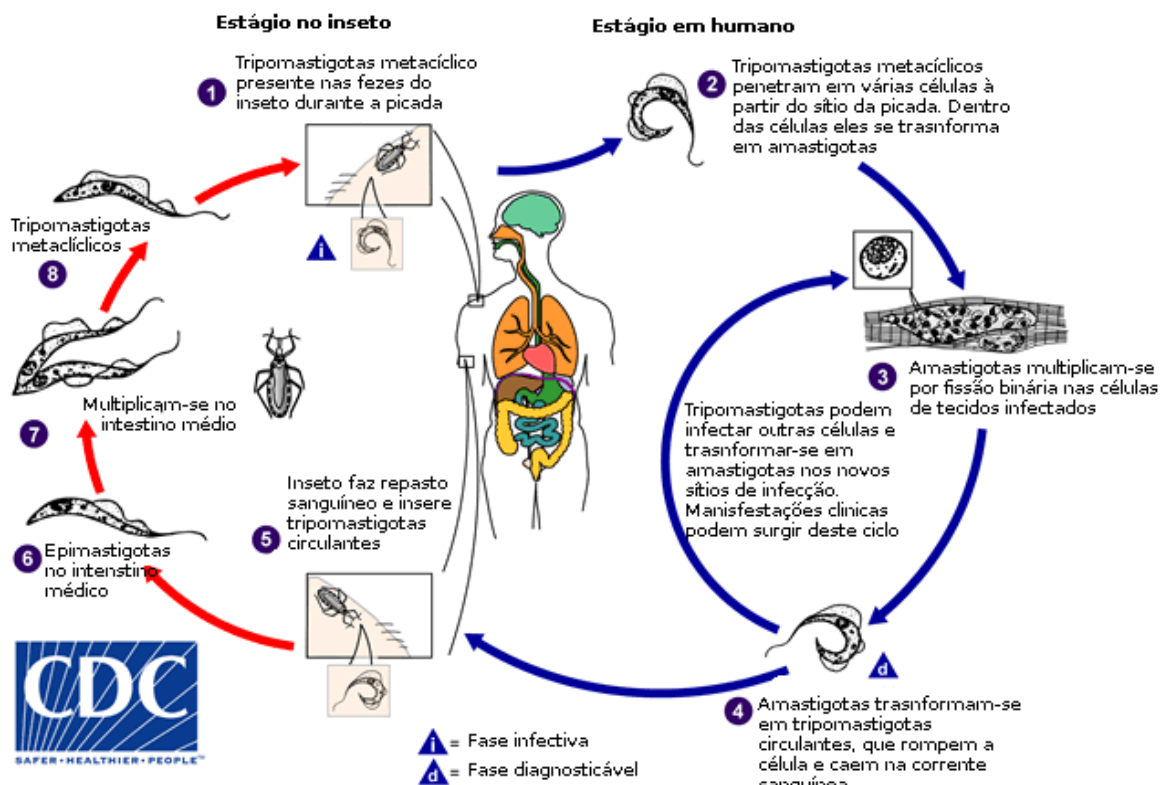
Alanina racemase isoforma longa de *Trypanosoma cruzi* (TcAlr_longa)

1.1 Introdução

1.1.1 *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário hemático da família dos tripanossomatídeos. ((O seu ciclo de vida apresenta três formas distintas (Figura 1): i) epimastigota, forma presente no inseto; ii) tripomastigota, forma sanguínea circulante e infectante em humanos e iii) amastigota, forma de replicação intracelular. Devido à alternância de hospedeiro e às diversas formas em seu ciclo de vida, a sua sobrevivência depende da habilidade de manter a homeostase intracelular de íons e nutrientes e catabolizar diferentes substratos para obter energia. Assim, o *T. cruzi* é capaz de utilizar carboidratos e aminoácidos como fonte de energia (CAZZULO, 1992 e SILBER et al., 2005).

Figura 1: Ciclo de vida do *T. cruzi*. 1) Tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes do inseto durante a picada; 2) Tripomastigotas metacíclicos penetram em várias células à partir do sítio da picada. Dentro das células, eles se transformam em amastigotas; 3) Amastigotas multiplicam-se por fissão binária nas células de tecidos infectados; 4) Amastigotas transformam-se em tripomastigotas circulantes que rompem a célula e caem na corrente sanguínea. Nessa fase os tripomastigotas podem infectar outras células e transformarem-se em amastigotas nos novos sítios de infecção. Manifestações clínicas podem surgir deste ciclo; 5) Inseto faz repasto sanguíneo e insere tripomastigotas circulantes; 6) Epimastigotas no intestino médio; 7) Multiplicação no intestino médio; 8) Tripomastigota metacíclicos. Os estágios 1, 5, 6, 7 e 8 ocorrem nos insetos e os estágios 2, 3 e 4 ocorrem em humanos.



Fonte: Adaptado de Center for Disease Control and Prevention (2016).

Os aminoácidos são importantes no metabolismo energético dos tripanossomatídeos (ZELEDON, 1960; MANCILLA; NAQUIRA; LANAS, 1967), além de auxiliarem em seu desenvolvimento, diferenciação (TONELLI et al., 2004), regulação do volume celular (ROHLOFF; RODRIGUES; DOCAMPO, 2003; ROHLOFF; MONTALVETTI; DOCAMPO, 2004) e resistência a diferentes tipos de estresse (PEREIRA et al., 2003). Em *T. cruzi*, os aminoácidos podem ser obtidos a partir de três fontes principais: biossíntese a partir de metabólicos precursores, transporte ativo de aminoácidos disponíveis no meio e degradação de proteínas fagocitadas (SILBER et al., 2005; PAES et al., 2011).

Na literatura há relatos de participação relevante de aminoácidos como prolina, glutamato, aspartato e arginina no metabolismo do *T. cruzi* (CAZZULO, 1992), entretanto, o papel biológico de D-alanina e/ou L-alanina livres nesse parasita ainda não foi elucidado. Segundo ENGEL et al., (1987), e URBINA et al., (1990), a produção de L-alanina em *T. cruzi* é uma forma de eliminar o composto NH_3 , já que este não pode ser eliminado pelo ciclo da ureia, porque faltam várias enzimas desse ciclo em *T. cruzi*, portanto, suas enzimas transaminases catalisam a transferência de grupos NH_2 de quase todos os aminoácidos para o piruvato, produzindo L-alanina.

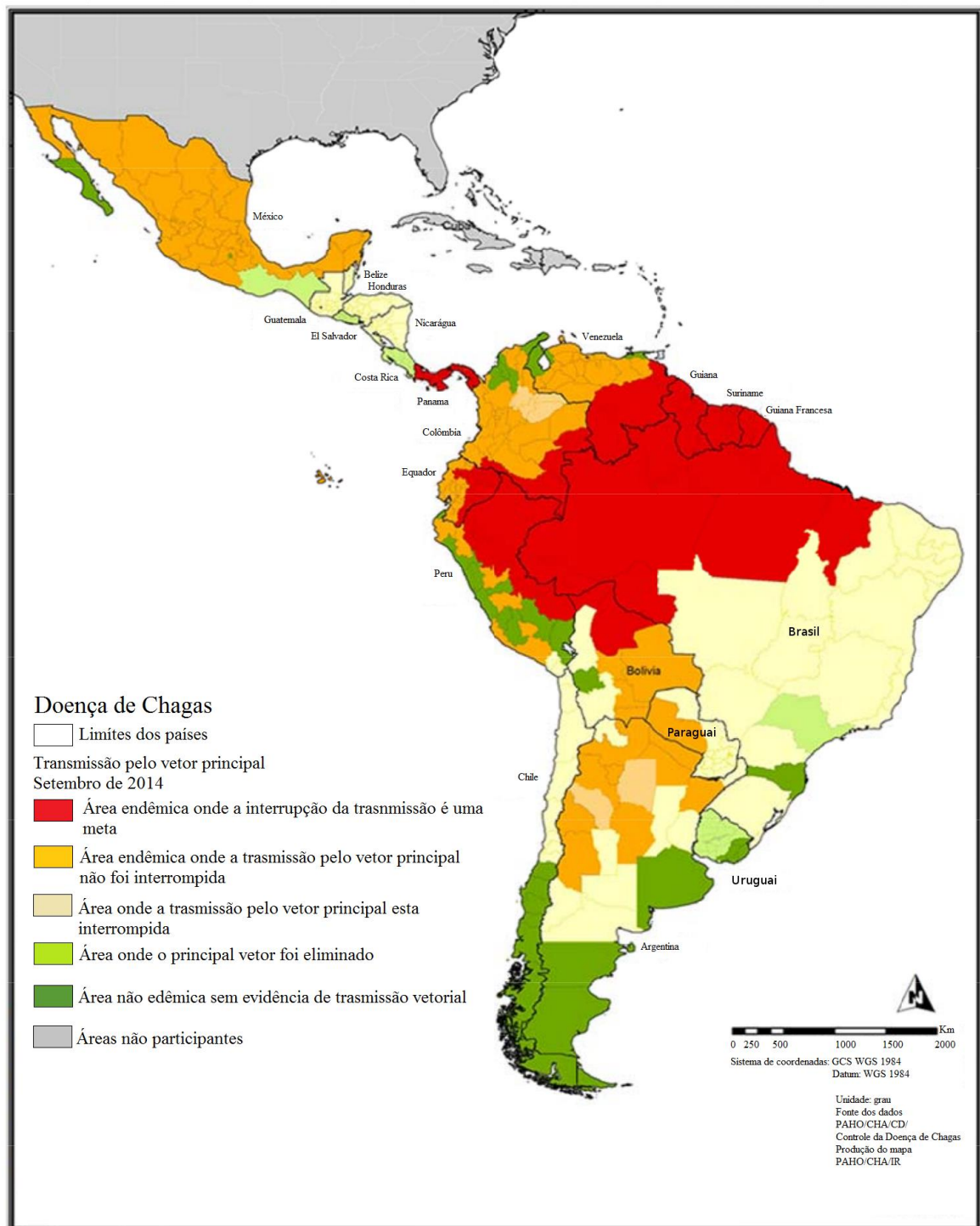
O *T. cruzi* possui apenas uma única mitocôndria que ocupa grande parte do seu volume e apresenta duas organelas que não existem em geral nos eucariotos, que são o glicosomo, onde ocorrem as primeiras reações da via glicolítica, e o reservossomo, cuja função é armazenar proteínas exógenas e possui alta atividade de hidrolases (CAZZULO, 1994; URBINA, 1994; CAZZULO; STORKA; TURK, 1997).

Dado que o *T. cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, a caracterização das vias metabólicas e de suas enzimas é importante para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

1.1.1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo *T. cruzi*. O parasita é transmitido principalmente pelo vetor *Triatoma infestans*, conhecido vulgarmente como "barbeiro", encontrado comumente na América Latina, que é por isso considerada endêmica (Figura 2). A Organização Mundial da Saúde (2013) estima que ocorrem cerca de 12.000 mortes por ano causadas pela Doença de Chagas (WHO, 2017).

Figura 2: Mapa geográfico da distribuição da Doença de Chagas (2014).



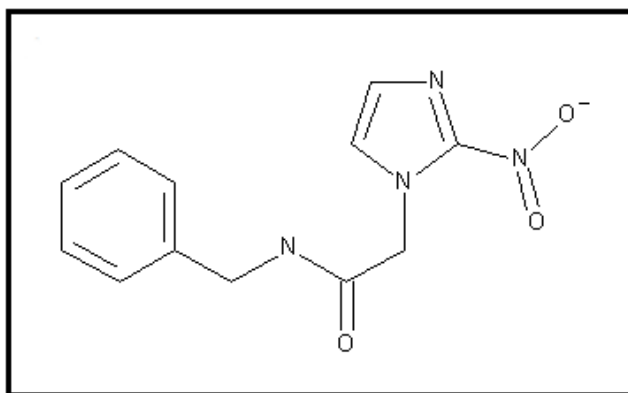
Fonte: www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=pt. Acesso em: 12/05/2017. Adaptado de

A Doença de Chagas é caracterizada por uma fase aguda que dura em média dois meses, sendo sucedida por uma fase crônica que tipicamente se prolonga por toda a vida do

hospedeiro. Quando esta se manifesta, leva a um quadro febril ou a outras manifestações clínicas, tais como miocardite, alterações eletrocardiográficas, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (DIAS; DESSOY, 2009).

Atualmente, o tratamento da doença é realizado com o benzonidazol (Figura 3), comercialmente distribuído com o nome Rochangan[®]. Evidências indicam que o medicamento atua na formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrolíticos, com eficiência na fase aguda da doença. Todavia, um dos problemas é que a maior parte dos pacientes passa pela fase aguda sem manifestações clínicas, ou com sintomas não específicos, que não permitem diagnosticar precocemente a infecção (PAES et al., 2011); isto faz com que a maior parte não seja diagnosticada a tempo, perdendo-se a chance de se ter tratamentos mais eficientes. Esses fatos somados ao aparecimento de resistência aos fármacos utilizados (REGUERA et al., 2006; GARCIA-ESTRADA et al., 2010) reforçam a necessidade de novas abordagens terapêuticas que permitam, por si só ou em combinação com o benzonidazol, otimizar o tratamento da fase crônica da doença.

Figura 3: Estrutura química do Benzonidazol.



Fonte: O autor

1.1.2 Alanina racemase (Alr)

A Alanina racemase (Alr) (E.C. 5.1.1.1) é uma isomerase que interconverte os isômeros L e D-alanina (L-Ala, D-Ala respectivamente) cuja ação depende do Piridoxal 5' fosfato (PLP) como cofator.

As enzimas racemases são encontradas em todos os procariotos, mas em apenas algumas espécies de eucariotos tais como animais aquáticos (ABE et al., 2005), fungos (HOFFMANN et al., 1994; CHENG et al., 2000), leveduras (ver na referencia se são varia

mesmo) (UO et al., 2001) e plantas (ONO et al., 2006). A falta da Alr na maioria dos eucariotos faz com que esta enzima seja alvo atraente para o desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos (COUÑAGO et al., 2009).

As Alrs mais estudadas são as de bactérias porque o aminoácido D-Ala é precursor na síntese do composto peptidoglicano, essencial na composição da parede celular, tanto para bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. O peptidoglicano é um polissacarídeo formado por resíduos alternados de N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico. Cada ácido N-acetilmurâmico encontra-se associado a um pequeno peptídeo, sendo constituído por L-alanina, ácido D-glutâmico, ácido meso-diaminopimélico e D-alanina, no caso de bactérias Gram-negativas, ou L-alanina, D-glutamina, L-lisina e D-alanina, ligado a outro peptídeo por pontes de cinco glicinas (entre a D-alanina de um peptídeo e a L-lisina de outro peptídeo), no caso de bactérias Gram-positivas. Estas pontes cruzadas são estabelecidas com auxílio de uma transpeptidase, resultando no composto N-acetilmuramil-L-Ala-D-Glu-meso-diaminopimelato-D-Ala-D-Ala.

A Alr é a primeira enzima da via biossintética do peptidoglicano, sua ação é a racemificação do isômero L-alanina para D-alanina. O dipeptídeo D-ala-D-ala é produzido pela ação da D-alanina ligase (E.C. 6.3.2.15), cuja estrutura foi determinada por FAN et al., (1997). Esse dipeptídeo é utilizado na síntese do composto N-acetilmuramil-L-Ala- D-Glu- Meso-diaminopimelato. Como a única forma de se obter este composto é por essa rota metabólica, as enzimas desta via são alvos para a busca de inibidores específicos para o desenvolvimento de antibióticos (SHAW; PETSKO; RINGE, 1997).

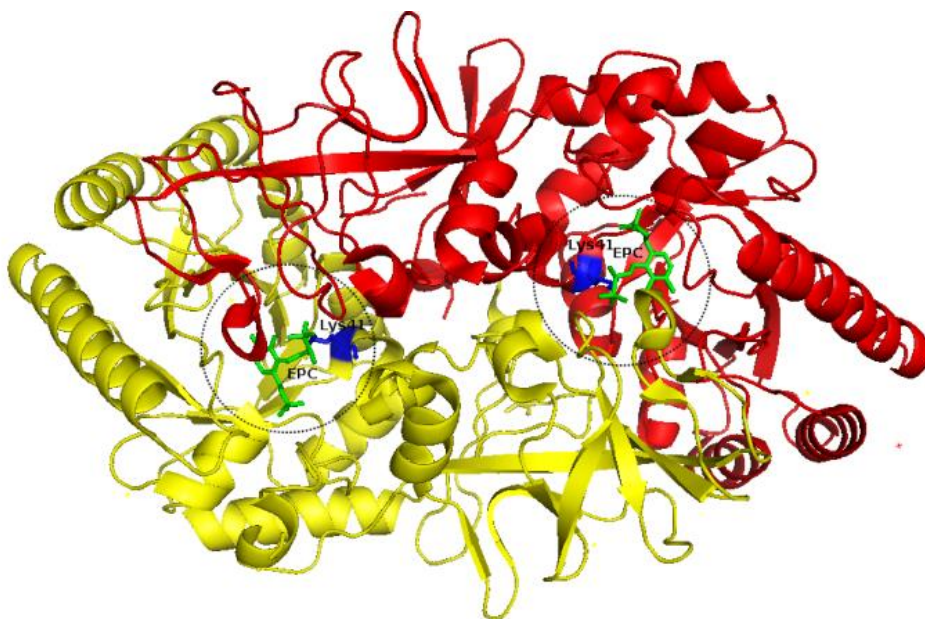
Várias bactérias, como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, contêm dois genes independentes que codificam para duas Alr (WALSH 1989), denominadas de DadB e AlrA. Experimentos mostram que a expressão de DadB é induzida quando as células são cultivadas em altas concentrações de L- ou D-Ala e é provavelmente responsável pelo catabolismo de D-Ala (McFALL; NEWMAN, 1996). Em contraste, a AlrA é constantemente expressa e provavelmente está envolvida na síntese de D-Ala.

Na literatura há descrição de Alrs de 18 organismos com estruturas tridimensionais depositadas no Protein Data Bank (PDB), entre eles (código PDB entre parêntesis): *Corynebacterium glutamicum* (2DY3) (MIYAGUCHI et al., 2011), *Bacillus anthracis* (3HA1) (COUÑAGO et al., 2009), *Bacillus stearothermophilus* (1XQK) (FENN et al., 2005), *Bacillus anthracis str. Ames* (2VD9) (AU et al., 2008), *Oenococcus oeni* (3CO8) (PALANI, BURLEY, SWAMINATHAN, 2013), *Mycobacterium tuberculosis* (1XFC) (LEMAGUERES et al., 2005), *Enterococcus faecalis* (3E5P) (PRIYADARSHIA et al., 2009), *Pseudomonas*

aeruginosa (1RCQ) (LEMAGUERES et al., 2003), *Streptomyces lavendulae* (1VFH) (NODA et al., 2004), *Escherichia coli* (3B8U) (WU et al., 2008) e *Pseudomonas fluorescens* (2ODO) (TSUGE; OHNISHI; YOKOIGAWA, 2011).

A análise das estruturas elucidadas das Alrs revela que se tratam de homodímeros em que o sítio ativo está localizado na interface entre os monômeros (Figura 4), cada um com aproximadamente 388 resíduos, massa molar de cerca de 40 kDa e constituído por dois domínios, um que vai do resíduo 1 até cerca de 240, composto por sete fitas- β , e um que compreende desde o resíduo 241 até final da cadeia, composto por três ou quatro fitas- β e hélices- α . (SHAW; PETSKE; RINGE 1997). Os parâmetros cinéticos dessas enzimas revelam que o ponto isoelétrico (pI) está entre 5,2 e 6,5, temperatura ótima entre 30 e 90 °C e pH ótimo entre 7,5 e 11.

Figura 4: Estrutura tridimensional da alanina racemase de *Bacillus anthracis*, código PDB 2DV9. Em amarelo e em vermelho estão representados os monômeros A e B, respectivamente; a região do sítio ativo está circulado em cada monômero e nelas estão destacados os resíduos Lys41 e o cofator PLP (PDB EPC).



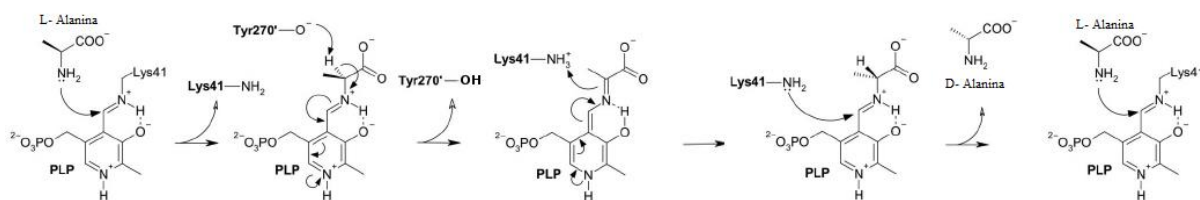
Fonte: AU et al., 2007

Na descrição das Alrs uma molécula de água foi identificada nos sítios ativos desempenhando papel importante na catálise enzimática e deve ser tomada em conta para o desenho de inibidores específicos (CONTI et al., 2011). Segundo SHAW, PETSKE e RINGE (1997), durante a catálise a cadeia lateral da Arg219 no sítio ativo forma uma ligação de hidrogênio com o anel de piridina do PLP, indicando que esse anel não é crucial para a

atividade catalítica. Portanto, o principal papel do cofator na catálise da Alr pode ser atribuído à solvatação (RUBINSTEIN; MAJOR, 2010).

Um mecanismo de reação proposto para a Alr inicia-se com o ataque do grupo amino ao carbono do anel da PLP, formando um intermediário com vida útil limitada, o que ajuda a enzima a evitar reações secundárias (Figura 5).

Figura 5: Mecanismo de ação da Alr. O mecanismo inicia-se com o ataque do par de elétrons do nitrogênio do grupo amino ao carbono insaturado do substrato do cofator. Este ataque promove a remoção do grupo Lys41-NH₂. Posteriormente, o oxigênio do alcóxido Tyr270' abstrai um próton ácido da estrutura do cofator, e o par de elétrons passa para a ligação entre o carbono e nitrogênio, formando a ligação C=N e transformando o alcóxido em Tyr270'-OH. Na sequência, a dupla C=N do cofator que é nucleofílica ataca um próton do grupo Lys41-NH₃⁺, que é eletrofílico, promovendo a entrada de um hidrogênio no cofator e tornado à ligação simples, novamente. Isto ocorre simultaneamente à passagem do par de elétrons não ligantes para o anel da piridina em ressonância, que se estende até o outro nitrogênio, que fica com carga positiva. O ataque do nitrogênio do Lys 41-NH₂ ao carbono insaturado da ligação C=N do cofator promove simultaneamente a remoção da D-alanina. Finalmente, o nitrogênio da L-alanina ataca o carbono C=N do cofator.



Fonte: Adaptado de AU et al., 2008.

Análises de simulações por dinâmica molecular (RUBINSTEIN; MAJOR, 2010; LIN et al., 2011) da estrutura selvagem e mutada Arg219Glu revelaram que a estabilização da formação do intermediário durante o mecanismo de ação na estrutura selvagem é devida a efeitos do solvente, enquanto que no mutante o Glu219 contribui na estabilização.

Um segundo mecanismo, apoiado pelo modelo teórico publicado por ONDRECHEN, BRIGGS e MCCAMMON (2001), indica uma ação alternativa envolvendo dois aminoácidos, Lys39 e Tyr265. O resíduo Lys39, ligado ao cofator PLP, atua no início da conversão de D-Ala em L-Ala, enquanto a Tyr265, localizada no outro monômero, desempenha outra função (YOSHIMURA, 2008). Nesse mecanismo, o grupo fenólico da Tyr265 pode estar na sua forma aniônica e, assim, a enzima seria mais ativa, enquanto que a Lys39 é desprotonada nesse mesmo pH, portanto, a Lys39 pode estar disponível e comportar-se como a base catalítica para a conversão de D-Ala em L-Ala.

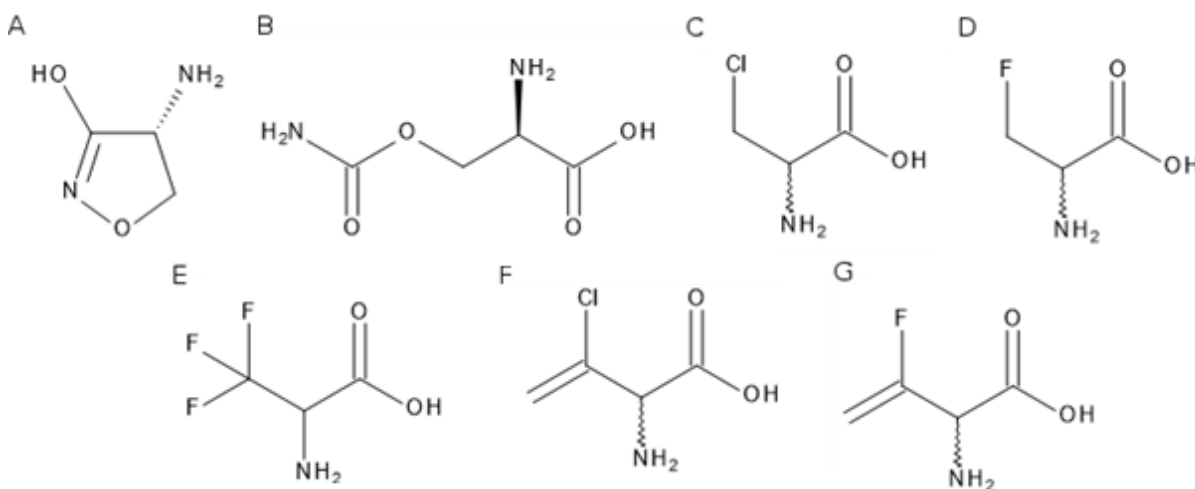
Além da reação de isomeração realizada pelas Alrs, estudos mostram que elas também são capazes de catalisar uma reação de transaminação (GRISHIN; PHILLIPS; GOLDSMITH, 1995; KUROKAWA; WATANABE; YOSHIMURA 1998) em pH entre 6,5 e 6,8, enquanto o

processo de isomerização tem seu pH ótimo entre 7 e 10 (STADTMAN; ELLIOT, 1957; TANNER, 2002).

Estudos realizados com a Alr de *Bacillus anthracis* indicam que essa enzima desempenha um papel chave na inibição da germinação de seus esporos. O papel do aminoácido L-alanina nesse microorganismo é promover a sua germinação, enquanto que o D-alanina é um potente inibidor da mesma (PRESTON; DOUTHIT, 1988). A inibição da Alr poderia desencadear uma germinação prematura levando à morte dos esporos (HUANG et al., 2004; CHESNOKOVA et al., 2009). *Bacillus anthracis* é uma bactéria Gram-positiva causadora da doença zoonótica antraz, mais comum em animais, mas que também pode ocorrer em humanos quando expostos aos esporos vivos. A pulverização de uma solução de um inibidor de Alr nos ambientes poderia ser uma estratégia para acelerar os esforços de descontaminação e reduzir o risco de infecção em seres humanos (YAN et al., 2007).

Muitos análogos de D-Ala que apresentam um halogênio na posição adequada para o ataque nucleofílico exibem uma atividade inibitória. Existem sete inibidores descritos de Alr, D-cicloserina, O-carbamoil-D-serina, β -cloroalanina, β -fluoroalanina, (BADET; ROISE; WALSH, 1984) β,β,β -trifluoroalanina, (FARACI, WALSH 1989) β -clorovinilglicina e β -fluorovinilglicina (Figura 6), que são ativos contra Alr de muitas bactérias, como de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. No entanto, não inibem outras enzimas contendo PLP (SHAW; PETSKO; RINGE, 1997).

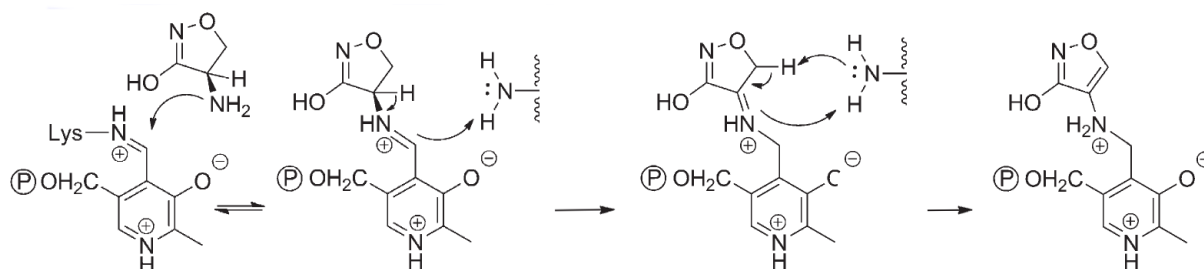
Figura 6: Estrutura química dos inibidores das Alr. (A) D-cicloserina. (B) O-carbamoil-D-serina. (C) β -cloroalanina. (D) β -fluoroalanina. (E) β,β,β -trifluoroalanina. (F) β -clorovinilglicina. (G) β -fluorovinilglicina.



Fonte: O autor.

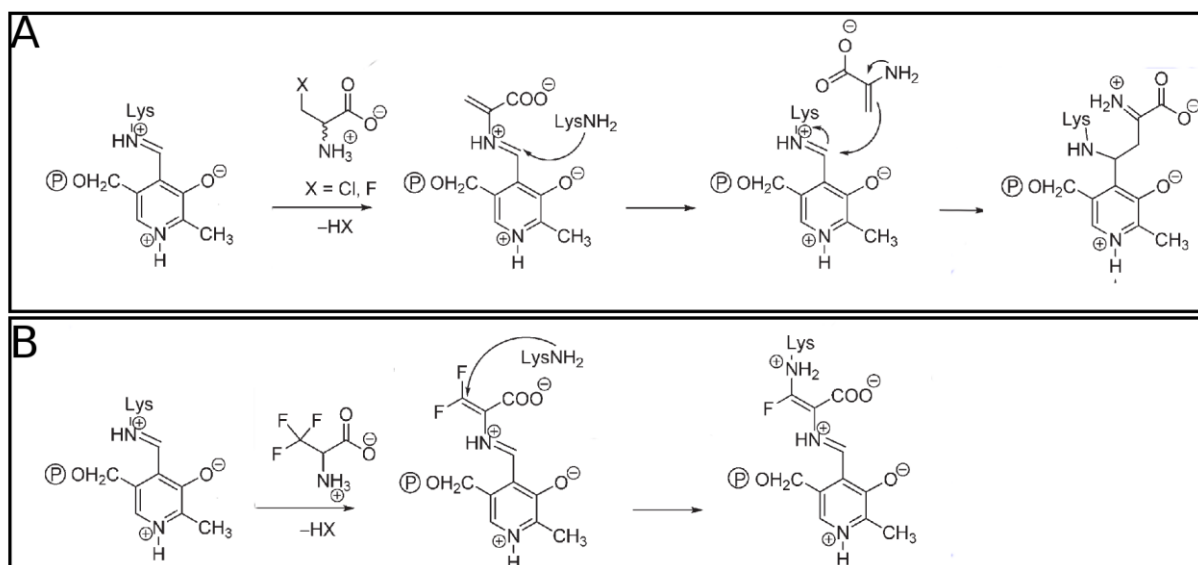
Os compostos β -cloroalanina, β -fluoroalanina e trifluoroalanina apresentam mecanismos de inibição diferentes dos inibidores D-cicloserina e O-carbamoil-D-serina, embora em ambos os casos a enzima seja irreversivelmente inibida, porque ocorre a formação de uma ligação covalente entre o cofator e o inibidor. A ação dos inibidores D-cicloserina e O-carbamoil-D-serina inicia-se com a formação de uma ligação covalente com o cofator PLP da enzima, inibindo a ação da Alr (Figura 7) (CONTI et al., 2011), enquanto que a ação dos inibidores β -haloalaninas e trifluoroalanina inicia-se pelo ataque do nitrogênio da lisina ao carbono insaturado do cofator ou carbono difluorado do inibidor (Figura 8) (FARACI; WALSH, 1989).

Figura 7: Mecanismo de ação do inibidor D-cicloserina. O mecanismo inicia-se com o ataque do par de elétrons do nitrogênio do grupo amino do inibidor ao carbono insaturado. Este ataque promove a remoção do grupo Lys-NH₂ e a formação da ligação covalente com o inibidor. Posteriormente, a dupla C=N do complexo, que é nucleofílico, ataca um próton do grupo Lys-NH₂, que é eletrofílico, promovendo a entrada de um hidrogênio e tornando a uma ligação simples. Em seguida, ocorre o ataque do par de elétrons do grupo Lys-NH₂ ao hidrogênio ligado ao inibidor e simultaneamente ocorre a formação da ligação dupla no anel do inibidor.



Fonte: Adaptado de CONTI et al., 2011.

Figura 8: Mecanismo de ação dos compostos β -cloroalanina, β -fluoroalanina e trifluoroalanina. Os mecanismos A e B iniciam-se com o ataque do par de elétrons do nitrogênio do grupo Lys-NH₂ do inibidor ao carbono insaturado do substrato do cofator. Este ataque promove a remoção do grupo Lys-NH₂. Posteriormente, a dupla C=C, que é o nucleofílico, ataca o carbono da dupla C=N do complexo cofator-Lys-NH₂.



Fonte: Adaptado de CONTI et al., 2011.

Em *T. cruzi* foram identificadas duas isoformas da Alr, uma longa (42 kDa) e outra curta (27,5 kDa). A hipótese é que essas enzimas podem atuar como reguladoras na reserva e/ou eliminação de L-alanina via formação de D-alanina. Além disso, o *T. cruzi* poderia também secretar uma isoforma da enzima que estaria envolvida na modificação de moléculas de membrana da célula alvo do hospedeiro, facilitando a adesão e/ou subsequente penetração e multiplicação do parasita (SELA; ZISMAN, 1997). Neste contexto, este trabalho visa acrescentar novas informações à literatura sobre a enzima alanina racemase isoforma longa de *T. cruzi*, no tocante à sua estrutura e a comportamentos bioquímicos.

1.2 Objetivos específicos

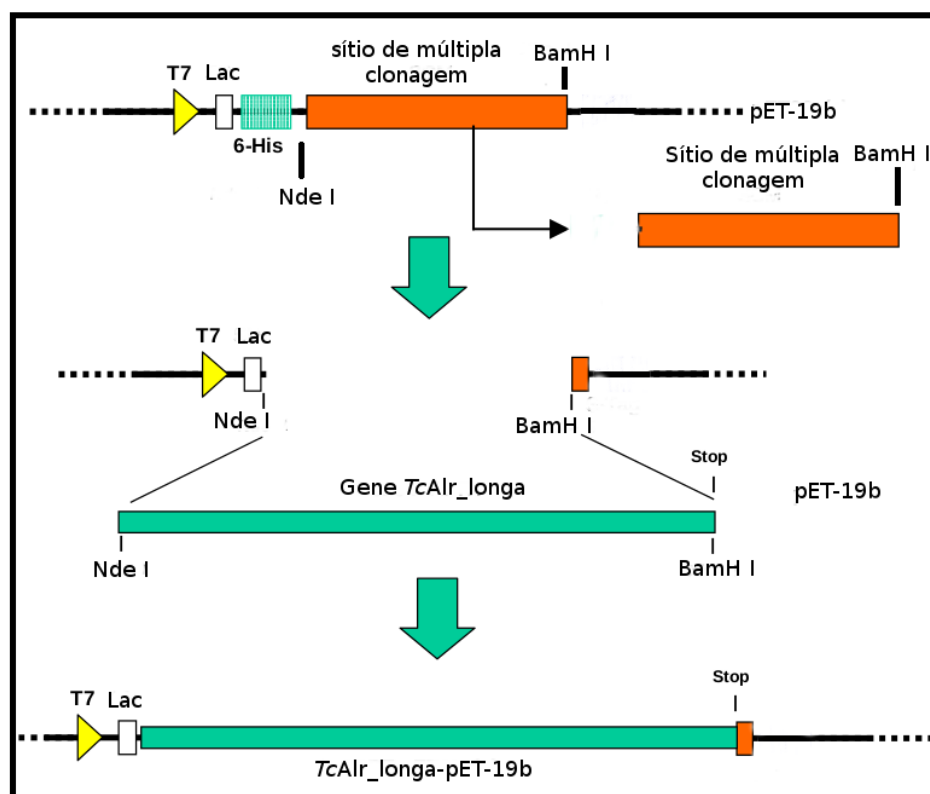
- Estabelecer um protocolo para otimizar a obtenção da enzima solubilizada;
- Realizar estudo do conteúdo da estrutura secundária por meio de dicroísmo circular;
- Realizar estudo estrutural por meio de modelagem por homologia.

1.3 Materiais e métodos

1.3.1 Obtenção do clone para expressão da *TcAlr_longa*

A *E. coli* BL21(DE3) GroEL contendo o DNA plasmidial pET-19b com o inserto correspondente ao gene codificante da enzima *TcAlr_longa* (Figura 9) foi disponibilizada pelo laboratório do Prof. Dr. Ariel Mariano Silber (Departamento de Parasitologia - Instituto de Ciências Biomédicas, USP).

Figura 9: Esquema referente à construção do gene da *TcAlr_longa* no plasmídeo pET-19b.



Fonte: O autor

1.3.2 Expressão

Para a expressão da *TcAlr_longa* foram utilizados 4 L de meio LB (SAMBROOK et al., 1989) com 100 µg mL⁻¹ de ampicilina e 50 µg mL⁻¹ de cloranfenicol, mantidos a 37 °C sob agitação a 190 rpm até atingir DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,6, em seguida, a cultura foi mantida sob agitação até atingir a temperatura de 20 °C, nessa temperatura foi adicionado 0,5 mM isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e manteve-se a agitação, mas a 150 rpm por 16

h. Após, a cultura foi centrifugada a $4800 \times g$ por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado da centrifugação foi solubilizado em tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,4 com 500 mM de NaCl e submetido à lise por sonicação com 4 pulsos de 1 min e intervalos de descanso em gelo de 1 min entre eles. Após a sonicação, adicionou-se 0,1% de Triton[®] X-100 e 50 µl de coquetel de inibidor de protease (AEBSF, pepstatina, PMSF, aprotinina, E-64, leupeptina, cloridrato de bestatina) (Sigma) para cada mililitro de tampão, o que foi seguido de centrifugação a $20000 \times g$ por 30 min a 4 °C, separando-se então a fração solúvel (sobrenadante) da insolúvel (precipitado).

1.3.3 Purificação em condições não desnaturantes

A fração solúvel foi submetida a duas etapas de purificação no cromatógrafo Äkta Purifier (GeHealthcare Life Sciences). A primeira etapa compreendeu cromatografia por afinidade a níquel em 5 mL de resina (HisTrap HP–GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi previamente equilibrada com 2 volumes de coluna (VC) de tampão A (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 500 mM de NaCl), o que foi seguido da aplicação da fração solúvel e lavagem com 16 VC do mesmo tampão. Após, eluiu-se durante 7,6 VC com uma mistura de tampão A com tampão B (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol) para resultar em 20 mM de imidazol, em seguida, eluiu-se durante 4,6 VC com uma mistura de tampão A com tampão B para resultar em 40 mM de imidazol e, por último, um gradiente até 100% do tampão B (500 mM de imidazol) durante 4,8 VC. Durante a cromatografia manteve-se fluxo de 1 mL min⁻¹ e frações de 1 mL foram coletadas por tubo. As frações eluídas contendo a TcAlr_longa foram reunidas e submetidas a uma diálise durante 24 h contra o tampão A.

Na segunda etapa de purificação realizou-se uma cromatografia por exclusão por tamanho em 75 mL de resina (Superdex[™] 75 HR 10/30 GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com 2 VC do tampão A e, após, a solução proteica foi aplicada, seguida de 1 VC de eluição do tampão A. Durante a cromatografia, manteve-se fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e frações de 500 µL foram coletadas por tubo. As frações eluídas das duas etapas de purificação foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE (12%)), método adaptado de SAMBROOK e RUSSEL, (2001).

1.3.4 Dosagem de proteína

A concentração de proteína em solução foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) e por absorbância em 280 nm. No primeiro método utilizou-se a Soro Albumina Bovina (BSA) a $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ como padrão para as curvas de calibração. As amostras foram diluídas de forma a apresentarem absorbâncias próximas ao ponto médio da curva de calibração. No segundo método utilizou-se tampão da amostra como branco e o valor do coeficiente de extinção molar para o cálculo da concentração.

1.3.5 Espalhamento dinâmico de Luz (DLS)

A análise por DLS foi realizada no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) com o equipamento DynaPro (*Protein Solutions*). Para o experimento, utilizaram-se aproximadamente $70 \text{ }\mu\text{L}$ de enzima a $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ em tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,5 com 150 mM NaCl. A amostra foi previamente centrifugada a $14000 \times g$ por 15 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e acondicionada em uma cubeta de quartzo. As medidas compreenderem 25 aquisições por 20 s a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O cálculo do raio hidrodinâmico foi realizado pelo software *Dynamics*TM versão 6.12.0.3.

1.3.6 Remoção da “his-tag”

Com a proteína purificada em condições nativas realizou-se a clivagem da “his-tag” da porção N-terminal com Enteroquinase (Sigma). O procedimento foi seguido conforme a descrição do fabricante.

1.3.7 Purificação em condições desnaturantes

A fração insolúvel da expressão foi solubilizada em solução tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,4 com 500 mM NaCl, 10 mM imidazol e 8 M ureia sob agitação constante por 2 h, seguida de centrifugação a $20000 \times g$ por 30 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante contendo a TcAlr_longa desnaturada foi purificado por gravidade em 5 mL de resina de níquel com os tampões A e B acrescidos de 2 M de ureia; o método de purificação seguiu o mesmo descrito da primeira etapa do item 2.3.3.

1.3.8 Reenovelamento *in vitro*

Após a purificação em condições desnaturantes, a TcAlr_longa foi submetida ao reenovelamento *in vitro*, em 6 passos de diálise a 4 °C. O primeiro passo compreendeu diminuir a concentração de ureia de 8 M para 2 M e troca para o tampão CHES (ácido 2-(ciclohexilamino) etanossulfônico) 20 mM pH 9,0, 500 mM NaCl, 1 mM de β -mercaptoetanol e 2 mM PLP. Nos passos seguintes, foi-se diminuindo em 0,5 mM a concentração de ureia a cada 24 h, até sua total retirada.

1.3.9 Dicroísmo circular (CD)

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-80 no LNBio com aproximadamente 500 μ L da proteína pura reenovelada a 0,1 mg mL⁻¹ em tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl e comprimentos de onda de 200 a 240 nm intervalo de 1 nm, a 10 °C, caminho ótico de 1 mm em cubeta de quartzo. Também se avaliou por CD a estabilidade térmica da proteína no intervalo de temperatura entre 10 °C e 98 °C, aquecimento e posterior resfriamento.

As análises dos espectros de CD foram realizadas com o pacote CDPro, que inclui os programas SELCON3, CONTINLL e CDSSTR para estimar a porcentagem de estrutura secundária a partir da comparação dos dados experimentais com espectros de um grupo de 43 proteínas de referência.

Quanto à atividade, foi ensaiada por espectrofotometria na reação de interconversão entre L-alanina e D-alanina. A atividade no sentido de D- para L- foi determinada com a mistura contendo 100 mM CHES pH 9,0, 0,5 U de L-alanina desidrogenase, 50 mM D-alanina, 2,5 mM NAD⁺ e a própria enzima. O aumento da absorbância a 340 nm devido à formação de NADH a 37 °C foi monitorado.

1.3.9 Ensaio enzimático

O ensaio enzimático foi realizado por espectrofotometria da reação de conversão entre L-alanina e D-alanina. A atividade no sentido de D- para L- foi determinada com a mistura contendo 100 mM CHES pH 9,0, 0,5 U de L-alanina desidrogenase, 50 mM D-alanina, 2,5 mM NAD⁺ e a própria enzima. O aumento da absorbância a 340 nm devido à formação de NADH a 37 °C foi monitorado.

1.3.10 Modelagem por homologia

A ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990) do website National Center for Biotechnology Information (NCBI) foi configurada para encontrar proteínas com estruturas depositadas no RCSB PDB com similaridades e identidades com a *TcAlr_longa*.

As estruturas selecionadas foram sobrepostas com o programa Multiprot (SHATS; NUSSINOV; WOLFSON, 2002) e o alinhamento entre as sequências foi realizado com o programa T_coffee3D (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). O alinhamento estrutural e os PDBs das proteínas selecionadas foram utilizados como arquivos de entrada para o programa Modeller (ESWAR et al., 2006). Este programa foi configurado com os parâmetros “default” e foram gerados trezentos modelos tridimensionais da proteína alvo, (ESWAR et al., 2006). As estruturas foram visualizadas pelo programa Pymol (SCHRODINGER, 2010) e os ligantes pelo LIGPLOT v.4.5.3 (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1996).

Os trezentos modelos foram validados em relação à pontuação Discrete Optimized Protein Energy (DOPE) (SHEN; SALI, 2006) e ao gráfico de Ramachandran com o uso do programa Procheck (LASKOWSKI et al., 1993). O modelo escolhido foi o que apresentou menor valor de DOPE e que não apresentava resíduos pertencentes ao sítio ativo nas regiões não permitidas do gráfico de Ramachandran.

1.3.11 Análise do modelo gerado por homologia

O modelo obtido por homologia da *TcAlr_longa* foi submetido ao banco de dados PDBsum (LASKOWSKI, 2009) a fim de analisar a estrutura secundária e a topologia. A sequência de aminoácidos das estruturas tridimensionais selecionadas como molde e a *TcAlr_longa* foram alinhadas pelo T_coffee3D. A visualização do alinhamento se deu pelo programa ALINE (BOND; SCHUTTELKOPF, 2009) com o fundo do mesmo colorido de acordo com a convenção de Alscript Calcons (BARTON, 1993); as estruturas secundárias foram estimadas pelo programa DSSP (KABSCH; SANDER, 1983).

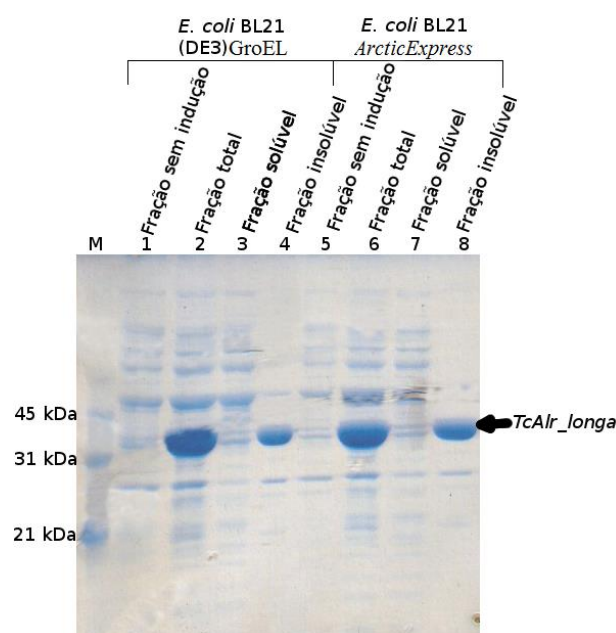
1.4 Resultados e discussões

1.4.1 Expressão e purificação da fração solúvel

A expressão heteróloga da *TcAlr_longa* com massa molecular monomérica de 42 kDa, 388 aminoácidos e pI teórico de 7,58 (ProtParam (GASTEIGER et al., 2005)) em *E. coli* BL21(DE3) GroEL foi analisada por SDS-PAGE (12%) (Figura 10), a comparação da fração sem indução (raia 1) e com indução (raia 2) revela que houve expressão da proteína. Ao se comparar a fração solúvel (raia 3) com a fração insolúvel (raia 4), observa-se que a proteína expressa está em maior destaque na fração insolúvel.

Na tentativa de aumentar o rendimento da proteína expressa para a fração solúvel, duas abordagens podem ser utilizadas, uma consiste em abaixar a temperatura e outra incluir chaperonas, ambas durante o período de indução (SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2008). A utilização de cepa bacteriana *E. coli* BL21 *ArcticExpress* (BELVAL et al., 2015) favorece a expressão no solúvel porque expressa conjuntamente duas chaperonas adaptadas a temperaturas baixas, 13 °C, que auxiliam no enovelamento da proteína superexpressa. Entretanto, para a proteína em estudo, a abordagem não apresentou melhora na fração solúvel, conforme analisado por SDS-PAGE (12%) na Figura 10.

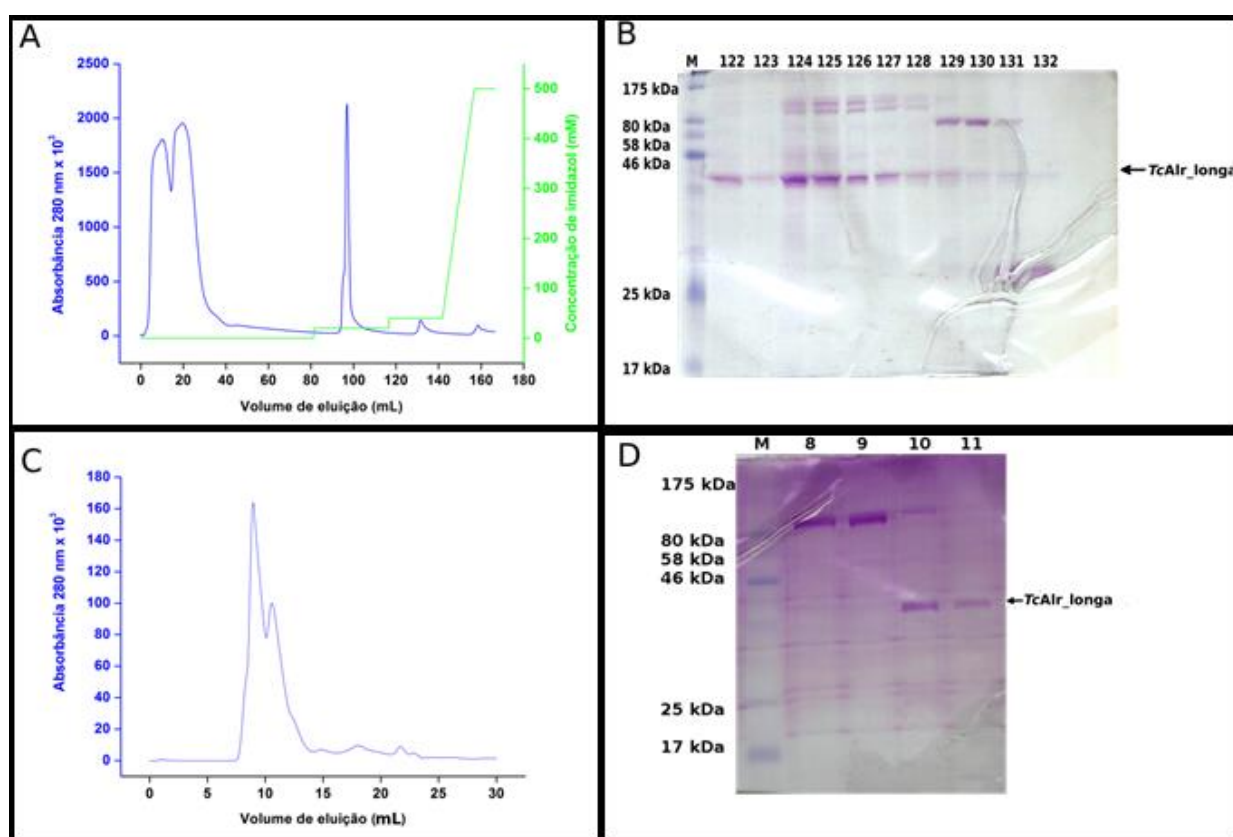
Figura 10: SDS-PAGE (12%). Raia M: marcador de massa molar. Raias 1, 2, 3 e 4: frações sem indução, total, solúvel e insolúvel, respectivamente, referentes à expressão em *E. coli* BL21 (DE3) GroEL. Raias 5, 6, 7 e 8: frações sem indução, total, solúvel e insolúvel, respectivamente, referentes à expressão em *E. coli* BL21 *ArcticExpress*.



Fonte: O autor

Com a fração solúvel, realizou-se purificação por cromatografia por afinidade a níquel, cujo perfil cromatográfico é representado na Figura 11 (A). A análise por SDS-PAGE (12%) (Figura 11 (B)) das frações indicaram que a *TcAlr_longa* foi eluída com contaminantes em 8% do tampão B, que corresponde a 40 mM de imidazol. Essas frações da *TcAlr_longa* com contaminantes foram submetidas à purificação por exclusão por tamanho, cujo perfil cromatográfico é representado na Figura 11 (C). A análise das frações por SDS-PAGE (12%) (Figura 11 (D)) revelaram frações relativamente puras. O rendimento desta purificação em condições nativas foi de 0,05 mg por litro de meio de cultura.

Figura 11: (A) Cromatograma referente à purificação por afinidade a níquel. (B) SDS-PAGE (12%), raia M corresponde ao marcador de massa molar e a numeração das demais raia refere-se às frações da purificação por níquel. (C) Cromatograma referente à purificação por exclusão por tamanho. (D) SDS-PAGE (12%), raia M corresponde ao marcador de massa molar e a numeração das demais raia refere-se às frações da purificação por exclusão por tamanho.



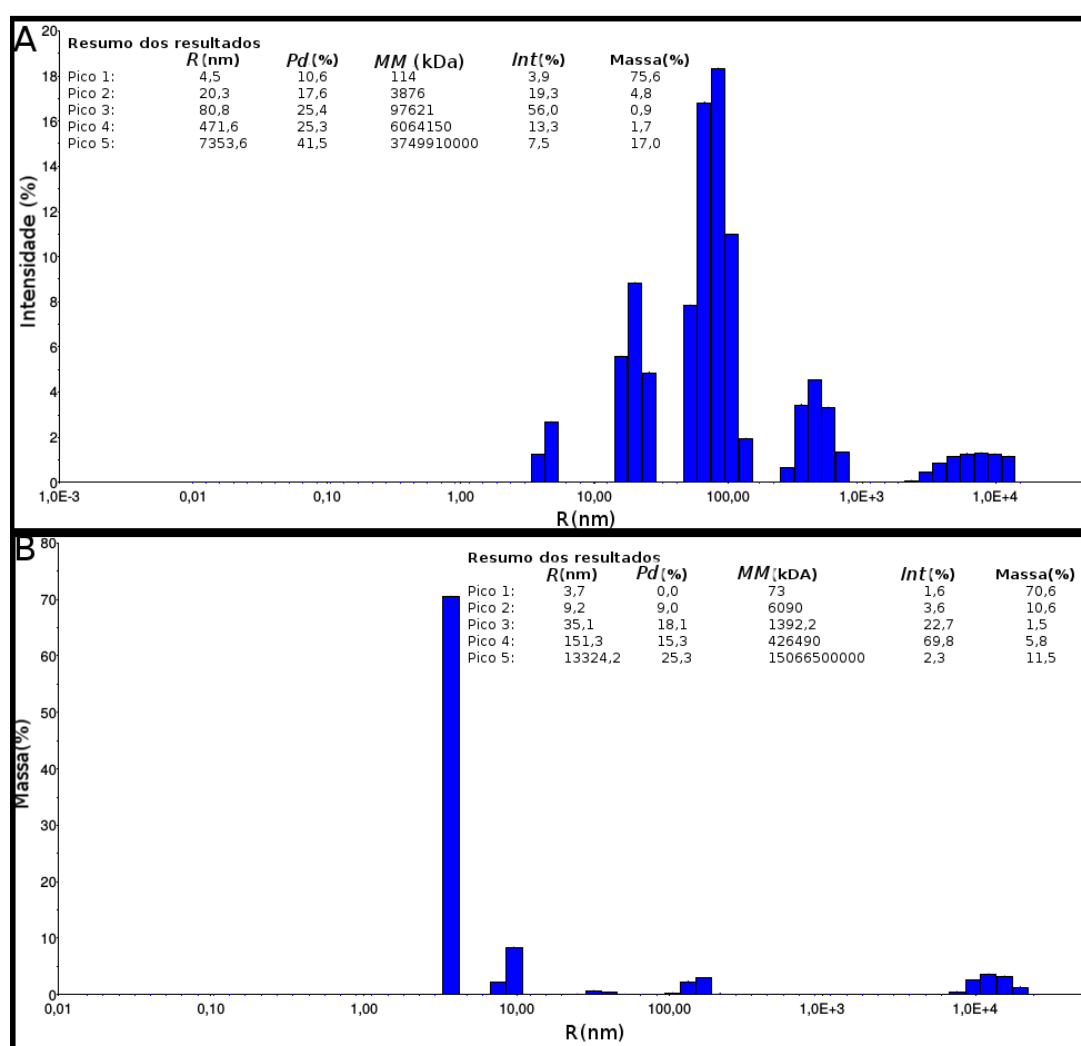
Fonte: O autor

1.4.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Após a segunda etapa de purificação, as frações puras foram reunidas e concentradas. Durante a concentração apareceram precipitados indicando perda de proteína em solução. A

técnica de espalhamento dinâmico de luz foi utilizada para investigar o estado de agregação da TcAlr_longa remanescente em solução, estimada na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Os resultados (Figura 12 (A) e (B)) indicaram que a solução proteica estaria constituída majoritariamente por cinco populações com tamanhos diferentes em 4 e 18 °C e a proteína em solução apresentava agregados em ambas às temperaturas, mesmo em baixa concentração, revelando que a solução não era monodispersa.

Figura 12: Análise do perfil de tamanho encontrado para as amostras de TcAlr_longa obtida por meio do espalhamento dinâmico de luz. Nos gráficos está representado o perfil de distribuição do tamanho em função da: (A) intensidade a 4 °C e (B) massa a 18 °C. *R* é o raio hidrodinâmico, *Pd* é a polidispersão, *MM* é a massa molar e *Int* é a intensidade.



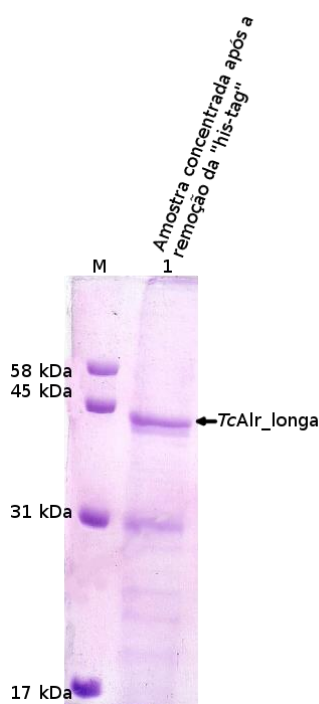
Fonte: O autor

Na tentativa de favorecer a desagregação, duas abordagens foram consideradas: a adição de compostos e a alteração do pH. Quatro compostos foram adicionados separadamente à solução da proteína: KCl, NaCl (SAHIN et al., 2010), Triton ou glicerol (HAMADA; ARAKAWA; SHIRAKI, 2009). As concentrações dos compostos usados variaram entre 0,1 e 1

mol L⁻¹. O pH da solução foi alterado por meio de diálise na faixa entre 4 e 10 (SAHIN et al., 2010). Entretanto, durante a concentração, observava-se a formação de precipitado com qualquer abordagem.

Outra tentativa foi remover enzimaticamente a “his-tag” da porção N-terminal, já que na literatura há relatos de alanina racemases em concentração de 10 mg mL⁻¹ sem “his-tag” (HOFFMANN et al., 1994; STRYCH et al., 2007; COUÑAGO et al., 2009). Após a remoção, a solução proteica foi concentrada até 2 mg mL⁻¹; durante esse processo não se observaram precipitados. A análise por SDS-PAGE (12%) (Figura 13) do concentrado indica que a proteína foi concentrada, mas não está totalmente pura. O rendimento obtido foi 2 mg mL⁻¹ em 100 µL de solução e pode ser considerado baixo quando comparado com proteínas concentradas a 10 mg mL⁻¹, considerando-se o propósito deste trabalho. O baixo rendimento e o alto custo de protease para a remoção da “tag” inviabilizou a realização de ensaios de cristalização.

Figura 13: SDS-PAGE (12%). Raia M: marcador de massa molar. Raia 1: amostra concentrada até 2 mg mL⁻¹ após a remoção da “his-tag”.



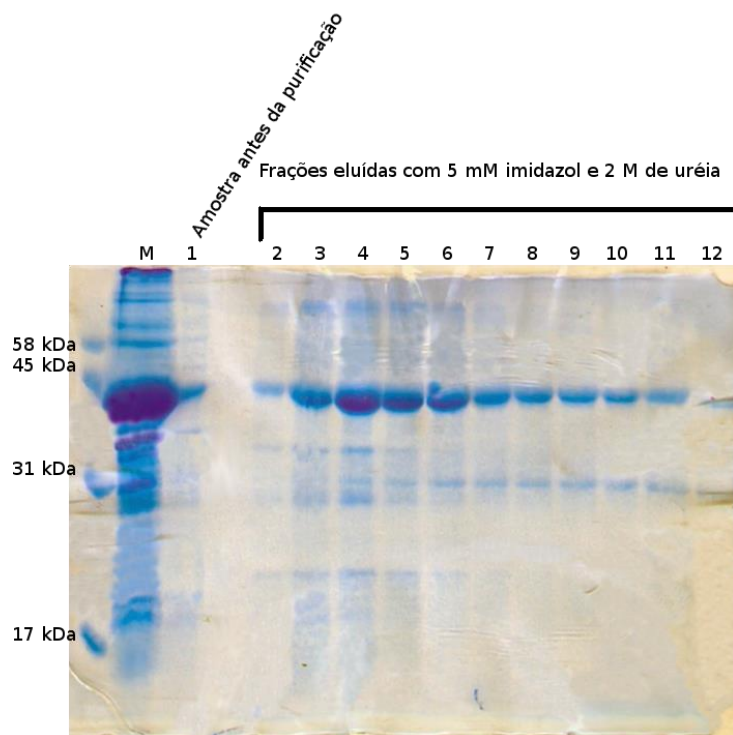
Fonte: O autor

1.4.3 Recuperação da TcAlr_longa a partir da fração insolúvel

A fração insolúvel obtida a partir da expressão foi solubilizada em tampão A com 8 M de ureia para a desagregação das proteínas. A Figura 14 mostra o SDS-PAGE (12%) das frações da

cromatografia realizada por gravidade; o gel revela que a TcAlr_longa foi eluída no tampão A contendo 500 mM de imidazol e 2 M de ureia.

Figura 14: SDS-PAGE (12%) da cromatografia de afinidade em resina de níquel por gravidade. Raia M: marcador de massa molar. Raias 1: amostra antes da purificação. Raias 2-12: frações eluídas com 500 mM imidazol e em 2 M de ureia.



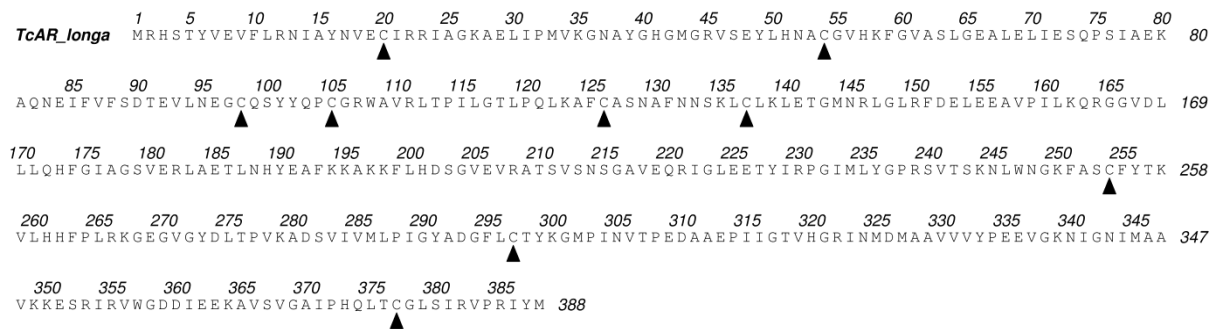
Fonte: O autor

Após a purificação, o reenovelamento *in vitro* foi realizado em vários passos de diálise para retirada gradativa da ureia. Inicialmente, a concentração de ureia era de 2 M, os passos seguintes implicaram reduzi-la de 0,5 em 0,5 M até a concentração de 0,5 M, a partir do que foi-se reduzindo a concentração sequencialmente pela metade, até que esta ficasse desprezível. Todo o processo de reenovelamento foi realizado à temperatura constante de 4 °C e sob agitação lenta a fim de diminuir a cinética e com concentração da proteína a 0,1 mg mL⁻¹ para minimizar a formação de agregados devida a alta concentração.

Para a composição do tampão de diálise, realizou-se primeiramente um estudo acerca da estrutura da alanina racemase de outros organismos (CONTI et al., 2011) a fim de analisar a localização do sítio ativo e a interação do PLP na estrutura. Observou-se que o cofator se localiza na interface dos monômeros e está ligado covalentemente à enzima, por isso, adicionou-se PLP até 2 mM ao tampão, com a intenção de facilitar a dimerização. Na sequência de aminoácidos da TcAlr_longa foram detectadas 9 cisteínas (Figura 15), mas a quantidade de cisteínas destas varia de 1 a 7 nas homólogas, embora, como relatado, elas não apresentem pontes dissulfeto

(SCALETTI; LUCKNER; KRAUSE, 2012), então, para evitar a formação de ligações indesejadas, adicionou-se ao tampão de diálise 20 mM de β -mercaptoetanol.

Figura 15: Sequência de aminoácidos da TcAlr_longa com 388 aminoácidos destaque para as 9 cisteínas.

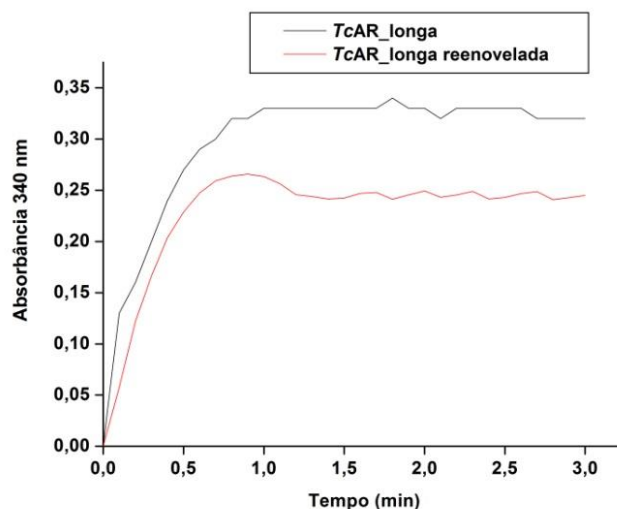


Fonte: O autor

1.4.4 Ensaio enzimático

A comparação da atividade da proteína expressa na fração solúvel após a purificação com a da proteína insolúvel purificada e reenovada *in vitro*, foi realizada para analisar se após o processo de reenvolvimento a proteína apresentava atividade. A Figura 16 mostra que em ambos os ensaios houve aumento da absorbância em 340 nm, característico de funcionalidade da proteína; observa-se, todavia, uma diferença entre as hipérboles apesar de se usar a mesma concentração das enzimas para o ensaio, assim, hipotetiza-se que não deve haver exatamente a mesma concentração de substrato em ambos os ensaios.

Figura 16: Ensaio enzimático comparando as atividades de *TcAlr_longa*.



Fonte: O autor

1.4.5 Dicroísmo circular (CD)

Para a análise do conteúdo de estruturas secundárias da *TcAlr_longa* reenovelada realizou-se um ensaio de CD da amostra. A Figura 17 (A) compara a proteína após o reenovelamento e em presença de 8 M de ureia. Observa-se que na presença de ureia a proteína não apresenta sinal de dicroísmo, caracterizando um estado sem estrutura secundária. Já no espectro após a retirada total da ureia, há um mínimo mais evidente por volta de 222 nm e outro menos evidente por volta de 208 nm, ou seja, a proteína reenovelou-se. Espectros que apresentam mínimos nesses comprimentos de ondas são característicos de proteínas que apresentam estrutura secundária de hélices- α e fitas- β na mesma proporção (KELLY; PRICE. 2000).

Os três programas do pacote CDpro, em média, indicaram que a proteína *TcAlr_longa* é constituída de 13,3% de hélice- α regular e 14,3% fita- β regular, Tabela 2. Com uma análise das estruturas de alaninas racemases homólogas, observou-se que é característico dessas proteínas uma mistura de estruturas secundárias hélice- α e fita- β em média em quantidades proporcionais (CONTI et al., 2011).

Tabela 1: Estimativas de estruturas secundárias obtidas pelos programas CONTINLL, SELCON3, CDSSTR.

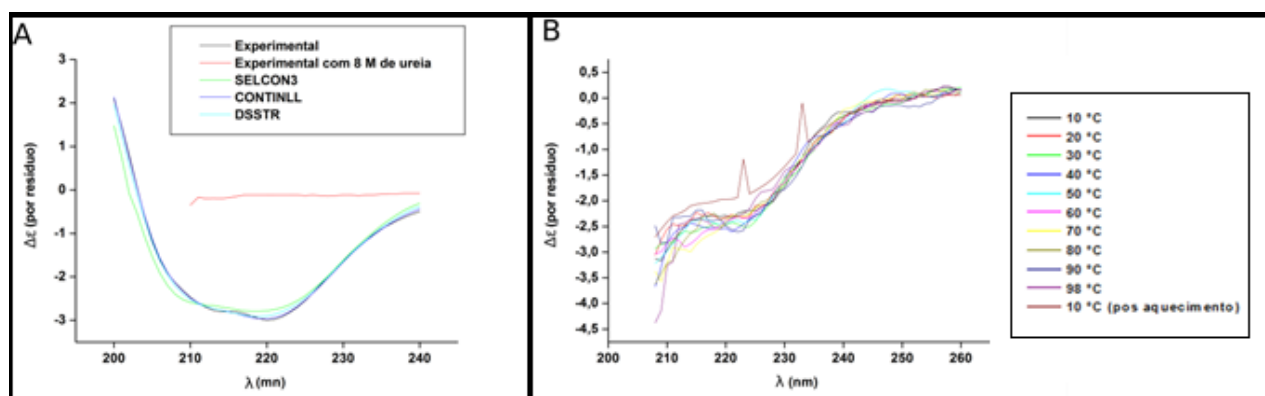
Estruturas secundárias	CONTINLL	SELCON3	CDSSTR	MEDIA±DP
Hélices- α (regulares) (%)	13	13	14	13,3 ± 0,8
Hélices- α (desordenadas) (%)	10	11	11	10,6± 0,5
Fitas- β (regulares) (%)	15	13	15	14,3±0,9
Fitas- β (desordenadas) (%)	10	9	10	9,6±0,8
Loops (%)	28	29	29	28,6±0,4
Desordenadas (%)	21	23	21	21,6±0,9

Fonte: O autor

DP: Desvio padrão

Realizou-se também um estudo de desnaturação térmica da proteína reenovelada. A Figura 17 (B) mostra um gráfico sobreposto dos espectros de dicroísmo da proteína em temperaturas de 10 °C até a 98 °C, variando-se no intervalo de 10 °C (exceto a última). Após o aquecimento, houve o resfriamento gradativo da proteína até a temperatura de início, 10 °C, em que houve uma nova leitura.

Figura 17: (A) Espectro de CD da TcAlr_longa reenovelada. (B) Espectro de CD da TcAlr_longa reenovelada em várias temperaturas.



Fonte: O autor

Pode-se afirmar que, mesmo com o aumento da temperatura até 98 °C, a proteína apresenta estrutura secundária, com resistência à desnaturação térmica, o que é característico para as alaninas racemases (YOSHIMURA; ESAKI; SODA, 1992; YOKOIGAWA et al., 1993). O resultado da atividade, somado ao da espectroscopia CD, indicam que o protocolo de

reenovelamento foi realizado com sucesso.

O desenvolvimento do protocolo de recuperação da TcAlr_longa do precipitado permite a recuperação da proteína da fração insolúvel e pode auxiliar na busca de inibidores específicos.

1.4.6 Modelagem por homologia

Foi encontrado um total de 11 sequências similares, que estão descritas na Tabela 3. O grau de identidade com a de TcAlr_longa foi entre 24 e 27%; segundo SANTOS FILHO e ALENCASTRO, (2003), para a construção do modelo por homologia, pode-se utilizar sequências com identidade acima de cerca de 25 %.

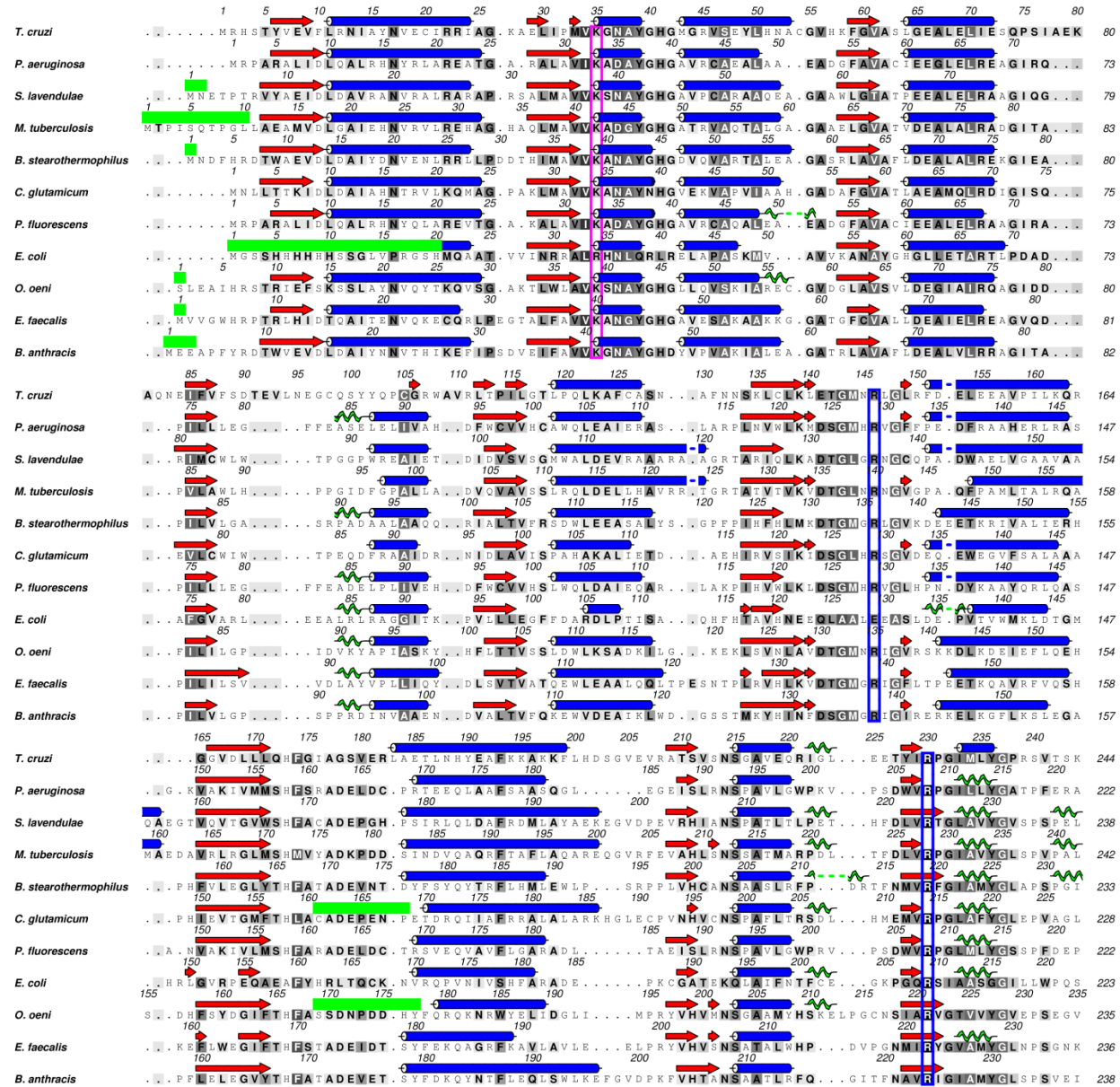
Tabela 2: Lista de moldes para a modelagem por homologia.

Código do PDB	Resolução (Å)	Organismo	Identidade (%)	Cobertura (%)
2DY3	2,10	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	26	94
3HA1	1,95	<i>Bacillus anthracis</i>	27	99
1XQK	1,90	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	27	99
2VD9	1,47	<i>Bacillus anthracis str. ames</i>	27	99
3CO8	2,10	<i>Oenococcus oeni</i>	26	95
1XFC	1,70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26	72
3E5P	1,90	<i>Enterococcus faecalis</i>	27	98
1RCQ	2,50	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27	97
1VFH	1,45	<i>Streptomyces lavendulae</i>	25	98
3B8U	2,00	<i>Escherichia coli K-12</i>	25	84
2ODO	2,40	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	24	93

Fonte: O autor

O alinhamento entre as sequências selecionadas está apresentado na Figura 18. Os resíduos que fazem parte do sítio catalítico da TcAlr_longa são Arg145, Arg230, Phe273, Met325 e Asp326 e estão indicados por retângulos azuis vazados. A Lys35, indicada pelo retângulo rosa vazado, é o resíduo que inicia a catálise da enzima e é possível observar que é conservada entre os organismos.

Figura 18: Alinhamento da sequência de aminoácidos entre as Alrs de *T. cruzi*, *P. aeruginosa*, *S. lavendulae*, *M. tuberculosis*, *G. stearothermophilus*, *C. glutamicum*, *P. fluorescens*, *E. coli*, *O. oeni*, *E. faecalis*, *B. anthracis*. Os resíduos estão coloridos de acordo com convenção de Alscript calcons. Em vermelho estão as fitas- β , em azul hélices- α e em verde hélices 3_{10} e π . O retângulo rosa vazado indica o resíduo que inicia a catálise e os retângulos azuis vazados indicam os demais resíduos do sítio ativo.

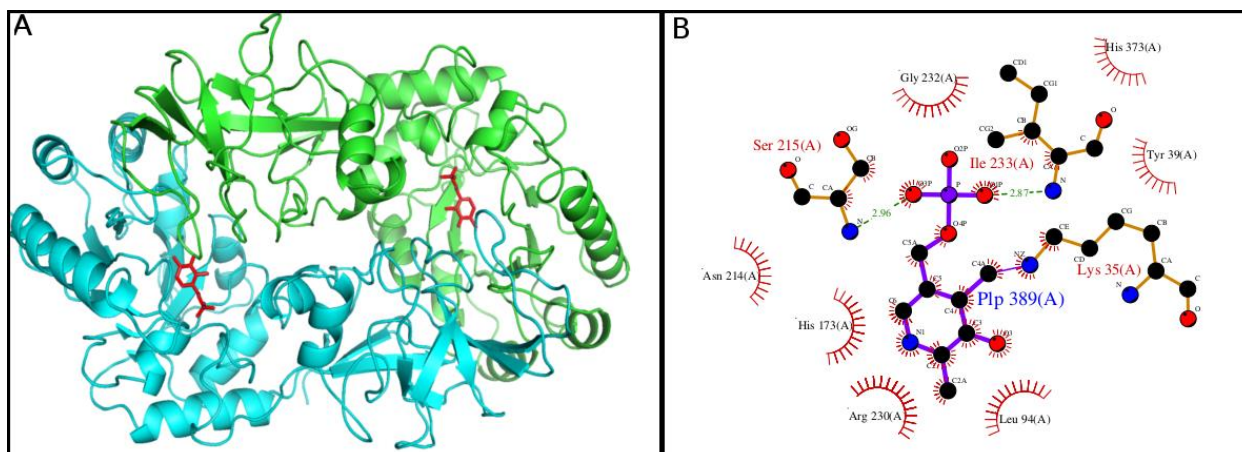




Fonte: O autor

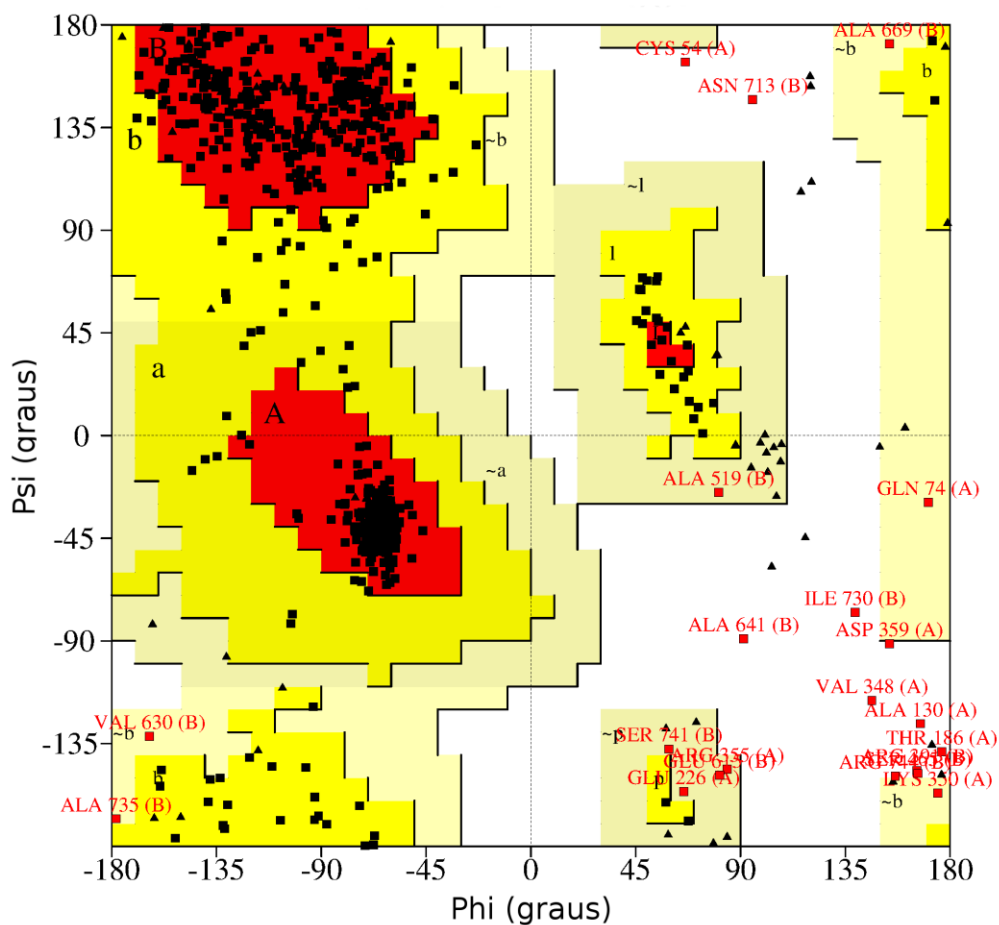
O modelo gerado por homologia selecionado foi aquele que apresentou o valor de Dope escore mais negativo (-42254,1), representando menor energia e maior estabilidade, e que também não apresentou resíduos do sítio ativo em regiões proibidas no gráfico de Ramachandran. O modelo final está apresentado na Figura 19 (A), gerado com o cofator PLP no sítio ativo. A Figura 19 (B) mostra as interações do cofator com os resíduos da estrutura gerada. O gráfico de Ramachandran está mostrado na Figura 20 e os índices listados na Tabela 4.

Figura 19: (A) Modelo por homologia da TcAlr_longa, em azul o monômero A, em verde o monômero B e em vermelho o cofator. (B) Interações entre o PLP e os resíduos da cadeia A.



Fonte: O autor.

Figura 20: Gráfico de Ramachandran para o modelo por homologia da TcAlr_longa. Em vermelho, amarelo escuro, amarelo claro e branco estão representadas as regiões favoráveis, adicionalmente permitidas, generosamente permitidas e proibidas, respectivamente.



Fonte: O autor

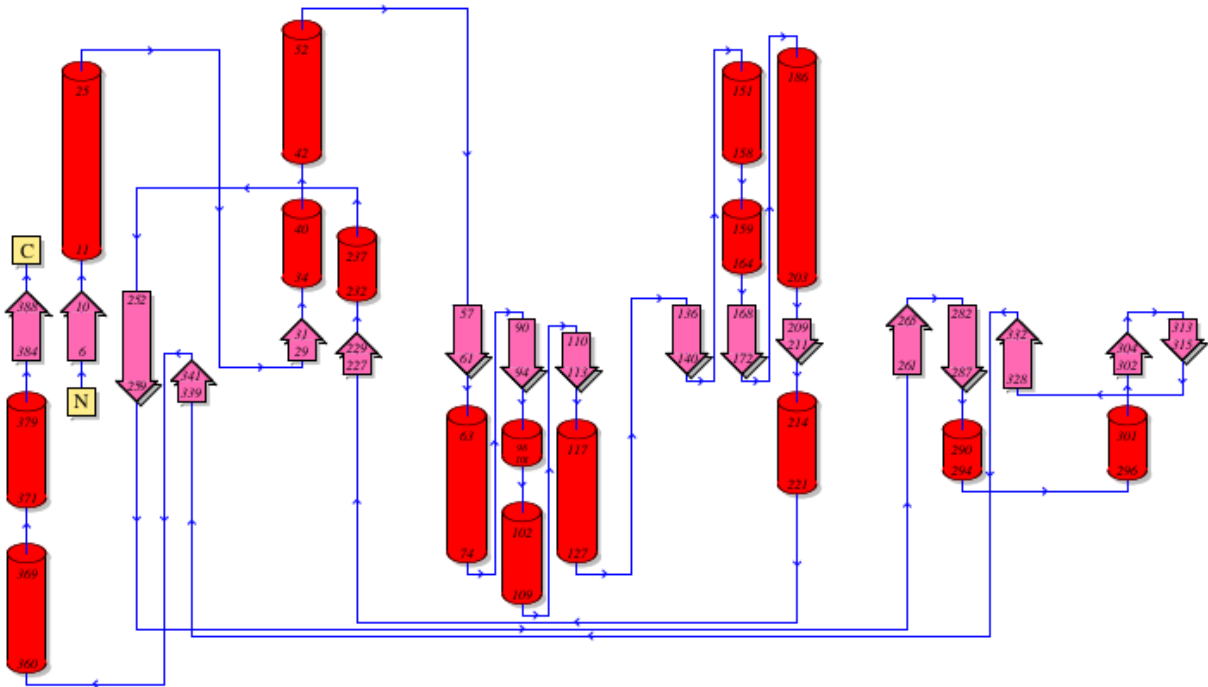
Tabela 3: Porcentagem dos resíduos em cada região do gráfico de Ramachandran.

Gráfico de Ramachandran	Resíduos (%) TcAlr_longa
Regiões permitidas energeticamente	82,9
Regiões adicionalmente permitidas	14,0
Regiões generosamente permitidas	1,5
Regiões proibidas	1,7

Fonte: O autor

A estrutura de TcAlr_longa com 388 resíduos obtida por modelagem foi submetida ao banco de dados PDBsum (Figura 21). Os resultados para os elementos de estrutura secundária indicaram que o monômero de TcAlr_longa é composto por 32,47% de hélices- α , 14,43% de fitas- β e 53,1% de desordem ("loops" e "turns").

Figura 21: Topologia da estrutura de TcAlr_longa predita pelo banco de dados PDBsum. As fitas- β e hélices- α estão representadas em rosa e vermelho, respectivamente, as regiões N- e C- terminal estão ilustradas em amarelo claro.



Fonte: O autor

1.5 Conclusões

A expressão heteróloga da TcAlr_longa com “his-tag” utilizando o sistema *E.coli* BL21 (DE3) GroEL quanto em *E.coli* BL21 ArcticExpress representou uma dificuldade inicial para o desenvolvimento do trabalho, uma vez que não foi possível obter proteína solúvel em quantidade necessária para a realizar ensaios de cristalização.

Análise por DLS revelou que a TcAlr_longa superexpressa apresentava extensa agregação em solução apesar de já relativamente diluída e isso justificaria o fato do aparecimento de precipitado durante a concentração. Por outro lado, após a remoção da “his-tag”, não houve aparecimento de precipitados e análises por SDS-PAGE (12%) e dosagem proteica do concentrado confirmaram que a remoção da tag foi essencial para obter a proteína em maior concentração. Devido ao alto custo da protease e por entender que vários passos de manipulação da proteína levam à perda de rendimento, é possível dizer que para viabilizar ensaios de cristalização a proteína deverá ser expressa sem a “his-tag”.

No entanto, para estudos que não demandam proteína em alta concentração, a construção com “his-tag” pode ser uma abordagem utilizada, já que se desenvolveu um protocolo de recuperação da proteína a partir da fração insolúvel.

Análises por dicroísmo circular e ensaio enzimático indicaram que o protocolo para o reenovelamento “*in vitro*” foi realizado com sucesso e a cauda de histidina não interferiu no reenovelamento e na atividade da enzima. Considerando-se que esta enzima não está presente em humanos e já é alvo para desenvolvimento de antibióticos para as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, o protocolo desenvolvido para o reenovelamento da proteína poderá auxiliar em futuros trabalhos que busquem inibidores específicos para enzima TcAlr_longa.

CAPÍTULO 2

Gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenase de *Naegleria gruberi* (NgGAPDH)

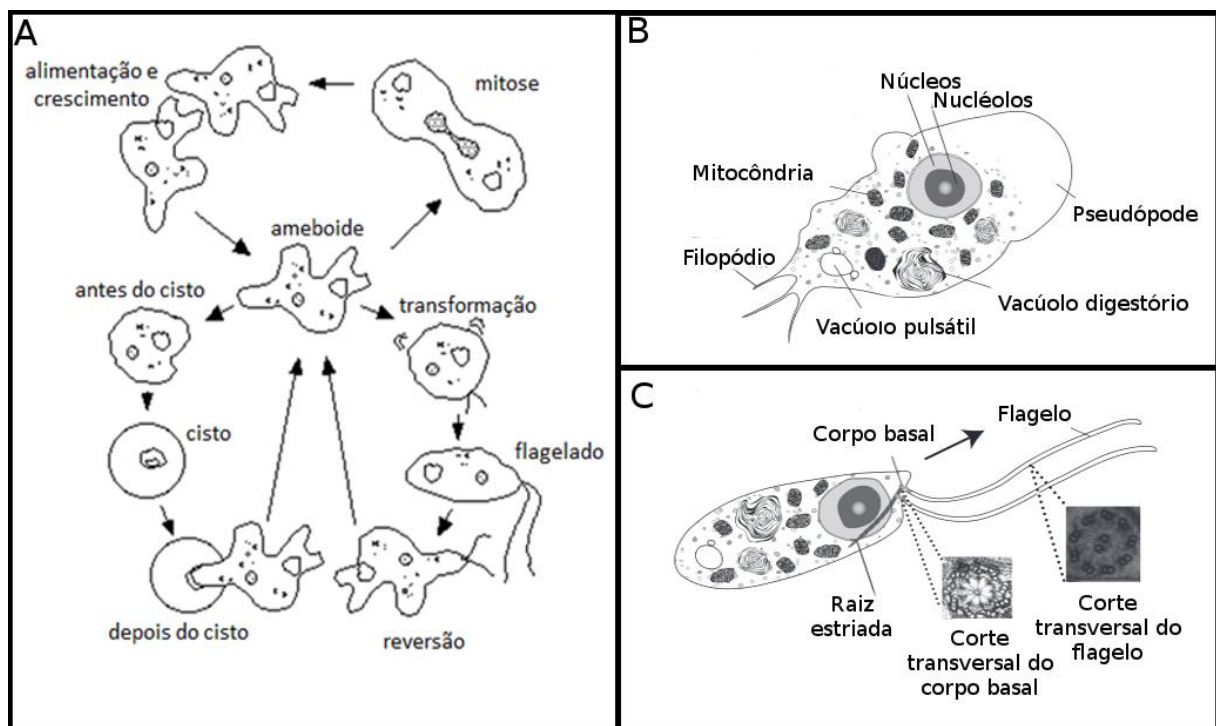
2.1 Introdução

2.1.1 *Naegleria gruberi*

N. gruberi é uma ameba pertencente ao filo Percolozoa, que teve seu genoma sequenciado por FRITZ-LAYLIN et al., (2010). É heterotrófica de vida livre, encontrada em ambientes aeróbios, água doce e solos úmidos (FULTON, 1970, 1993; DE JONCKHEERE, 2002).

Em seu ciclo de vida (Figura 22 (A)), apresenta uma forma predominante, que é a ameboide (Figura 22 (B)), na qual, mede cerca de 15 µm e pode se reproduzir a cada 1,6 h, quando se alimenta de bactérias, mas quando entra em contato com o solo ou um líquido, como água, e tem a sua fonte de alimento retirada, sofre transformação para a forma flagelada (Figura 21 (C)) (FULTON, 1993). Esta forma, por sua vez, auxilia na locomoção para um local mais favorável. Curiosamente, não persiste nesta forma, voltando à ser ameboide em questão de horas, possivelmente devido ao fato de que pode se alimentar e reproduzir apenas enquanto está nesta forma. Há outra forma, não ativa, que *N. gruberi* assume, conhecida como de cisto (CARPRETTE, 2007; RODRIGUEZ-EZPELETA et al., 2007; FRITZ-LAYLIN et al., 2010).

Figura 22: (A) Ciclo de vida da *N. gruberi*. (B) Forma ameboide. (C) Forma flagelada.



Fonte: Adaptado de CARPRETTE, 2007 e FRITZ-LAYLIN et al., 2010.

Há mais de cem espécies de *Naegleria*, mas apenas três são patogênicas (Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 2008). *N. gruberi* não é patogênica, mas apresenta características semelhantes às de *Naegleria fowleri*, que, embora viva livremente em água doce aquecida, é um agente patogênico oportunista que pode causar Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP), fatal em humanos (VISVESVARA et al., 2007). Detectada pela primeira vez em 1965 por Fowler e Carter na Austrália, esta ameba é adquirida através das vias aéreas durante a natação ou por meio de inalação de cisto durante tempestades de poeira. A ameba invade o cérebro e leva a inflamação e dano tecidual. Entre os sintomas estão febre, dor de cabeça, anorexia, náuseas, vômitos e sinais de irritação meníngea. Dependendo do estado fisiológico de acolhimento do infectado, em cerca de 70 h após o início dos sintomas, ele (a) é levado à morte.

O estudo de microorganismos eucarióticos primitivos é essencial para melhor compreensão da evolução dos eucariotos. *N. gruberi* é uma ameba primitiva e o sequenciamento do seu genoma revelou uma alta similaridade com organismos evoluídos (FRITZ-LAYLIN et al., 2010). Segundo BABAI et al., (2010), uma via metabólica de interesse para o estudo evolutivo é a via glicolítica, por ela ser altamente conservada entre as espécies; por isso, a caracterização estrutural e funcional de enzimas chave dessa via contribuirá para a melhor compreensão do metabolismo eucariótico primitivo (FRITZ-LAYLIN et al., 2010).

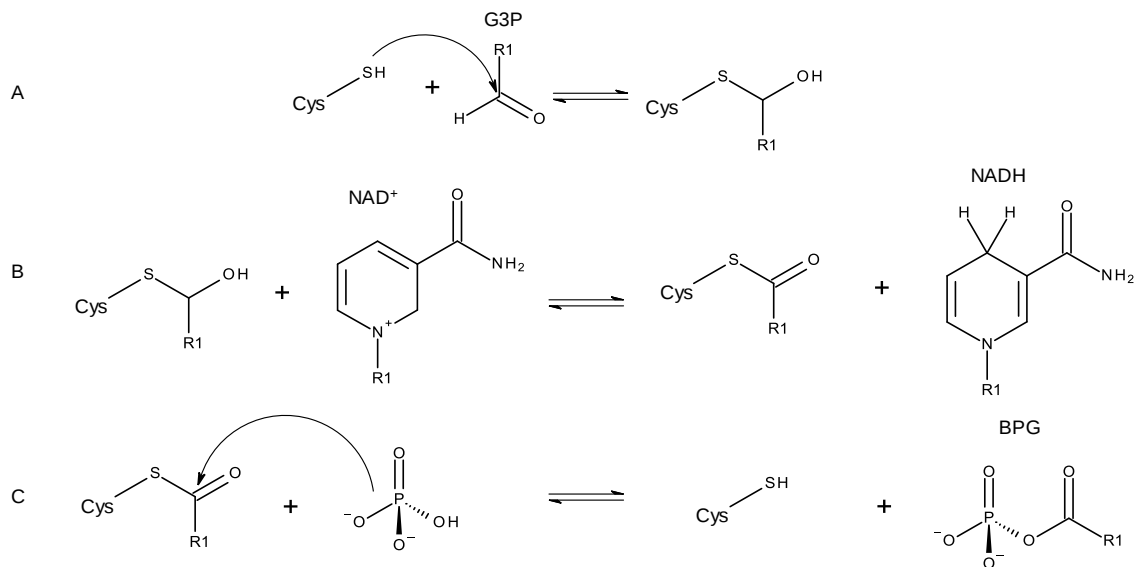
A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é uma das enzimas que participada via glicolítica. Estudos indicam que os domínios catalíticos desta proteína nos eucariotos e procariotos apresentam 60% de identidade, por isso, os genes desta enzima são frequentemente usados como marcadores filogenéticos (CANBACK et al., 2002; IDDAR et al., 2005; BUHAY et al., 2007), além de auxiliar no estudo de genética, expressão e regulação, e podem descrever as posições taxonômicas de diversas espécies em diferentes níveis (LAWRENCE et al., 1991; SCHLAEPER; ZUBER 1992; LIAUD et al., 1994; BROWN et al., 2000; DHEDA et al., 2004; RUBIE et al., 2005).

2.1.2 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12), da classe das enzimas oxidorreduzases, catalisa a sexta etapa da via glicolítica. A sua ação é a conversão do gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 1,3-Bifosfoglicerato (BGP) na presença do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) (BAKER et al., 2014).

O mecanismo de ação da GAPDH inicia-se com o ataque do grupo sulfidríla da cisteína catalítica à carbonila do grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato, resultando em um hemiacetal. (Figura 23 (A)). Em seguida, o hemiacetal sofre oxidação pela ação do NAD^+ , que se reduz a NADH (Figura 23 (B)). Na última etapa ocorre o ataque nucleofílico do fosfato inorgânico ao tioéster, restaurando a sulfidríla da cisteína (Figura 23 (C)).

Figura 23: Esquema do mecanismo de ação da GAPDH. (A) formação do hemiacetal; (B) oxidação do hemiacetal; (C) formação do 1,3-bifosfoglicerato (BPG).



Fonte: O autor

Além de seu papel na via glicolítica, a GAPDH é uma proteína com múltiplas funções; há evidências de sua participação no desenvolvimento de retinopatia diabética (KANWAR; KOWLURU, 2009), autofagia celular, regulação do gene da histona, sinalização celular mediada pelo receptor, apoptose e resposta ao estresse oxidativo, entre outras (SAWA et al., 1997; SIROVER, 1997). Além disso, estudos apontam que essa enzima pode estar envolvida em várias doenças neurodegenerativas (por exemplo, mal de Alzheimer (BUTTERFIELD; HARDAS; LANGE, 2010), mal de Parkinson e doença de Huntington), câncer de próstata e distúrbios metabólicos (BERRY, 2004).

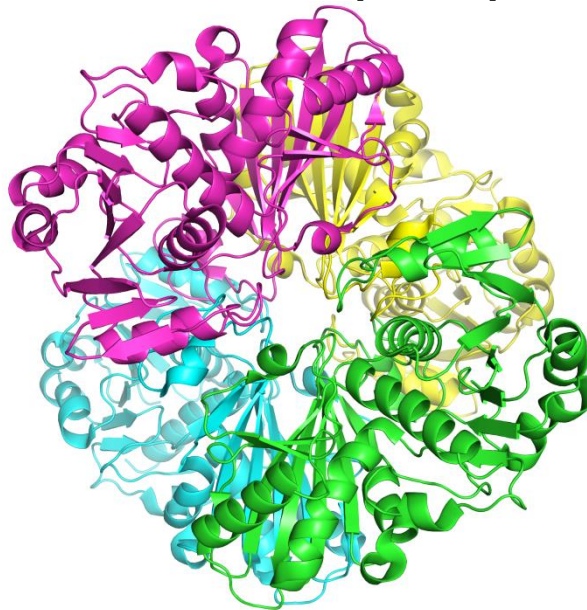
A GAPDH é altamente distribuída na natureza em uma variedade de espécies, como de bactérias, animais, etc. (FOTHERGILL-GILMORE; MICHELS 1993). É encontrada principalmente no citosol e em algumas organelas (por exemplo, cloroplastos). Devido a seu

papel fundamental no metabolismo energético, sua abundância, seu fácil preparo e sua conservação notável durante a evolução, esta enzima tem sido bem caracterizada.

Na literatura, há descrição de estruturas tridimensionais, depositadas no Protein Data Bank (PDB), de 39 organismos, entre eles, por exemplo: *T. cruzi* (glicosomal) (Código PDB 4LSM) (LADAME et al., 2003), *Trypanosoma brucei* (glicosomal) (Código PDB 4P8R) (VELLIEUX et al., 1993), *Leishmania mexicana* (glicosomal) (Código PDB 1GYP) (KIM et al., 1995), *Homo sapiens* (Código PDB 1ZNQ) (ISMAIL; PARK, 2005), *Oryza sativa* (Código PDB 3E6A) (TIEN et al., 2012), *Saccharomyces cerevisiae* (Código PDB 3PYM), *Homaurs americanus* (Código PDB 1GPD) (MORAS et al., 1975) e *Escherichia coli* (Código PDB 1GAD) (DUEE et al., 1996).

A partir da análise das estruturas, é possível afirmar que a GAPDH é uma proteína multimérica com massa molecular nativa entre 140 e 200 kDa composta por quatro monômeros idênticos de aproximadamente 35 a 50 kDa (ISMAIL; PARK, 2005) (Figura 24). Cada subunidade da enzima é formada por dois domínios, um para a interação com o NAD^+ e outro denominado domínio catalítico (HARRIS; WATERS, 1976). O enovelamento dessa enzima é conhecido como de Rossmann, já que a região central apresenta uma folha- β paralela torcida rodeada por hélices- α em ambos os lados (SEIDLER, 2013).

Figura 24: Representação da estrutura de GAPDH de *Homo sapiens* (código PDB 1ZNQ). A estrutura apresenta quatro monômero idênticos com massa molecular de 35 kDa, representados por cores distintas.



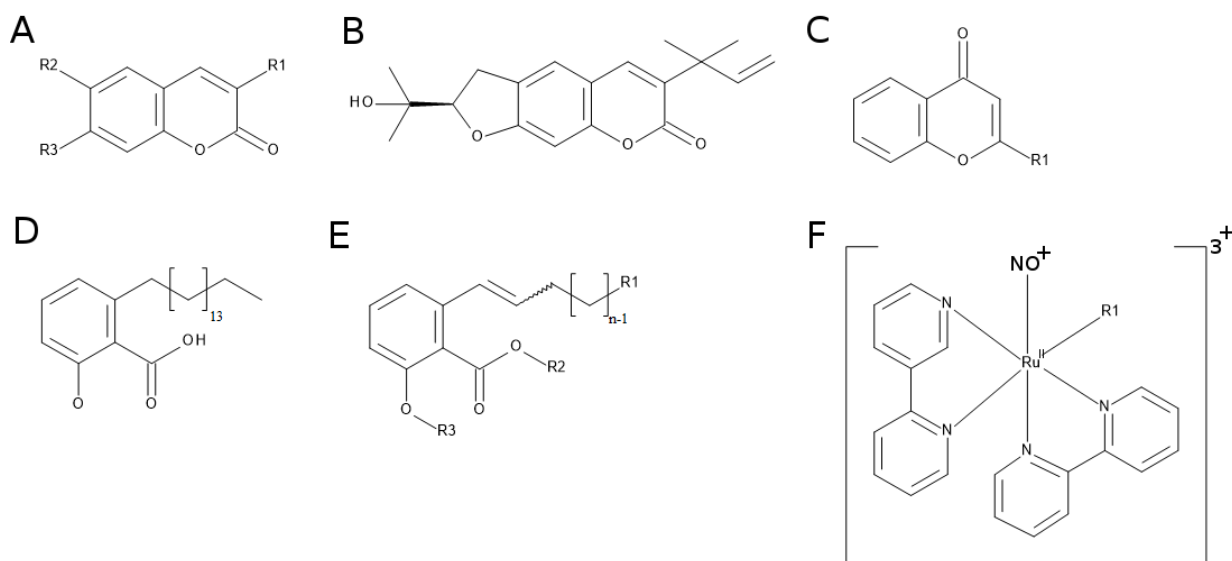
Fonte: ISMAIL; PARK, 2005.

A caracterização enzimática dessas enzimas revela que o pI está entre 4,25 e 9,1, a temperatura ótima entre 25 e 87 °C e o pH ótimo entre 7 e 10, além de serem proteínas com regulação alostérica, cuja propriedade cooperativa da ligação do cofator depende do organismo estudado (LEVITZKI, 1974; YUEQUAN; SHIYING; ZHENGJIONG, 2000).

Os tripanosomatídeos são altamente dependentes da glicólise como fonte de energia e essa grande dependência faz das enzimas glicolíticas alvos plausíveis para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos (GUIDO et al., 2010, DIAS; DESSOY, 2009). Um desses alvos é a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, por esse motivo foram desenvolvidos inibidores específicos para GAPDH de *T.cruzi*, *L. mexicana* e *T.brucei* (GUIDO et al., 2008); além disto, é considerada potencial alvo para o desenvolvimento de inibidores específicos para o tratamento da MAP (ONDARZA, 2007).

Atualmente existem vários inibidores específicos para a GAPDH descritos na literatura. Em um apanhado geral, os inibidores encontrados são de origem natural e sintética, e apresentam boa diversidade química (Figura 24). Quanto aos de origem natural, destacam-se cumarinas (Figura 25 (A) e (B)), flavonóides (Figura 25 (C)) e ácidos anacárdicos (Figura 25 (D)), quanto aos de origem sintética, destacam-se os derivados de nucleosídeos (Figura 25 (E)) e os complexos doadores de NO (Figura 25 (E)) (DIAS; DESSOY, 2009).

Figura 25: Inibidores de origem natural (A, B, C e D) e sintética (E e F) da enzima GAPDH de *T. cruzi* (PDB 3DMT).



Fonte: Adaptado de DIAS; DESSOY, 2009.

Estudos relatam que a GAPDH desempenha um papel fundamental para a sobrevivência de microorganismos patogênicos e por isso há 38 estruturas de GAPDHs determinadas, no entanto, pouco se sabe da estrutura das GAPDH's de organismos eucarióticos primitivos. Em função dos estudos realizados previamente e das informações publicadas sobre *N. gruberi*, propomos a caracterização estrutural e funcional da primeira GAPDH pertencente ao filo Percolozoa.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer as condições para produção da NgGAPDH de forma heteróloga em *E. coli*;
- Determinar os parâmetros cinéticos da enzima NgGAPDH;
- Estabelecer as condições de cristalização da NgGAPDH para a determinação da estrutura tridimensional por difração de raios-X;
- Realizar análise da estrutura obtida por cristalografia;
- Comparar a estrutura obtida com as demais GAPDHs disponíveis no PDB.

2.3 Materiais e Métodos

2.3.1 Obtenção do Clone Contendo o Gene da NgGAPDH

Realizou-se um estudo para decidir qual plasmídeo seria utilizado para a expressão da NgGAPDH. Os fatores levados em consideração no estudo foram: i) quais enzimas de restrição não clivavam a sequência de nucleotídeos do gene da NgGAPDH (com auxílio do programa BioEdit v.7.2.5) e fossem compatíveis com a região de múltipla clonagem do plasmídeo e ii) expressão de “his-tag” no N-terminal clivável por Trombina. Após a escolha, encomendou-se a preparação do plasmídeo com o inserto junto à empresa Genscript. Com este recebido, realizou-se a inserção em *E. coli*. BL21(DE3) por eletroporação.

2.3.2 Expressão

Os testes de expressão da proteína NgGAPDH foram realizados com concentrações 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 e 1 mM de IPTG, durante 4 e 16 h, em temperatura de 37 e 20 °C. A cultura crescida em cada condição distinta foi submetida à lise por sonicação com 4 pulsos de 1 min e intervalos de descanso em gelo de 1 min entre os pulsos. O lisado foi centrifugado a $20000 \times g$ por 30 min a 4 °C, separando-se a fração solúvel (sobrenadante) da insolúvel (precipitado). Todos os passos foram analisados por SDS-PAGE (12%).

2.3.3 Purificação

A fração solúvel foi submetida a duas etapas de purificação no cromatógrafo Äkta Purifier (GeHealthcare Life Sciences). A primeira etapa compreendeu a cromatografia por afinidade a níquel em 1 mL de resina (HisTrap HP–GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi previamente equilibrada com 2 VC de tampão A1 (20 mM fosfato de sódio pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol), o que foi seguido da aplicação da fração solúvel e lavagem com 35 VC de tampão B1 (20 mM fosfato de sódio pH 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol) e por último um gradiente com o tampão C1 (20 mM fosfato de sódio pH 8,0, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol). Durante a cromatografia manteve-se fluxo de 1 mL min^{-1} e frações de 1 mL foram coletadas por tubo. As frações eluídas contendo a NgGAPDH foram reunidas, submetidas a uma diálise durante 24 h contra o tampão D1 (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 2 mM NAD^+) e concentradas por ultrafiltração com filtros Amicon-ultra/10.000 MWCO (Millipore).

Na segunda etapa de purificação realizou-se a cromatografia por exclusão por tamanho em 75 mL de resina (Superdex™ 75 HR 10/30 GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com 2 VC com o tampão D1 e, após, foi aplicada a solução proteica seguida de 1 VC de eluição pelo tampão D1. Durante a cromatografia manteve-se fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e frações de 500 μL foram coletadas por tubo.

Na terceira etapa da purificação realizou-se uma cromatografia por afinidade a níquel em 1 mL de resina (HisTrap HP–GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi previamente equilibrada com 2 VC de tampão A2 (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 2 mM NAD^+), o que foi seguido da aplicação da amostra sem a “his-tag” e lavagem com 35 VC de tampão A2 e, por último, um gradiente com o tampão B2 (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 2 mM NAD^+ , 500 mM imidazol). Durante a cromatografia manteve-se fluxo de 1 mL min^{-1} e frações de 1 mL foram coletadas por tubo. As frações eluídas contendo a NgGAPDH foram reunidas, submetidas a uma diálise durante 24 h contra o tampão A2 e concentradas por ultrafiltração com filtros Amicon-ultra/10.000 MWCO (Millipore). As frações eluídas das três etapas de purificação foram analisadas por SDS-PAGE (12%).

2.3.4 Remoção da “his-tag”

Com a solução de proteína purificada após as duas primeiras etapas de purificação realizou-se a clivagem da “his-tag” da porção N-terminal com Trombina. O kit utilizado foi da Sigma, Recombi-1Kt, Clean-Cleave™ kit, Número do lote SLBC7066. O procedimento foi seguido conforme a descrição do fabricante.

2.3.5 Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi realizada como descrito no item 2.3.4.

2.3.6 Estudos cinéticos

Estudos cinéticos foram realizados por meio de medidas de absorção a 340 nm para monitorizar a concentração de NADH a 25 °C durante 10 minutos num espectrofotômetro (Varian Cary 50) (BARBOSA; NAKANO, 1987); todas as medidas foram feitas em triplicatas. Em todos os ensaios, a mistura da reação continha (concentrações em um volume final de 500 μL): tampão (50 mM Tris-HCl, 1 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 1 mM β -

mercaptoetanol, NAD^+ e arsenato em diferentes concentrações), $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de enzima e a reação iniciava-se com adição do substrato G3P em diferentes concentrações.

No ensaio inicial, a concentração de arsenato foi testada a 0,1, 0,2, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 25, 30, 40 e 100 mM, enquanto que as concentrações de NAD^+ e G3P foram sempre 2 e 5 mM, respectivamente, e os outros componentes foram utilizados tal como descrito antes. O papel do arsenato no ensaio deve ser para inibir a reação inversa (SOUZA et al., 1998), embora não sendo tóxico para a enzima (NÉMETI; GREGUS, 2009; GREGUS et al., 2009; BAYNES; DOMINICZAK, 2015), por conseguinte, a sua concentração ótima permite levar a cabo o ensaio, com melhor eficiência.

Com a concentração ótima de arsenato, o pH ótimo foi determinado, ensaiando-se em 6,0, 6,4, 6,8, 7,0, 7,4, 7,8, 8,0, 8,4, 8,8, 9,0, 9,4, 9,8 e 10 em tampões diferentes (Tris, glicina e MES), e a temperatura ótima, ensaiando-se em 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 35,0, 37,0 e 40 °C, para o que a mistura foi incubada durante 5 min para estabelecer um equilíbrio térmico prévio.

Finalmente, para a determinação dos parâmetros cinéticos, foram usadas a concentração ótima de arsenato, o pH ótimo e a temperatura ótima. Para G3P, a sua concentração foi variada de 0,05 mM a 0,2 mM enquanto a concentração de NAD^+ foi mantida a 5 mM. Para NAD^+ , a sua concentração foi variada 1,6-7,5 mM, enquanto que a concentração G3P foi mantida constante a 1 mM. As velocidades iniciais foram estimadas com o programa Dynafit (KUZMIC, 2009). Coeficientes de Hill, K e v_{max} foram estimados com o programa SigrafW (LEONE et al., 2005).

2.3.7 Ensaios de cristalização

A proteína NgGAPDH pura e previamente concentrada a 10 mg mL^{-1} foi submetida aos ensaios de cristalização. O método utilizado foi difusão de vapor em gota suspensa (RUPP, 2009) em placas de cristalização de 24 poços, com 500 μL de solução no poço; cada gota foi montada com 2 μL da solução do poço e 2 μL da solução de proteína em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl e 25 mM NAD^+ . Aproximadamente 800 condições de cristalização foram realizadas a fim de se obter cristais com qualidade suficiente para a determinação da estrutura tridimensional. Os kits utilizados para os ensaios foram Morpheus, Midas, JCSG Screen, Clear Strategy Screen e PGA Screen, todos do fabricante Molecular Dimensions, e o kit Pi-PEG do fabricante Jena Biosciences.

2.3.8 Coleta de Dados de Difração de Raios X

Os primeiros cristais obtidos foram submetidos ao feixe de raios X em presença de nitrogênio à temperatura de 100 K com comprimento de onda de 1,458 Å no difratômetro da Bruker® Venture V8 da Universidade Federal do Paraná, para confirmar que eram proteicos. Os conjuntos de dados foram obtidos a partir de cristais de NgGAPDH submetidos ao feixe de raios X em presença de nitrogênio à temperatura de 100 K com comprimento de onda de 1,458 Å na linha W01B-MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) utilizando um detector PILATUS 2M (Dectris), com oscilação do cristal por imagem de 1°, distância de 130 mm e tempo de exposição por imagem de 5,2 s. Os cristais foram montados em loops e as condições de cristalização eram crioprotetoras porque tinham PEG em quantidade suficiente. Outros dois conjuntos de dados foram coletados no Instituto de Física de São Carlos com o difratômetro Rigaku RAXIS-IV++, cujos parâmetros foram: oscilação do cristal por imagem de 1° com distância de 180 mm e tempo de exposição por imagem de 6 min.

2.3.9 Processamento de Dados de Difração de Raios X

Após a coleta dos dados de difração de raios X, as imagens foram processadas, integradas e escalonadas com os programas xds e xscale (KABSCH, 1994).

2.3.10 Substituição molecular

Com a ferramenta BLAST do website National Center for Biotechnology Information (NCBI) foram identificadas estruturas do Protein Data Bank (PDB) que apresentavam maior similaridade e identidade com a sequência de aminoácidos da proteína NgGAPDH. Para a preparação do modelo foi utilizado o programa Chainsaw (STEIN, 2008) e para encontrar as rotações e translações das moléculas foi utilizado o programa Phaser (McCOY et al., 2007).

2.3.11 Refinamento da Estrutura

A estrutura de NgGAPDH foi modelada e refinada através de um processo iterativo com os programas Coot (EMSLEY; COWTAN, 2004) e Phenix.refine (AFONINE; GROSSE-KUNSTLEVE; ADAMS, 2005).

2.3.12 Validação da estrutura

O modelo final da NgGAPDH foi validado pelos programas Procheck (LASKOWSKI et al., 1993), Molprobity (CHEN et al., 2010), ValidationPDB (WESTBROOK et al., 2003) e Moleman2 (KLEYWEGT, 1996).

2.3.13 Análises e comparações

A estrutura da NgGAPDH foi submetida ao PDBsum a fim de analisar e representar o conteúdo de estruturas secundárias e sua topologia. A seleção das estruturas para as análises e comparações com a de NgGAPDH foi baseada nas constantes no banco de dados HOMSTRAD (MIZUGUCHI et al., 1998). O alinhamento da sequência de aminoácidos entre as estruturas selecionadas e a NgGAPDH foi realizado com o programa T_coffee3D, a visualização do alinhamento se deu pelo programa ALINE, as estruturas secundárias foram estimadas pelo programa DSSP e o fundo da figura do alinhamento foi colorido de acordo com a convenção de Alscript Calcons.

Com o intuito de gerar um alinhamento entre todas as GAPDHs com estruturas cristalográficas conhecidas, a sequência da NgGAPDH foi submetida aos servidores PDBFold e DALI (HOLM; ROSENSTRON, 2010). A análise da superfície de potencial eletrostático foi realizada pelo programa AMBER (Assited Model Building and Energy Refinement) (CASE et al., 2016) através do servidor PDB2PQR Version 2.0 que utiliza o programa APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) (BACKER et al., 2001). O estudo evolutivo foi realizado com o auxílio do programa ConSurf (ASHKENAZY et al., 2016). As figuras foram produzidas pelo programa PyMOL e a das interações com o ligante pelo programa LIGPLOT v.4.5.3.

2.3.14 Estudos por dinâmica molecular

A estrutura com Asn145 no rotâmero observado “t” (LOVELL et al., 2000), as mutadas para Ser145 e as formas holo e apo da proteína foram submetidas às análises por dinâmica molecular. A forma apo foi estudada a partir da forma holo sem o cofactor. Inicialmente, com o módulo LeaP (SCHAFMEISTER et al., 1995) do Amber, a proteína foi imersa em uma caixa contendo moléculas de água tipo TIP3P (JORGENSEN et al., 1983). A extensão da caixa implicou numa distância mínima de 12 Å de qualquer borda e íons foram adicionados para neutralizar o sistema. Os parâmetros foram obtidos a partir do campo de força ff14SB (MAIER et al., 2015).

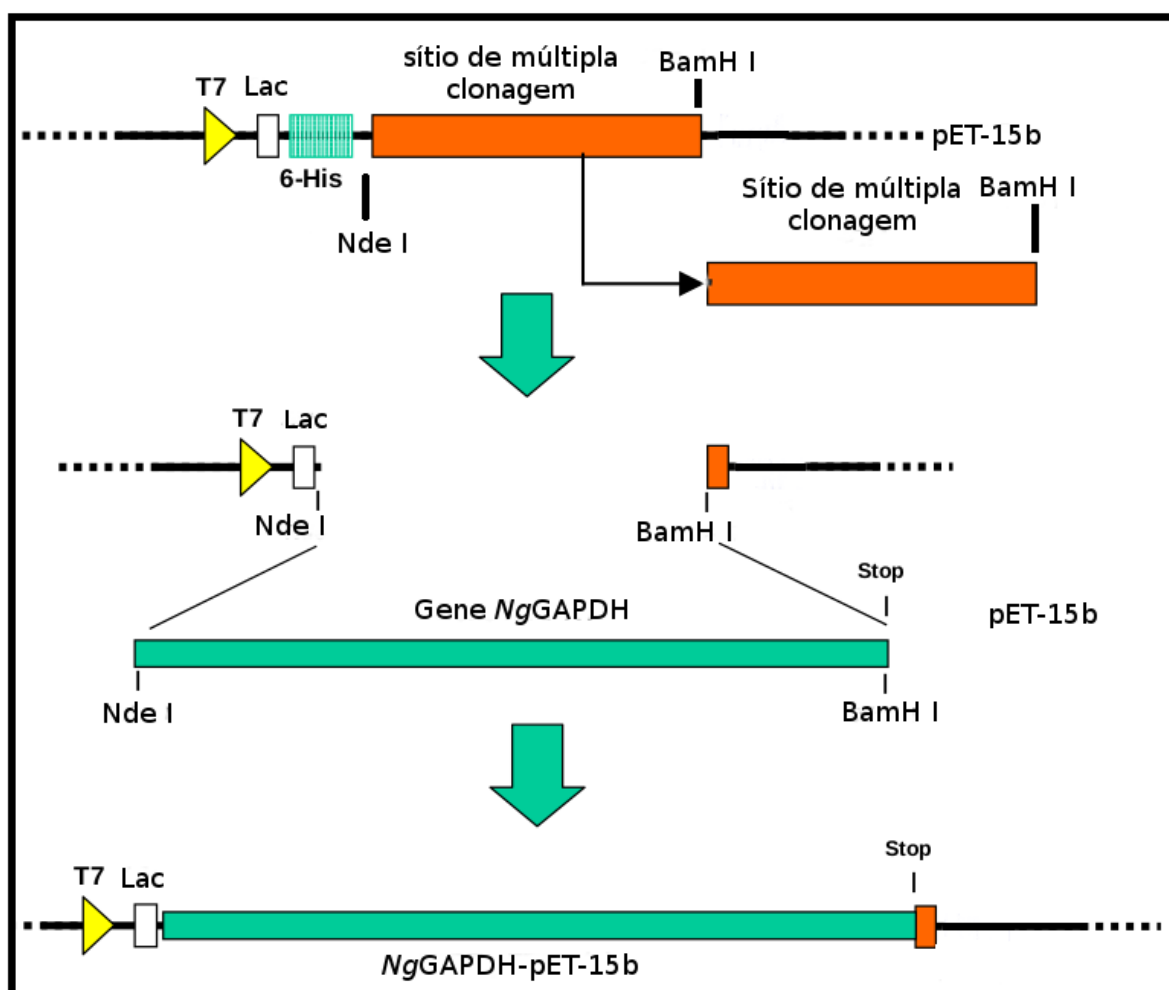
As estruturas foram submetidas ao Sander do pacote do Amber. Inicialmente, o sistema foi submetido a uma minimização com fortes restrições sobre a proteína até a convergência. A molécula foi aquecida até 300 K por 50 ps com fracas restrições sobre a proteína, o que foi seguido de uma rápida dinâmica durante 50 ps e, após, a dinâmica produtiva, sem restrições, durante 2000 ps. Em todos os casos, um corte de 12 Å de distância foi mantido para cálculo das interações. A trajetória foi registrada a cada 2 ps, gerando no total 1000 registros. As simulações foram realizadas com três sementes randômicas diferentes (triplicatas). Os cálculos do “Root-mean-square deviation” (RMSD) e da correlação de movimentos foram realizados pelo Cpptraj (ROE; CHEATHAM, 2013), os gráficos de correlação foram gerados pelo GNUPLOT v. 4.6.

2.4 Resultados e Discussões

2.4.1 Clonagem, Expressão e Purificação

O gene codificante da *NgGAPDH*, que tem massa molecular de 36 kDa, com 333 aminoácidos e pI teórico de 6,60, foi inserido no plasmídeo pET15b e possibilitou a expressão da proteína com a “his-tag” no N-terminal, com a intenção de facilitar a purificação, o esquema da construção do gene no plasmídeo esta representado na Figura 26.

Figura 26: Esquema da construção do gene da *NgGAPDH* no plasmídeo de expressão pET-15b.

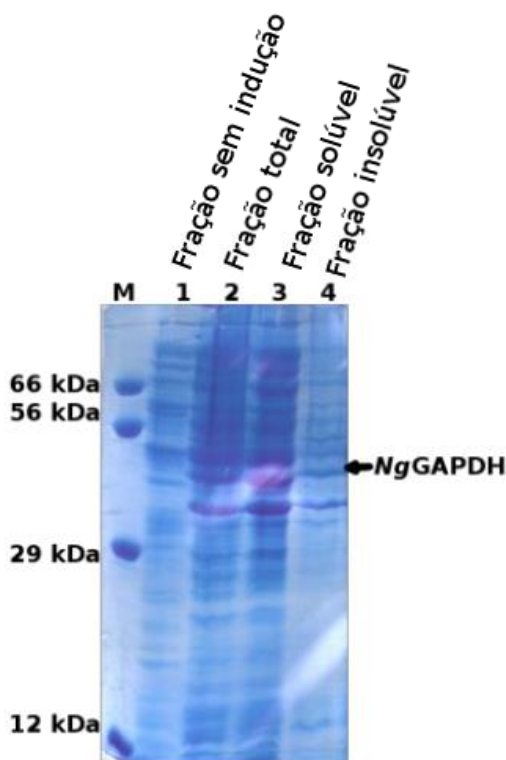


Fonte: O autor

A melhor condição de expressão da proteína *NgGAPDH* foi em meio LB com ampicilina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, 0,5 mM de IPTG sob agitação de 150 rpm por 16 h a 37°C . A análise por SDS-PAGE (12%) (Figura 27) da fração do meio de cultura sem indução e com indução revelou a

expressão da proteína de interesse, que se apresenta em maior concentração na fração solúvel (MACHADO; SILVA; IULEK 2016).

Figura 27: SDS-PAGE (12%) referente à expressão heteróloga da *NgGAPDH*. Raia M: Marcador massa molar. Raia 1: Fração sem indução. Raia 2: Fração total. Raia 3: Fração solúvel. Raia 4: Fração insolúvel A posição após migração da *NgGAPDH* é indicada.



Fonte: O autor

Com a fração solúvel, deu-se seguimento à purificação. No cromatograma da purificação por afinidade a níquel (Figura 28 (A)), observaram-se dois picos bem separados; a análise por SDS-PAGE (12%) (Figura 28 (B)) revelou que a *NgGAPDH* foi eluída durante o gradiente (2º pico) em aproximadamente 100-180 mM de imidazol, além de indicar que a proteína não estava pura e, portanto, seria necessária mais uma etapa de purificação.

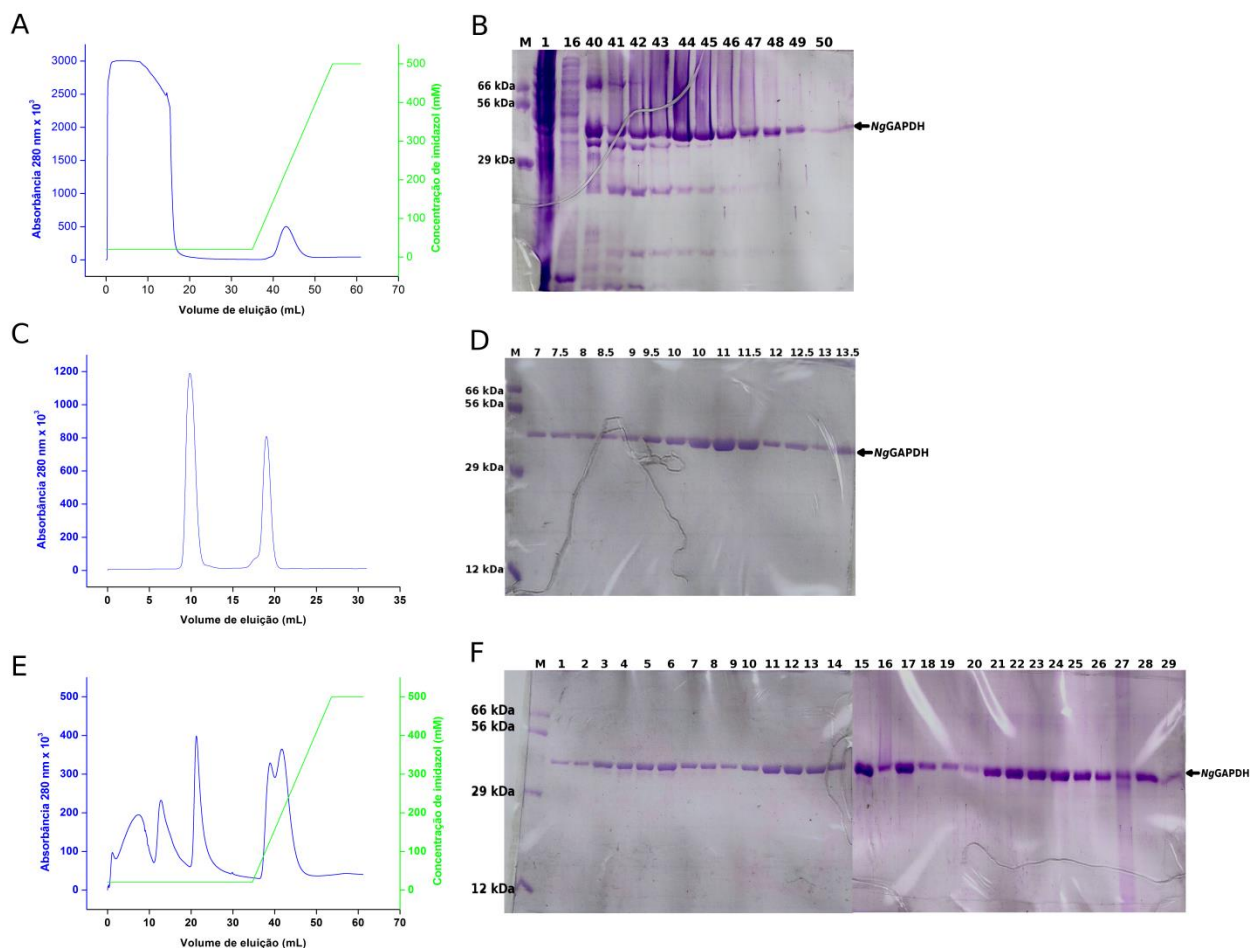
Baseado nas informações da Figura 28 (B) optou-se por realizar a cromatografia por exclusão por tamanho. No cromatograma da purificação por exclusão por tamanho (Figura 28 (C)), observaram-se dois picos bem separados e a análise por SDS-PAGE (12%) (Figura 28 (D)) do primeiro pico revelou frações puras da *NgGAPDH*. Considerando que para a cristalização a solução da proteína deve estar homogênea e que eventualmente a clivagem com Trombina pode não apresentar eficiência de 100%, optou-se por introduzir uma última etapa de purificação e

esta foi realizada após a clivagem da “his-tag” da NgGAPDH, a fim de separar as proteínas sem “tag” das que remanesceram com a “tag”.

O cromatograma por afinidade a níquel (Figura 28 (E)) mostra vários picos antes e durante o gradiente de imidazol. A análise por SDS-PAGE (12%) (Figura 28 (F)) revela a presença da NgGAPDH em todas as frações. A proteína eluída antes do gradiente era a de interesse, porque não apresentava afinidade ao níquel devido à remoção da “his-tag”. O rendimento após as etapas de purificação foi de 25 mg de proteína pura para cada litro de meio de cultura (MACHADO; SILVA; IULEK, 2016).

A partir do perfil cromatográfico da terceira etapa de purificação é possível hipotetizar que na solução há a presença de mais de um estado oligomérico da proteína; segundo SEIDLER, (2013), a GAPDH pode se apresentar em mais que um estado oligomérico em solução, já; PARK et al., (2009) afirma que a forma predominante em solução é a tetramérica.

Figura 28: (A) Cromatograma da purificação por afinidade a níquel. (B) SDS-PAGE (12%), raia M, marcador de massa molar, e a numeração das demais raia referem-se às frações da purificação por afinidade a níquel. (C) Cromatograma da purificação por exclusão por tamanho. (D) SDS-PAGE (12%), raia M, marcador de massa molar, e a numeração das raia referem-se às frações da purificação por exclusão por tamanho. (E) Cromatograma da purificação por afinidade a níquel após a clivagem da “his-tag”. (F) SDS-PAGE (12%), raia M, marcador de massa molar, e a numeração das demais raia referem-se às frações da purificação por afinidade a níquel após a clivagem da “his-tag”. A posição após migração da NgGAPDH é indicada.



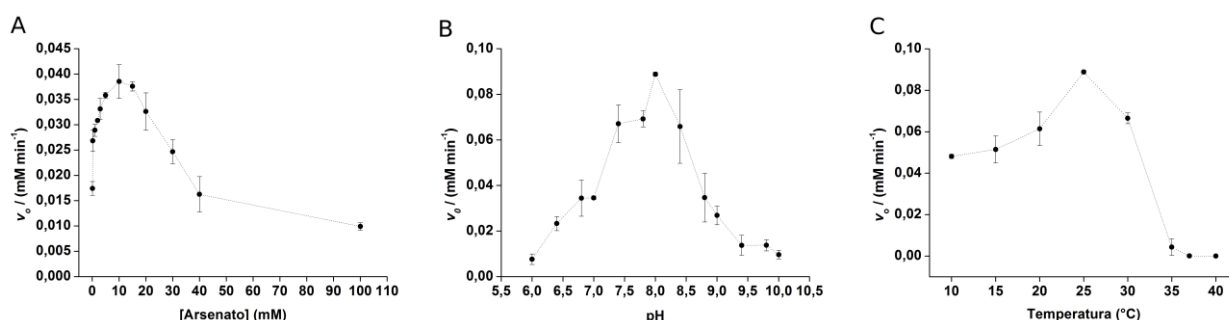
Fonte: O autor.

2.4.2 Estudos cinéticos

A proteína com “his-tag” não revelou atividade frente ao substrato (dados não mostrados). Os estudos cinéticos foram, então, todos realizados após a remoção da “his-tag”. Eles indicaram que a concentração ótima de arsenato foi de 10 mM (Figura 29 (A)), embora se verifique que a concentração de 30 mM (BARBOSA; NAKANO, 1987) é habitualmente utilizada, apesar de não ser determinada explicitamente. O pH ótimo foi de 8,0 (Figura 29 (B)), o que está de acordo com outras GAPDHs, que variam de 7,0 a 10,0, com a maioria entre 8,0 e 9,0, das quais podem-se destacar as de *Homo sapiens*, pH 8,0-8,3 (HEINZ; FREIMULLER, 1982); *Trypanosoma brucei*, pH 8,0-8,5 (MISSET et al., 1987); *Saccharomyces cerevisiae*, pH 8,5

(BYERS, 1982) e *Pisum sativum*, pH 8,5-9,0 (DUGGLEBY; DENNIS, 1982). A temperatura ótima foi de 25 °C (Figura 29 (C)), o que é semelhante às de *Oryctolagus cuniculus* (NALETOVA; MURONETZ; SCHMALHAUSEN, 2006) e *Arabidopsis thaliana* (ZAFFAGNINI et al., 2007), mas, diferente da de *H. sapiens* (MOUNTASSIF et al., 2009), que apresenta uma temperatura ótima de cerca de 43 °C. A temperatura observada para GAPDH pode estar relacionada com o habitat do organismo.

Figura 29: (A) Velocidades iniciais versus concentrações de arsenato, de 0,1-100 mM. (B) Velocidades iniciais versus diferentes valores de pH, de 6,0-10,0. (C) Velocidades iniciais versus diferentes temperaturas, de 10,0 - 40,0 °C. Os pontos são a média das triplicatas e as barras correspondem a +1 e -1 do desvio padrão.

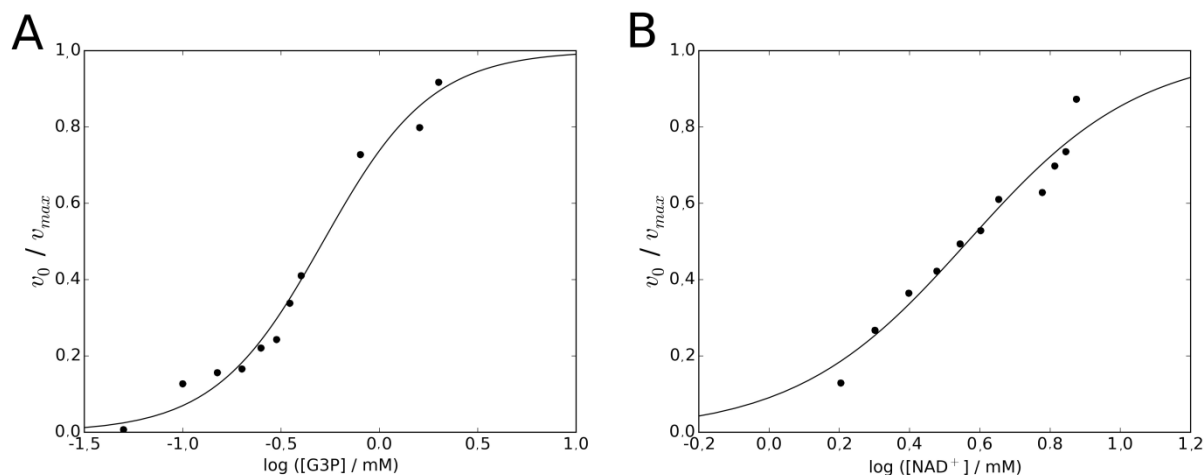


Fonte: O autor

Os gráficos das velocidades iniciais versus as concentrações iniciais de G3P e NAD^+ (Figura 30 (A) (B), respectivamente) revelaram um comportamento sigmoidal, esperado para enzimas alostéricas. Valores de K_M e $v_{m\acute{a}x}$, calculados por meio de gráficos de Michaelis-Menten ou Lineweaver-Burk, são reportados para inúmeras GAPDHs (RYZLAKM; PIETRUSKO, 1988; SCHOMBURG; CHANG; SCHOMBURGA, 2002; WIGGERS et al., 2007; TIEN et al., 2012), ainda que a enzima tenha um comportamento alostérico (LEVITZKI, 1974; YUEQUAN, SHIYING; ZHENGJIONG, 2000).

Os valores do coeficiente de Hill (n), K e $v_{m\acute{a}x}$ para o G3P foram 1,57, 0,51 mM e 0,77 mM min^{-1} , respectivamente, e para o NAD^+ 1,77, 3,68 mM, 0,76 mM min^{-1} , respectivamente, sugerem uma cooperatividade positiva para ambos os substratos.

Figura 30: (A) Velocidades iniciais versus diferentes concentrações de G3P. (B) Velocidades iniciais versus diferentes concentrações de NAD^+ . Curvas sigmoidais ajustadas.



Fonte: O autor

2.4.3 Estudos estruturais

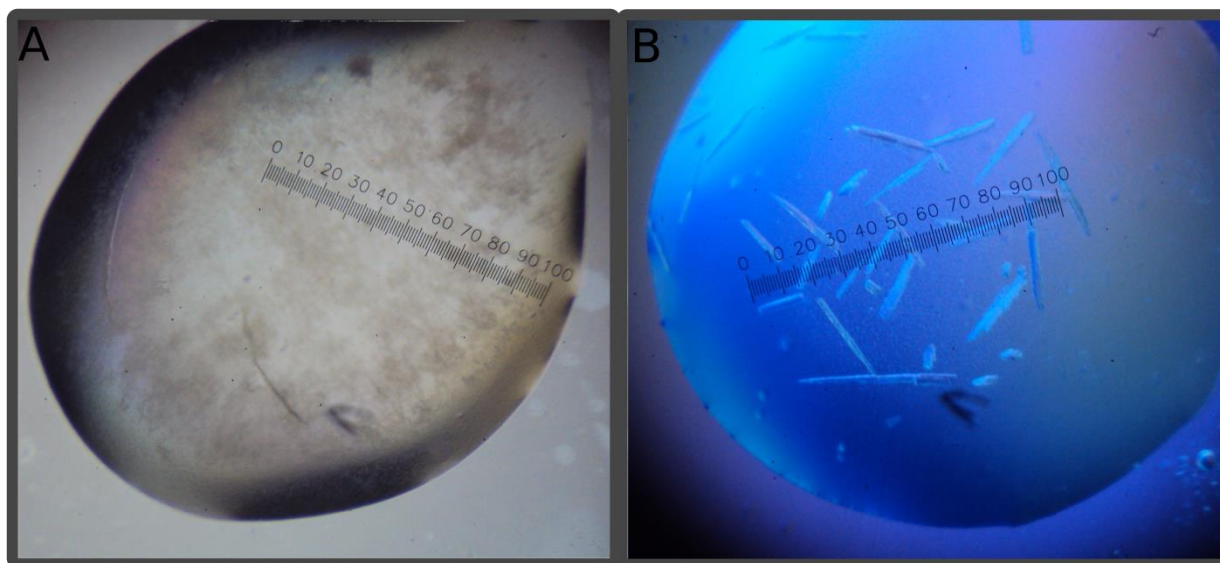
2.4.3.1 Cristalização

A observação das gotas dos primeiros ensaios de cristalização por 30 dias revelou que a maioria apresentava grande quantidade de precipitado (Figura 31 (A)) e, assim, não foi possível detectar qualquer condição de cristalização promissora.

Na tentativa de favorecer o crescimento de cristais de proteína, decidiu-se remover a “tag” da região N-terminal e novos ensaios de cristalização foram realizados com os mesmos kits anteriormente testados. Após 3 dias, em várias gotas apareceram cristais (Figura 31 (B)) e estes foram submetidos ao difratômetro, que revelou serem de proteínas, porém, sem apresentar qualidade satisfatória para a coleta de dados de difração.

Esses resultados indicaram que a remoção da “his-tag” foi fundamental para a cristalização da NgGAPDH. É possível concluir que a influência da “his-tag” na cristalização depende do microorganismo fonte estudado; por exemplo, MUKHERJEE et al., (2009) relatam a cristalização da GAPDH com a “his-tag” de *Antheraea mylitta*, enquanto que ELLIOTT et al., (2008) relatam a cristalização da GAPDH sem a his-tag de *Helicobacter pylori*.

Figura 31: Ensaio de cristalização da NgGAPDH. A escala total (100 divisões) corresponde a 1 mm. (A) Gota com precipitado. (B) Gota com cristais de proteínas.



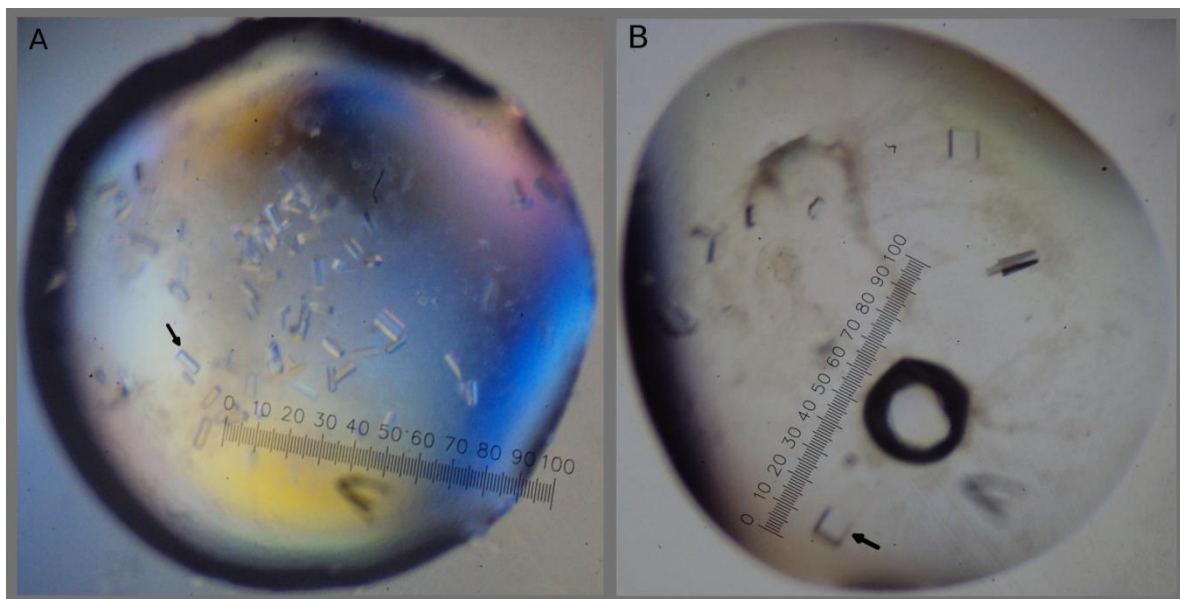
Fonte: O autor

A fim de obter cristais melhores, realizaram-se novos ensaios de cristalização com o kit comercial Pi-PEG do fabricante Jena Bioscience. Decidiu-se por esse kit porque as soluções eram semelhantes às condições dos primeiros cristais obtidos.

Os melhores cristais foram obtidos após 3 dias nas seguintes condições: 12,9 % (m/V) PEG 2000; 50 mM tampão acetato (pH 5,2) e 6,4 % (m/V) PEG 200, (Cristal1) (Figura 32 (A)) e 2,5% (m/V) PEG 1000; 50 mM tampão acetato (pH 4,8) e 25,7 % (m/V) PEG 2000 MME, (Cristal2) (Figura 32 (B)).

As condições de cristalização encontradas para a NgGAPDH podem ser utilizada como condições de partida para o planejamento de ensaios de cristalização para enzimas similares de outros organismos, especialmente para a de *N. fowleri*. Comparando-se com as condições de cristalização das GAPDHs de outras espécies (MORAS et al., 1975; VELLIEUX et al., 1993; KIM et al., 1995; DUEE et al., 1996; LADAME et al., 2003; ISMAIL; PARK, 2005; ELLIOTT et al., 2008; MUKHERJEE et al., 2009; TIEN et al., 2012), a maioria cristaliza em pH abaixo de 7,0 e em presença de NAD^+ ; nesse caso, para a de *N. gruberi*, o NAD^+ foi essencial para a cristalização.

Figura 32: Cristais obtidos com o kit Pi-PEG. A escala total (100 divisões) corresponde a 1 mm e as setas indicam o cristal usado para a coleta dos dados. (A) cristal1. (B) cristal2.



Fonte: O autor

2.4.3.2 Determinação e descrição da estrutura

A partir dos cristais obtidos, foram coletados quatro conjuntos de dados, dois no difratômetro Rigaku RAXIS-IV++ no Instituto de Física de São Carlos - USP e dois no Síncrotron LNLS, linha MX2. O processamento dos dados de difração de cada conjunto revelou que o grupo de espaço é $P2_1$. Doravante, relatamos somente os dois cristais que difrataram no LNLS, dado que apresentam maior resolução.

Para o cristal1, com dimensões aproximadas de $0,03 \times 0,08 \times 0,01 \text{ mm}^3$, proveniente da gota ilustrada na Figura 32 (A), os parâmetros de cela foram: $a = 83,69 \text{ Å}$, $b = 94,08 \text{ Å}$, $c = 93,14 \text{ Å}$, $\beta = 100,38^\circ$. Para o cristal2, com dimensões aproximadas de $0,08 \times 0,08 \times 0,01 \text{ mm}^3$, proveniente da gota ilustrada na Figura 32 (B), os parâmetros de cela foram: $a = 83,74 \text{ Å}$, $b = 94,55 \text{ Å}$, $c = 90,93 \text{ Å}$, $\beta = 99,96^\circ$. Foi obtido um total de 360 imagens de difração de cada cristal. Para o cristal1, decidiu-se realizar o corte de resolução em $2,40 \text{ Å}$ com base nos valores dos índices de completeza, relação sinal/ruído ($\langle I/\sigma(I) \rangle$), R_{sym} e principalmente $CC_{1/2}$ (EVANS; MURSHUDOV, 2013), enquanto que para o cristal2 o corte foi realizado em $1,94 \text{ Å}$ de acordo com os mesmos critérios. A Tabela 5 mostra os resultados do processamento.

Tabela 4: Dados de coleta, resultados do processamento e estatísticas do refinamento. Valores correspondentes à última faixa de resolução estão entre parêntesis.

	Cristal 1	Cristal 2
<i>Estatística da coleta dos dados</i>		
Fonte de raios X	W01B-MX2, LNLS	W01B-MX2, LNLS
Comprimento de onda (Å)	1,45866	1,45866
Temperatura (K)	100	100
Detector	PILATUS 2M	PILATUS 2M
Distância Cristal-Detector (mm)	130	130
Intervalo de rotação por imagem (°)	1,0	1,0
Intervalo total de rotação (°)	360	360
Tempo de exposição por imagem (s)	10	5,2
Grupo espacial	$P2_1$	$P2_1$
<i>Estatística do processamento</i>		
Faixa de resolução (Å)	30,48 - 2,40 (2,47 - 2,40)	29,85 - 1,94 (2,00 - 1,94)
Número total de reflexões	374223 (31486)	625891 (39328)
Número de reflexões únicas	54382 (4463)	102380 (8647)
Completeza (%)	97,6 (96,5)	99,1 (94,4)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	19,94 (3,66)	18,26 (2,28)
R_{sym} (%)	9,0 (67,3)	7,3 (70,1)
R_{meas} (%)	9,7 (72,6)	8,0 (79,6)
$CC_{1/2}$ (%)	99,8 (87,4)	99,9 (78,7)
Fator B global do Wilson plot (Å ²)	34,01	24,55
Monômeros na unidade assimétrica	4	4
Porcentagem de solvente (%)	50,10	49,25
<i>Estatística do refinamento</i>		
R_{free}	-	0,2029
R	-	0,1652
Número de resíduos	-	1352
Número de moléculas de água	-	1281
NADH	-	4
PGE	-	1
Na ⁺	-	4
RMSbl (Å)	-	0,007
RMSba (Å)	-	1,206
RMScc (Å)	-	0,046

Fonte: O autor

O cálculo do coeficiente de Matthews indicou quatro monômeros proteicos na unidade assimétrica. Para obter a estimativa inicial das fases, a substituição molecular foi realizada com o

modelo editado da estrutura tridimensional da GAPDH de *Oryza sativa* (OsGAPDH) (63% de identidade de sequência e cobertura de 80%), código PDB 3E6A, com resolução de 3,77 Å, compreendendo apenas um monômero deste. A Figura 33 mostra o alinhamento entre as sequências de aminoácidos da NgGAPDH e da OsGAPDH.

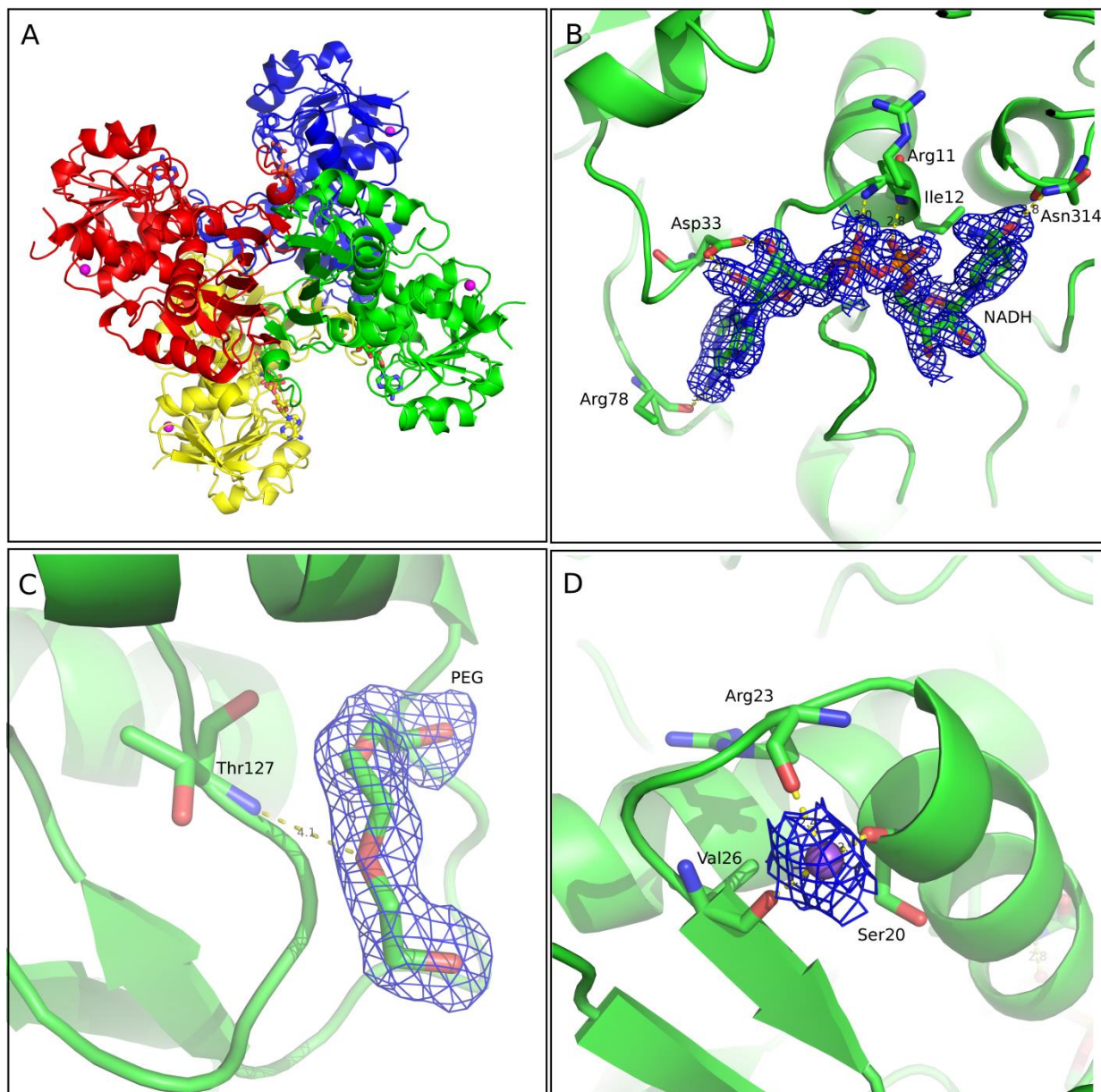
Figura 33: Alinhamento das sequências de aminoácidos de NgGAPDH e OsGAPDH. A coloração do fundo em preto e tons de cinza está de acordo com a convenção de Alscript Calcons.

NgGAPDH/1-333	.MVKIGINGFGRI GRLVFRASLERIDVEVVAINDIMMTPEYMIYMIKYDTVHGKF.HGKLEHT.EKSIIV	67
OsGAPDH/1-335	GKIKIGINGFGRI GRLVARVALQSEDELVAVNDPFITTDYMTYMFKYDTVHGQWKHSIDIKIDSKTLL	70
NgGAPDH/1-333	NGREITHVLCE RDPEQLPWGOHNVEYVVESTGIFTKLSAAKHLKGGAKRVVISAP.ADTPTFVMGVNNHE	136
OsGAPDH/1-335	GEKPVTVFGIRNPDEIPWAEAGAEYVVESTGVFTDKEKAAAHKGGAKKVVISAPSKDAPMFVCGVNE	140
NgGAPDH/1-333	YKPEMTVINNASCTTNC LAPIAAVLHENFGIIEGLMTTVHAVTATQPTVDAPS.KDWRGGRAAGYNIIPS	206
OsGAPDH/1-335	YTSIDIVSNASCTTNC LAPLAKVIHDNFGIIEGLMTTVHAITATQKTVDGPS.KDWRGGRAASFNIIPS	210
NgGAPDH/1-333	STGAAKAVGLVIPSLNGKLTGMAFRVPTVDVSVVDLTCRLKPKATKKOIDEAMKAASESERFKGILKFTD	276
OsGAPDH/1-335	STGAAKAVGLVLPDLNGKLTGMSFRVPTVDVSVVDLTVRIEKAASYDAIKSAIKSASEG.KLKGIIGYVE	279
NgGAPDH/1-333	EEVVSDFVHDSASSITYDSKASICLNEHFVKVVAWYDNEWGYSNRVLDLIKSTAKIQ	333
OsGAPDH/1-335	EDLVSTDFVGDSSIFDAKAGIALNDNFVKLVAVYDNEWGYSNRVIDLIRHMAKT.	335

Fonte: O autor

Após a substituição molecular, realizou-se um procedimento de construção automatizado, seguido de um refinamento de corpo rígido e vários ciclos de refinamento com restrições entremeadas com construção manual. O modelo final para NgGAPDH (Figura 34 (A)) provido dos dados do cristal2 corresponde a um tetrâmetro na unidade assimétrica, apresenta quatro moléculas de NADH com interação com os resíduos Arg11, Ile12, Asp33, Arg78 e Asn314 (Figura 34 (B)) (a forma reduzida do cofator foi modelada devido à presença do β-mercaptoetanol na solução da proteína (LAMBE; WILLIAMS, 1965)), uma molécula de PEG com interação com a Thr127 do monômero A (Figura 34 (C)), quatro íons de Na⁺ com interação com os resíduos Ser20, Arg23 e Val26 (Figura 34 (D)) e 1281 moléculas de água.

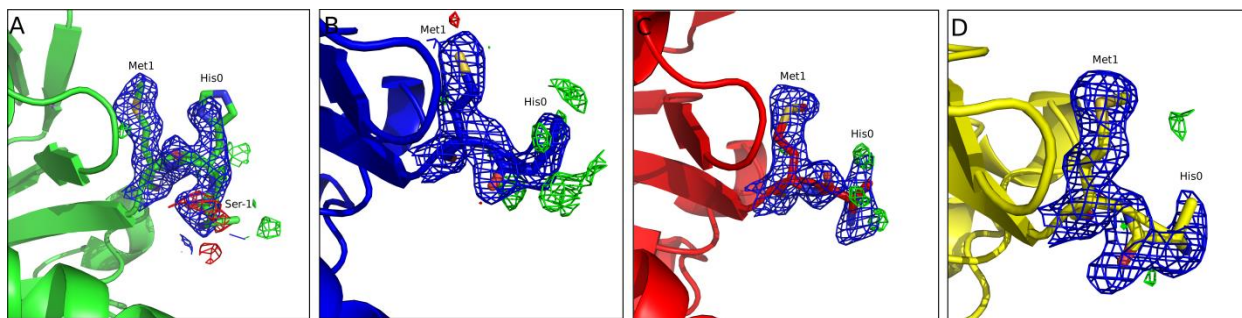
Figura 34: (A) Modelo final da NgGAPDH, cada monômero está representado por cor diferente. (B) Interações entre o NADH (código PDB NAI) e a proteína. (C) Interações entre o PEG (código PDB PGE) e a proteína. (D) Interações entre o íon Na^+ e a proteína. As ligações de hidrogênio estão representadas em verde. Contornos dos mapas: em azul $2mFo-DFc$ a $1,0 \sigma$, em verde e vermelho $mFo-DFc$ a 3σ .



Fonte: O autor

As coordenadas da estrutura NgGAPDH foram depositadas no banco de dados PDB (Protein Data Bank) com o código de acesso 5UR0. As estatísticas do refinamento estão resumidas na Tabela 5. Durante a construção do modelo, foi observada densidade eletrônica nos mapas na região N-terminal além do resíduo 1, em todos os monômeros. A Figura 35 (A), (B), (C) e (D) ilustra essa região dos monômeros A, B, C e D, respectivamente.

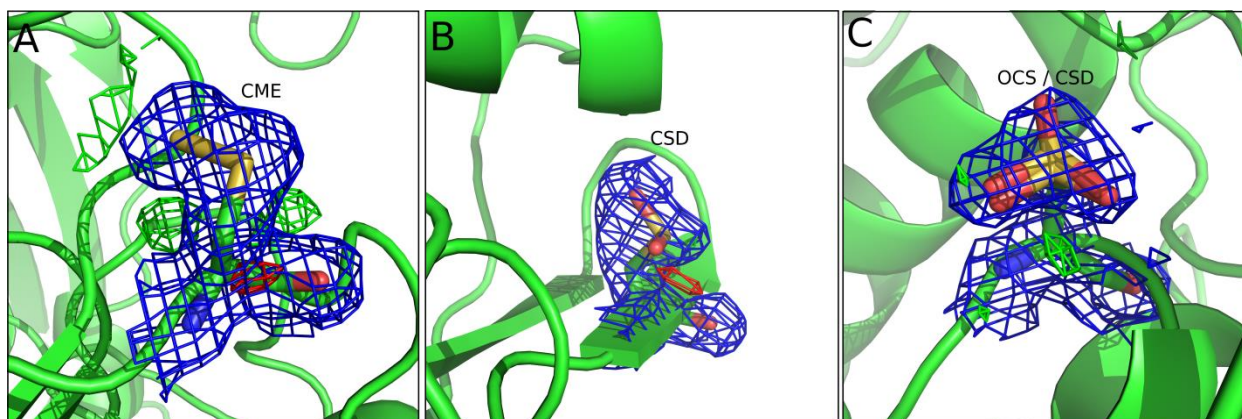
Figura 35: (A), (B), (C) e (D) representam o N-terminal modelado dos monômeros A, B, C e D respectivamente. Contorno dos mapas: em azul $2mFo-DFc$ a $1,0 \sigma$, em verde e vermelho $mFo-DFc$ a 3σ .



Fonte: O autor

Os resíduos Cys 76, 149 e 300 de cada monômero apresentaram densidades eletrônicas compatíveis para oxidação do grupo sulfidril. A Figura 36 (A), (B) e (C), ilustra a modificação destes resíduos, que foram modelados para S,S-(2-hidroxyetil) tiocisteína (código PDB CME), 3-sulfinoalanina (código PDB CSD) e ácido cisteinasulfônico (código PDB OCS) alternado com CSD, respectivamente.

Figura 36: (A) CME. (B) CSD. (C) OCS e CSD. Contorno dos mapas: em azul $2mFo-DFc$ a $1,0 \sigma$, em verde e vermelho $mFo-DFc$ a 3σ .



Fonte: O autor

A estrutura cristalográfica da NgGAPDH foi submetida ao servidor PDBSum; os resultados indicaram que o tetrâmero é estabilizado por 90 ligações de hidrogênio formadas entre os resíduos dos monômeros A, B, C e D. A Tabela 6 lista o número de resíduos que estão na interface, a área de interface, a quantidade de pontes salinas, a quantidade de ligações de hidrogênio e a quantidade de contatos sem ligações entre os monômeros.

Tabela 5: Número de resíduos, área de interface, quantidade de pontes salinas, quantidade de ligações de hidrogênio e quantidade de contatos sem ligação entre os monômeros para formar o tetrâmero.

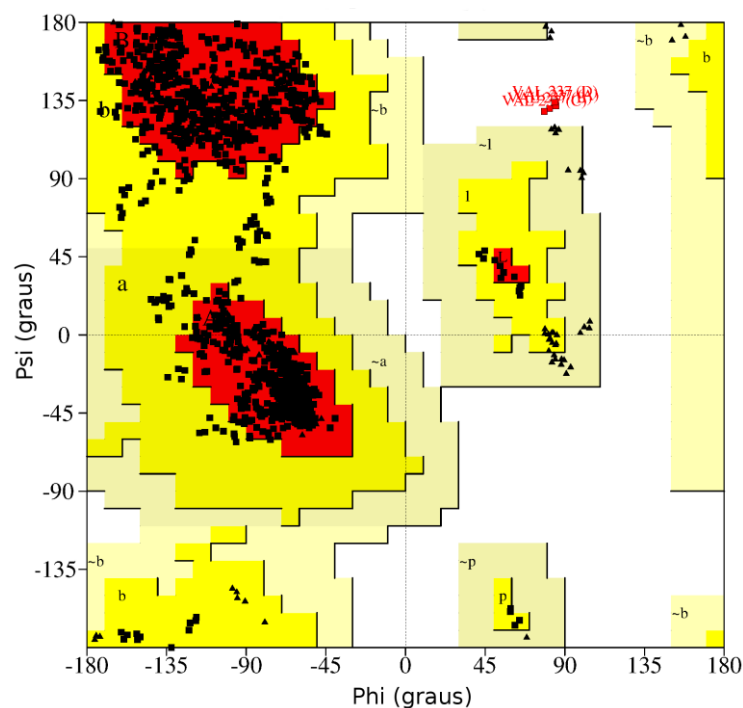
Cadeias	Nº de resíduos na interface	Área da interface (Å)	Nº de pontes salinas	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de contatos sem ligações
A : B	43 : 42	1914 : 1895	8	26	270
C : D	45 : 44	1913 : 1906	8	26	266
A : C	28 : 28	1434 : 1440	2	18	199
B : D	28 : 28	1416 : 1417	2	18	203
A : D	8 : 9	515 : 517	1	6	56
B : C	9 : 9	512 : 506	1	6	55

Fonte: O autor

2.4.3.3 Validação do modelo final

O gráfico de Ramachandran está apresentado na Figura 37 e os índices estão listados na Tabela 7.

Figura 37: Gráfico de Ramachandran da estrutura NgGAPDH gerado pelo programa Procheck. Em vermelho, amarelo escuro, amarelo claro e branco estão representadas as regiões adicionalmente permitidas, generosamente permitidas e proibidas, respectivamente.



Fonte: O autor

Tabela 6: Porcentagem dos resíduos em cada região do gráfico de Ramachandran.

Gráfico de Ramachandran	Resíduos (%) <i>NgGAPDH</i>
Regiões permitidas energeticamente	88,9
Regiões adicionalmente permitidas	9,6
Regiões generosamente permitidas	2,1
Regiões proibidas	0,3

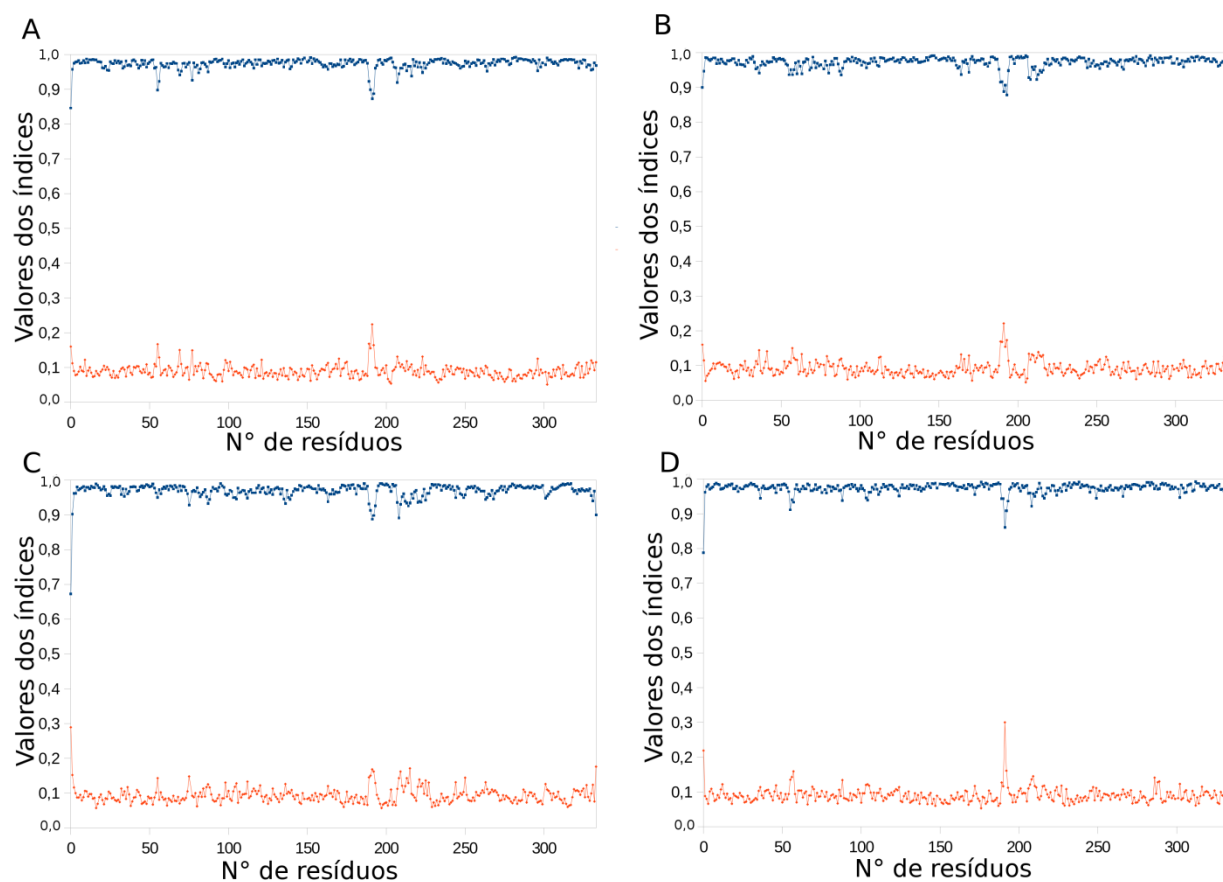
Fonte: O autor

A Val237 de todos os monômeros está localizada em região proibida; esse resíduo apresenta densidade eletrônica bem definida e sua conformação incomum é encontrada em várias GAPDHs, está localizada no domínio catalítico próximo ao NADH e próxima à cisteína catalítica (Cys149), que no cristal de *NgGAPDH* analisado apresenta-se oxidada (Figura 34 (C)).

O programa Molprobity apontou resíduos com ângulos com desvio significativo da idealidade, Asn202 e Ile203 de todos os monômeros, Val175 e His176 dos monômeros A, C e D, e a Cys244 do monômero A, além dos resíduos Met 228 do monômero A, Lys63 e Tyr40 do monômero C e Tyr312 do monômero D como rotâmeros incomuns. Para todos esses resíduos a densidade eletrônica justifica a posição modelada.

A análise da correlação entre a densidade eletrônica e o modelo foi representada pelos índices RSCC (valor do coeficiente de correlação do espaço real) e RSR (valor residual no espaço real) calculados pelo programa Moleman2. A Figura 38 mostra os gráficos dos índices RSCC e RSR por resíduo de cada monômero da estrutura *NgGAPDH* e a Tabela 8 relata os valores globais desses índices para cada monômero.

Figura 38: Qualidade do ajuste na densidade eletrônica por resíduo baseada no mapa $2mFo-DFc$. As linhas em azul e vermelho mostram os índices RSCC e RSR, respectivamente. (A), (B), (C) e (D) representam os monômeros A, B, C e D, respectivamente.



Fonte: O autor

Tabela 7: Valores globais de RSCC e RSR baseados no mapa $2mFo-DFc$ para a estrutura cristalográfica de NgGAPDH, relatados para cada monômero, bem como a média global.

Monômero	NgGAPDH	
	RSCC	RSR
A	0,9666	0,1068
B	0,9661	0,1071
C	0,9631	0,1106
D	0,9669	0,1068
Todas as cadeias	0,9657	0,1078

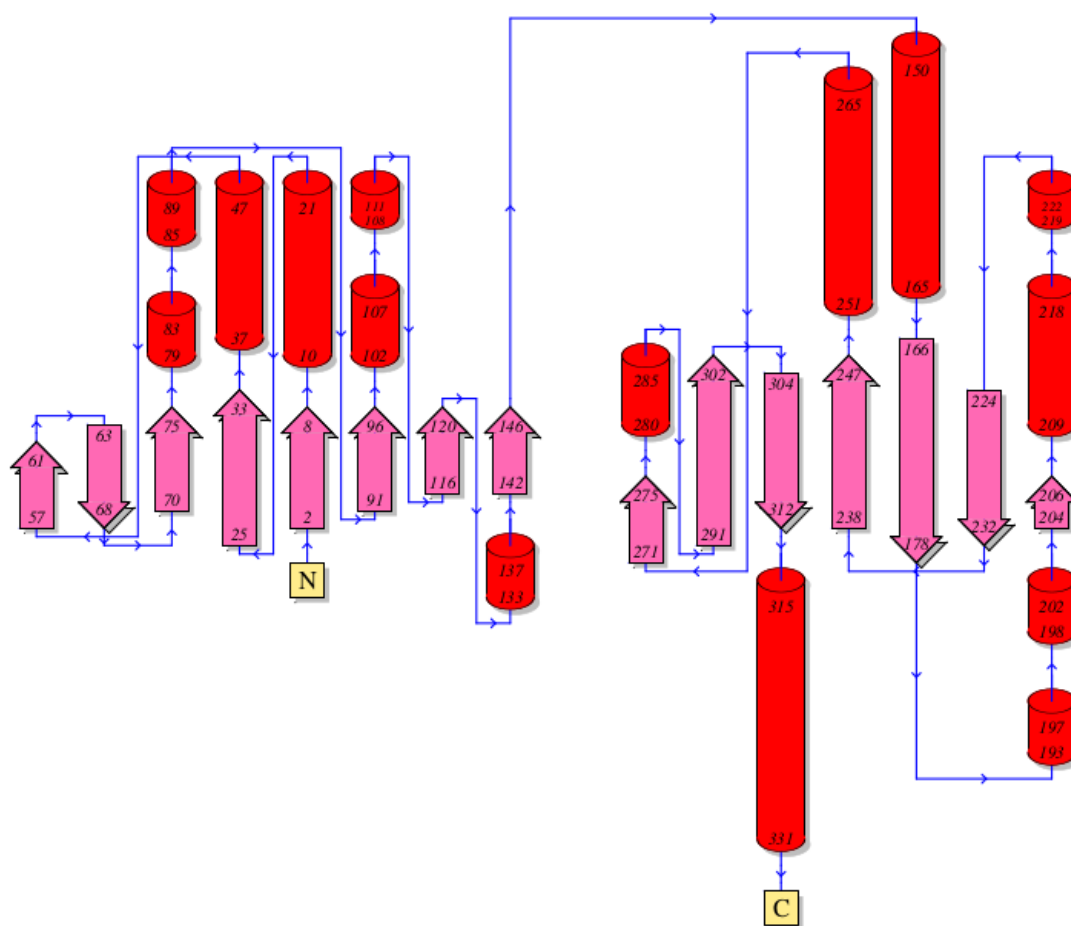
Fonte: O autor

2.4.3.4 Análises e comparações estruturais

2.4.3.4.1 Enovelamento da estrutura da NgGAPDH

A estrutura de NgGAPDH foi submetida ao banco de dados PDBsum (Figura 39). Os resultados para os elementos de estrutura secundária indicaram que o monômero de NgGAPDH é composto por 30,47% de hélices- α , 26,62% de fitas- β e 42,92% de regiões desordenadas ("loops" e "turns").

Figura 39: Topologia da estrutura de NgGAPDH ilustrada pelo banco de dados PDBsum. Em vermelho e rosa estão representadas as fitas- β e hélices- α , respectivamente.



Fonte: O autor

A estrutura cristalográfica da NgGAPDH é a primeira estrutura de GAPDH de organismo pertencente ao filo Percolozoa, por esse motivo, uma análise minuciosa foi realizada na busca

por diferenças e semelhanças estruturais com proteínas pertencentes a organismos de outros filos.

O alinhamento 3D da NgGAPDH com estruturas de proteínas dos bancos de dados dos servidores PDBFold e DALI indicou similaridade com Z-score = 52,7 desta com a estrutura de GAPDH de *Oryza sativa* (Código PDB 3V1Y, rmsd = 0,7 para 333 Cas; identidade de 62 %). O enovelamento da NgGAPDH é classificado segundo o SCOP (MURZIN et al., 1995) como “FedE/GAPDH domain-like”, com o arranjo $\alpha/\beta/\alpha/\beta$ (3) da classe $\alpha+\beta$ e apresenta folhas mistas do tipo 2134, na qual a fita 2 é paralela a 1 (Figura 40 (A)) e o domínio N-terminal é classificado como “Rossmann-fold”.

As estruturas com Z-score < 27,4 e identidade entre 10 a 14 % também foram listadas nos resultados do DALI. Segundo YANG; DOOLITTLE; BOURNE, (2005) as estruturas tridimensionais das proteínas são muito mais conservadas do que a sequência de aminoácidos, por esse motivo, apesar da baixa identidade entre a Aspartato-semialdeído desidrogenase e a NgGAPDH, a sobreposição (Figura 40 (B)) das estruturas revelou um domínio semelhante classificado pelo SCOP como “immunoglobulin/albumin-binding domain-like”, que compreende 3 hélices- α , com topologia do tipo “spectrin-like fold”.

De acordo com a análise das estruturas das GAPDHs (MORAS et al., 1975; VELLIEUX et al., 1993; KIM et al., 1995; DUEE et al., 1996; LADAME et al., 2003; ISMAIL; PARK, 2005; ELLIOTT et al., 2008; MUKHERJEE et al., 2009; TIEN et al., 2012) a NgGAPDH apresenta dois domínios: o domínio de interação com o NADH, que compreende do resíduo 1 ao 133 e do resíduo 314 ao 333, e o domínio catalítico, que compreende do resíduo 134 ao 313 (Figura 40 (C)). A comparação da estrutura da NgGAPDH com estruturas pertencentes a outros organismos indicaram que o enovelamento é altamente conservado, como esperado.

Figura 40: (A) Representação do domínio “FedE/GAPDH domain-like” com arranjo $\alpha/\beta/\alpha/\beta$ (3) da classe $\alpha+\beta$, na qual as regiões de folhas e fitas estão separadas e apresentam folhas mistas do tipo 2134, na qual a fita 2 é paralela a 1. (B) Sobreposição entre o monômero A da NgGAPDH (amarelo) e o monômero A da aspartato-semialdeído desidrogenase (código PDB 2R00). (C) Representação do monômero A da NgGAPDH, em roxo o domínio do NADH que compreende os resíduo 1 ao 133 e 314 ao 333 e em azul o domínio do sítio ativo, que compreende os resíduos 134 ao 313.

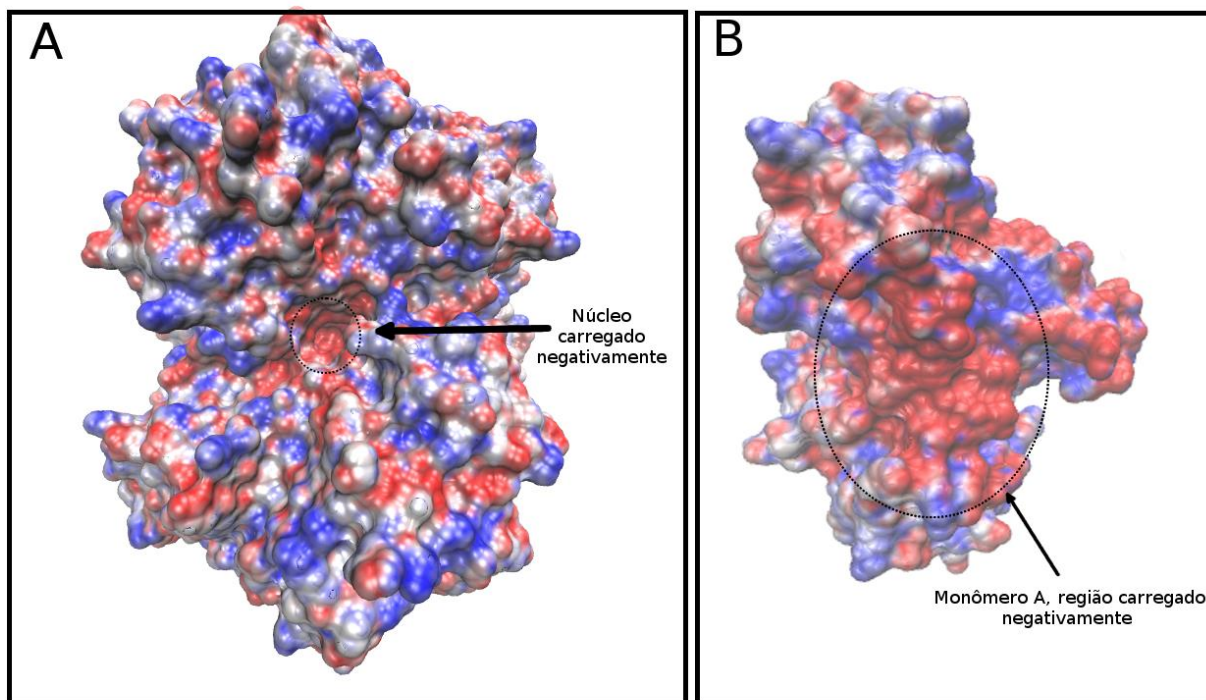


Fonte: O autor

2.4.3.4.2 Superfície de potencial eletrostático

Uma análise detalhada da superfície de potencial eletrostático (Figura 41 (A)) revelou a presença de uma cavidade carregada negativamente formada pela interação entre os quatros monômeros na estrutura tetramérica da NgGAPDH. Essa região pode ser visualizada na figura 41 (B), que mostra a região carregada negativamente do monômero.

Figura 41: (A) Superfície de potencial eletrostático da estrutura tetramérica da *NgGAPDH*, em destaque a cavidade carregada negativamente formada pela interação entre os monômeros. (B) Superfície de potencial eletrostático do monômero A, em destaque a região carregada negativamente.

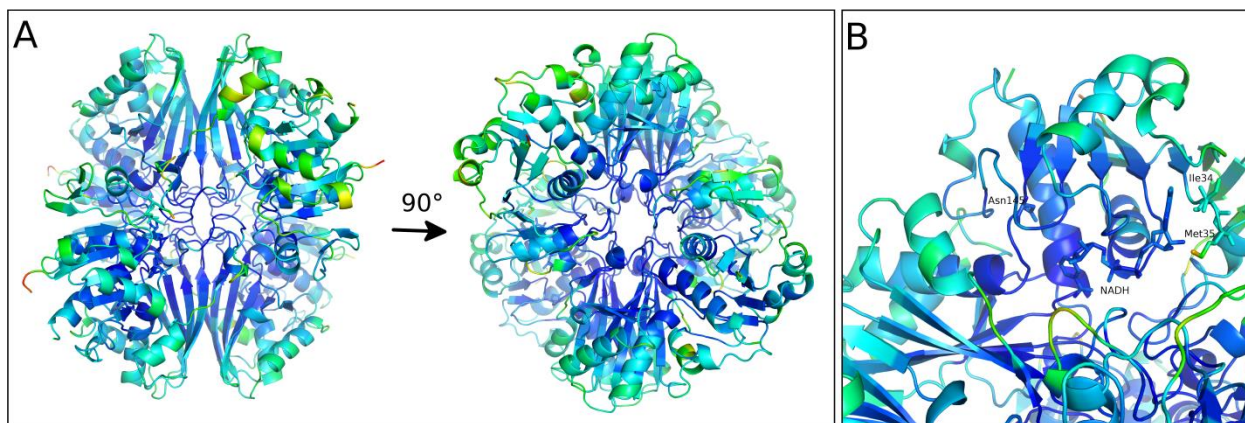


Fonte: O autor

2.4.3.4.3 Análise dos parâmetros de deslocamento atômico

Uma análise da distribuição dos parâmetros de deslocamento atômico ao longo da sequência modelada da proteína *NgGAPDH* (Figura 42 (A)) indica que as regiões N e C-terminal apresentaram valores de B-factor relativamente altos, com o máximo de $79,77 \text{ \AA}^2$, enquanto que as regiões de interação entre os monômeros e os resíduos que interagem com o cofator, inclusive a Asn145, apresentaram valores de B-factor relativamente baixos, com o mínimo de $12,91 \text{ \AA}^2$, com exceção de Ile34 e Met35 (Figura 42 (B)).

Figura 42: Estrutura colorida pela sucessão de cores de arco-íris de acordo com os parâmetros de deslocamento atômico (azul, 12,91 Å², e vermelho, 79,77 Å²). (A) Tetrâmero em duas orientações, giradas de 90 ° no eixo y. (B) Destaque para o cofator NADH e os resíduos Ileu34 e Met35, que pertencem ao domínio do cofator, e o resíduo Asn145, que pertence ao domínio catalítico.

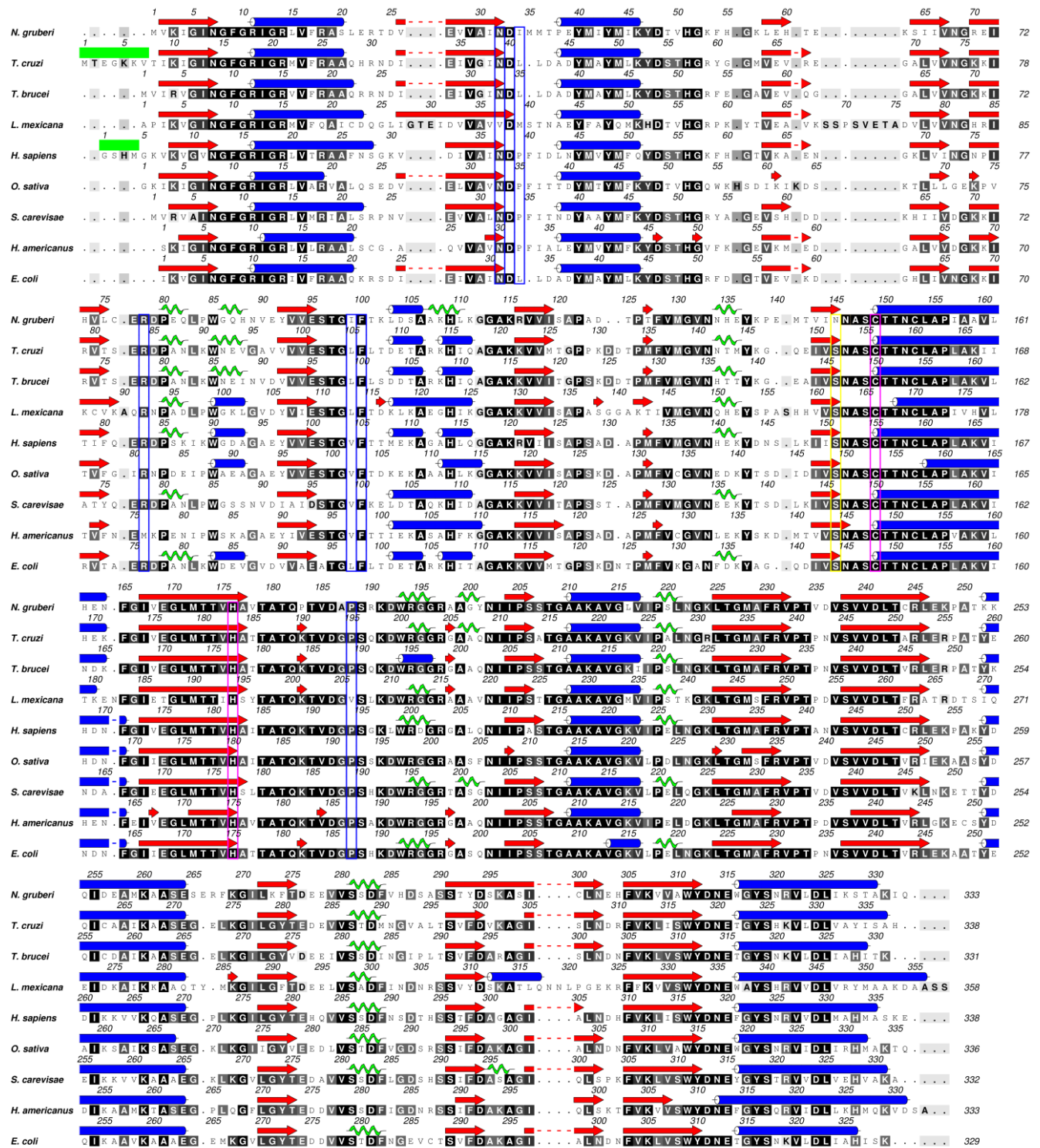


Fonte: O autor

2.4.3.4.4 Alinhamento e sobreposição das estruturas

As estruturas das GAPDHs selecionadas para o alinhamento e as comparações foram aquelas indicadas pelo HOMESTRAD, que analisa o perfil evolutivo entre as sequências de aminoácidos, e foram privilegiadas para representar um de cada domínio dos eucariotos: *T. cruzi* (glicosomal) (Código PDB 4LSM) (LADAME et al., 2003), *Trypanosoma brucei* (glicosomal) (Código PDB 4P8R) (VELLIEUX et al., 1993), *Leishmania mexicana* (glicosomal) (Código PDB 1GYP) (KIM et al., 1995), *Homo sapiens* (Código PDB 1ZNQ) (ISMAIL; PARK, 2005), *Oryza sativa* (Código PDB 3E6A) (TIEN et al., 2012), *Saccharomyces cerevisiae* (Código PDB 3PYM), *Homaurs americanus* (Código PDB 1GPD) (MORAS et al., 1975) e *Escherichia coli* (Código PDB 1GAD) (DUEE et al., 1996). O alinhamento entre as estruturas selecionadas incluindo a NgGAPDH está apresentado na Figura 43 e os valores de RMSD entre Cas estão relatados na Tabela 9.

Figura 43: Alinhamento da sequência de aminoácidos entre as estruturas da GAPDHs de *N. gruberi* (Código PDB 5UR0), *T. cruzi* (Código PDB 4LSM), *T. brucei* (Código PDB 4P8R), *L. mexicana* (Código PDB 1GYP), *H. sapiens* (Código PDB 1ZNQ), *O. sativa* (Código PDB 3E6A), *S. cerevisiae* (Código PDB 3PYM), *H. americanus* (Código PDB 1GPD) e *E. coli* (Código PDB 1GAD). Os retângulos cheios verdes apontam os aminoácidos que não foram modelados na estrutura cristalográfica, os retângulos vazados azuis indicam os resíduos que interagem com o cofator, os retângulos vazados em rosa destacam os resíduos catalíticos e o retângulo amarelo destaca o resíduo Asn do domínio catalítico.



Fonte: O autor

Tabela 8: Valores de RMSD entre C α s referentes às sobreposições das estruturas de NgGAPDH, *T. cruzi* (Código PDB 4LSM), *T. brucei* (Código PDB 4P8R), *L. mexicana* (Código PDB 1GYP), *H. sapiens* (Código PDB 1ZNQ), *O. sativa* (Código PDB 3E6A), *S. cerevisiae* (Código PDB 3PYM), *H. americanus* (Código PDB 1GPD) e *E. coli* (Código PDB 1GAD).

Organismo / código PDB	RMSD (Å)
<i>T. cruzi</i> / 4LSM	0,7
<i>T. brucei</i> / 4P8R	0,7
<i>L. mexicana</i> / 1GYP	1,3
<i>H. sapiens</i> / 1ZNQ	0,9
<i>O. sativa</i> / 3E6A	0,8
<i>S. cerevisiae</i> / 3PYM	0,9
<i>H. americanus</i> / 1GPD	1,5
<i>E. coli</i> / 1GAD	0,8

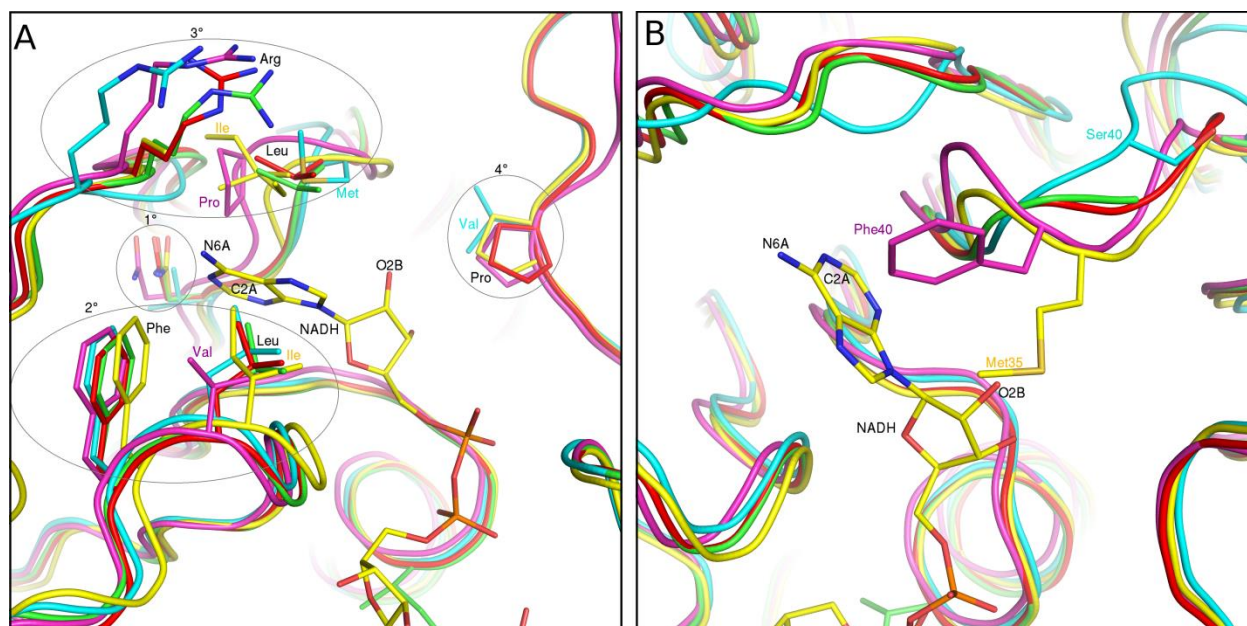
Fonte: O autor

GAPDHs glicosomais de *L. mexicana*, *T. cruzi* and *T. brucei* foram identificadas como potenciais alvos porque apresentam diferenças significativas na formação da cavidade do anel adenina do cofator, comparadas com a enzima humana (SURESH et al., 2001; COWAN-JACOB et al., 2002). De acordo com SURESH et al., (2001) há quatro regiões que diferenciam as estruturas de GAPDH dos tripanosomas da humana e, portanto, são exploradas para o desenho de inibidores específicos (Figura 44 (A)). É possível que qualquer uma dessas regiões em *N. fowleri* seja semelhante ou idêntica à alguma do seu gênero e, por isso, a caracterização dessas regiões na estrutura da *N. gruberi* poderia ser explorada para o desenho de inibidores para a *N. fowleri* (ONDARZA, 2007). Os resíduos pertencentes às quatro regiões estão indicados pelos retângulos vazados azuis no alinhamento da Figura 43.

A primeira região é próxima ao átomo C2A da base do anel de adenina do cofator, *N. gruberi* apresenta um resíduo hidrofílico (Asn32) idêntico ao de *T. cruzi*, *T. brucei* e *H. sapiens*, ao invés da Val37 hidrofóbica de *L. mexicana* (Figura 44 (A)). A segunda região está localizada próxima ao átomo N6A da base, em que *N. gruberi* apresenta Ile99 e Phe100. O segundo resíduo é conservado, mas o primeiro corresponde a Leu em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. mexicana*, enquanto quanto que em *H. sapiens* corresponde a Val (Figura 44 (A)). Segundo SURESH et al. (2001) os resíduos hidrofóbicos dessa região poderiam contribuir com maior seletividade para a busca de inibidores específicos.

A terceira região considerada é a cavidade da interação do átomo N6A do anel da base de adenina. Em *N. gruberi*, esta região é formada por Ile34 (refinada, inclusive, em duas conformações) e Arg78. O segundo resíduo é conservado, mas o primeiro corresponde a Leu em *T. cruzi* e *T. brucei*, no entanto, em *L. mexicana*, corresponde a Met, mas a Pro em *H. sapiens* (Figura 44 (A)). No alinhamento é possível observar que a posição da Met35 é única na *N. gruberi* comparada entre as estruturas selecionadas; este resíduo apresenta uma cadeia lateral estendida, portanto, está mais próximo do anel de adenina do que em qualquer outro protozoário ou em humanos, que possuem diferentes resíduos e conformações (Figura 44 (B)). Finalmente, a quarta região explorada para o desenho de inibidores específicos é próxima ao átomo O2B da adenosina da ribose. Em *N. gruberi*, este átomo está perto da Pro188 do monômero vizinho e corresponde ao mesmo resíduo em *T. cruzi*, *T. brucei* e *H. sapiens*, mas em *L. mexicana* é uma Val (Figura 44 (A)).

Figura 44: Sobreposição da estrutura da GAPDH de *N. gruberi* (amarelo), *T. cruzi* (verde), *T. brucei* (vermelho), *L. mexicana* (azul), *H. sapiens* (rosa). (A) Destaque para as quatro regiões que interagem com o anel adenina do cofator. (B) Terceira região ampliada e em outra orientação, com destaque para a Met35 em *N. gruberi* (amarelo), Ser40 em *L. mexicana* (azul) e Phe40 em *H. sapiens* (rosa).

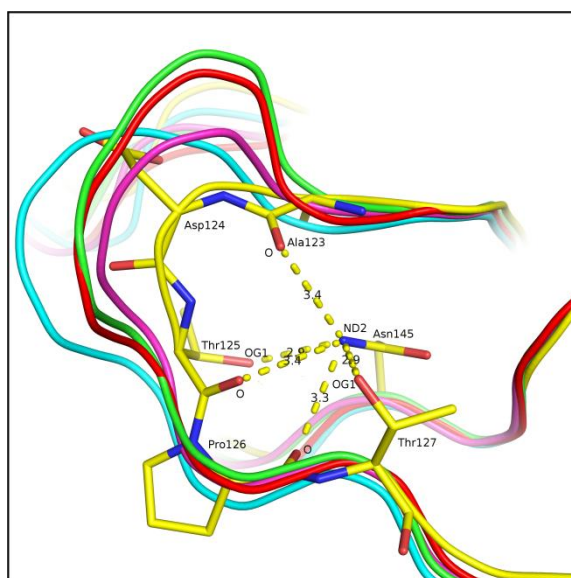


Fonte: O autor

O alinhamento (Figura 43) mostra que o domínio catalítico, entre os resíduos 134 e 313 da *N. gruberi*, é altamente conservado, com exceção da Asn145 (retângulo amarelo indicado na Figura 43), sendo *NgGAPDH* a única proteína que apresenta esse resíduo nessa posição, enquanto que as demais GAPDHs apresentam Ser ou Thr na posição correspondente (BERMAN et al., 2000). As interações do átomo ND2 da Asn145 foram estudadas por dinâmica molecular,

que indicaram que esse resíduo é capaz de fazer ligação de hidrogênio (com ângulo mínimo D-H-A de 120 ° e distância máxima D-A de 3,5 Å) com o oxigênio (O) da cadeia principal dos resíduos Ala123, Thr125 e Pro126, e com o oxigênio (OG1) da cadeia lateral dos resíduos Thr125 e Thr127, interações que são únicas para essa proteína (Figura 45). Os resíduos que interagem com o Asn145 pertencem ao loop que está entre a sexta folha- β e a quinta hélice- α (Figura 39), que será doravante denominado “bonded loop”.

Figura 45: Sobreposição das estruturas de GAPDH de *N. gruberi* (amarelo), *T. cruzi* (verde) (Código PDB 4LSM), *T. brucei* (vermelho) (Código PDB 4P8R), *L. mexicana* (azul) (Código PDB 1GYP), *H. sapiens* (rosa) (Código PDB 1ZNQ). As linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio formadas durante a dinâmica produtiva entre o átomo ND2 da Asn145 aos átomos O de Ala123, Thr125 e Pro126 e aos átomos OG1 de Thr125 e Thr127.



Fonte: O autor

2.4.3.4.5 Estudo por dinâmica molecular

Estudos por dinâmica molecular foram realizados para investigar características particulares da estrutura da NgGAPDH, como o efeito da presença da Asn na posição 145, a consequência de uma mutação para Ser (N145S) sobre a movimentação do loop 123-127 (resíduos Ala123, Asp124, Thr125, Pro126 e Thr127; “bonded loop”) e diferenças entre as formas holo e apo.

2.4.3.4.5.1 Efeito da mutação N145S na flexibilidade do “bonded loop”

A NgGAPDH é atualmente a única GAPDH com estrutura resolvida (ALTSCHUL et al., 1990) que apresenta uma Asparagina na sua posição 145, enquanto que outras estruturas

apresentam geralmente uma Serina ou uma Treonina. Quando Ser145 é iniciado, na dinâmica, na conformação do rotâmetro “p” (encontrado na maioria das estruturas homólogas) ou como no rotâmetro “m”, geralmente, depois de algum tempo, ele se transforma em um rotâmetro “t”, onde permanece na maior parte do tempo. Assim, os resultados foram semelhantes para ambos os mutantes e, portanto, serão apresentados aqui apenas para o primeiro. A Tabela 10 mostra o RMSD da média das triplicatas dos resíduos do “bonded loop” por cadeia durante a dinâmica produtiva para cada monômero e as correspondentes diferenças entre as proteínas nativas e mutantes.

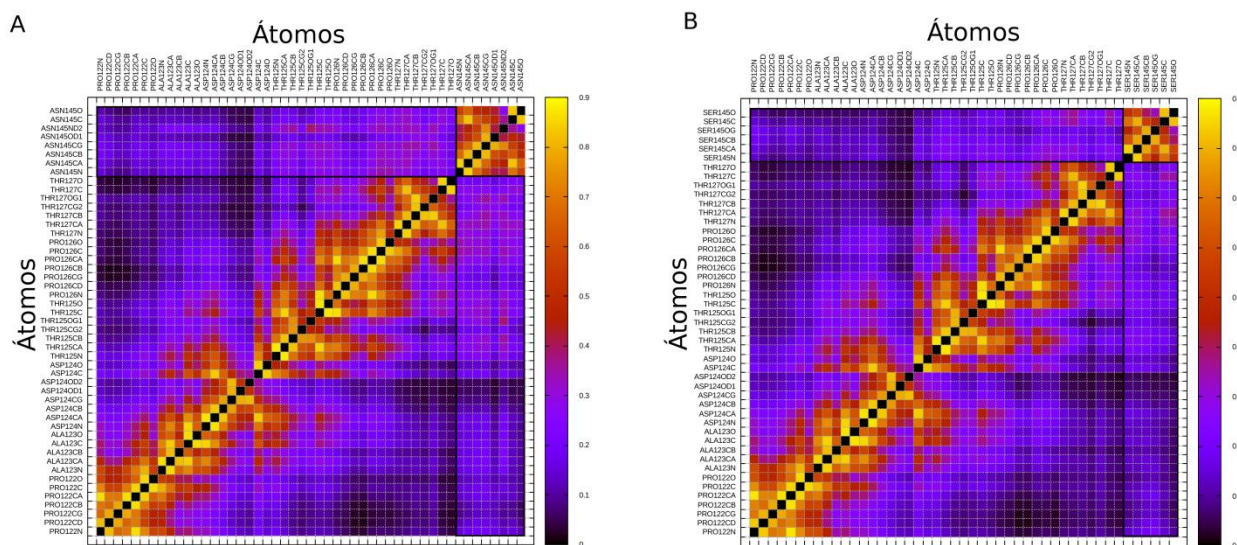
Tabela 9: RMSD (Å) para os resíduos que pertencem ao “bonded loop” da estrutura NgGAPDH.

NgGAPDH	RMSD (Å)			
	Monômero A	Monômero B	Monômero C	Monômero D
Nativa (Asn145)	1,2823	1,7035	1,3780	1,6549
Mutante (Ser145)	1,0833	1,1533	1,2873	1,3096
Nativa - Mutante	0,1990	0,5502	0,0907	0,3453

Fonte: O autor

A partir da Tabela 10 é possível concluir que a presença de Asn145 na estrutura de NgGAPDH faz com que o “bonded loop” tenha maior flexibilidade do que com Ser. De fato, o número de ligações de hidrogênio que ND2 da Asn145 forma com os resíduos Ala123, Thr125, Pro126 e Thr127 durante a dinâmica é em média 1,99, enquanto que a Ser não realiza ligações hidrogênio com esse loop. A Figura 46 (A) ilustra a correlação de movimento entre a Asn145 e os resíduos pertencentes ao “bonded loop”; observa-se no gráfico que o átomo ND2 da Asn tem maior correlação de movimento com os átomos OG1 da Thr125 e da Thr127. Por outro lado, a Figura 46 (B) revela que a Ser145 leva a uma menor correlação geral, embora haja ainda alguma correlação de movimento com a Thr127. Nos dois gráficos, os valores apresentados são promediações envolvendo as 4 cadeias e as triplicatas. Portanto, a conclusão é que o “bonded loop” tende a seguir a movimentação da Asn145, o que lhe confere uma flutuação relativamente alta durante a dinâmica, e isso é peculiar da NgGAPDH.

Figura 46: Gráficos de correlação de movimento do resíduo 145 com o “bonded loop”, os retângulos delineados em preto destacam relações de interesse. (A) Asn145. (B) Ser145, a partir do rotâmero “p”.



Fonte: O autor

2.4.3.4.5.2. Comparação entre as formas holo e apo

As formas holo e apo da GAPDH de *Palinurus versicolor* foram previamente caracterizadas por SHEN et al., (2000); de acordo com esse autor, distâncias entre átomos dos resíduos Arg11, Ile12, Asp33 e Arg78 (numeração de acordo com a sequência de *N. gruberi*), que estão no domínio do cofactor, indicam se a estrutura esta “aberta” ou “fechada”. A Tabela 11 mostra as médias dessas distâncias para as estruturas cristalográficas de *P. versicolor* e *B. stearothermophilus* (WONACOTT; SKARZYNSKI, 1990), e as médias obtidas a partir de dinâmica molecular da estrutura NgGAPDH.

Pode-se observar que essas diferenças de distância para NgGAPDH são, em geral, relativamente baixas ou mesmo positivas, as quais foram relacionadas (SHEN et al., 2000) a uma menor cooperatividade negativa (menor valor negativo) na ligação do cofator, observada em *P. versicolor* comparada à estrutura de *B. stearothermophilus*, esta última com diferenças maiores entre as distância e cooperatividade negativa elevada. NgGAPDH foi previamente relatada com cooperatividade positiva (MACHADO; SILVA; IULEK, 2016), o que poderia, então, confirmar tal tendência. No entanto, mais dados sobre as formas apo e holo desta classe de proteínas cuja

cooperatividade já foi caracterizada poderia corroborar a relação das diferenças de distância com a tendência de cooperatividade.

Tabela 10: Distâncias em Å entre átomos do domínio do cofator.

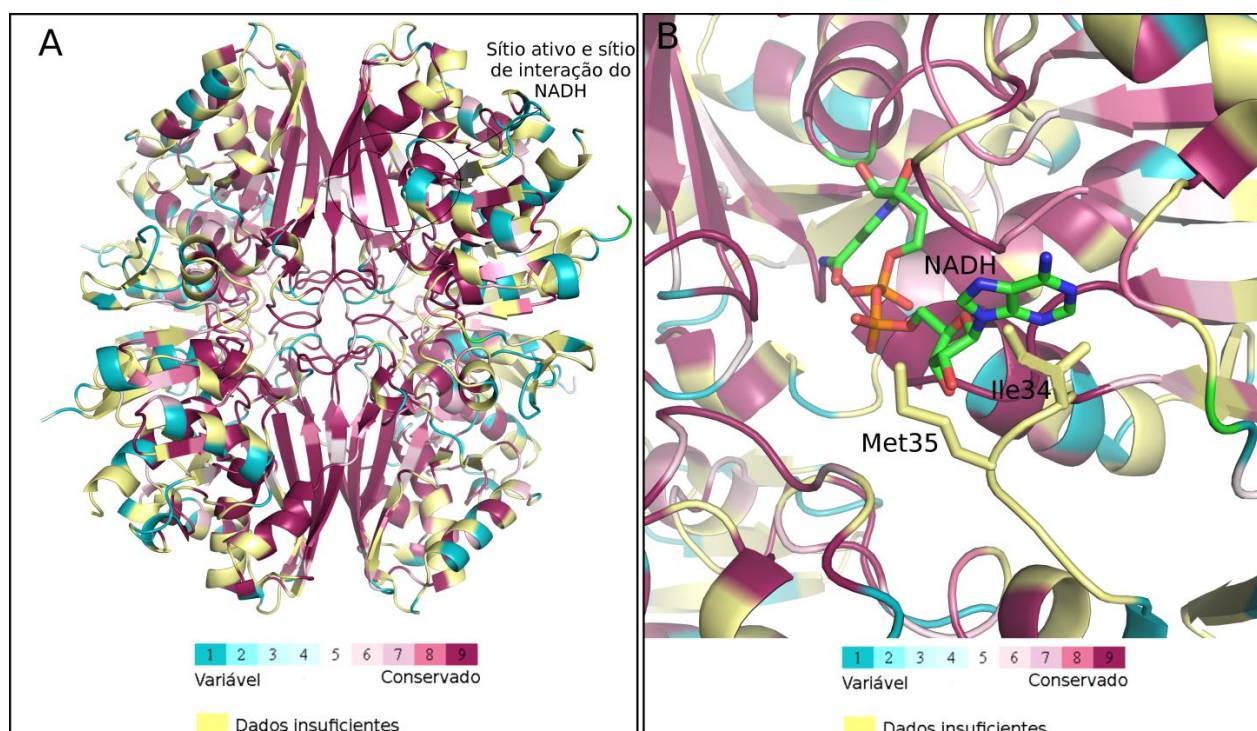
	<i>N. gruberi</i>			<i>P. versicolor</i>			<i>B. stearrowthermophilus</i>		
	Holo	Apo	Holo-Apo	Holo 1SZJ	Apo 1CRW	Holo-Apo	Holo 1GD1	Apo 2GD1	Holo-Apo
CaAsn314 – CaArg11 (Å)	11,12	11,33	-0,21	10,31	10,76	-0,45	10,42	11,20	-0,78
CaAsn314-CaIle12 (Å)	9,88	10,28	-0,40	9,54	9,95	-0,41	9,63	10,16	-0,53
CaAsn314-CaAsp33 (Å)	23,09	22,33	0,76	21,83	22,20	-0,37	21,82	22,53	-0,71
CaAsn314-CaAgr78 (Å)	27,88	28,63	-0,75	26,48	26,85	-0,37	26,58	27,31	-0,73
ND2Asn314-NArg11 (Å)	11,34	11,04	0,30	10,12	10,48	-0,36	10,33	11,16	-0,83
ND2Asn314-NIle12 (Å)	9,94	9,74	0,20	9,26	9,59	-0,33	9,41	10,07	-0,66
ND2Asn314-OD2Asp33 (Å)	20,72	20,58	0,14	17,64	18,29	-0,65	19,18	20,43	-1,25
ND2Asn314-OD1Asp33 (Å)	19,25	18,53	0,72	19,36	19,89	-0,29	17,57	18,75	-1,18
ND2Asn314-OArg78 (Å)	26,37	26,78	-0,41	24,64	24,76	-0,12	24,75	25,35	-0,55
Valores combinados			0,35			-3,35			-7,72

Fonte: O autor

2.4.3.4.6 Estudo evolutivo preliminar

A Figura 47 (A) produzida pelo Web Server ConSurf foi colorida de acordo com a conservação evolutiva dos aminoácidos; observa-se que o domínio do cofator e o domínio do sítio ativo são conservados, como esperado, no entanto, os resíduos Ile34 e Met35, que estão próximos do NADH, não são conservados, como destacado na Figura 47 (B).

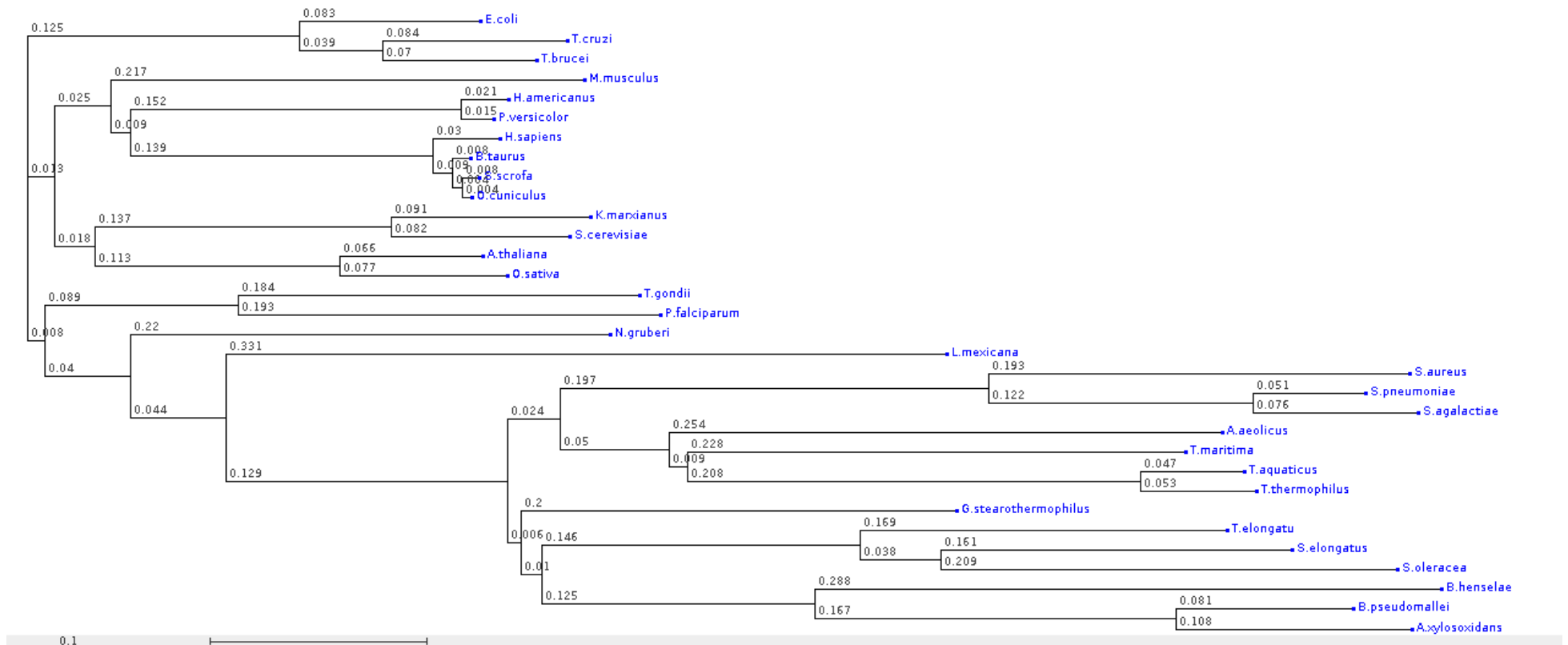
Figura 47: Estrutura da NgGAPDH colorida de acordo com o perfil evolutivo de conservação dos aminoácidos. (A) Estrutura global com destaque para os sítios ativo e de ligação ao NADH. (B) Destaque para os resíduos Met35 e Ile34, que interagem com o cofator.



Fonte: o autor

A GAPDH de *N. gruberi* pertence a um organismo primitivo, sendo assim, sua estrutura tridimensional pode no futuro contribuir com informações a respeito da evolução das GAPDHs nos eucariotos. O dendrograma das relações filogenéticas entre os organismos *E. coli*, *T. cruzi*, *T. brucei*, *M. musculus*, *H. americanus*, *P. versicolor*, *H. sapiens*, *B. taurus*, *S. scrofa*, *O. cuniculus*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *O. sativa*, *T. gondii*, *P. falciparum*, *N. gruberi*, *L. mexicana*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *A. aeolicue*, *T. maritima*, *T. aquaticus*, *T. thermophilus*, *G. stearothermophilus*, *T. elongatus*, *S. oleracea*, *B. henselae*, *B. pseudomallae* e *A. xylosoxidans*, construído pelo web Server ConSurf (Figura 48), mostra um perfil evolutivo preliminar entre essas estruturas de GAPDHs.

Figura 48: Dendrograma das relações filogenéticas entre os organismos *E. coli*, *T. cruzi*, *T. brucei*, *M. musculus*, *H. americanus*, *P. versicolor*, *H. sapiens*, *B. taurus*, *S. scrofa*, *O. cuniculus*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *O. sativa*, *T. gondii*, *P. falciparum*, *N. gruberi*, *L. mexicana*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *A. aeolicus*, *T. maritima*, *T. aquaticus*, *T. thermophilus*, *G. stearothermophilus*, *T. elongatus*, *S. oleracea*, *B. henselae*, *B. pseudomallei* e *A. xylosoxidans*. Construído no website ConSurf, a escala representa valores probabilísticos que estimam a proximidade entre as estruturas.



Fonte: O autor

2.5 CONCLUSÕES

A proteína NgGAPDH foi expressa e purificada com êxito na forma solúvel, homogênea e em quantidade que possibilitou realizar as análises cinéticas e ensaios de cristalização. Entretanto, não foi possível realizar as caracterizações da proteína com a “his-tag”, ou seja, o corte da “tag” foi essencial para ambos os estudos.

Os parâmetros cinéticos obtidos da NgGAPDH levam a concluir que as propriedades cinéticas desta enzima são semelhantes às das demais. O alinhamento entre várias GAPDHs revelou que o domínio catalítico entre os resíduos é altamente conservado, como esperado, com exceção da Asn145, presente somente em NgGAPDH, enquanto que as demais GAPDHs apresentam Ser ou Thr na mesma posição.

A influência da presença do Asn145 na estrutura da NgGAPDH foi analisada por dinâmica molecular; os resultados indicaram que os resíduos Ala123, Asp124, Thr125, Pro126 e Thr127 apresentaram uma maior correlação de movimentos com o resíduo Asn do que com Ser na mesma posição, indicando maior flexibilidade na presença da Asn do que com o Ser.

A NgGAPDH apresenta cooperatividade positiva; a comparação das distâncias entre átomos pertencentes aos resíduos Arg11, Ile12, Asp33 e Arg78 na forma holo e apo indicaram diferenças baixas quando comparadas com enzimas que exibem cooperatividade negativa. A partir dessa análise, hipotetiza-se que há uma tendência de que as GAPDHs que exibem cooperatividade positiva apresentem diferenças entre as distâncias entre esses átomos menores do que as que apresentam cooperatividade negativa.

Perspectivas

Não foi possível realizar a cristalização da *TcAlr_longa*, pois em altas concentrações, necessárias para os testes, ocorre a precipitação da proteína. Assim, a próxima etapa a ser realizada deve ser a expressão sem a “his-tag”, para os posteriores ensaios de cristalização.

Para a *NgGAPDH*, novos trabalhos terão como objetivos obter o mutante N145S e avaliar a sua cinética frente ao substrato, comparando-a com a da nativa.

Referências

- ABE, H.; YOSHIKAWA, N.; SAROWER, M. G.; OKADA, S. Biol. Physiological function and metabolism of free D-alanine in aquatic animals. **Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 1571-1577, 2005.
- AFONINE, P. V.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D. A robust bulk-solvent correction and anisotropic scaling procedure. **Acta Crystallographica, Section D: Structural Biology**, v. 61, p. 850–855, 2005.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W. E LIPMAN, D. J. Basic Local alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ASHKENAZY, H.; ABADI, S.; MARTZ, E.; CHAY, O.; MAYROSE, I.; PUPKO, T.; Ben-Tal, N. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v. 44, p. W344-W350, 2016.
- AU, K.; REN, J.; WALTER, T. S.; HARLOS, K.; NETTLESHIP, J. E.; OWENS, R. J.; STUART, D. I.; ESNOUF, R. M. Structures of an alanine racemase from *Bacillus anthracis* (BA0252) in the presence and absence of (R)-1-aminoethylphosphonic acid (L-Ala-P). **Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 64, p. 327-333, 2008.
- BACKER, N. A.; SEPT, D.; JOSEPH, S.; HOLST, M. J.; MCCAMMON, A. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 10037-10041, 2001.
- BADET, B.; ROISE, D.; WALSH, C. T. Inactivation of the *dadB* *Salmonella typhimurium* alanine racemase by D and L isomers of beta-substituted alanines: kinetics, stoichiometry, active site peptide sequencing, and reaction mechanism. **Biochemistry**, v. 23, p. 5188-, 1984.
- BAIBAI, T.; OUKHATTAR, L.; MOUNTASSIF, D.; ASSOBEI, O.; SERRANO, A.; SOUKRI, A. Comparative molecular analysis of evolutionarily distant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Sardina pilchardus* and *Octopus vulgaris*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 42, p. 863– 872, 2010.
- BAKER, B.Y.; SHI, W.; WANG, B.; PALCZEWSKI, K. High-resolution crystal structures of the photoreceptor glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with three and four-bound NAD molecules. **Protein Science**, v. 23, p.1629–1639, 2014.
- BARBOSA, V. M; NAKANO, M. Muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Anas sp.-1*. Purification and properties of the enzyme. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 88B, p. 563-568, 1987.

BARTON, G. J. ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments. **Protein Engineering**, v. 6, p. 37-40, 1993.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica medica**. 4. ed. Elsevier/LtdA, 2015. p. 148.

BELVAL, L.; MARQUETTE, A.; MESTRE, P.; DEMANGEAT, G.; MERDINOGLU, D.; CHICH, J. F. A fast and simple method to eliminate Cpn60 from functional recombinant proteins produced by *E. coli* Artic Express. **Protein Expression and Purification**, v. 109, p. 29-34, 2015.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res.** v. 28, 235-242, 2000.

BERRY, M. D. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a target for small-molecule disease-modifying therapies in human neurodegenerative disorders. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 29, p. 337-45. 2004.

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, p. 510-512, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248–254, 1976.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**, 2 ed. Garland Publishing, New York, 1998.

BROWN, E. W.; DAVIS, R. M.; GOUK, C.; ZWET, T. V. Phylogenetic relationships of necrogenic *Erwinia* and *Brenneria* species as revealed by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 2057 –2068, 2000.

BUHAY, J. E.; MONI, G.; MANN, N.; CRANDALL, K. A. A molecular taxonomy in the dark: evolutionary history, phylogeography, and diversity of cave crayfish in the subgenus *Aviticambarus*, genus *Cambarus*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, p. 435 – 448, 2007.

BUTTERFIELD, D. A.; HARDAS, S. S.; LANGE, M. L. Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease: many pathways to neurodegeneration. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, p. 369-93, 2010.

CANBACK, B.; ANDERSSON, S. G.; KURLAND, C. G. The global phylogeny of glycolytic enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 6097– 6102, 2002.

CASE, D. A.; DARDEN, T. A.; CHEATHAM, T. E.; SIMMERLING, I., C.L.; WANG, J.; DUKE, R. E.; LUO, R.; WALKER, R. C.; ZHANG, W.; MERZ, K. M.; ROBERTS, B.; HAYIK, S.; ROITBERG, A.; SEABRA, G.; SWAILS, J.; GOETZ, A. W.; KOLOSSVÁRY, I.; WONG, K. F.; PAESANI, F.; VANICEK, J.; WOLF, R. M.; LIU, J.; WU, X.; BROZELL, S. R.; STEINBRECHER, T.; GOHLKE, H.; CAI, Q.; YE, X.; WANG, J.; HSIEH, M. J.; CUI, G.; ROE, D. R.; MATHEWS, D. H.; SEETIN, M. G.; SALOMON-FERRER, R.; SAGUI, C.; BABIN, V.; LUCHKO, T.; GUSAROV, S.; KOVALENKO, A.; KOLLMAN, P. A. **AMBER** 16. San Francisco: University of California 2016.

CAPRETTE, D. R. An Amoeba-flagellate: *Naegleria gruberi*. <<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/invertebrates/naegleria.html>. 2007>. Acesso em: 20 set. 2015.

CAZZULO, J. J. Aerobic fermentation of glucose by Trypanosomatids. **FASEB Journal**, v. 6, p. 3153-3161, 1992.

CAZZULO, J. J. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 26, p. 157-65, 1994.

CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK, V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Biological Chemistry**, v. 378, p. 1-10. 1997.

CHEN, V. B.; BRYAN, W. A.; HEADD, D. A.; KEEDY, M. A.; IMMORMINO, M. R.; KAPRAL, G. J.; MURRAY, J. S.; RICHARDSON, D. C. MolProbity: all atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography**, v. 66, p.12-21, 2010.

CHENG, Y. Q.; WALTON, J. D. A eukaryotic alanine racemase gene involved in cyclic peptide biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 4906-4911, 2000.

CHESNOKOVA, O. N.; MCPHERSON, S. A.; STEICHEN, C. T.; TURNBOUGH, C. L. JR. The spore-specific alanine racemase of *Bacillus anthracis* and its role in suppressing germination during spore development. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 1303-1310, 2009.

CONTI, P.; TAMBORINI, L.; PINTO, A.; BLONDEL, A.; MINOPRIO, P.; MOZZARELLI, A.; MICHELI, C. D. Drug Discovery Targeting Amino Acid Racemases. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 6919-6946, 2011.

COUÑAGO, R.M.; DAVLIEVA, M.; STRYCH, U.; HILL, R.E.; KRAUSE, K.L. Biochemical and structural characterization of alanine racemase from *Bacillus anthracis* (Ames). **BMC Structural Biology**, v. 9, p. 9-53, 2009.

COWAN-JACOB, S. W.; KAUFMANN, M.; ANSELMO, A. N.; STARK W.; GRUÉTTER, M. G. Structure of rabbit-muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. D59, p. 2218-2227, 2003.

DE JONCKHEERE, J. F. A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. **Acta Protozoologica**, v. 41, p. 309-342. 2002.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 2444-2457, 2009.

DHEDA, K.; HUGGETT, J. F.; BUSTIN, S. A.; JOHNSON, M. A.; ROOK, G.; ZUMLA, A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in realtime PCR. **Biotechniques**, v. 37, p. 112–119, 2004.

DUEE, E.; OLIVIER-DEYRIS, L.; FANCHON, E.; CORBIER, C.; BRANLANT, G.; DIDEBERG, O. Comparison of the structures of wild-type and a N313T mutant of *Escherichia coli* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases: implication for NAD⁺ binding and cooperativity. **Journal of Molecular Biology**, v. 257, p. 814-838, 1996.

DUGGLEBY, R. G.; DENNIS, D. T. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pea seeds. **Methods Enzymol**, v. 89, p. 319-325, 1982.

ELLIOTT, P. R.; MOHAMMAD, S.; MELROSE, H. J.; MOODYA, P. C. E. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of an NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Helicobacter pylori*. **Acta crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 64, p. 727–729, 2008.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. **Acta Crystallographica, Section D: Structural Biology**, v. 60, p. 2126-2132, 2004.

ENGEL, J. C.; FRANKE, B. M.; CAZZULO, B. M.; STOPPANI, A. O. M.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 26, p. 1-10, 1987.

ESWAR, N.; WEBB, B.; MARTI-RENOM, M. A.; MADHUSUDHAN, M. S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M. Y.; PIEPER, U. E SALLI, A. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Current Protocols in Protein Science**, v. 5, p. 291-2931, 2006.

EVANS, P.; MURSHUDOV, G. N. How good are my data and what is the resolution? **Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography**, v. 69, p. 1204–1214, 2013.

FAN, C.; PARK, I. S.; WALSH, C. T.; KNOX, J. R. D-alanine: D-alanine ligase: phosphonate and phosphinate intermediates with wild type and the Y216F mutant. **Biochemistry**. v. 4, p. 2531-1538. 1997.

FENN, T.D.; HOLYOAK, T.; STAMPER, G.F.; RINGE, D. Effect of a Y265F mutant on the transamination-based cycloserine inactivation of alanine racemase. **Biochemistry**, v. 44, p. 5317-5327, 2005.

FARACI, W. S.; WALSH, C. T. Mechanism of inactivation of alanine racemase by beta, beta, beta-trifluoroalanine. **Biochemistry**, v. 28, p. 431, 1989.

FLAHERTY, K. M.; MCKAY, D. B.; KABSCH, W.; HOLMES, K. C. Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 5041–5045, 1991.

FRITZ-LAYLIN L. K.; SE. P.; GINGER, M. L.; DACKS, J. B; CARPENTER, M. L; FIELD, M. C; KUO, A.; PAREDEZ, A.; CHAPMAN, J.; PHAM, J.; SHU, S.; NEUPANE, R.; CIPRIANO, M.; MANCUSO, J.; TU, H.; SALMOV, A.; LINDQUIST, E.; SHAPIRO, H.; LUCAS, S.; GRIGORIEV, I. V.; CANDE, W. Z. ; FULTON, C. ; ROKHSAR, D. S. E DAWSON, S. C. The Genome of *Naegleria gruberi* Illuminates Early Eukaryotic Versatility. **Cell**, v. 140, p. 631–642. 2010.

FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; MICHELS, P. A. Evolution of glycolysis. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 59, p. R105 – R235, 1993.

FULTON, C. Amebo-flagellates as research partners: The laboratory biology of *Naegleria* and *Tetramitus*. **Methods in Cell Physiology**, v. 4, p. 341-476, 1970.

FULTON, C. *Naegleria*: A research partner for cell and developmental biology. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, p. 520-532, 1993.

GARCIA-ESTRADA, C.; PRADA, C. F.; FERNÁNDEZ-RUBIO, C.; ROJO-VÁZQUEZ, F.; BALAÑA-FOUCE, R. DNA topoisomerases in apicomplexan parasites: promising targets for drug discovery. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 277, p.1777-1787, 2010.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana. **Press**, p. 571-607, 2005.

GREGUS, Z.; ROOS, G.; GERRLINGS, P.; NÉMETI, B. Mechanism of thiol-supported arsenate reduction mediated by phosphorolytic-arsenolytic enzymes: II. Enzymatic formation of arsenylated products susceptible for reduction to arsenite by thiols. **Toxicological Sciences**, v. 110, p. 282-292, 2009.

GRISHIN, N. V.; PHILLIPS, M. A.; GOLDSMITH, E. Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. **Protein Science**, v. 4, p. 1291- 1304 1995.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças Infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 81-94, 2010.

GUIDO, R. V., TROSSINI, G. H. G., CASTILHO, M. S., OLIVA, G.; FERREIRA, E. I.; ANDRICOPULO, A. D. Structure-activity relationships for a class of selective inhibitors of the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 964-973, 2008.

HAMADA, H.; ARAKAWA, T.; SHIRAKI, K. Effect of additives on protein aggregation. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, p. 400-407. 2009.

HARRIS, J. I.; WATERS, M. **The Enzymes**, edited by P. D. Boyer. New York: Academic Press p. 1-49, 1976.

HEINZ, F.; FREIMÜLLER, B. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human tissues. **Methods Enzymol**, v. 89, p. 301-305, 1982.

HOFFMANN, K.; SCHNEIDER-SCHERZER, E.; KLEINKAUF, H.; ZOCHER, R. Purification and characterization of eukaryotic Alanine Racemase acting as key enzyme in cyclosporin biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 12710-12714, 1994.

HOLM, L.; ROSENSTROM, P. Dali server: conservation mapping in 3D. **Nucleic Acids Research**, v.38, p. W545-W549, 2010.

HUANG, C. M.; ELMETS, C. A.; TANG, D. C.; LI, F.; YUSUF, N. Proteomics reveals that proteins expressed during the early stage of *Bacillus anthracis* infection are potential targets for the development of vaccines and drugs. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 2, p. 143-151, 2004.

IDDAR, A.; VALVERDE, F.; ASSOBEI, O.; SERRANO, A.; SOUKRI, A. Widespread occurrence of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase among gram-positive bacteria. **International Microbiology**, v. 8, p. 251 –258, 2005.

ISMAIL, S. A.; PARK, H. W. Structural analysis of human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Acta Crystallographica, Section D: Structural Biology**, v. 61, p. 1508-1513, 2005.

JORGENSEN, W. L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J.; IMPEY, R. W.; KLEIN, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **Journal of Chemical Physics**, v. 79, p. 926-935, 1983.

KABSCH, W. XDS: Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p.795-800, 1994.

KABSCH, W.; SANDER C: Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, p.2577-2637, 1983.

KANWAR, M.; KOWLURU, A. Role of Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase in the Development and Progression of Diabetic Retinopathy. **Diabetes**, v. 58, p. 227-234, 2009.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. **Current Protein & Peptide Science**, v. 1, p. 349-384, 2000.

KIM, H.; FEIL, I. K.; VERLINDE, C. L.; PETRA, P. H.; HOL, W. G. Crystal structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania mexicana*: implications for structure-based drug design and a new position for the inorganic phosphate binding site. **Biochemistry**, v. 34, p. 14975-14986, 1995.

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

KUROKAWA, Y.; WATANABE, A.; YOSHIMURA, T.; ESAKI, N.; SODA, K. Transamination as a Side-Reaction Catalyzed by Alanine Racemase of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Biochemistry**, v. 124, p. 1163-1169, 1998.

KUZMIC, P. Chapter 10 – DynaFit—A Software Package for Enzymology. **Methods Enzymology**, v. 467, p. 247-280, 2009.

LADAME, S.; CASTILHO, M. S.; SILVA, C. H.; DENIER, C.; HANNAERT, V.; PÉRIÉ, J.; OLIVA, G.; WILLSON, M. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with an analogue of 1,3-bisphospho-d-glyceric acid. **European Journal of Biochemistry**, v. 22, p. 4574-86, 2003.

LAMBE, R. F.; WILLIAMS. D. C. The Enzymic Reduction of Nicotinamide-Adenine Dinucleotide by β -Mercaptoethanol. **Biochemical Journal**, v. 97, p. 475- 478, 1965.

LAWRENCE, J. G.; HARTL, D. L.; OCHMAN, H. Molecular considerations in the evolution of bacterial genes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 33, p. 241 – 250, 1991.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v.26, p.283-291, 1993.

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

LEMAGUERES, P.; IM, H.; DVORAK, A.; STRYCH, U.; BENEDIK, M.; KRAUSE, K.L. Crystal structure at 1.45 Å resolution of alanine racemase from a pathogenic bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, contains both internal and external aldimine forms. **Biochemistry**, v. 42, p. 14752-14761, 2003.

LEMAGUERES, P.; IM, H.; EBALUNODE, J.; STRYCH, U.; BENEDIK, M.J.; BRIGGS, J.M.; KOHN, H.; KRAUSE, K.L. The 1.9 Å crystal structure of alanine racemase from *Mycobacterium tuberculosis* contains a conserved entryway into the active site. **Biochemistry**, v. 44, p. 1471-1481, 2005.

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; FURRIEL, R. P.; BORIN, I. A. SigrafW: An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 33, 399-403, 2005.

LEVITZKI, A. Half-of-the-sites and all-of-the-sites reactivity in rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Journal of Molecular Biology**, v. 90, p. 451-458, 1974.

LIAUD, M. F.; VALENTIN, C.; MARTIN, W.; BOUGET, F. Y.; KLOAREG, B.; CERFF, R. The evolutionary origin of red algae as deduced from the nuclear genes encoding cytosolic and chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Chondrus crispus*. **Journal of Molecular Evolution**, v. 38, p. 319 – 327, 1994.

LIN, Y. L.; GAO, J.; RUBINSTEIN, A.; MAJOR, D. T. Molecular dynamics simulations of the intramolecular proton transfer and carbanion stabilization in the pyridoxal 5'-phosphate dependent enzymes L-dopa decarboxylase and alanine racemase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 11, p. 1438-1446, 2011.

LOVELL, S. C.; WORD, J. M.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. The Penultimate Rotamer Library. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**, v. 40, p. 389-408, 2000.

MACHADO, A. T. P.; SILVA, M.; IULEK, J. Expression, purification, enzymatic characterization and crystallization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Naegleria gruberi*, the first one from phylum Percolozoa. **Protein Expression and Purification**, v. 30, p. 127-125, 2016.

MAIER, J. A.; MARTINEZ, C.; KASAVAJHALA, K.; WICKSTROM, L.; HAUSER, K. E.; SIMMERLING, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, p. 3696-3713, 2015.

MANCILLA, R.; NAQUIRA, C.; LANAS, C. Protein biosynthesis in trypanosomidae. II. The metabolic fate of DL-leucine-1-C14 in *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 21, p. 154-159, 1967.

McCOY, A. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, p. 658-674, 2007.

McFALL, E.; NEWMAN, E. B.; In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt F C, editor. Vol. 1. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol. p. 358–379, 1996. 2011.

MIYAGUCHI, I.; SASAKI, C.; KATO, R.; OIKAWA, T.; SUGIO, S. Crystal Structure of Alanine Racemase from *Corynebacterium glutamicum* at 2.1 Å resolution, Código no PDB 2DY3.

MISSET, O.; VAN BEEUMEN, J., LAMBEIR, A. M.; VAN DER MEER, R.; OPPERDOES, F. R. Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. Comparison of the glycosomal and cytosolic isoenzymes. **European Journal of Biochemistry**, v. 162, p. 501-507, 1987.

MIZUGUCHI, K.; STEBBINGS, L.; BAKKER, P, de.; DEANE, C.; SHI, J.; SHIRAI, H.; BLUNDELL, T.; OVERINGTON, J. **The HOMSTRAD**, 2017.

MORAS, D.; OLSEN, K. W.; SABESAN, M. N.; BUEHNER, M.; FORD, G. C.; ROSSMANN, M. G. Studies of asymmetry in the three-dimensional structure of lobster D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 9137-9162, 1975.

MURZIN, A. G.; BRENNER, S. E; HUBBARD, T. Chothia C.SCOP – A structural classification of proteins data base for the investigation of sequences and structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, p. 536-540, 1995.

MUKHERJEE, S.; MAITY, S.; ROY, S.; GHORAI, S.; CHAKRABARTI, M.; AGARWAL, R.; DUTTA, D.; GHOSH, A. K.; DASA, A. K. Cloning, overexpression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Antheraea mylitta*. **Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 65, p. 937–940. 2009.

MOUNTASSIF, D.; BAIBAI, T.; FOURRAT, L.; MOUTAOUAKKIL, A; IDDAR, A.; EL KEBBAJ, M. S.; SOUKRI, A. Immunoaffinity purification and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 41, p. 399-406, 2009.

MURAY, R. K. **Bioquímica Ilustrada**, 27. ed. Mc grew hill, 2007.

NALETOVA, I. N.; MURONETZ, V. I.; SCHMALHAUSEN, E. V. Unfolded, oxidized, and thermoinactivated forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interact with the chaperonin GroEL in different ways. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 831-838, 2006.

NÉMETI, B.; GREGUS, Z. Mechanism of thiol-supported arsenate reduction mediated by phosphorolytic-arsenolytic enzymes: I. The role of arsenolysis. **Toxicological Sciences**, v. 110, p. 270-281, 2009.

NODA, M.; MATOBA, Y.; KUMAGAI, T.; SUGIYAMA, M. Structural evidence that alanine racemase from a D-cycloserine-producing microorganism exhibits resistance to its own product. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 46153-46161, 2004.

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.

ONDARZA, R. N. Drug Targets From Human Pathogenic Amoebas: *Entamoeba Histolytica*, *Acanthamoeba Polyphaga* and *Naegleria Fowleri*. **Infectious Disorders: Drug Targets**, v. 7, p. 266-280, 2007.

ONO, K.; YANAGIDA, K.; OIKAWA, T.; OGAWA, T.; SODA, K. Alanine racemase of alfalfa seedlings (*Medicago sativa* L.): first evidence for the presence of an amino acid racemase in plants. **Phytochemistry**, v. 67, p. 856-860, 2006.

ONDRECHEN, M. J.; BRIGGS, J. M.; MCCAMMON, J. A. A model for enzyme-substrate interaction in alanine racemase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, p. 2830-2834, 2001.

PAES, L. S.; MANTILLA, B. S.; BARISÓN, M. J.; WRENGER, C.; SILBER, A. M. The Uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* Mitochondrion: Opportunities to Target New Drugs Against Chagas' Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v.17, p. 2074-2099, 2011.

PALANI, K.; BURLEY, S. K.; SWAMINATHAN, S. Structure of alanine racemase from *Oenococcus oeni* with bound pyridoxal 5'-phosphate. **Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 69, p. 15-19, 2013.

PARK, J.; HAN, D.; KIM, K.; KANG, Y.; KIM, Y. O-GlcNAcylation disrupts glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homo-tetramer formation and mediates its nuclear translocation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 254–262, 2009.

PASTORE, A.; LESK, A. M. Comparison of the structures of globins and phycocyanins: Evidence for evolutionary relationship. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 8, p. 33-15, 1990.

PEREIRA, C. A., ALONSO, G. D.; IVALDI, S.; SILBER, A. M.; ALVES, M. J.; TORRES, H. N.; FLAWIÁ, M. M. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. **FEBS Letters**, v. 554, p. 201-205, 2003.

PRESTON, R. A.; DOUTHIT, H. A. Functional relationships between L- and D-alanine, inosine and NH₄Cl during germination of spores of *Bacillus cereus*. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 3001-3010, 1988.

PRIYADARSHI, A.; LEE, E. H.; SUNG, M. W.; NAM, K. H.; LEE, W. H.; KIM, E. E.; HWANG, K. Y. Structural insights into the alanine racemase from *Enterococcus faecalis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 1030-1040. 2009.

REGUERA, R. M.; REDONDO, C. M.; GUTIERREZ DE PRADO, R.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; BALAÑA-FOUCE, R. DNA topoisomerase I from parasitic protozoa: a potential target for chemotherapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1759, p.117-131, 2006.

ROE, D. R.; CHEATHAM, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, p. 3084–3095, 2013.

RODRIGUEZ-EZPELETA N.; BRINKMANN, H.; BURGER, G.; ROGER A. J.; GRAY, M. W.; PHILIPPE, H.; LANG, B. F. Toward resolving the eukaryotic tree: The phylogenetic positions of Jakobids 388 and cercozoans. **Current Biology**, v. 17, p. 1420–1425 2007.

ROHLOFF, P., RODRIGUES, C. O.; DOCAMPO, R. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 126, p. 219-30, 2003.

ROHLOFF, P.; MONTALVETTI, A.; DOCAMPO, R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 52270-52281, 2004.

RUBINSTEIN, A.; MAJOR, D. T. Understanding catalytic specificity in alanine racemase from quantum mechanical and molecular mechanical simulations of the arginine 219 mutant. **Biochemistry**, v. 49, p. 3957-3964, 2010.

RUBIE, C.; KEMPF, K.; HANS, J.; SU, T.; TILTON, B.; GEORG, T.; BRITTNER, B.; LUDWIG, B. Schilling M. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p.101– 109, 2005.

RUPP, B. **Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology**. Garland Science: 2009.

RYZLAKM, M. T.; PIETRUSZKO, R. Heterogeneity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 954, p. 309-324, 1988.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 307, p. 249-64, 2008.

SAHIN, E.; GRILLO, A. O.; PERKINS, M. D.; ROBERTS, C. J. Comparative effects of pH and ionic strength on protein-protein interactions, unfolding, and aggregation for IgG1 antibodies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 99, p. 4830-4848, 2010.

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

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

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

SAWA. A; KHAN, A. A; HESTER, L. D.; SNYDER, S. H. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and non neuronal cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 11669–11674, 1997.

SCALETTI, E. R.; LUCKNER, S. R.; KRAUSE, K. L.; Structural features and kinetics characterization of alanine racemase from *Staphylococcus aureus* (Mu50). **Acta Crystallographica, Section D: Structural Biology**, v. 68, p. 82-92, 2012.

SCHAFMEISTER, C. E. A. F.; ROSS, W.S.; ROMANOVSKI, V. **LeaP**. University of California, San Francisco, 1995.

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

SHEN, Y.; LI, J.; SONG, S.; LIN, Z. Structure of Apo-glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Palinurus versicolor*. **Journal of Structural Biology**, v. 130, p. 1–9, 2000.

SCHLAEPER, B. S.; ZUBER, H. Cloning and sequencing of the genes encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase, and triose phosphate isomerase (gap operon) from mesophilic *Bacillus megaterium*: comparison with corresponding sequences from thermophilic *Bacillus* species. **Gene**, v. 122, p. 53 – 63, 1992.

SCHNUCHE, A.; WILTSHECK, R.; CZISCH, M.; HERRLER, M.; WILLIMSKY, G.; GRAUMANN, P.; MARAHIEL, M. A.; HOLAK, T. A. Structure in solution of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. **Nature**, v. 364, p. 169–17, 1993.

SCHOMBURG, I.; CHANG, A.; SCHOMBURGA, D. BRENDA, enzyme data and metabolic information. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 47–49, 2002.

SCHRODINGER, L. L. C. **The PyMOL molecular graphics system**, versão 1.3r1; 2010.
SEIDLER, N. W. GAPDH: **Biological Properties and Diversity**, Springer Science+Business Media Dordrecht 2013.

SELA, M.; ZISMAN, E. Different roles of D-amino acids in immune phenomena. **FASEB Journal**, v. 11, p. 449-56, 1997.

SHAW, J. P.; PETSKE, G. A.; RINGE, D. Determination of the structure of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.9 Å resolution. **Biochemistry**, v. 36, p. 1329-1342, 1997.

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

SILBER, A. M.; COLLI, W.; ULRICH, H.; ALVES, M. J. M.; PEREIRA, C. A. Amino Acid Metabolic Routes in *Trypanosoma cruzi*: Possible Therapeutic Targets Against Chagas Disease. **Current Drug Targets**, v. 5, p. 53-64, 2005.

SIROVER, M. A. Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 65, p. 1-8. 1997.

STADTMAN, T. C.; ELLIOT, P. Studies on the enzymic reduction of amino acids. II. Purification and properties of D-proline reductase and a proline racemase from *Clostridium sticklandii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 228, p. 983-997, 1957.

STEIN, N. CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 41, p. 641-643, 2008.

STRYCH, U.; DAVLIEVA, M.; LONGTIN, J. P.; MURPHY, E. L.; IM, H.; BENEDIK, M. J.; KRAUSE, K. L. Purification and preliminary crystallization of alanine racemase from *Streptococcus pneumoniae*. **BMC Microbiology**, v. 17, p. 1-7, 2007.

SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D. P.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS Letters**, v. 424, p. 131–135, 1998.

SURESH, S.; BRESSI, J. C.; KENNEDY, K. J.; VERLINDE, C. L.; GELB, M. H.; HOL, W. G. Conformational changes in *Leishmania mexicana* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by designed inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, p. 423-435, 2001.

TANNER, M. E. Understanding nature's strategies for enzyme-catalyzed racemization and epimerization. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, p. 237-246, 2002.

TIEN, Y. C.; CHUANKHAYAN, P.; HUANG, Y. C.; CHEN, C. D.; ALIKHAJEH, J.; CHANG, S. L.; CHEN, C. J. Crystal structures of rice (*Oryza sativa*) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexes with NAD⁺ and sulfate suggest involvement of Phe37 in NAD⁺ binding for catalysis. **Plant Molecular Biology**, v. 80, p. 389-403. 2012.

TONELLI, R. R.; SILBER, A. M.; ALMEIDA DE FARIA, M.; HIRATA, I. Y.; COLLI, W.; ALVES, M. J. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Cellular Microbiology**, v. 6, p. 733-41, 2004.

TSUGE, H.; OHNISHI, K.; YOKOIGAWA, K. Crystal structure of *Pseudomonas Fluorescens* Alanine Racemase, código do PDB 2DODO, 2011.

UO, T.; YOSHIMURA, T.; TANAKA, N.; TAKEGAWA, K.; ESAKI, N. Functional characterization of alanine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*: a eucaryotic counterpart to bacterial alanine racemase. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2226-2233, 2001.

URBINA, J. A. Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 10, p. 107-110. 1994.

URBINA, J. A.; YSERN, X.; MILDVAN, A. S. Involvement of a divalent cation in the binding of fructose 6-phosphate to *Trypanosoma cruzi* phosphofructokinase: kinetic and magnetic resonance studies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 278, p. 187-94, 1990.

VELLIEUX, F. M.; HAJDU, J.; VERLINDE, C. L.; GROENDIJK, H.; READ, R. J.; GREENHOUGH, T. J.; CAMPBELL, J. W.; KALK, K. H.; LITTLECHILD, J. A.; WATSON, H. C. Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from Laue data. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 2355-2359, 1993.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 50, p. 1-26. 2007.

YANG, S.; DOOLITTLE, R. F.; BOURNE, P. E. Phylogeny determined by protein domain content. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 373-378, 2005.

YAN, X.; GAI, Y.; LIANG, L.; LIU, G.; TAN, H. A gene encoding alanine racemase is involved in spore germination in *Bacillus thuringiensis*. **Archives of Microbiology**, v. 187, p. 371-378, 2007.

YOKOIGAWA, K.; KAWAI, H.; ENDO, K.; LIM, Y. H.; ESAKI, N.; SODA, KENJI. Thermolabile Alanine Racemase from a Psychrotroph, *Pseudomonas fluorescens*: purification and properties. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, p. 93-97, 1993.

YOSHIMURA, T.; ESAKI, N.; SODA, K. Structure and function of Alanine Racemase. **Bulletin of the Institute for Chemical Research, Kyoto University**, v. 70, p. 378-384, 1992.

YOSHIMURA, T.; GOTO, M. D-amino acids in the brain: structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases. **FEBS Journal**, v. 275, p. 3527-3537, 2008.

YUEQUAN, S.; SHIYING, S.; ZHENGJIONG, L. Structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Palinurus versicolor* in a tetragonal crystal form. **Science in China, Series B: Chemistry**, v. 9, p. 96-104, 2000.

WALSH, C. T. Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. **Journal of Biological Chemistry**, v. 64, p. 2393-2396. 1989.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering**, v. 8, P. 127-134, 1996.

WESTBROOK, J.; FENG, Z.; BURKHARDT, K.; BERMA, N. H. M. Validation of protein structures for protein data bank. **Methods in Enzymology**, v. 374, p. 370-85. 2003.

WIGGERS, H. J.; CHELESKI, J.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; MONTANARI, C. A. Effects of organic solvents on the enzyme activity of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in calorimetric assays. **Analytical Biochemistry**, v. 370, p. 107-114, 2012.

WHO, Statistical Information System Website. Disponível em: <<http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>>. Acesso em: 6 de fev. 2017.

WONACOTT, A. J.; SKARZYNSKI, T. The molecular basis for negative cooperativity in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Acta Crystallographica**, v. A46, p.100, 1990.

WU, D.; HU, T.; ZHANG, L.; CHEN, J.; DU, J.; DING, J.; JIANG, H.; SHEN, X. Residues Asp164 and Glu165 at the substrate entryway function potently in substrate orientation of alanine racemase from *E. coli*: Enzymatic characterization with crystal structure analysis. **Protein Science**, v. 17, p. 1066-1076, 2008.

ZAFFAGNINI, M.; MICHELET, L.; MARCHAND, C.; SPARLA, F.; DECOTTIGNIES, P.; LE MARECHAL, P.; MIGINIAC-MASLOW, M., et al., The thioredoxin-independent isoform of chloroplastic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is selectively regulated by glutathionylation. **FEBS Journal**, v. 274, p. 212-226, 2007.

ZELEDON, R. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture.II. Effect of carbohydrates and related substances and some amino compounds on the respiration. **Journal of Parasitology**, v. 46, p. 541-51, 1960.