



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Diego Oliveira Nolasco da Silva

**Estrutura cristalográfica da Purina Nucleosídeo
Fosforilase do *Mycobacterium tuberculosis*.**

Dissertação para a obtenção do título de mestre em Biofísica Molecular, Área de Concentração - Biofísica Molecular. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.

Orientador: Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr.

São José do Rio Preto – SP
2005

Nolasco, Diego.

Estrutura cristalográfica da Purina Nucleosídeo Fosforilase do
Mycobacterium tuberculosis / Diego Oliveira Nolasco da Silva. - São
José do Rio Preto: [s.n], 2005
61 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Walter Filgueira de Azevedo Júnior
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica molecular. 3. Cristalografia. 4.
Proteínas - Estrutura. 5. Purina Nucleosídeo Fosforilase. 6. PNP
(Enzimas) 7. MtPNP (Enzima) I. Azevedo Júnior, Walter Filgueira de.
II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biotecnologia, Letras e
Ciências Exatas. III. Título..

CDU – 577.322

Dedico este trabalho às mulheres da minha vida, na ordem em que às conheci, Mama, Vó Luiza e Tia Josi. Obrigado pelo apoio incondicional durante toda a minha vida, pelo carinho e pela compreensão nos momentos de ausência. Amo vocês.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr. pela orientação e pelo ambiente descontraído e alegre que sempre manteve no laboratório.

Aos professores do Departamento de Física pelos ensinamentos transmitidos e pela harmonia.

À Dra. Fernanda Canduri pelo apoio e pelos valiosos ensinamentos desde a minha chegada a Rio Preto.

À minha querida *ic* Janaina pelo empenho e dedicação no laboratório, pela paciência, pelos cristais e, principalmente, pela amizade.

Aos meus colegas de Departamento pelo companheirismo, pelas dicas e pelos papos de corredor durante todo o tempo.

À Marisa pela amizade, pelas contas divididas na república, em restaurantes bacanas e botecos vagabundos e, mais ainda, pela paciência.

Ao amigo Hugo pelas discussões acaloradas sobre temas vazios e textos sem sentido, pelas caronas, pelas cervejas e festas e pelos muitos momentos de companheirismo.

Aos comparsas Mário e Magno pelas dicas e pelo apoio, pelas histórias e piadas, pelas farras e pescarias e, acima de tudo, pela amizade.

Ao amigo Pepeu por ter me acolhido no ambiente familiar de sua casa e me tratado como a um irmão, pelas contas rachadas e pelas grandes dicas de sobrevivência.

Às vizinhas Aline, Bruna, Éricka, Laura, Mirian e Nádia e ao agregado Dudu pelos sorrisos e abraços, pelas histórias e festas e, principalmente, pelo apoio nos momentos difíceis. Jamais me esquecerei de vocês.

À Thaís, seu irmão e seus pais pelo amor, pelo carinho, pelos ensinamentos e, mais ainda, por acreditarem em mim. Vocês moram no meu coração.

À minha Mama, minhas avós, meus tios e tias, primos e primas, o meu muito obrigado e todo o meu amor.

À CAPES e à FAPESP pelo financiamento deste trabalho.

A Deus.

Índice Geral

Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	ix
1. Introdução	1
1.1. A Tuberculose	1
1.2. A Purina Nucleosídeo Fosforilase	2
1.3. Metabolismo	5
1.4. Propriedades da PNP	7
1.5. Mecanismo Cinético	9
1.6. A PNP do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
2. Objetivos	13
3. Materiais e Métodos	14
3.1. Cristalização de Macromoléculas Biológicas	14
3.2. Técnicas de Cristalização de Macromoléculas biológicas	17
3.3. Cristalização da MtPNP	18
3.3.1. MtPNP Apoenzima	18
3.3.2. MtPNP Complexada	19
3.4. Coleta e Processamento de Dados de Difração de Raios X	19
3.5. Condições que Produzem Difração	19
3.6. O Problema da Fase	21

3.7. Substituição Molecular	22
3.7.1. Determinação das Estruturas da MtPNP	25
3.8. Refinamento Cristalográfico de Macromoléculas	25
4. Resultados e Discussão	27
4.1. Cristalização e Coleta de Dados de Difração de Raios X	27
4.1.1. Cristalização e Coleta de Dados de Difração de Raios X da MtPNP·PO ₄	27
4.1.2. Cristalização e Coleta de Dados de Difração de Raios X da MtPNP·Acy·PO ₄	27
4.2. Substituição Molecular	28
4.3. Refinamento Cristalográfico	29
4.4. Descrição das Estruturas	30
4.4.1. MtPNP·PO ₄	31
4.4.2. MtPNP·Acy·PO ₄	33
4.5. Comparação entre a MtPNP e a HsPNP	35
4.6. Comparação entre os complexos MtPNP·ImmH·PO ₄ e MtPNP·Acy·PO ₄	38
5. Conclusão	42
Apêndice A – Radiação Síncrotron	44
Apêndice B – “The Maximum Likelihood Method”	46
Apêndice C – Bfactors da Estruturas Resolvidas	51
Referências	54

Anexo – Crystallographic structure of PNP from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9Å resolution

61

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Reação enzimática catalisada pela PNP: β -purina nucleosídeo + $P_i \leftrightarrow$ base púrica + α -D-pentose-1-fosfato	3
Figura 1.2 - Efeitos metabólicos da deficiência ou inibição da PNP, levando ao acúmulo de dGTP, à inibição da Ribonucleotídeo redutase e, conseqüentemente da síntese do DNA celular (BZOWSKA et al., 2000)	6
Figura 1.3 – Possíveis enovelamentos da Purina Nucleosídeo Fosforilase. A estrutura dimérica (A) é uma Pirimidina Nucleosídeo Fosforilase do <i>Bacillus stearothermophilus</i> . A estrutura trimérica (B) é uma Purina Nucleosídeo Fosforilase do <i>Mycobacterium bovis</i> . A estrutura hexamérica (C) é uma purina Nucleosídeo Fosforilase da <i>Escherichia coli</i>	9
Figura 1.4 - Possíveis ordens de ligação dos substratos, nas direções fosforolítica e sintética (ERION et al., 1997)	11
Figura 1.5 - Diagrama do trímero (A) e do monômero (B) da PNP do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complexada com fosfato	13
Figura 3.1 - Representação esquemática de um diagrama de solubilidade, ilustrando as regiões de variação da solubilidade de uma proteína quando a concentração do agente cristalizante é alterada	15
Figura 3.2 - Ilustração do método de difusão de vapor “hanging drop vapor diffusion”	18
Figura 3.3 - Foto do cristal da MtPNP apoenzima	18

Figura 3.4 - Representação esquemática da lei de Bragg	20
Figura 3.5 - Esfera de Ewald interceptada por um ponto da rede recíproca, B. No esquema O é a origem da rede recíproca, C é o cristal e A é o raio da esfera ($1/\lambda$)	21
Figura 4.1 – Diagrama do trímero (A) e do monômero (B) da PNP do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complexada com fosfato	31
Figura 4.2 – Diagrama de Ramachandran Φ - Ψ para a estrutura da MtPNP·PO ₄	32
Figura 4.3 – Densidade eletrônica do resíduo Tyr92, mostrando a importância de altas resoluções. Mapa de densidade $2F_o - F_c$ $1\sigma(F)$	33
Figura 4.4 - Diagrama de Ramachandran Φ - Ψ para a estrutura da MtPNP·Acy·PO ₄	34
Figura 4.5 – Densidade eletrônica da molécula do inibidor Acyclovir ocupando o sítio ativo no monômero A. Mapa de densidade $F_o - F_c$ $4\sigma(F)$	35
Figura 4.6 – Alinhamento das estruturas primárias da MtPNP e da HsPNP feito utilizando o programa MultAlin (CORPET, 1988). A coincidência, mostrada em vermelho, é de, aproximadamente, 34%	36
Figura 4.7 – Comparação dos monômeros da HsPNP (A) e da MtPNP (B) (NOLASCO <i>et al.</i> , 2004)	37
Figura 4.8 – Comparação dos sítios ativos da HsPNP (em laranja) e da MtPNP (em amarelo mostrando a legenda dos resíduos) (NOLASCO <i>et al.</i> , 2004)	38
Figura 4.9 - Comparação dos sítios ativos da MtPNP·ImmH·PO ₄ (em laranja) e da MtPNP·Acy·PO ₄ (em amarelo)	39

Figura 4.10 – Região da “tampa” do sítio catalítico formada pelos resíduos compreendidos entre a Pro62 e a Gly70	40
Figura 4.11 – Transição coil-hélice nos resíduos compreendidos entre a Gly235 e a Ala248	41

Índice de Tabelas

Tabela 4.1 - Valores obtidos na etapa de substituição molecular	29
Tabela 4.2 – Estatísticas dos refinamentos cristalográficos das quatro estruturas da MtPNP	30

Lista de Abreviaturas

PNP	- Purina Nucleosídeo Fosforilase
MtPNP	- Purina Nucleosídeo Fosforilase do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
HsPNP	- Purina Nucleosídeo Fosforilase do <i>Homo sapiens</i> (humana)
PDB	- Protein Data Bank (Banco de dados de proteínas)
ADA	- Adenosina deaminase
AMP	- Adenosina monofosfato
GMP	- Guanosina monofosfato
IMP	- Inosina monofosfato
dGuo	- Desoxiguanosina
dGMP	- Desoxiguanosina monofosfato
dGDP	- Desoxiguanosina difosfato
dGTP	- Desoxiguanosina trifosfato
NDP	- Nucleotídeo difosfato
dNDP	- Desoxinucleotídeo difosfato
dNTP	- Desoxinucleotídeo trifosfato
Gua	- Guanina
ATP	- Adenosina trifosfato
M_r	- Massa molecular
CC	- Coeficiente de correlação
PC	- Correlação de Patterson
V_m	- Volume de Matthews

CCP4 - Collaborative Computational Project n° 4 (Projeto computacional n° 4)

MtPNP·PO₄ - Purina Nucleosídeo Fosforilase do *Mycobacterium tuberculosis* em complexo com fosfato

MtPNP·Acy·PO₄ - Purina Nucleosídeo Fosforilase do *Mycobacterium tuberculosis* em complexo com Aciclovir e fosfato

MtPNP·Hypo·PO₄ - Purina Nucleosídeo Fosforilase do *Mycobacterium tuberculosis* em complexo com Hipoxantina e fosfato

MtPNP·Ino·PO₄ - Purina Nucleosídeo Fosforilase do *Mycobacterium tuberculosis* em complexo com Inosina e fosfato

Resumo

A Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) catalisa a fosforólise de nucleosídeos de purina para suas respectivas bases e açúcares (ribose ou desoxirribose) 1-fosfato. A PNP desempenha uma função central no metabolismo das purinas, normalmente operando na via de recuperação do DNA das células. Mais ainda, a PNP cliva ligações glicosídicas com inversão da configuração para produzir α -ribose 1-fosfato. Acredita-se que no organismo do *Mycobacterium tuberculosis* a PNP desempenha tarefas similares, o que levanta o interesse em desenvolver ciência que dê suporte para o desenvolvimento de drogas baseadas na estrutura desta proteína.

A proteína é um homotrímero simétrico com um arranjo triangular das subunidades, similar às PNPs triméricas de mamíferos. Cada monômero consiste de um enovelamento α/β formado por onze fitas β circundadas por oito hélices α .

O estudo desta PNP visa proporcionar comparações com outras estruturas, na intenção de identificar as bases estruturais de possíveis diferenças ou similaridades funcionais entre esta e outras PNPs, num esforço para desenvolver pesquisa que dê suporte para o desenho de novas drogas mais seletivas e poderosas contra a tuberculose.

Abstract

The Purine nucleoside phosphorylase (PNP) catalyses the phosphorolysis of purine nucleosides to corresponding bases and ribose 1-phosphate. PNP plays a central role in purine metabolism, normally operating in the purine salvage pathway of cells. Moreover, PNP cleaves glycosidic bond with inversion of configuration to produce α -ribose 1-phosphate. It is believed that in the MtPNP is responsible for the same labor in the *Mycobacterium tuberculosis* organism, which arouses the interest in developing science for giving support to the development of structure based drugs.

The protein is a symmetrical homotrimer with triangular arrangement of the subunits, similar to the trimeric mammalian PNPs. Each monomer consist of a α/β folding formed by eleven β sheet surrounded by eight α helices.

The study of this PNP aims the possibility of caring out comparisons with other structures, in order to identify the structural basis of possible differences or functional similarities between this and other PNPs, in an effort to develop research which gives support to the design of more selective and powerful new drugs against tuberculosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Tuberculose

A tuberculose causa oito milhões de novas infecções e mata dois milhões de pessoas anualmente, em todo o mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (<http://www.oms.int>). Estima-se que, aproximadamente, dois bilhões de indivíduos, um terço da população mundial, estejam infectados com a tuberculose em sua forma latente. A tuberculose ressurgiu no final dos anos oitenta e foi declarada emergência global pela OMS. A alta susceptibilidade das pessoas infectadas com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) à doença e a proliferação das cepas resistentes à multidrogas criaram um interesse mundial na expansão dos atuais programas de pesquisa sobre a tuberculose. Novos agentes antimicrobianos são necessários para o tratamento dos infectados com tais cepas mutantes resistentes às drogas já existentes, para a redução do tempo de tratamento e para a diminuição das complicações e dos efeitos colaterais sentidos pelos pacientes (SHI *et al*, 2001).

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica causada por várias bactérias do gênero *Mycobacterium*. A forma mais freqüente da doença é a tuberculose pulmonar, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (bacilo de Koch), mas podem ocorrer ainda lesões cerebrais, lupus e outras complicações, algumas vezes produzidas pelo bacilo de Koch e outras vezes pelo bacilo de origem bovina (*Mycobacterium bovis*) (<http://www.oms.int>).

1.2. A Purina Nucleosídeo Fosforilase

Desde os primeiros relatos estruturais, Purina Nucleosídeo Fosforilases (PNPs) de várias origens têm sido estudadas, analisadas e cogitadas como potenciais alvos para o desenho racional de drogas. A importância dessa proteína está no fato de que as PNPs não mostram nenhuma modificação em suas estruturas mesmo quando as proteínas são extraídas de formas mutantes (cepas mutantes) do mesmo organismo. Pode-se, ainda, enfatizar a similaridade das estruturas e a atividade funcional da proteína em diferentes organismos.

O desenvolvimento do conhecimento acerca da Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) exige esforços principalmente no tocante aos estudos estruturais. Grande parte desses estudos, que vêm sendo feitos por diversos grupos de pesquisa em todo mundo, destaca a PNP humana (HsPNP) (EALICK *et al.*, 1990) como propulsora do grande número de estruturas que viriam em seguida. Existem hoje 14 estruturas da HsPNP depositadas no Banco de dados de proteínas (PDB) (códigos de acesso: 1ULA, 1ULB, 1M73, 1PF7, 1PWY, 1RCT, 1RFG, 1RR6, 1RSZ, 1RT9, 1V2H, 1V3Q, 1V41 e 1V45).

Um outro caminho a ser seguido é a solução e análise de estruturas de diferentes organismos, o que em conjunto com estudos bioquímicos, fisiológicos e enzimáticos pode contribuir para a resposta de diversas questões acerca da função de cada componente estrutural (FADEL, 2000). Com o intuito de possibilitar conhecimentos mais aprofundados sobre os diversos organismos alvo, para o desenvolvimento de ciência de verdadeira relevância, iniciou-se então uma corrida na direção dos dados cristalográficos de alta resolução, o que perdura até

hoje. Assim, estruturas de enzimas similares, porém de diferentes organismos, vêm sendo resolvidas e analisadas a cada dia.

A Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) catalisa a fosforólise de nucleosídeos de purina para suas respectivas bases e açúcares (ribose ou desoxirribose) 1-fosfato. A PNP desempenha uma função central no metabolismo das purinas, normalmente operando na via de recuperação do DNA das células. A enzima é específica para nucleosídeos de purina na configuração β e exibe preferência por ribosil contendo nucleosídeos relativos aos análogos arabinose, xilose, lixose e estereoisômeros. Mais ainda, a PNP cliva ligações glicosídicas com inversão da configuração para produzir α -ribose 1-fosfato (STOECKLER *et al.*, 1980; BZOWSKA *et al.*, 1990; DE AZEVEDO *et al.*, 2003). A reação enzimática catalisada pela PNP é mostrada na Figura 1.1.

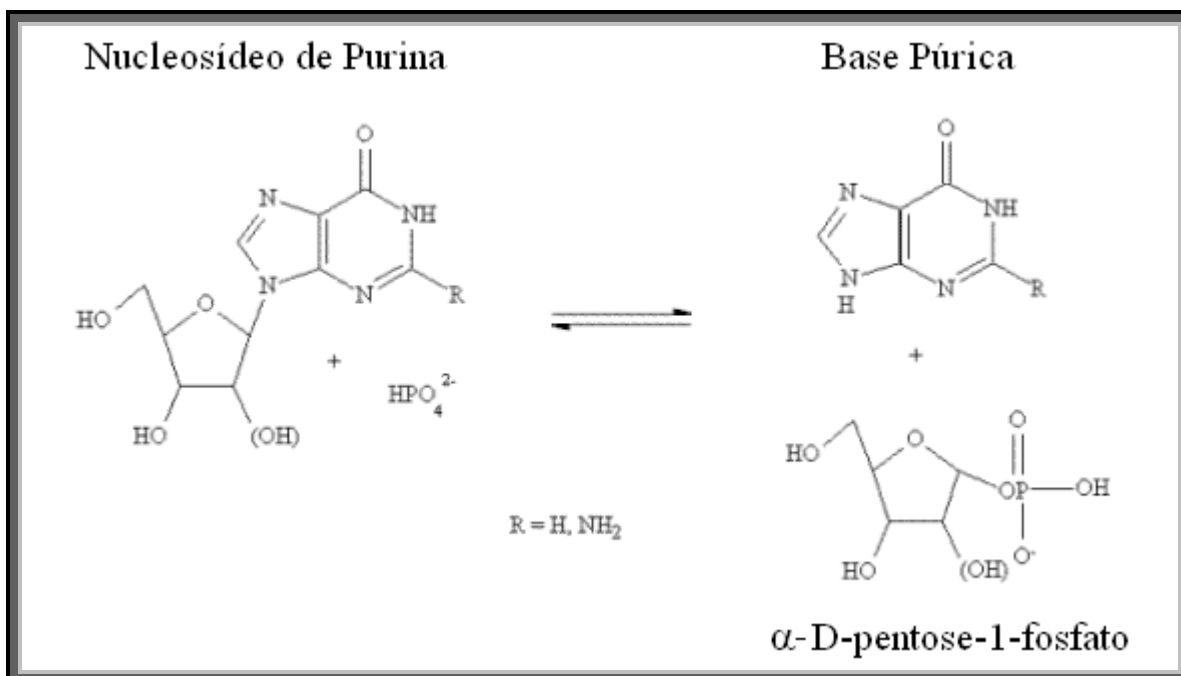


Figura 1.1 – Reação enzimática catalisada pela PNP: β -purina nucleosídeo + $\text{P}_i \Leftrightarrow$ base púrica + α -D-pentose-1-fosfato.

A PNP catalisa a fosforólise de muitos nucleosídeos análogos (EALICK *et al.*, 1990), sendo que inosina, guanosina e desoxiguanosina são os principais substratos fisiológicos para PNPs de mamíferos (DOS SANTOS *et al.*, 2003). As PNPs têm sido isoladas e purificadas de uma variedade de fontes, incluindo organismos procarióticos e eucarióticos. As PNPs de mamíferos exibem uma estrutura trimérica com peso molecular sempre em torno de 100 kDa, enquanto as PNPs de bactérias exibem, geralmente, uma estrutura hexamérica com peso molecular em torno de 150 kDa. Ambas diferem em relação à estrutura quaternária, subunidades e seus substratos específicos. A enzima bacteriana utiliza adenosina e purina arabinose como substrato, enquanto a de mamíferos é mais eficiente na síntese de guanosina, inosina e seus análogos (EALICK *et al.*, 1991).

Adenosina e desoxiadenosina não são degradadas pelas PNPs de mamíferos. Os nucleosídeos e nucleotídeos são deaminados pela adenosina deaminase (ADA) e pela adenosina monofosfato deaminase (AMP) para seus derivados de inosina correspondentes, os quais, por sua vez, podem ser mais degradados (CANDURI *et al.*, 2004). Em humanos, a PNP é somente uma rota para degradação de desoxiguanosina e a deficiência genética desta enzima causa a imunossupressão, mediada pelas células T (MORRIS & OMURA, 2000).

Processos bioquímicos envolvendo nucleotídeos e precursores de nucleotídeos são algumas das reações mais importantes e fundamentais para a função e sobrevivência do organismo (PARKS & AGARWAL, 1971). A descoberta da reação enzimática responsável pela clivagem da ligação glicosídica é atribuída a Levene e Medigreceanu em 1911. Kalckar, em 1945, mostrou o segundo

produto da reação como sendo ribose-1-fosfato em vez de ribose como se esperava na época. Esta nova evidência forneceu argumentos para afirmar que a clivagem glicosídica era devido a fosforólise enzimática, ao invés da hidrólise, e foi confirmada pelo próprio Kalckar em 1947 (PUGMIRE & EALICK, 2002).

1.3. Metabolismo

Na síntese *de novo* de ribonucleotídeos de purina a formação de adenosina monofosfato (AMP) e guanosina monofosfato (GMP), a partir de inosina monofosfato (IMP), é irreversível, mas bases púricas, nucleosídeos e nucleotídeos podem ser interconvertidos através da atividade de PNP, ADA e hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (AVARBOCK *et al.*, 1999). A deficiência ou inibição da PNP, então, levaria à não conversão de desoxiguanosina (dGuo) em guanina (Gua), acarretando no acúmulo de desoxiguanosina trifosfato (dGTP) o que inibiria alostericamente a enzima Ribonucleotídeo redutase e, conseqüentemente, a síntese de DNA celular (Figura 1.2) (BZOWSKA *et al.*, 2000).

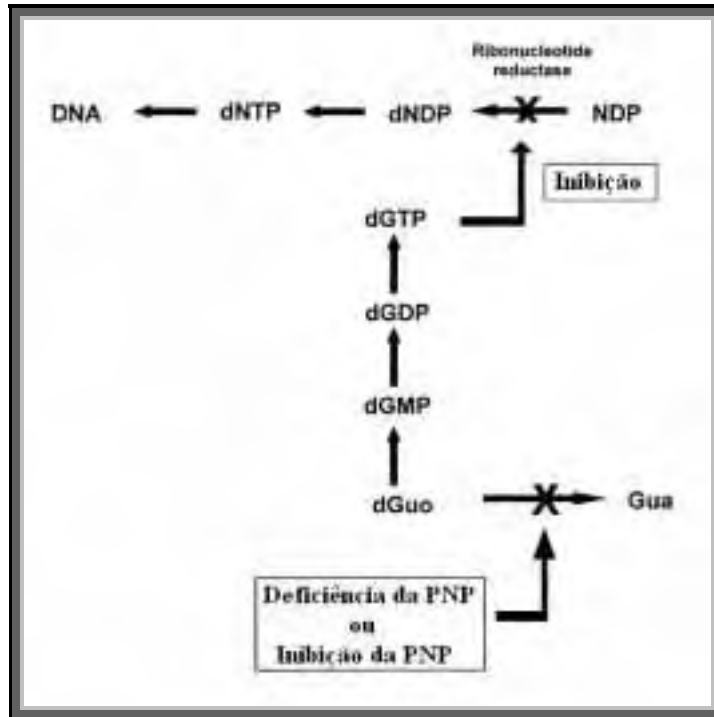


Figura 1.2 – Efeitos metabólicos da deficiência ou inibição da PNP, levando ao acúmulo de dGTP, à inibição da Ribonucleotídeo redutase e, conseqüentemente da síntese do DNA celular (BZOWSKA et al., 2000).

No que concerne ao metabolismo humano de nucleosídeos de purina, as recorrentes deficiências hereditárias das enzimas citoplasmáticas ADA ou PNP causam anormalidades que são seletivamente tóxicas para linfócitos e resultam em doenças no sistema imunológico. Ambas condições são herdadas numa forma autossômica recessiva, e resultam de mutações em genes estruturais localizados nos cromossomos 20q (ADA) e 14q (PNP) (HERSHFIELD & KREDICH, 1980).

Quinases para inosina, guanosina, e desoxiinosina não ocorrem em células de mamíferos, e significativa fosforólise da desoxiguanosina provavelmente ocorra somente em condições deficientes de PNP (HERSHFIELD & KREDICH, 1980).

É importante citar que, com a reação catalisada pela ADA, ambos ribo e desoxirribonucleosídeos de purina são convertidos pela PNP à via de recuperação para formar somente ribonucleotídeos, para que então a subsequente produção de desoxirribonucleotídeos para síntese de DNA seja regulada alostericamente pela enzima Ribonucleotídeo redutase (BZOWSKA *et al.*, 2000). A falta de qualquer dNTP pode levar a célula a sofrer apoptose, ao passo que o excesso é mutagênico. Assim, a probabilidade de um dado dNTP ser erroneamente incorporado em uma cadeia de DNA, que está sendo sintetizada, aumenta com a concentração relativa a dos outros dNTPs (VOET & VOET, 2000).

1.4. Propriedades da PNP

PNPs de diversas fontes, com diferentes especificidades, têm sido identificadas e purificadas. E por causa da ênfase recente dada ao genoma funcional das espécies, devido a sua maior correlação com a estrutura do que com a identidade das seqüências, tentativas de classificação têm sido feitas com base na massa molecular (M_r), composição da unidade biológica e especificidade dos substratos (BZOWSKA *et al.*, 2000). Foi feita também a classificação em famílias com base no enovelamento de nucleosídeo fosforilases (Purina e Pirimidina Nucleosídeo Fosforilases) (PUGMIRE & EALICK, 2002).

As PNPs foram classificadas em duas categorias com base em diversos critérios e em alguns estudos cristalográficos como segue (BZOWSKA *et al.*, 2000):

- a) Homotriméricas de baixa massa molecular ($M_r \sim 80-100$ kDa), específicas para a catálise de 6-oxopurinas e seus nucleosídeos e análogos, tendo

como fontes principalmente mamíferos (humano, bezerro) e algumas bactérias (*Cellulomonas sp.*, *Mycobacterium tuberculosis*).

- b) Homohexaméricas de alta massa molecular ($M_r \sim 110-160$ kDa) e uma maior especificidade que ocorre para 6-oxo e 6-aminopurinas, sendo encontrados em bactérias (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*).

Outras PNPs não são incluídas nesta classificação pois apresentam estruturas quaternárias diméricas, triméricas, tetraméricas, pentaméricas e hexaméricas, com diferentes especificidades para substratos, e estão presentes em algumas bactérias, em mamíferos e em parasitas (BZOWSKA et al., 2000; SHI et al., 2004) (Figura 1.3).

Ainda sobre classificação, estudos estruturais com nucleosídeo fosforilases mostram a descoberta de somente dois possíveis enovelamentos, os quais provêm as bases para a definição de duas famílias distintas: a família Nucleosídeo Fosforilase I (NP-I) compreendendo enzimas que compartilham enovelamento comum da subunidade em estruturas α/β e apresentam estruturas quaternárias triméricas ou hexaméricas, sendo que membros da família NP-I aceitam um intervalo de nucleosídeos de purina, tanto quanto pirimidina e uridina. E a família Nucleosídeo Fosforilase II (NP-II) como aquelas enzimas que apresentam estrutura quaternária dimérica, onde cada subunidade característica consiste de um pequeno domínio α separado por uma grande fenda de um domínio α/β maior, e aceitam como substratos timidina e uridina em organismos inferiores mas são específicos para timidina em indivíduos superiores, incluindo humanos (PUGMIRE & EALICK, 2002).

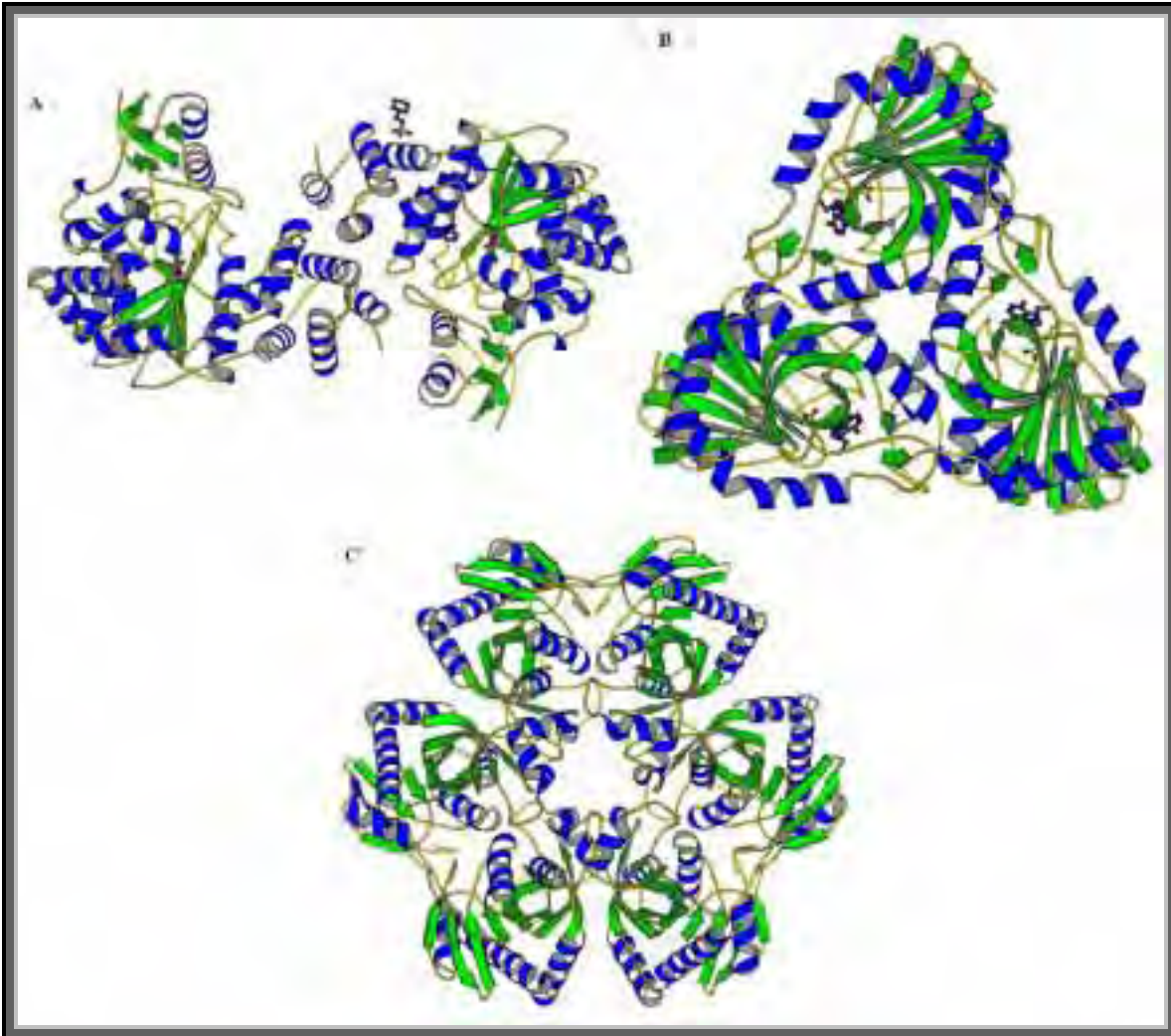


Figura 1.3 – Possíveis enovelamentos da Purina Nucleosídeo Fosforilase. A estrutura dimérica (A) é uma Pirimidina Nucleosídeo Fosforilase do *Bacillus stearotherophilus*. A estrutura trimérica (B) é uma Purina Nucleosídeo Fosforilase do *Mycobacterium bovis*. A estrutura hexamérica (C) é uma purina Nucleosídeo Fosforilase da *Escherichia coli*.

1.5. Mecanismo Cinético

Uma característica comum da reação catalisada pela PNP é que ela possui um mecanismo cinético complexo. Tal comportamento é observado para todas as PNPs inclusive quando o substrato variável é o fosfato. Isto pode ser referido como a ativação do substrato a altas concentrações e cooperatividade (BZOWSKA *et al.*, 2000).

Apesar de não obedecer linearmente à cinética de Michaelis-Menten, tal tratamento é utilizado para a obtenção de dois conjuntos de constantes cinéticas para as PNPs bovina (valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a ligação do nucleosídeo e para o fosfato) e humana (valores obtidos diretamente em diferentes concentrações de fosfato), a partir de concentrações baixas e altas dos substratos, os quais são variados separadamente dentro de um intervalo de concentração. Não está claro se os pares de constantes são devidos a uma não-equivalência dos sítios ativos ou outras razões (BZOWSKA *et al.*, 2000), ou a uma dissociação induzida por substratos do trímero em monômeros (ROPP & TRAUT, 1991).

Análises das estruturas da PNP demonstram que o sítio ativo está localizado em uma cavidade enterrada na proteína, na interface entre duas subunidades. O subsítio da purina localiza-se mais internamente, evitando contato com o solvente. Existe ainda uma ordem de ligação dos substratos e liberação dos produtos, na qual o subsítio da purina parece ser bloqueado quando ocorre o complexo PNP-ribose-1-fosfato, que resultaria em um complexo *dead-end*. Por outro lado, a ligação inicial da purina pode resultar em uma mudança conformacional que promova também interações adicionais entre a PNP e ribose-1-fosfato. Assim, há suporte para considerar a ligação ordenada na direção sintética, com a ligação da base púrica precedendo a ligação de ribose-1-fosfato (Figura 1.4) (ERION *et al.*, 1997).

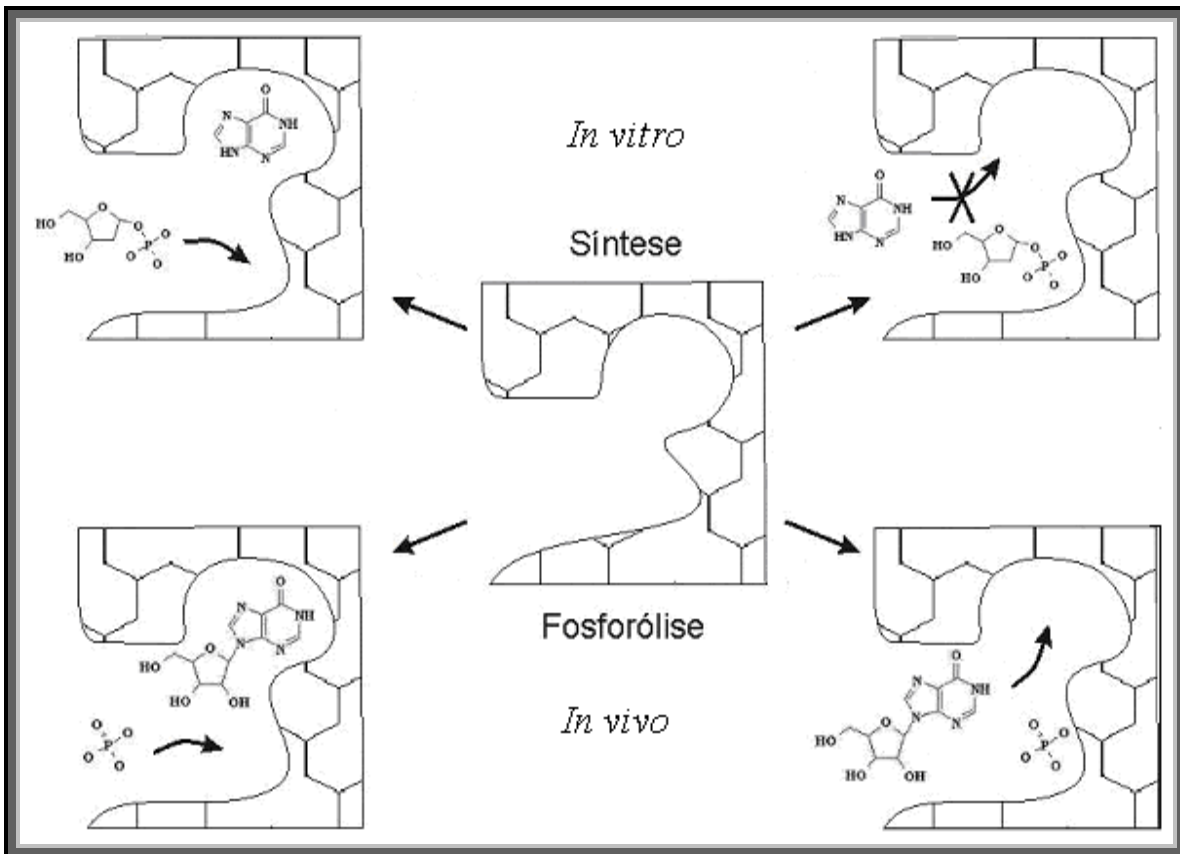


Figura 1.4 – Possíveis ordens de ligação dos substratos, nas direções fosforólítica e sintética (ERION *et al.*, 1997).

Estudos de efeitos de isótopo cinético para fosforólise e arsenólise indicam que a reação procede por um mecanismo do tipo substituição nucleofílica, passando necessariamente por um estado de transição, no qual o anel de ribose possui caráter de íon oxocarbenio, sendo, provavelmente, a liberação da purina a etapa limitante da reação (PORTER *et al.*, 1992; KLINE *et al.*, 1993).

1.6. A PNP do *Mycobacterium tuberculosis*

Uma proteína de seqüência homóloga à da PNP humana foi identificada no genoma do *Mycobacterium tuberculosis*. O genoma do *Mycobacterium tuberculosis* é composto por 4 411 529 pares de base e contém 3924 genes.

Baseado em homologia de seqüências, funções bioquímicas foram atribuídas à aproximadamente 40% das proteínas previstas, enquanto similaridades com outras proteínas descritas foram encontradas para outros 44% e os 16% restantes não mostraram semelhança com nenhuma proteína conhecida e podem ainda guardar proteínas com funções micobacteriais específicas (COLE *et al.*, 1998).

Não existe ainda literatura específica sobre a bioquímica e a fisiologia da PNP do *Mycobacterium tuberculosis* (MtPNP), o que incentiva a pesquisa e abre portas para estudos futuros acerca da proteína. Acredita-se, porém, que a MtPNP também age especificamente na via de recuperação do DNA do *Mycobacterium tuberculosis* e assim desperta grande interesse no que concerne a compreensão de todo seu mecanismo de ação e inibição. Isso nos leva a especular sobre a possibilidade de desenho racional de drogas a partir de ensaios enzimáticos com a proteína e da estrutura tridimensional da MtPNP.

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivos a cristalização e a solução da estrutura tridimensional da Purina Nucleosídeo Fosforilase expressa do *Mycobacterium tuberculosis* (MtPNP). O estudo desta PNP visa proporcionar comparações com outras estruturas na intenção de identificar as bases estruturais de possíveis diferenças ou similaridades funcionais entre esta e outras PNPs, num esforço para desenvolver pesquisa que dê suporte para o desenho racional de novas drogas mais seletivas e poderosas contra a tuberculose.

3. Materiais e Métodos

A proteína foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos e pelo Prof. Dr. Luiz Augusto Basso, Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia (UFRGS), Porto Alegre – Brasil, ligado à Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose. A MtPNP foi obtida a partir de métodos de clonagem, expressão e purificação (Basso *et al.*, 2001).

A massa molecular da MtPNP foi estimada em 80 000 Da. A massa molecular determinada por experimento de espectrometria de massa para o monômero da MtPNP foi de 27 437 Da, muito próximo da massa molecular prevista que era de 27 571 Da.

3.1. Cristalização de Macromoléculas biológicas

Biocristalografia é a aplicação das técnicas de difração de raios X para cristais de macromoléculas biológicas. O uso desta técnica, juntamente com estudos bioquímicos, tem contribuído para esclarecer a base molecular da atividade biológica destas macromoléculas (BLUNDELL & JOHNSON, 1976).

Para se determinar a estrutura tridimensional de uma macromolécula por técnicas de difração de raios X, é essencial a obtenção de monocristais de tamanho apropriado para a coleta de dados de difração de raios X. Como o número de variáveis envolvidas no processo de cristalização é muito grande (como concentração de sal, temperatura, pH, agentes precipitantes e aditivos) encontrar as condições ideais pode levar dias, meses, anos ou pode ainda nunca acontecer (BLUNDELL & JOHNSON, 1976).

Para cristalizar uma macromolécula em um determinado solvente, é necessário leva-la lentamente a um estado de supersaturação. As fases deste processo estão ilustradas no diagrama abaixo (Figura 3.1).

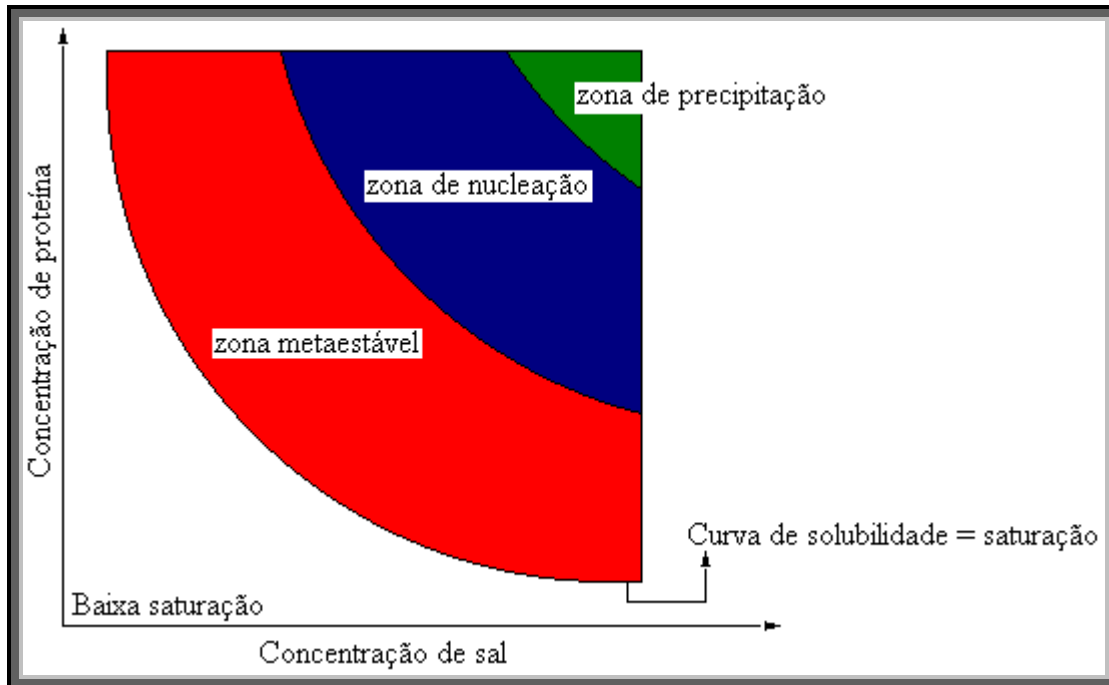


Figura 3.1 – Representação esquemática de um diagrama de solubilidade, ilustrando as regiões de variação da solubilidade de uma proteína quando a concentração do agente cristalizante é alterada.

Cristalização é um processo de ordenação no qual as moléculas assumem posições regulares no estado sólido. Um processo de cristalização pode ser considerado como um equilíbrio dinâmico entre as partículas no estado líquido e no estado sólido. Sendo assim, o cristal cresce quando o equilíbrio é deslocado no sentido de solidificação.

A curva de solubilidade divide as regiões de baixa saturação e de supersaturação. Na região de baixa saturação a macromolécula não será cristalizada. Logo acima se encontra a região de supersaturação, que é dividida em três zonas: zona metaestável, zona de nucleação e zona de precipitação.

Quando a supersaturação é alcançada rapidamente, a proteína em solução precipita, no entanto, quando a supersaturação é alcançada lentamente, a solução de proteína alcança a zona de nucleação, onde se formam os núcleos (primeiros agregados ordenados de proteína). Conforme a solubilidade da proteína diminui, os núcleos atingem a zona metaestável, onde ocorrerá o crescimento do cristal (DUCRUIX & GIEGÉ, 1992).

O uso de cristais na biologia estrutural veio depois de 1934, quando Bernal e Crowfoot produziram o primeiro padrão de difração de raios X de uma proteína, o da pepsina. Desde então, representantes de muitas famílias de macromoléculas têm sido cristalizadas (DUCRUIX & GIEGÉ, 1992).

O principal objetivo da cristalização de uma macromolécula é o seu estudo por técnicas de cristalografia por difração de raios X. Este passo é fundamental para o desenvolvimento de estudos acerca da estrutura tridimensional de pequenas moléculas e proteínas. A cristalização é umas das etapas mais críticas no processo de solução da estrutura de uma macromolécula e, geralmente, a que despende mais tempo.

A cristalização de macromoléculas é composta, basicamente, por três passos distintos: nucleação, crescimento e término do crescimento. Devido ao fato de que proteínas e ácidos nucléicos necessitam de pH e força iônica definidas para a sua estabilidade e função, cristais de macromoléculas devem ser crescidos a partir de soluções aquosas complexas. A cristalização começa com a nucleação e as condições para se atingir a nucleação são, algumas vezes, difíceis de se repetir e, desta forma, os procedimentos de semeadura com um material cristalino pré-formado se fazem necessários. Em alguns momentos este é o único método

para se obter resultados reprodutíveis. A nucleação requer um estado de supersaturação maior do que aquele da fase de crescimento (DE AZEVEDO, 1997).

O término do crescimento de um cristal de macromolécula pode ter diversas causas, desconsiderando as triviais como a remoção da macromolécula do meio de cristalização, por exemplo. Entre essas causas temos os defeitos de crescimento, o envenenamento das faces e o envelhecimento da macromolécula (DE AZEVEDO, 1997).

3.2. Técnicas de Cristalização de Macromoléculas Biológicas

Existem muitas técnicas de cristalização de macromoléculas biológicas, porém todas têm como objetivo trazer a solução da macromolécula a um estado de supersaturação. As principais técnicas são: difusão de vapor e diálise.

A técnica mais utilizada atualmente é a técnica de difusão de vapor pelo método chamado *hanging drop vapor diffusion* (Figura 3.2), que consiste em “pendurar” uma gota contendo a macromolécula a ser cristalizada, diluída em tampão com o agente de cristalização e aditivos, em uma lamínula e equilibrá-la contra um reservatório contendo a solução do agente de cristalização a uma concentração mais alta do que na gota. O equilíbrio ocorre por meio de troca de água (da gota para o reservatório), isto leva a uma diminuição do volume da gota e, conseqüentemente, a um aumento na concentração de todos os constituintes da gota de cristalização (DUCRUIX & GIEGÉ, 1992).

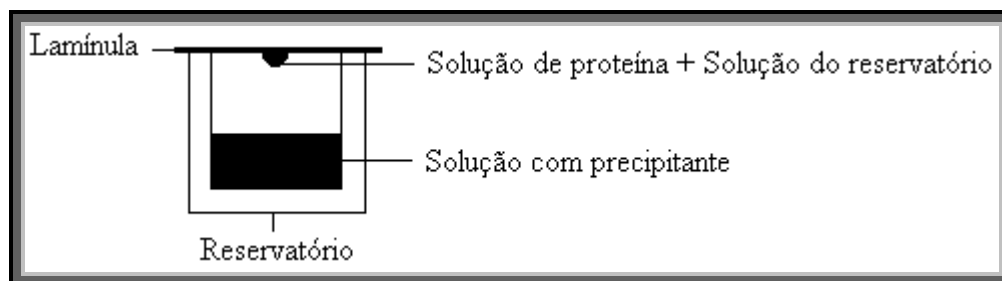


Figura 3.2 – Ilustração do método de difusão de vapor “hanging drop vapor diffusion”.

3.3. Cristalização da MtPNP

3.3.1. MtPNP Apoenzima

A MtPNP foi cristalizada segundo condições previamente estabelecidas (SHI *et al.*, 2001). Resumidamente, a MtPNP ($1\mu\text{L}$ à uma concentração de $25\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) contendo $5\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ foi misturada com igual volume da solução do poço que continha 100 mM de Tris, $\text{pH } 8,0$, 25% de PEG 3350 e 25 mM de MgCl_2 e foi equilibrada contra $1,0\text{ mL}$ da solução do poço (Figura 3.3).



Figura 3.3 – Foto do cristal da MtPNP apoenzima.

3.3.2. MtPNP Complexada

A cristalização (co-cristalização) da MtPNP complexada com o inibidor Aciclovir repetiu a condição da MtPNP·PO₄ e o inibidor foi adicionado a uma razão molar (Inibidor:proteína) de 2:1.

3.4. Coleta e Processamento de Dados de Difração de Raios X

Dados de difração de raios X de comprimento de onda igual a 1,4270Å foram coletados utilizando a fonte de luz síncrotron (ver Apêndice A) na estação CPr do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas, Brasil (POLIKARPOV & PERLES *et al*, 1998; POLIKARPOV & OLIVA *et al*, 1998), utilizando um detector CCD. Os cristais foram montados em loops e apenas os cristais de MtPNP·PO₄ foram protegidos criogenicamente com glicerol. Os demais cristais não necessitaram de proteção criogênica. O ângulo de oscilação φ foi sempre igual a 1° e o número de imagens variou entre 120 e 160.

As imagens foram processadas usando o programa Mosflm e escalonadas usando o programa Scala, ambos integrantes do pacote CCP4 (Collaborative Computational Project n° 4).

3.5. Condições que Produzem Difração

Os Bragg mostraram que um conjunto de planos paralelos, com índices hkl e espaçamento interplanar d_{hkl} , produz um feixe difratado quando raios X de

comprimento de onda (λ) atingem os planos num ângulo (θ) e são refletidos no mesmo ângulo, isto acontecerá se θ obedecer a seguinte condição:

$$2d_{hkl} \sin \theta = \lambda$$

Os planos paralelos com espaçamento interplanar d_{hkl} são apresentados no esquema da lei de Bragg (Figura 3.4). Admitiremos aqui a notação casual para a ilustração de raios, assim dois raios (R_1 e R_2) são refletidos formando um ângulo θ com os planos.

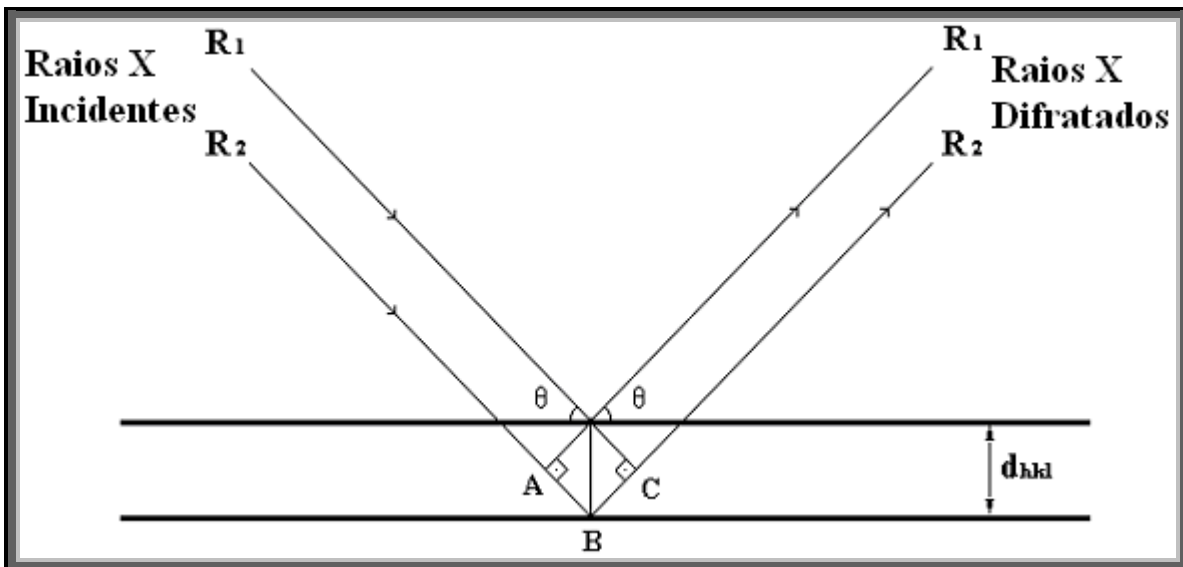


Figura 3.4 – Representação esquemática da lei de Bragg.

A satisfação da lei de Bragg para um conjunto de planos hkl tem simplesmente como condição a coincidência do retículo recíproco com a superfície da esfera de reflexão, chamada esfera de Ewald. Um ponto de difração só será considerado como tal se um ponto do retículo recíproco passar pela esfera de Ewald. Esta condição está apresentada na representação esquemática da esfera de Ewald (Figura 3.5).

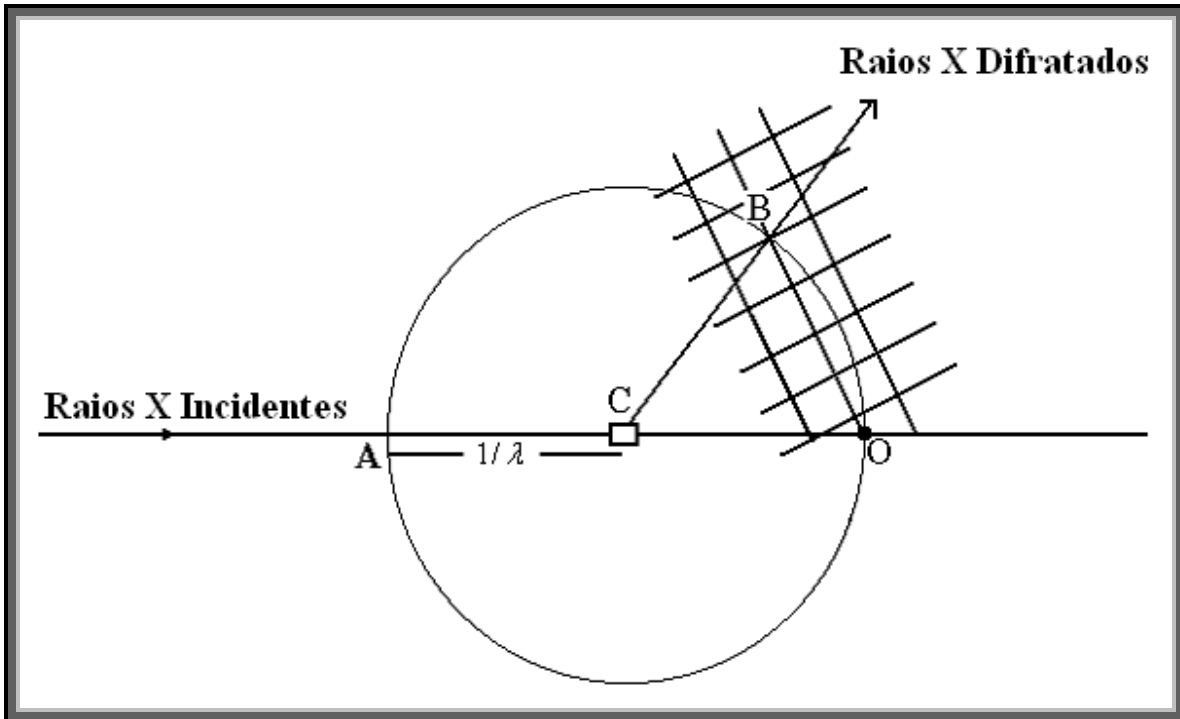


Figura 3.5 – Esfera de Ewald interceptada por um ponto do retículo recíproco, B. No esquema O é a origem do retículo recíproco, C é o cristal e A é o raio da esfera ($1/\lambda$).

3.6. O Problema da Fase

Para calcular a densidade eletrônica $\rho(xyz)$ é necessário o conhecimento do módulo do fator de estrutura ($F(hkl)$) e da fase do fator de estrutura ($\alpha(hkl)$). Isso é enfatizado quando se escreve a equação da densidade eletrônica que segue:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} F(hkl) \exp i\alpha(hkl) \exp - 2\pi i(hx + ky + lz)$$

Durante um experimento de difração de raios X só se registram as intensidades e toda informação sobre a fase é perdida. Portanto, é impossível determinar a estrutura diretamente das medidas do padrão de difração, visto que

parte da informação está perdida. **O problema da fase é o problema básico de qualquer determinação de estrutura** (DE AZEVEDO, 1997).

3.7. Substituição Molecular

A substituição molecular é um dos métodos disponíveis para se resolver o problema da fase. Nesse método uma estrutura conhecida homóloga é ajustada na cela unitária da estrutura que se pretende resolver e as fases da estrutura conhecida são usadas como uma primeira aproximação para as fases na nova estrutura. O ajuste do modelo se faz em uma procura em seis dimensões, ou graus de liberdade, que consistem basicamente em procuras de ordem rotacional e translacional (DE AZEVEDO, 1997).

O modelo inicial (também chamado modelo de busca) a ser usado na procura deve ser o mais homólogo possível da macromolécula a ser estudada. No caso de proteínas, uma identidade igual ou superior a 50% de homologia deve ser suficiente para a solução desta etapa. O maior problema com a utilização de modelos com baixa identidade está na estimativa grosseira das fases do modelo a ser estudado, o que pode causar problemas durante a etapa de refinamento da estrutura a ser resolvida. Assim, a utilização de modelos de busca de altíssima identidade com a macromolécula alvo é fortemente indicada. (RUSSO *et al.*, 1996).

A procura rotacional é feita no espaço de Patterson, que é obtido por síntese de Fourier tomando-se como termos o quadrado dos fatores de estrutura e assim temos que a função de Patterson $P(u)$ é da seguinte forma:

$$P(u) = \frac{1}{V} \sum_H |F(H)|^2 \exp(2\pi i H \cdot u)$$

onde V é o volume da cela unitária, $F(H)$ é o fator de estrutura, H é um vetor posição do espaço recíproco e u é um vetor posição no espaço de Patterson. Pode-se mostrar que no espaço de Patterson os máximos correspondem aos vetores entre os átomos da cela unitária ao invés das posições absolutas dos átomos na cela unitária. Se considerarmos o mapa de Patterson de uma macromolécula em uma cela unitária, em geral, os vetores menores serão vetores intramoleculares e os maiores serão vetores intermoleculares. Como a função de Patterson é a transformada de Fourier de $F(H)^2$ esta pode ser calculada a partir de um conjunto de dados de difração, sem nenhuma informação sobre a fase.

Numa função de rotação só se quer considerar os vetores intramoleculares, visto que todos os vetores no mapa de Patterson começam na origem e, por conseguinte, os vetores mais próximos da origem serão os intramoleculares. Escolhendo-se criteriosamente o raio máximo no espaço de Patterson, onde será feita a procura rotacional, as chances de se achar a rotação certa são aumentadas. O raio máximo no espaço de Patterson é um dos parâmetros de entrada para se efetuar a procura rotacional (BRÜNGER *et al.*, 1992).

Outro parâmetro a ser observado é a faixa de resolução a ser usada no cálculo dos mapas de Patterson. Reflexões de mais alta resolução diferem marcadamente, mesmo entre estruturas com alta homologia, visto que essas reflexões trazem informações sobre os detalhes estruturais. Reflexões de baixa resolução refletem aspectos relacionados com a estrutura secundária. Assim,

pode-se inferir que nuances estruturais são dependentes da faixa de resolução que se pode utilizar tanto na substituição molecular quanto no refinamento, o que na prática implica em testar diversas faixas até que se encontre resultados satisfatórios.

A partir destes e de outros parâmetros menos importantes o modelo pode passar por um passo posterior de refinamento baseado na correlação de Patterson (PC), ou coeficiente de correlação (CC). Neste momento o modelo é tratado como um corpo rígido e sua orientação (rotação e translação) é definida de forma a minimizar a função $E_{total}(C, C_i, t_i)$ definida como:

$$E_{total} = (1 - CC(C, C_i, t_i))$$

onde a CC é o coeficiente de correlação entre $|E_{obs}|^2$ e $|E_{model}|^2$ e é dada por:

$$CC(C, C_i, t_i) = \frac{\sum ab - (\sum a \sum b) / N}{\left\{ \left[\sum a^2 - (\sum a)^2 / N \right]^{1/2} \right\} \left\{ \left[\sum b^2 - (\sum b)^2 / N \right]^{1/2} \right\}}$$

onde $a = |E_{obs}|^2$, $b = |E_{model}(C, C_i, t_i)|^2$ e as somatórias são feitas sobre o conjunto de reflexões observadas. E_{obs} representa os fatores de estrutura normalizados observados e E_{model} os fatores de estrutura normalizados do modelo. Os fatores de estrutura normalizados são dados pela seguinte equação:

$$E(H)^2 = \frac{|F(H)|^2}{\varepsilon \sum_{j=1}^N f_j^2}$$

onde H é um vetor do espaço recíproco, f_j os fatores de espalhamento atômico e ε é um inteiro geralmente igual a 1, mas pode assumir outros valores para

conjuntos especiais de reflexões em certos grupos espaciais (STOUT & JENSEN, 1989).

O coeficiente de correlação (CC) terá valores de -1 (correlação inversa perfeita), passando por 0 (sem correlação) e com o máximo de 1 (correlação perfeita). Assim, a minimização da função E_{total} leva à maximização da função CC , ou seja, os parâmetros serão ajustados de forma que haja uma máxima correlação entre $|E_{obs}|^2$ e $|E_{model}|^2$.

3.7.1. Determinação das Estruturas da MtPNP

As estruturas da MtPNP foram determinadas por substituição molecular usando o programa AMoRe (NAVAZA *et al.*, 1994). Este programa, também integrante do pacote CCP4, compõe-se das diversas etapas específicas do procedimento da substituição molecular, porém todas são executadas de maneira automática na interface gráfica que foi utilizada (The CCP4 Program Suíte).

3.8. Refinamento Cristalográfico de Macromoléculas

O problema do refinamento cristalográfico pode ser formulado como um problema de otimização quimicamente restrita não-linear. O objetivo é otimizar a concordância do modelo atômico com os dados observados e com informações químicas preliminares (AGARWAL, 1978).

Num experimento bem sucedido obtemos do cristal informações sobre os parâmetros da cela unitária e sobre o módulo do fator de estrutura, normalmente chamado de fator de estrutura observado ($F_{obs}(hkl)$), para cada reflexão de índices

hkl . Para a resolução de qualquer estrutura são necessárias, além da informação do módulo do fator de estrutura observado, informações sobre a fase do fator de estrutura, as quais são perdidas no experimento de difração de raios X. Uma vez que o problema da fase tenha sido resolvido, o passo seguinte na determinação da estrutura cristalográfica é o refinamento. No refinamento, as coordenadas atômicas (x_j, y_j, z_j) do modelo inicial são usadas para o cálculo do fator de estrutura conforme a equação:

$$F_{calc}(hkl) = \sum_{j=1}^N f_i \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)]$$

onde F_{calc} é o fator de estrutura calculado, f_i é o fator de espalhamento atômico e hkl são os índices das reflexões. O processo de refinamento visa trazer o valor de F_{calc} o mais próximo possível de F_{obs} , variando as coordenadas atômicas e o fator de vibração térmica B , porém, sempre respeitando restrições estereoquímicas e eletrostáticas.

4. Resultados e Discussão

4.1. Cristalização e Coleta de Dados de Difração de Raios X

4.1.1. Cristalização e Coleta de Dados de Difração de Raios X da MtPNP·PO₄

Os cristais de MtPNP apoenzima foram os primeiros a serem obtidos e apresentaram dimensões de, aproximadamente, 0,5 x 0,6 x 0,7mm. Dados de difração de raios X foram coletados a 1,9Å de resolução e, quando indexados, mostraram pertencer ao grupo de Laue primitivo ortorrômbico P2₁2₁2, com parâmetros de cela $a=117,9\text{Å}$, $b=134,3\text{Å}$, $c=44,2\text{Å}$ e os ângulos $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ (valores finais obtidos após o refinamento destes parâmetros, utilizando as cento e vinte imagens coletadas). Os dados apresentaram ainda completeza de 90,7% e $R_{\text{sym}}=6,2\%$.

Sabendo que a unidade assimétrica contém um trîmero de massa molecular igual a 82 713 Da, estimou-se o volume de Matthews $V_m=2,1\text{Å}^3\cdot\text{Da}^{-1}$. Assim, o volume parcial de solvente no cristal estudado era de 41,9%.

Nas cento e vinte imagens coletadas foram observadas 524 878 reflexões, das quais 52 718 eram reflexões independentes.

4.1.2. Cristalização e Coleta de Dados de Difração de Raios X da MtPNP·Acy·PO₄

Nesta fase, ensaios de co-cristalização da MtPNP com o inibidor Aciclovir (Acycloguanosine, 9-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-guanine) foram efetuados e cristais similares em tamanho e formato aos cristais de MtPNP apoenzima foram obtidos. À proteína, que já continha 5 mM de NaH₂PO₄, foi adicionada uma

quantidade de Aciclovir na proporção molar de 1:2 e esta solução foi misturada com a solução do poço, que continha 100 mM de tampão Tris, pH 8,0, 25% de PEG 3350 e 25 mM MgCl₂, de forma que a gota consistia de 50% da solução de proteína e 50% da solução do poço. A gota foi equilibrada contra 0,6 mL da solução do poço.

A difração dos cristais de MtPNP·Acy-PO₄ apresentou resolução de 2,1Å e mostrou que os cristais mantiveram o grupo espacial com parâmetros de cela $a=105,1\text{Å}$, $b=135,7\text{Å}$, $c=41,4\text{Å}$ e ângulos $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ (valores finais obtidos após o refinamento destes parâmetros, utilizando as cento e cinquenta imagens coletadas). Os dados apresentaram ainda completude de 94,8% e $R_{\text{sym}}=5,8\%$.

Como os cristais ainda apresentavam um trímero, de mesma massa molecular (82 713 da), na unidade assimétrica o volume de Matthews calculado foi igual a $1,9\text{Å}^3\cdot\text{Da}^{-1}$, o que possibilitou a determinação do volume parcial de solvente em 35,7%.

Nas cento e cinquenta imagens coletadas foram observadas 288 832 reflexões, das quais 33 436 eram reflexões independentes.

4.2. Substituição Molecular

Após o processamento e a interpretação dos conjuntos coletados iniciou-se o procedimento de substituição molecular para a solução do problema da fase. A estrutura utilizada como modelo de busca para a substituição molecular da MtPNP·PO₄ foi a estrutura da MtPNP complexada com 9-deazahypoxantina, Iminoribitol e fosfato (código pdb 1180). Para a substituição molecular do complexo

MtPNP·Acy·PO₄ utilizou-se a estrutura da MtPNP·PO₄. Para a substituição molecular foi utilizado o programa AMoRe (NAVAZA, 1994), do pacote de programas CCP4 (Collaborative Computational Project n° 4) e os valores de coeficiente de correlação (*CC*) e *R*_{factor} inicial são mostrados na tabela 4.1:

Tabela 4.1 – Valores obtidos na etapa de substituição molecular.

Substituição Molecular								
	<i>CC</i> (%)	<i>R</i> _{factor} inicial (%)	α (°)	β (°)	γ (°)	<i>T</i> _x (Å)	<i>T</i> _y (Å)	<i>T</i> _z (Å)
MtPNP·PO ₄	66,4	34,9	67,99	14,57	88,31	0,0997	0,2828	0,4258
MtPNP·Acy·PO ₄	64,6	35,4	80,59	10,75	74,62	0,0804	0,3038	0,4098

4.3. Refinamento Cristalográfico

O refinamento cristalográfico das estruturas foi realizado com a utilização do programa REFMAC5 (MURSHUDOV *et al.*, 1997), parte integrante do pacote CCP4. O método de refinamento aplicado pelo REFMAC5 é o Método da Máxima Verossimilhança (*The Maximum Likelihood Method*) (FISHER, 1921) (ver Apêndice B).

Os valores obtidos na etapa de refinamento cristalográfico são mostrados na tabela 4.2:

Tabela 4.2 – Estatísticas dos refinamentos cristalográficos das quatro estruturas da MtPNP.

MtPNP·PO₄	
Faixa de Resolução	20Å - 1,9Å
R_{factor}	19,00%
R_{free}	26,30%
Nº de aminoácidos (trímero)	788
Nº de moléculas de água (trímero)	457
Nº de grupos de fosfato (trímero)	3
MtPNP·Acy·PO₄	
Faixa de Resolução	20Å - 2,1Å
R_{factor}	17,30%
R_{free}	26,30%
Nº de aminoácidos (trímero)	788
Nº de moléculas de água (trímero)	367
Nº de grupos de fosfato (trímero)	3
Nº de inibidores ligados (trímero)	3

4.4. Descrição das Estruturas

A MtPNP apresenta, nos dois momentos aqui descritos (MtPNP·PO₄ e MtPNP·Acy·PO₄), uma estrutura simetricamente homotrimérica de arranjo triangular das subunidades, assim como as PNPs de mamíferos. Cada monômero da proteína está enovelado numa topologia do tipo α/β , consistindo de onze fitas β circundadas por oito hélices α (Figura 4.1). As estruturas mostraram densidades eletrônicas bastante claras para três grupos de fosfato, um por monômero, substância que estava presente em altas concentrações nas condições de cristalização.

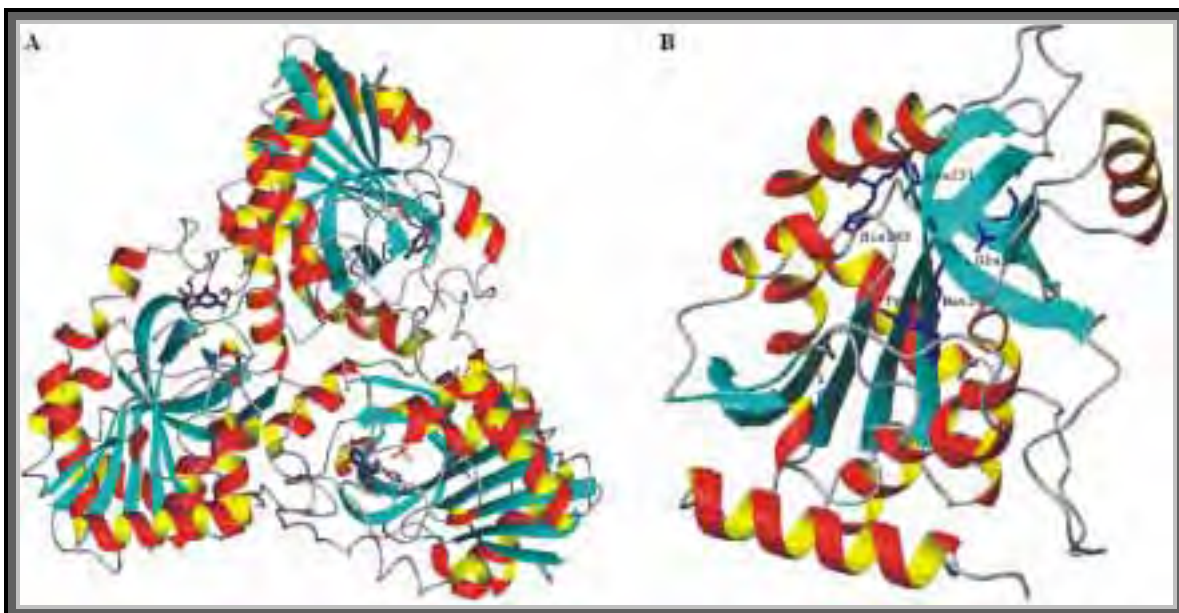


Figura 4.1 – Diagrama do trîmero (A) e do monômero (B) da PNP do *Mycobacterium tuberculosis* complexada com fosfato.

Os três sítios catalíticos independentes se encontram nas interfaces das subunidades e são compostos por cinco resíduos, Tyr92, Glu189, Met207, Asn231 e His243.

4.4.1. MtPNP·PO₄

Na etapa de refinamento cristalográfico 457 moléculas de água foram adicionadas ao modelo e os três sítios de ligação de fosfato foram preenchidos. Assim, a estrutura de 788 aminoácidos foi refinada e ao final desta etapa apresentou R_{factor} de 19,0% e R_{free} de 26,3%.

Análises do diagrama de Ramachandran Φ - Ψ para esta estrutura (Figura 4.1) indicaram que 92,3% dos resíduos se encontram nas regiões mais favoráveis, 6,8% dos resíduos se encontram nas regiões adicionalmente permitidas, 0,3% dos resíduos se encontram em regiões generosamente permitidas e apenas quatro

resíduos (0,6%) estão em regiões não permitidas no mapa. As análises do mapa de densidade eletrônica ($2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$) de alta resolução (Figura 4.2) concordam com as posições da Thr209, dos três monômeros, e da His68 do monômero A.

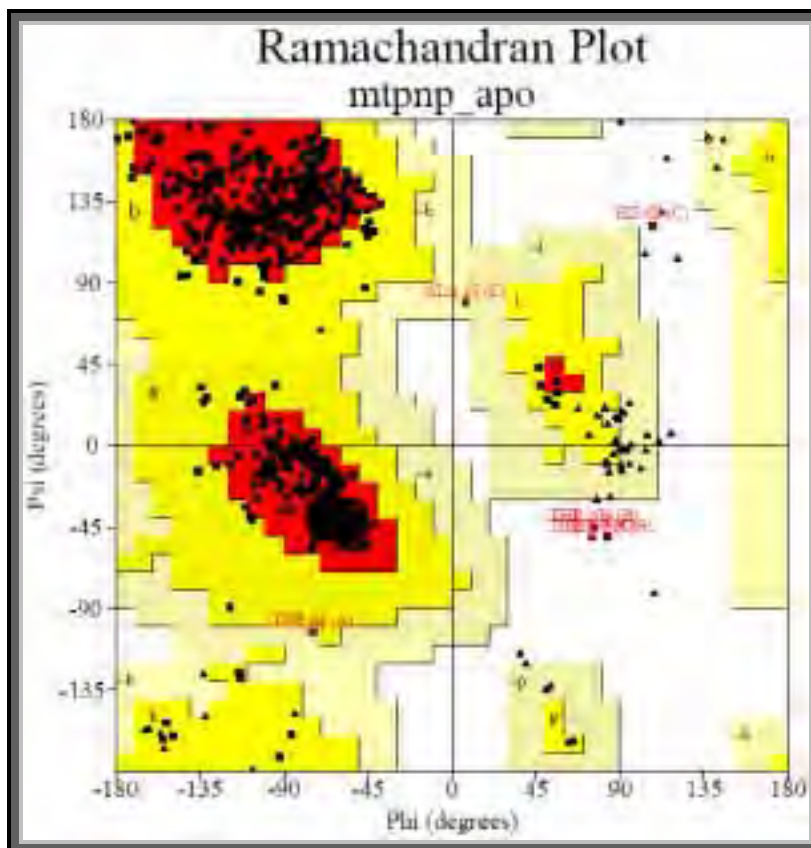


Figura 4.2 – Diagrama de Ramachandran Φ - Ψ para a estrutura da MtPNP·PO₄.

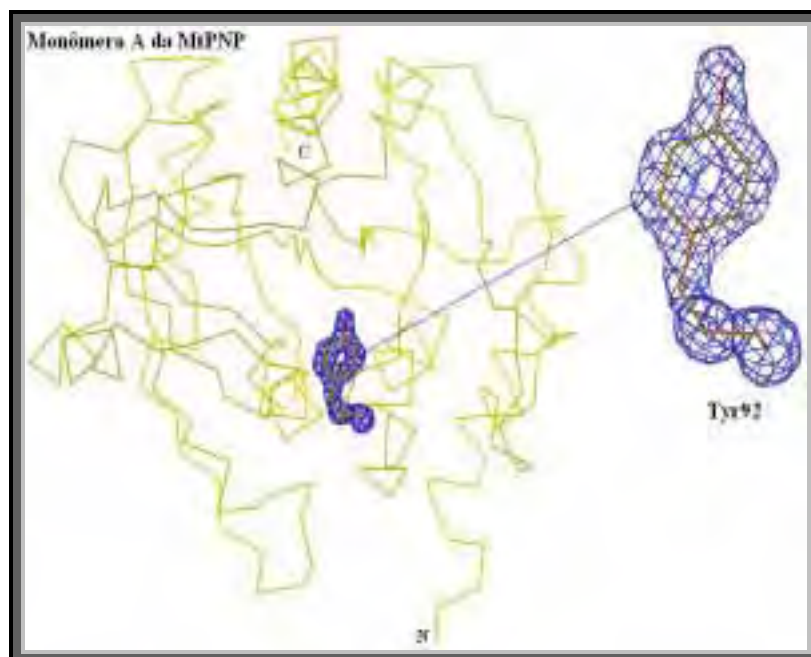


Figura 4.3 – Densidade eletrônica do resíduo Tyr92, mostrando a importância de altas resoluções. Mapa de densidade $2F_o - F_c$ $1\sigma(F)$.

4.4.2. MtPNP-Acy-PO₄

Na etapa de refinamento cristalográfico 367 moléculas de água foram adicionadas ao modelo, os três sítios de ligação de fosfato foram preenchidos e as moléculas do inibidor foram alojadas nas densidades eletrônicas correspondentes em cada monômero. Assim, a estrutura de 788 aminoácidos foi refinada e ao final desta etapa apresentou Rfactor de 17,3% e Rfree de 26,3%.

A estrutura em questão apresenta 87,3% dos resíduos nas regiões mais favoráveis do diagrama de Ramachandran Φ - Ψ (Figura 4.3), 11,3% dos resíduos nas regiões adicionalmente permitidas, 0,8% dos resíduos nas regiões generosamente permitidas e outros quatro resíduos (0,6%) em regiões não permitidas do mapa. As análises do mapa de densidade eletrônica ($2F_{obs} - F_{calc}$) levam a crer na veracidade da estrutura, visto que apenas alguns aminoácidos do N e do C terminal não ajustam perfeitamente com suas respectivas densidades

eletrônicas. Há ainda de se destacar as densidades eletrônicas do inibidor Aciclovir (Figura 4.4), que se apresentaram bastante claras e com tamanhos e formatos compatíveis com a molécula. O inibidor tem uma área total de $196,3\text{\AA}^2$, dos quais $123,0\text{\AA}^2$ fazem contato com o sítio catalítico.

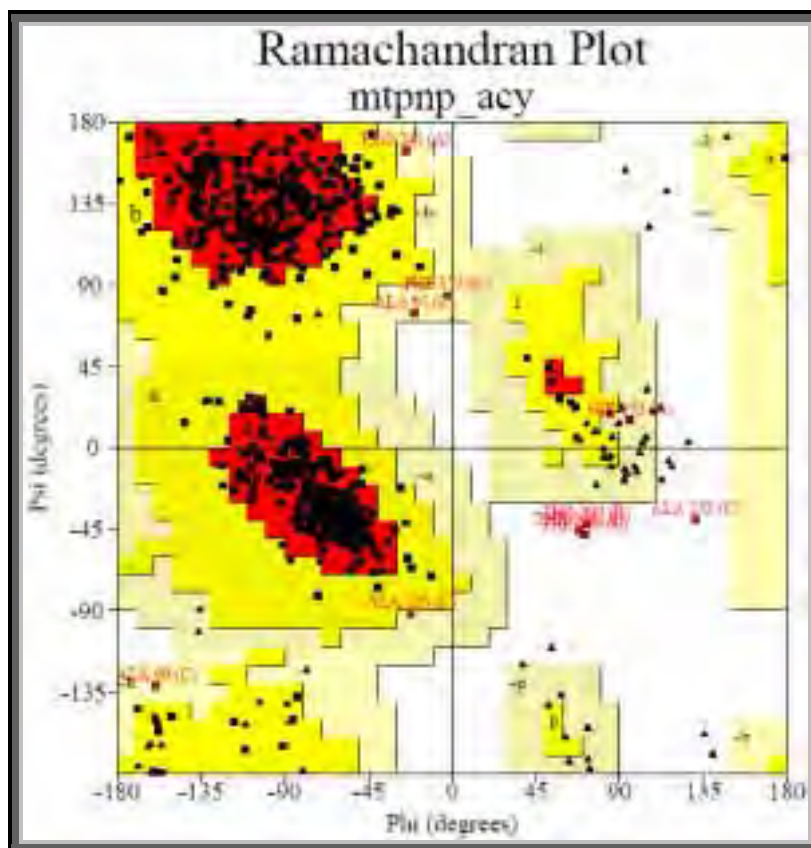


Figura 4.4 - Diagrama de Ramachandran Φ - Ψ para a estrutura da MtPNP·Acy·PO₄.

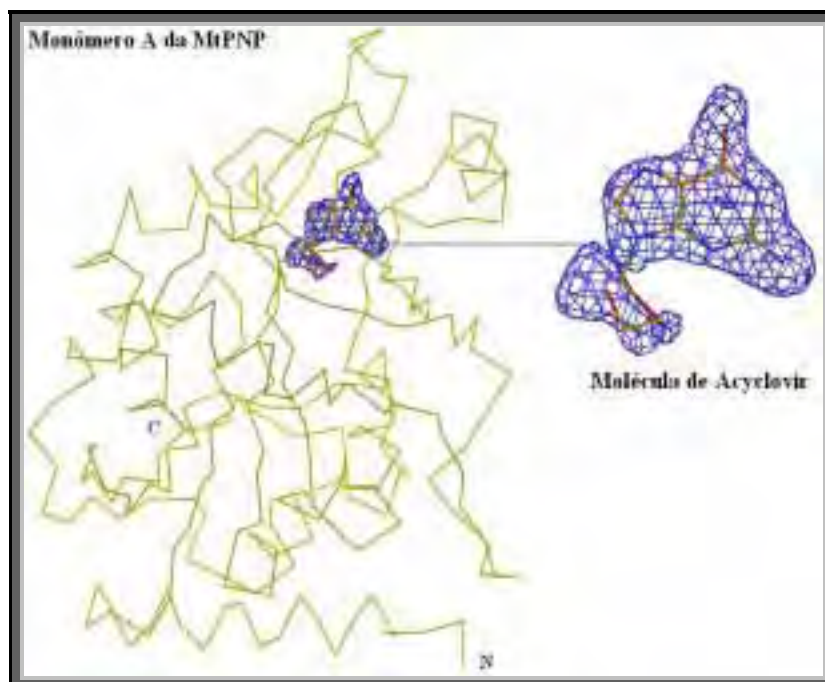


Figura 4.5 – Densidade eletrônica da molécula do inibidor Aciclovir ocupando o sítio ativo no monômero A. Mapa de densidade $F_o - F_c$ $4\sigma(F)$.

4.5. Comparação entre a MtPNP e a HsPNP

O alinhamento das seqüências da MtPNP e da HsPNP indica que os resíduos Tyr92, Glu189, Met207, Asn231 e His243 são conservados em ambas estruturas.

A primeira estrutura cristalográfica da PNP humana (EALICK *et al.*, 1990) indicou como sítio ativo as regiões compreendidas entre os resíduos 32-33, 84-88, 115-118, 200-201, 217-220, 243-244 e 257, juntamente com o resíduo 159 da unidade subjacente. A comparação da estrutura primária da MtPNP com a estrutura primária da HsPNP indica a não conservação da Lys244 (Figura 4.9).

A estrutura a 2,3Å de resolução da PNP humana (DE AZEVEDO *et al.*, 2003) mostrou um posicionamento diferente do resíduo Lys244, quando comparada com a estrutura da PNP proposta por EALICK *et al.*, 1990. Vários

estudos de desenho de drogas baseados na estrutura usaram o sítio ativo definido na estrutura de EALICK *et al.*, 1990, inclusive levando em conta a interação de diversos inibidores com a Lys244 da HsPNP (MONTGOMERY, 1993).

Tomou-se, então, como referência as estruturas da HsPNP apoenzima (código PDB 1M73) (DE AZEVEDO *et al.*, 2003) e da HsPNP em complexo com Aciclovir (código PDB 1PWY) (DOS SANTOS *et al.*, 2003). Todas as sobreposições e cálculos de desvio foram realizados utilizando o programa LSQKAb componente do pacote CCP4.

A estrutura primária da MtPNP tem 34% de identidade com a estrutura primária da HsPNP (Figura 4.9), porém, as estruturas secundária, terciária e quaternária são extremamente próximas (NOLASCO *et al.*, 2004) (Figura 4.10).

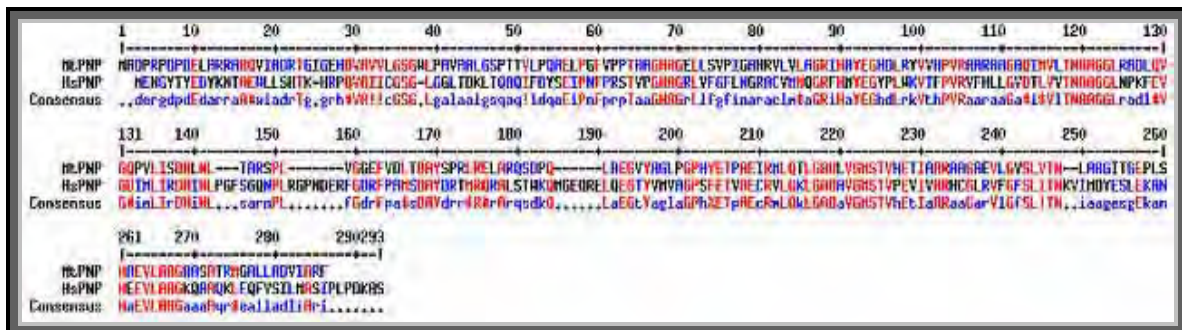


Figura 4.6 – Alinhamento das estruturas primárias da MtPNP e da HsPNP feito utilizando o programa MultAlin (CORPET, 1988). A identidade, mostrada em vermelho, é de, aproximadamente, 34%.

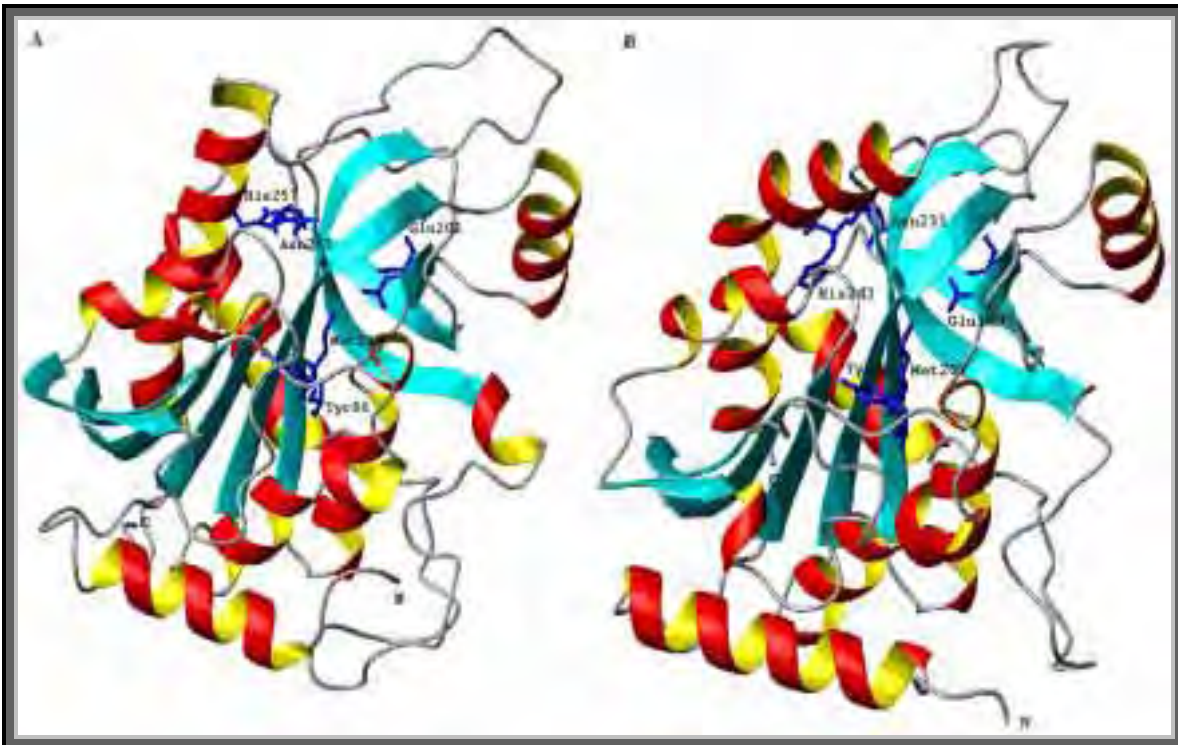


Figura 4.7 – Comparação dos monômeros da HsPNP (A) e da MtPNP (B) (NOLASCO *et al.*, 2004).

Mesmo sendo de diferentes origens, ambas PNPs apresentam a característica estrutura trimérica das PNPs de mamíferos. Os sítios ativos da MtPNP e da HsPNP (código de acesso no PDB: 1M73) são formados, exatamente, pelos mesmos resíduos e estes estão dispostos de forma idêntica (NOLASCO *et al.*, 2004) (Figura 4.11). Sobrepondo as estruturas observou-se um RMSD de 2,5Å, em média. Fazendo a sobreposição somente dos resíduos que formam o sítio catalítico do monômero A observou-se, ainda, um RMSD de 0,9Å.

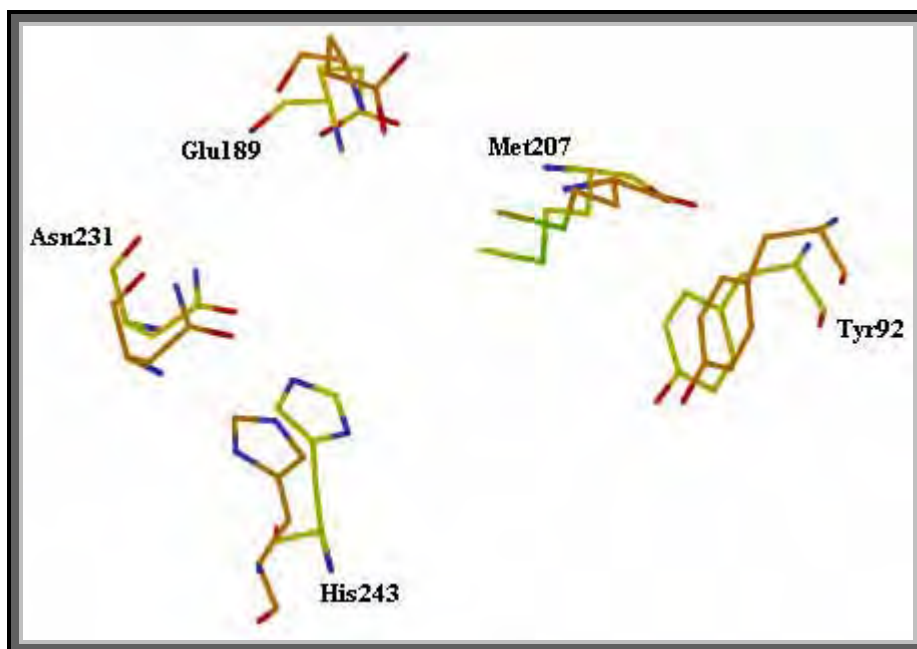


Figura 4.8 – Comparação dos sítios ativos da HsPNP (em laranja) e da MtPNP (em amarelo mostrando a legenda dos resíduos) (NOLASCO *et al.*, 2004).

4.6. Comparação entre os complexos MtPNP·ImmH·PO₄ e MtPNP·Acy·PO₄

Tomou-se como referência a estrutura da MtPNP complexada com o inibidor Imucilina-H (código PDB 1G2O). Todas as sobreposições e cálculos de desvio foram realizados utilizando o programa LSQKAB componente do pacote CCP4 (CCP4, 1994).

Apesar dos diferentes grupos espaciais, P₃₂₁ para o complexo MtPNP·ImmH·PO₄ e P₂₁₂₁₂ para o complexo MtPNP·Acy·PO₄, a sobreposição das estruturas revelou semelhanças e diferenças significantes. O RMSD observado entre os dois trímeros, 2,3Å, não implica em mudanças conformacionais substanciais dos resíduos. Acredita-se fortemente que essas diferenças são devido ao empacotamento cristalográfico nos cristais, que pertencem a diferentes grupos espaciais.

Ajustando somente os sítios de ligação, um RMSD de 0,4Å foi observado, mostrando que o sítio catalítico não sofre mudanças conformacionais importantes, corroborando com a idéia de que as mudanças, realmente, se devem aos diferentes empacotamentos cristalográficos (Figura 4.12). Uma diferença realmente significativa foi observada na área de contato dos inibidores com a proteína. A molécula do inibidor Imucilin-H faz um contato cuja área total é de 161,0Å² com o sítio catalítico da MtPNP, já a molécula do inibidor aciclovir faz um contato cuja área total é de 123,0Å² com o sítio catalítico da MtPNP.

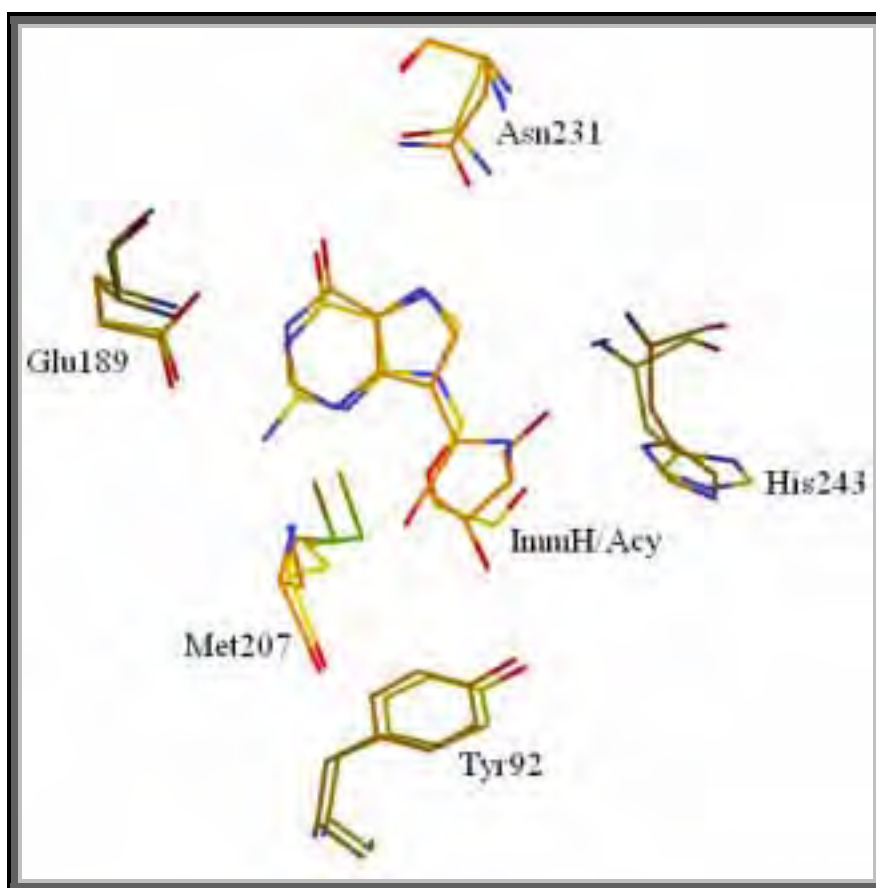


Figura 4.9 - Comparação dos sítios ativos da MtPNP·ImmH·PO₄ (em laranja) e da MtPNP·Acy·PO₄ (em amarelo)

O elevado valor do RMSD (quando da sobreposição de toda a proteína) se deve a dois grupos de resíduos que apresentam maiores diferenças. O primeiro

deles é o *loop* formado pelos resíduos entre Pro62 e Gly70, região responsável pela formação de um tipo de “tampa” para o ligante, essa região não interage diretamente com o ligante (Figura 4.13). O segundo grupo é o que forma a hélice que vai dos resíduos Gly235 até Ala248, incluindo a His243 que é parte integrante do sítio ativo (Figura 4.14).

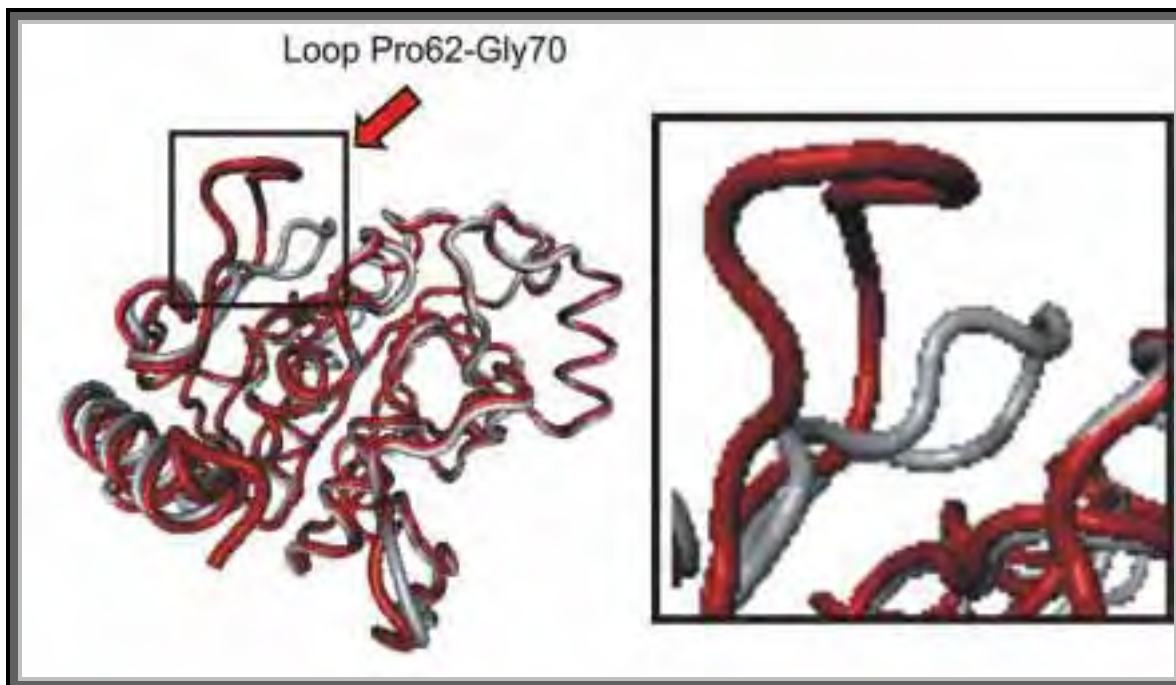


Figura 4.10 – Região da “tampa” do sítio catalítico formada pelos resíduos compreendidos entre a Pro62 e a Gly70.

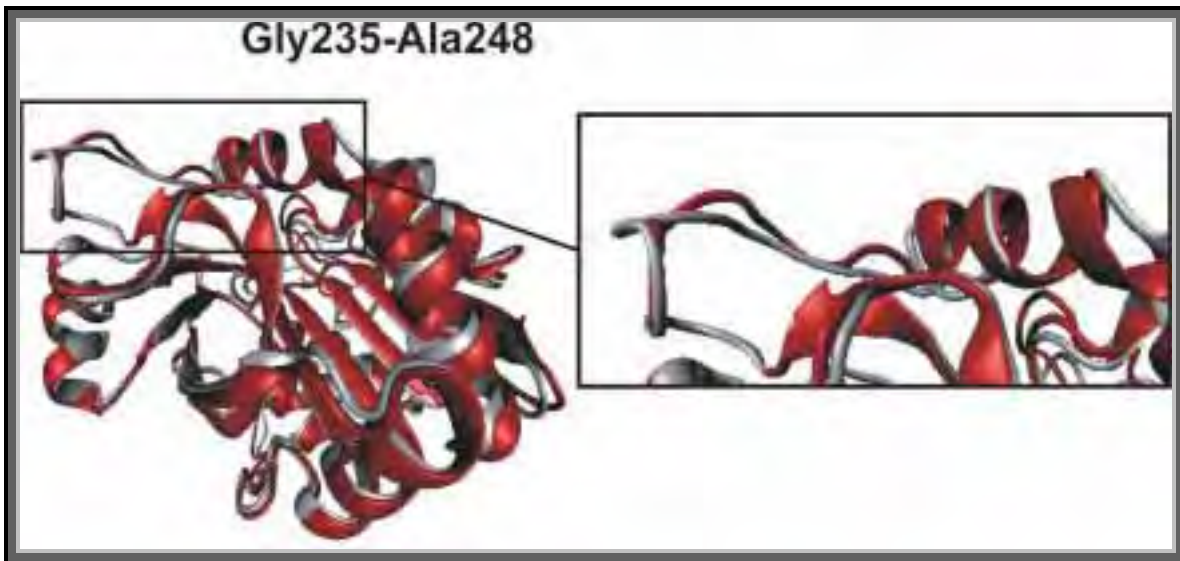


Figura 4.11 – Transição coil-hélice nos resíduos compreendidos entre a Gly235 e a Ala248.

As posições das moléculas de água não mostram diferenças substanciais e os grupos de fosfato estão ligeiramente deslocados por conta da diferença de tamanho entre os inibidores, mas as cadeias laterais da Arg88 e da His90 continuam participando da ligação de hidrogênio intermolecular com o O1 do fosfato, enquanto a Ser36 interage com ambos O3 e O4, através dos átomos da cadeia lateral.

5. Conclusão

O conhecimento aprofundado da proteína colabora para o aprimoramento do que hoje é chamado de Genoma Estrutural do *Mycobacterium tuberculosis*, que consiste em decifrar estruturas protéicas além de suas respectivas funções. A solução da estrutura da MtPNP apoenzima e da estrutura da MtPNP complexada com o inibidor Aciclovir fornece informações que contribuem para o entendimento, a nível atômico, dos processos de ligação e inibição da proteína.

A análise comparativa feita entre as estruturas das PNPs Humana e do *Mycobacterium tuberculosis* não mostrou grandes diferenças conformacionais, mesmo tendo as proteínas diferentes origens. A sobreposição das estruturas mostrou que o sitio catalítico é formado pelos mesmos resíduos, além de um baixo valor de RMSD.

Na comparação feita entre as estruturas complexadas da MtPNP (MtPNP·ImmH·PO₄ e MtPNP·Acy·PO₄) diferenças conformacionais causadas pela interação com os inibidores não foram observadas, mesmo sabendo da maior área de contato entre a molécula do inibidor Imucilin-H com a proteína quando comparada com a área de contato do inibidor Aciclovir com a proteína.

As informações estruturais fornecidas pelas estruturas da MtPNP apresentadas neste trabalho têm importância ímpar no tocante a comparações com outras PNPs, revelando semelhanças e peculiaridades no intuito de desenvolver pesquisa que dê suporte para o desenvolvimento de drogas mais poderosas contra a tuberculose.

Estas estruturas têm ainda como valor a possibilidade de prover informações que poderão, num futuro próximo, ser utilizadas no desenho racional

de drogas mais seletivas contra a tuberculose, diminuindo as complicações no tratamento e o sofrimento dos portadores da doença.

Apêndice A – Radiação Síncrotron

Historicamente a luz síncrotron foi observada pela primeira vez em 1947 (ELDER *et al.*, 1947) e era utilizada somente em experimentos de física de partículas. Em 1960 a luz foi usada em modo *parasítico*, a chamada primeira geração. Em meados dos anos 70 suas propriedades únicas e seu valor começaram a ser apreciados e fontes dedicadas totalmente a experimentos com luz síncrotron foram construídas. Estes laboratórios, onde a maior parte da luz é produzida por desvios de órbita ocasionados por dipolos, são chamados de fontes de segunda geração. Laboratórios de luz síncrotron que utilizam dispositivos de inserção como onduladores e *wingglers* e têm feixes de elétrons de alto brilho (intensos e altamente colimados) são chamados de fontes de terceira geração (MOCELLIN, 2002).

A radiação síncrotron é gerada no momento em que elétrons a altas velocidades sofrem desvios significativos em sua órbita. Estes desvios são ocasionados pela ação do campo magnético criado pelos dispositivos dipolares (ímãs) que estão dispostos ao longo de um anel de armazenamento. Assim, ocorre a formação de um estreito cone de luz que se propaga na direção de propagação dos elétrons (tangenciando o anel de armazenamento). O ângulo de abertura desse cone é aproximadamente igual a $2\gamma^{-1}$, onde:

$$\gamma = \frac{E}{M_0 C^2}$$

que é a razão entre a energia total E e a energia da massa de repouso M_0C^2 dos elétrons.

Outro parâmetro importante do anel de armazenamento é a potência total radiada (P_{total}), que é dada por:

$$P_{total} (KW) = 8,85 \cdot 10^{-2} \frac{E^4 (GeV)}{R(m)} \cdot I(mA)$$

onde $8,85 \cdot 10^{-2}$ é a potência total radiada por elétron, E é a energia total em Giga-eletrovolts, R é o raio de curvatura do magneto de dipolo em metros e I é a corrente que percorre o anel em mili-ampéres.

No LNLS os elétrons circulam com uma energia de 1,37GeV para um raio de 2,735 metros. A corrente de operação típica depois da injeção é de 175 mA. Assim, a potência total de operação no LNLS é de 19,95KW.

A linha de cristalografia de proteínas (CPr) opera radiação na faixa dos raios X com comprimento de onda igual a 1,4270Å.

Apêndice B – “The Maximum Likelihood Method”

Cristalógrafos do início do século XX observaram que os parâmetros utilizados para a determinação das posições atômicas de um cristal podiam ser melhorados pela minimização das diferenças entre as amplitudes do fator de estrutura observado e do fator de estrutura calculado (MURSHUDOV *et al.*, 1997). Um dos primeiros trabalhos publicados sobre o tema e sobre a aplicação do método dos mínimos quadrados para a solução deste problema foi escrito por Hughes em 1941 (HUGHES, 1941).

Tempos depois, ocorreu o desenvolvimento de uma aproximação para análises estruturais chamada de método da transformada de Fourier, onde correções para parâmetros atômicos eram feitas no espaço real baseadas no mapa de diferenças das posições atômicas (BOOTH, 1946). Assim, similaridades foram mostradas nas duas aproximações pela comparação das primeiras derivadas das duas funções, o que possibilitou a Cruickshank (1952, 1956) a visualização da complementaridade das duas análises, além do provimento de novas equações para o cálculo do posicionamento atômico (COCHRAN, 1948).

Recentemente dados estatísticos têm mostrado que é melhor utilizar as equações do chamado “*Maximum Likelihood Method*” (Método da Máxima Verossimilhança) ao invés das equações do método dos mínimos quadrados (STUART & ORD, 1991). Luzzati mostrou que a suposição de que todos os erros são consequência dos erros das coordenadas utilizadas para a substituição molecular é verdadeira e que são os mesmos erros para todos os átomos, logo, os

fatores de estrutura é que estão distribuídos numa Gaussiana e não suas amplitudes.

O interesse em se utilizar as equações do *Maximum Likelihood Method* tem sido estimulado por conta de sua bem sucedida aplicação na redução da influência do modelo de busca (LUNIN & URZHUMTSEV, 1984).

Princípios do Método

A idéia básica é que a estrutura final é mais consistente quando se superestima a importância dos dados observados (*data*) e que a probabilidade de veracidade da estrutura deve incluir todos os tipos de erros, incluindo erros do modelo (*model*). À medida que o modelo se aperfeiçoa os erros diminuem e as probabilidades ficam mascaradas, o que aumenta as possibilidades.

Se tivermos N observações de diferentes valores de x_j , conseqüentemente, a probabilidade de veracidade da estrutura (**L**) será:

$$L = P(X_1, X_2, \dots, X_N)$$

Se as observações forem independentes o **L** será o produto de todas as probabilidades individuais:

$$L = \prod_{j=1}^N P(X_j)$$

Logo, a função **L** é a probabilidade do modelo gerado pelos dados, $P(\text{model}, \text{data})$, ser verdadeira. Mas existe a tendência de se acreditar que os dados gerados pelo modelo, $P(\text{data}, \text{model})$, sejam uma boa reflexão da realidade, o que não é verdade.

Assim, a razão entre o número de dados experimentais e o número de parâmetros a serem estimados é pequena. O uso de informações químicas anteriores é essencial. Isso significa que todo refinamento de macromoléculas pode ser visto como uma aplicação do teorema de Bayes, como segue:

O Teorema de Bayes

Admitamos que $P(A, B)$ é a probabilidade de **A** ser verdadeiro sabendo que **B** é verdadeiro. Se **A** depende de **B** então isso será diferente de $P(A)$, que é a probabilidade geral de **A** ser verdadeiro independente de **B**. Assim, Aplicando a lei da multiplicação para probabilidades, temos:

$$P(A, B) = P(A)P(B, A)$$

onde $P(B, A)$ é a probabilidade de **B** ser verdadeiro sabendo que **A** certamente é verdadeiro.

O diagrama de Venn ilustra o que foi dito acima:

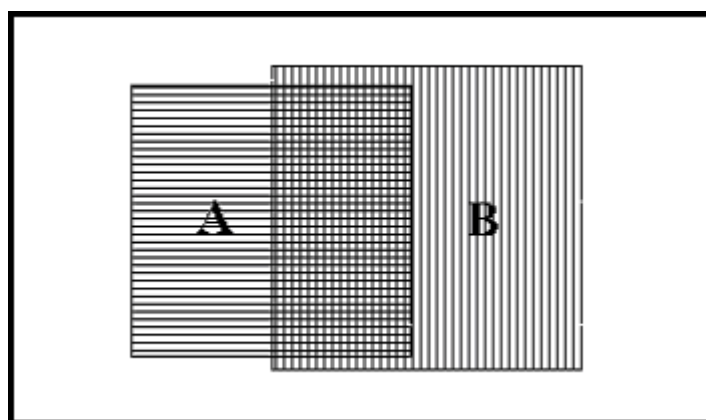


Diagrama de Venn – Ilustração da lei da multiplicação para as probabilidades.

A caixa inteira representa todas as possibilidades, ou 100%. A caixa **A** representa a probabilidade de **A** ser verdadeiro. Admitindo que **A** representa 20 da

caixa, $P(A) = 0,2$. A caixa **B** representa a probabilidade de **B** ser verdadeiro.

Admitindo que **B** representa 25% da caixa, $P(B) = 0,25$.

A região de sobreposição representa a probabilidade de ambas **A** e **B** serem verdadeiros, $P(A, B) = 0,1$. Se assumirmos que **A** é verdadeiro, **B** também o

será metade do tempo, $P(B, A) = 0,5 = 0,1 / 0,2$. Se assumirmos que **B** é verdadeiro,

A o será 40% do tempo, $P(A, B) = 0,4 = 0,1 / 0,25$.

Assim podemos verificar a lei da multiplicação para probabilidades como segue:

$$P(A, B) = P(A)P(B, A) = 0,2 \times 0,5 = 0,1$$

$$P(B, A) = P(B)P(A, B) = 0,25 \times 0,4 = 0,1$$

Assim,

$$P(A, B) = P(A)P(B, A) = P(B)P(A, B) \therefore$$

$$P(B, A) = \frac{P(B)P(A, B)}{P(A)}$$

Em termos da Função **L**, teremos:

$$P(\text{model}, \text{data}) = \frac{P(\text{model})P(\text{data}, \text{model})}{P(\text{data})}$$

Assim os dados observados estão fixos e podemos variar somente os parâmetros do modelo, logo o denominador é só uma constante de normalização.

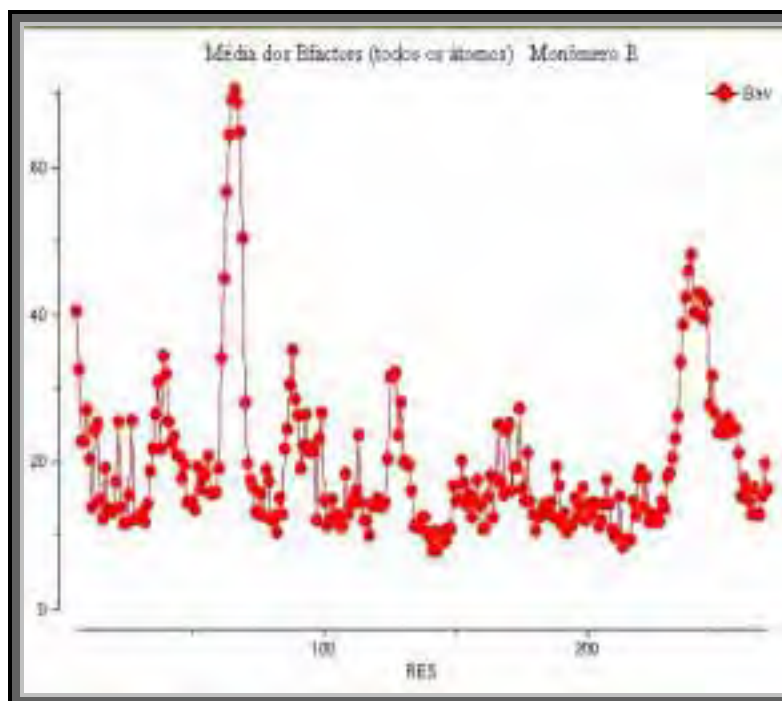
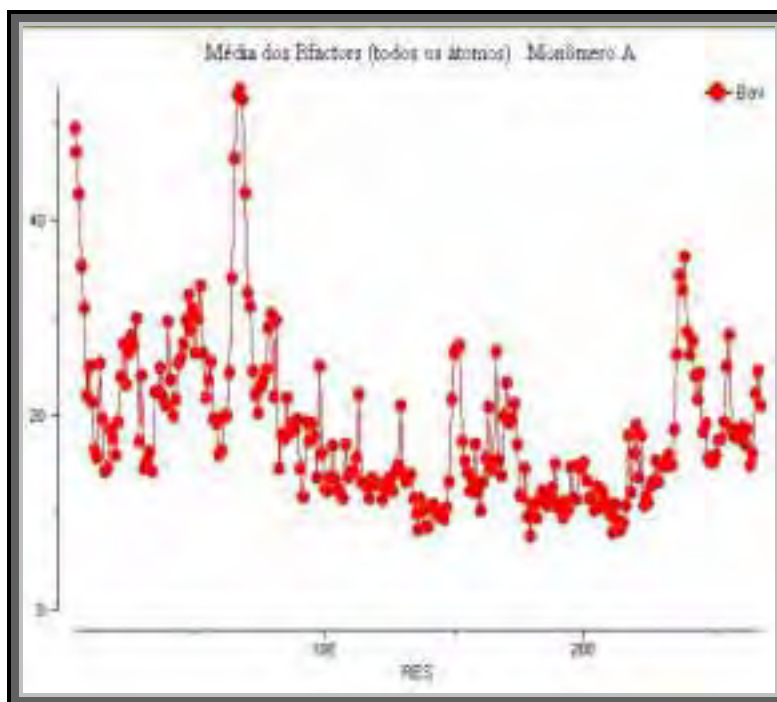
Se quisermos minimizar ainda mais a função **L**, o valor de um fator constante não alterará a posição de seu máximo, logo:

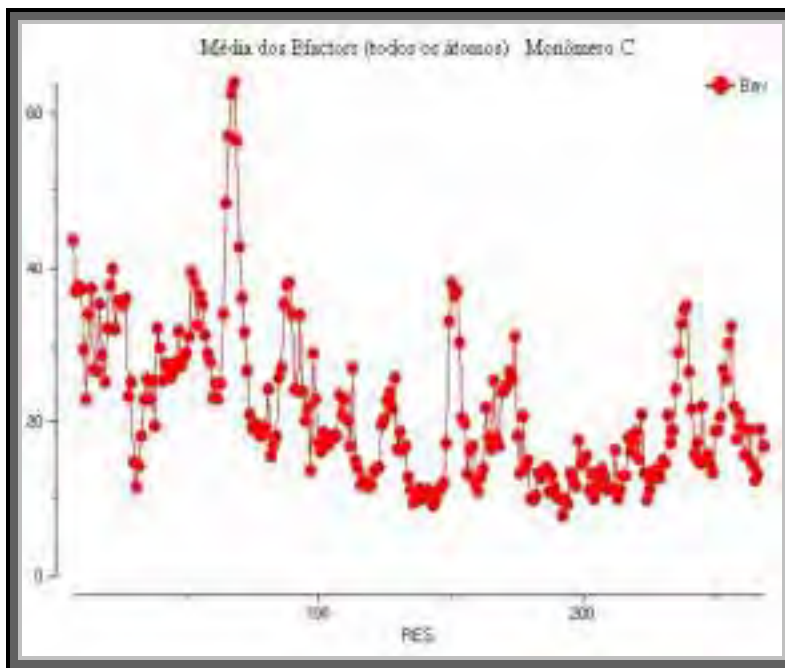
$$L(\text{model}, \text{data}) = P(\text{model})P(\text{data}, \text{model})$$

A partir da equação acima podemos inferir que o modelo de busca só vai influenciar na construção do mapa de densidades quando a posição dos resíduos que o formam estiverem corretas, impedindo assim que a nova estrutura seja refinada com “bias” do modelo.

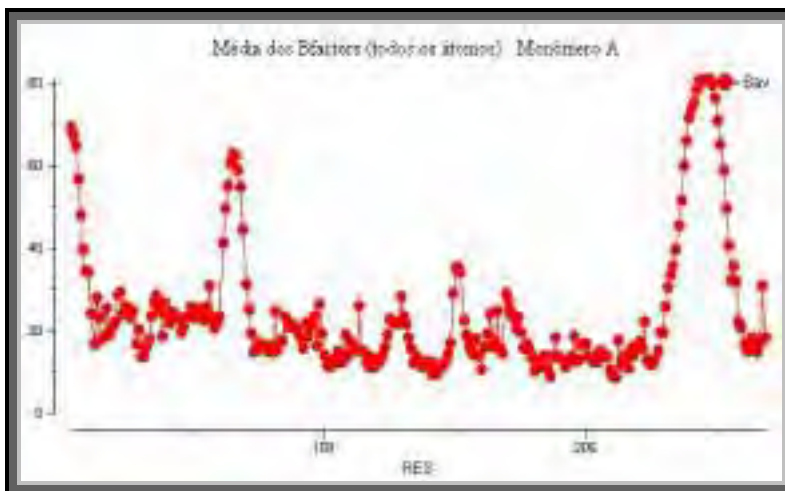
Apêndice C – Bfactors das estruturas resolvidas

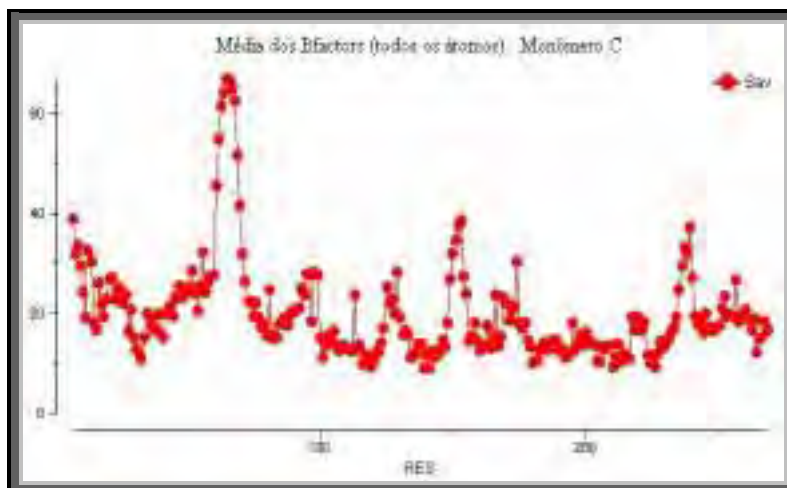
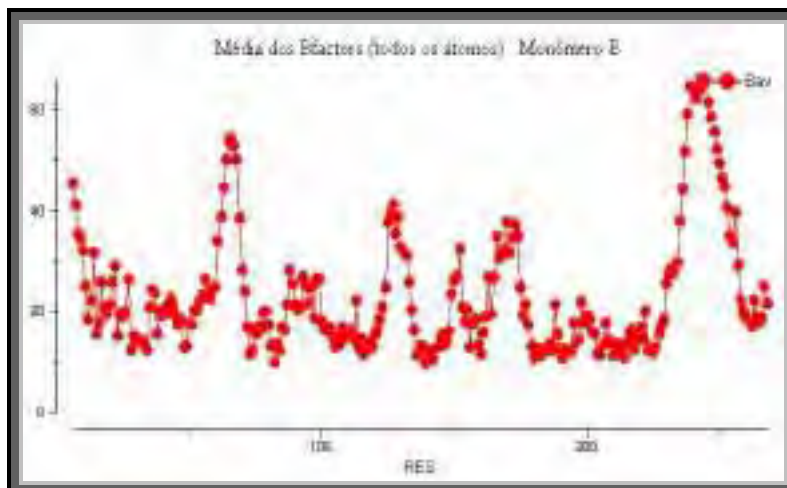
Seguem abaixo os gráficos de Bfactors (fatores de temperatura) relativos a cada monômero analisado da estrutura da MtPNP·PO₄.





Seguem abaixo os gráficos de Bfactors (fatores de temperatura) relativos a cada monômero analisado da estrutura da MtPNP·Acy·PO₄.





Referências

- AGARWAL, R.C.; A new least-squares refinement technique based on the fast Fourier transform algorithm. **Acta Crystallogr.** A34, 791-809 (1978)
- AGARWAL, R.P.; PARKS, R.E. JR.; Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes. Volume Content and behavior of sulfhydryl groups. **J. Biol. Chem.** 10;246(11):3763-8 (1971)
- AVARBOCK, D.; SALEM, J.; LI, L.S.; *et al.*; Cloning and characterization of a bifunctional RelA/SpoT homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. **Gene.** 11;233(1-2):261-9 (1999).
- BASSO, L.A.; SANTOS, D.S.; SHI, W.; *et al.*; Purine nucleoside phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*. Analysis of inhibition by a transition-state analogue and dissection by parts. **Biochemistry.** 27;40(28):8196-203 (2001)
- BLUNDELL, T. L.; & JOHNSON, L. N.; **Protein Crystallography.** London: Academic Press (1976)
- BRÜNGER, A.T.; X-PLOR Version 3.1 manual. Yale Univ. USA (1992)

BZOWSKA, A.; KULIKOWSKA, E.; SHUGAR, D.; Properties of purine nucleoside phosphorylase (PNP) of mammalian and bacterial origin. **Z. Naturforsch [C]**. 45(1-2):59-70 (1990)

BZOWSKA, A.; KULIKOWSKA, E.; SHUGAR, D.; Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. **Pharmacol. Ther.** 88(3):349-425. (2000) Review

CANDURI, F.; DOS SANTOS, D.M.; SILVA, R.G.; *et al.*; Structures of human purine nucleoside phosphorylase complexed with inosine and ddl. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 23;313(4):907-14 (2004)

COLE, S.T.; BROSCH, R.; PARKHILL, J.; *et al.*; Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature.** 11;393(6685):537-44 (1998).

CORPET, F.; Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Res.** 25;16(22):10881-90 (1988)

DE AZEVEDO, W.F. JR.; Introdução à biocristalografia com o estudo estruturas da quinase dependente de ciclina 2 (CDK2) complexada com inibidores, USP, SP (1997)

DE AZEVEDO, W.F. JR.; CANDURI, F.; DOS SANTOS, D.M.; *et al.*; Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase at 2.3Å resolution. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 29;308(3):545-52 (2003)

DOS SANTOS, D.M.; CANDURI, F.; PEREIRA, J.H.; *et al.*; Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase complexed with aciclovir. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 308(3):553-9 (2003)

DUCRUIX, A.; & GIEGÉ, R.; *Crystallization of nucleic acids and proteins. A practical approach.* Oxford, UK: IRL Press (1992)

EALICK, S.E.; BABU, Y.S.; BUGG, C.E.; *et al.*; Application of crystallographic and modeling methods in the design of purine nucleoside phosphorylase inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 15;88(24):11540-4 (1991)

EALICK, S.E.; RULE, S.A.; CARTER, D.C.; *et al.*; Three-dimensional structure of human erythrocytic purine nucleoside phosphorylase at 3.2 Å resolution, **J. Biol. Chem.** 265 (3) 1812-1820 (1990)

ELDER, F.R.; GUREWITSCH, A.M.; LANGMUIR, R.V.; *et al.*; Radiation from electrons in a synchrotron, **Phys. Rev.** 71:829 (1947)

ERION, M.D.; STOECKLER, J.D.; GUIDA, W.C.; *et al.*; Purine nucleoside phosphorylase. 2. Catalytic mechanism. **Biochemistry**. 30; 36(39):11735-48 (1997)

FADEL, V.; Estrutura cristalográfica da hemoglobina isolada do lobo guará (*Chrysocyon brachiurus*), UNESP, SP (2000)

FISHER, R. A.; "On Mathematical Foundations of Theoretical Statistics", **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, série A 222, p309-368 (1921)

HERSHFIELD, M.S.; KREDICH, N.M.; S-Adenosylhomocysteine metabolism in adenosine deaminase deficient cells. **Adv. Exp. Med. Biol.** 122A:421-5 (1980)

KLINE, P.C.; SCHRAMM, V.L.; Purine nucleoside phosphorylase. Catalytic mechanism and transition-state analysis of the arsenolysis reaction. **Biochemistry**. 7;32(48):13212-9 (1993)

LUNIN, V.Y. & URZHUMTSEV A.G.; **Acta Cryst.** A40, 269-277 (1984)

MCREE, D.E.; XtalView/Xfit - A versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. **J. Struct. Biol.** 125(2-3):156-65 (1999)

MOCELLIN, A.; Espectroscopia de multicoincidência aplicada ao estudo de moléculas, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física Gleb Wataghin, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (2002)

MORRIS, P.E. JR.; OMURA, G.A.; Inhibitors of the enzyme purine nucleoside phosphorylase as potential therapy for psoriasis. **Curr. Pharm. Des.** 6(9):943-59 (2000) Review

MURSHUDOV, G.N.; VAGIN, A.A.; DODSON, E.J.; Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.** 1;53(Pt 3):240-55 (1997)

NAVAZA, J.; AMoRe: an automated package for molecular replacement, **Acta Crystallogr. A** 50 157-163 (1994)

NOLASCO, D.O.; CANDURI, F.; PEREIRA, J.H.; *et al.*; Crystallographic structure of PNP from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9Å resolution. **Biochem. And Biophys. Res. Commun.** (324) 789-794 (2004)

POLIKARPOV, I.; OLIVA, G.; CASTELLANO, E.E.; *et al.*, **Nucl. Instrum. Methods A**, 405, 159-164 (1998)

- POLIKARPOV, I.; PERLES, L.A.; DE OLIVEIRA, R.T.; *et al.*, Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the brazilian national synchrotron laboratory **J. Synchrotron Rad.** 5, 72-76 (1998)
- PORTER, J.G.; CATALANO, R.; MCENROE, G.; *et al.*, C-type natriuretic peptide inhibits growth factor-dependent DNA synthesis in smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.** 263(5 Pt 1):C1001-6 (1992)
- PUGMIRE, M.J.; EALICK, S.E.; Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. **Biochem. J.** 1;361(Pt 1):1-25 (2002) Review
- ROPP, P.A.; TRAUT, T.W.; Allosteric regulation of purine nucleoside phosphorylase. **Arch Biochem Biophys.** 1;288(2):614-20 (1991)
- RUSSO, A.A.; JEFFREY, P.D.; PATTEN, A.K.; *et al.*, **Nature**, (Lodon) 382, 325-331 (1996)
- SHI, W.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S.; *et al.*; Structures of Purine Nucleoside Phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* in complexes with Immucillin-H and Its Pieces, **Biochemistry**, (40) 8204-8215 (2001)
- SHI, W.; TING, L.M.; KICSKA, G.A.; *et al.*; Plasmodium falciparum purine nucleoside phosphorylase: crystal structures, immucillin inhibitors, and dual catalytic function. **J. Biol. Chem.** 30;279(18):18103-6 (2004).

STOECKLER, J.D.; CAMBOR, C.; PARKS, R.E. JR.; Human erythrocytic purine nucleoside phosphorylase: reaction with sugar-modified nucleoside substrates.

Biochemistry. 8;19(1):102-7 (1980)

STOUT, G.H. & JENSEN L.H.; "X-ray Structure Determination", 2nd ed. Wiley, New York, USA. (1989)

STUART, A. & ORD, J.K.; Classical Inference and relationship, Vol. 2. Kendall's advanced theory of statistics (5th edn.). New York, Edward Arnold (1991)

VOET, J.G.; VOET, D.; Biochemistry and Molecular Biology Education (BAMBEEd).

Biochem. Educ. 1;28(3):124 (2000)

Anexo – Crystallographic structure of PNP from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9Å resolution

Crystallographic structure of PNP from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9 Å resolution

Diego O. Nolasco^{a,b}, Fernanda Canduri^{a,b}, José H. Pereira^{a,b}, Janaina R. Cortinóz^a,
Mário S. Palma^c, Jaim S. Oliveira^d, Luiz A. Basso^d, Walter F. de Azevedo Jr.^{a,*},
Diógenes S. Santos^{d,*}

^a Departamento de Física, UNESP, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, UNESP, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil

^c Laboratory of Structural Biology and Zoochemistry-CEIS, Department of Biology, Institute of Biosciences, UNESP, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil

^d Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose, Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional, PUCRS, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

Received 1 September 2004

Available online 2 October 2004

Abstract

Even being a bacterial purine nucleoside phosphorylase (PNP), which normally shows hexameric folding, the *Mycobacterium tuberculosis* PNP (MtPNP) resembles the mammalian trimeric structure. The crystal structure of the MtPNP apoenzyme was solved at 1.9 Å resolution. The present work describes the first structure of MtPNP in complex with phosphate. In order to develop new insights into the rational drug design, conformational changes were profoundly analyzed and discussed. Comparisons over the binding sites were specially studied to improve the discussion about the selectivity of potential new drugs.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Tuberculosis; PNP; Crystallography; Apoenzyme; Selectivity

Tuberculosis causes eight million new infections and kills two million people each year worldwide according to the World Health Organization (WHO). It is estimated that approximately two billion individuals, one-third of the world population, are infected with latent TB. Tuberculosis resurged in the late 1980s and was declared to be a global emergency by the WHO. The high susceptibility of human immunodeficiency virus-infected persons to the disease and the proliferation of multi-drug-resistant (MDR) strains have created a worldwide interest in expanding current programs in tuberculosis research. New antimycobacterial agents are needed to treat *Mycobacterium tuberculosis* strains resistant to

existing drugs and to shorten the treatment course to improve patient compliance [1].

The TB is a chronic infectious disease caused by various alcohol–acid-resistant bacterium from the *Mycobacterium* gender. The more frequent cyclic form of the disease is the pulmonary tuberculosis, caused by the *M. tuberculosis* (Koch *bacillus*), but can also cause cerebral lesions, skinny (lupus), and ganglionaries, some times produced by the human origin *bacillus*, some times produced by the bovine origin *bacillus*. The Koch *bacillus* is an extremely small and resistant bacterium, in stick shape. It can live in dry conditions for months and can also resist disinfectants of moderate action.

Purine nucleoside phosphorylase (PNP) catalyzes the phosphorolysis of purine nucleosides to corresponding bases and ribose 1-phosphate. PNP plays a central role in purine metabolism, normally operating in the purine

* Corresponding authors.

E-mail addresses: walterfa@df.ibilce.unesp.br (W.F. de Azevedo Jr.), diogenes@pucrs.br (D.S. Santos).

salvage pathway of cells. PNP is specific for purine nucleosides in the β -configuration and exhibits a preference for ribosyl-containing nucleosides relative to the analogs containing arabinose, xylose, and lyxose stereoisomers. Moreover, PNP cleaves glycosidic bond with inversion of configuration to produce α -ribose 1-phosphate [2–4].

PNP is an enzyme of purine metabolism that functions in the salvage pathway, including even those of protozoan parasites, thus enabling the cells to utilize purine bases recovered from metabolized purine ribo- and deoxyribonucleosides to synthesize purine nucleotides [5–7]. The PNPs from various sources are members of a broader class of N-ribohydrolases and transferases, the transition states for which share ribosyl oxocarbenium like character, with cleavage of the C–N ribosyl bond [8,9].

A number of parasites lacking the ability to synthesize purine nucleotides de novo must utilize host purines, formed by PNP, for DNA synthesis. Thus, inhibition of PNP could prevent the spread of parasitic infection [10].

The human PNP is a potential target for drug development, which could induce immune suppression to treat, for instance, autoimmune diseases, T-cell leukemia, lymphoma, and organ transplantation rejection. Furthermore, PNP inhibitors can also be used to avoid cleavage of anticancer and antiviral drugs, since many of these drugs mimic natural purine nucleosides and can thereby be cleaved by PNP before accomplishing their therapeutic role [2,3].

Homologs to enzymes in the purine salvage pathway have been identified in the genome sequence of *M. tuberculosis*. The genome of *M. tuberculosis* comprised of 4,411,529 bp containing 3924 potential open reading frames [11]. On the basis of sequence homology, biochemical functions have been attributed to approximately 40% of the predicted proteins, while similarities to other described proteins were found for another 44% and the remaining 16% bore no resemblance to known proteins and may encode proteins with specific mycobacterial functions [11,12].

In the de novo synthesis of purine ribonucleotides, the formation of adenosine monophosphate (AMP) and guanine monophosphate (GMP) from inosine monophosphate (IMP) is irreversible, but purine bases, nucleosides, and nucleotides can be interconverted through the activities of purine nucleoside phosphorylase, adenosine deaminase, and hypoxanthine–guanine phosphoribosyl transferase. The specific inhibition of MtPNP could potentially lead to the accumulation of guanine nucleotides since a putative guanylate kinase and a nucleoside diphosphate kinase are encoded in the genome [13].

The crystallographic structure of the MtPNP was first determined in 2001 at 1.75 Å resolution with Immucil-

lin-H [14,15] and inorganic phosphate, and also solved at 2.0 Å resolution with 9-deazahypoxanthine and iminoribitol [16].

We have now obtained X-ray diffraction data using synchrotron radiation and refined the structure of the apoenzyme at 1.9 Å resolution, using the recombinant MtPNP with inorganic phosphate (MtPNP · PO₄). Our analysis of the MtPNP · PO₄ structural data, and structural differences between the apoenzyme and the MtPNP · Immucillin-H · PO₄ complex provides new insights into substrate binding, the purine-binding site, and can be used for future inhibitors' design.

Methods

Crystallization. Recombinant MtPNP was expressed and purified as previously described [1]. MtPNP was crystallized using the experimental conditions described elsewhere [16]. In brief, the PNP (1 μ L at a concentration of 25 mg ml⁻¹) containing 5 mM NaH₂PO₄ was mixed with an equal volume of the reservoir solution containing 100 mM Tris, pH 8.0, 25% PEG 3350, and 25 mM MgCl₂, and equilibrated against 1.0 mL of the reservoir solution. Diffraction from the crystals was consistent with the space group *P*2₁2₁2 (*a* = 117.95 Å, *b* = 134.35 Å, and *c* = 44.20 Å), with a trimer in the asymmetric unit (*V*_m = 2.12 Å³ Da⁻¹; 41.92% solvent content).

Data collection, processing, and structure determination. Crystals were cryoprotected by transfer to crystallization solution with 20% glycerol and flash-cooled at 100 K. X-ray diffraction data were collected at 1.4270 Å wavelength on a CCD detector using synchrotron radiation at beam line CPR at the Synchrotron Radiation Source

Table 1
Data collection and refinement statistics

MtPNP · PO ₄	
<i>Data collection</i>	
Resolution limits (Å)	40.0–1.9 (2.0–1.9)
Completeness (%)	90.7 (87.3)
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2
<i>a</i>	117.95
<i>b</i>	134.34
<i>c</i>	44.20
α	90°
β	90°
γ	90°
<i>R</i> _{sym} (%) ^a	6.2 (24.4)
No. of reflections	
Unique	52718
Total	524878
<i>Structure refinement</i>	
<i>R</i> _{factor} ^b	19.00
<i>R</i> _{free} ^c	26.30
No. of amino acids (trimmer)	788
No. of waters	457
No. of phosphate groups	3

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

^a $R_{\text{sym}} = 100 \sum |I(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum I(h)$, where $I(h)$ is the observed intensity and $\langle I(h) \rangle$ is the mean intensity of reflections *h* overall of $I(h)$.

^b $R_{\text{factor}} = 100 \sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum F_{\text{obs}}$. The sums are being taken over all reflections with $F/\sigma(F) > 2$ cutoff.

^c $R_{\text{free}} = R_{\text{factor}}$ for 10% of the data, which were not included during the crystallographic refinement.

(Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas, Brazil). Data for the MtPNP were processed at 1.9 Å resolution using the program MOSFLM and scaled with the program SCALA [17] and were 90.7% complete with R_{sym} of 6.2%. In the highest resolution shell (1.9–2.0 Å) the reflections presented R_{sym} of 24.4%.

Structure determination and refinement. The structure of MtPNP · PO₄ was solved by molecular replacement with AMoRe software package [18] using the trimer of *M. tuberculosis* PNP · 9dH-

X · IR · PO₄ (PDB ID code 1I80) complex as search model, the ligands and water molecules were removed from the model. The best solution after rigid-body refinement yielded an initial R_{factor} of 34.9% and a correlation coefficient of 66.4% using data in the resolution range of 8.0–4.0 Å. The atomic positions obtained from molecular replacement were used to initiate the crystallographic refinement. Model building was performed employing the program XtalView [19] using $2F_o - F_c$ and $F_o - F_c$ electron density maps. The densities for the phosphate groups were localized, one by monomer, and these groups were added. A total of 457 water molecules were added in the model, 50 molecules by each refinement step. The structure refinement of MtPNP · PO₄ was performed using Refmac5 [20]. The final model had R_{free} and R_{factor} of 26.30% and 19.00%, respectively (Table 1). The overall stereochemical quality of the final model was assessed by the programs PROCHECK [21] and Parmodel [22] (Table 2).

Quality of the model. Analysis of the Ramachandran diagram $\Phi - \Psi$ plot for the present structure indicates that 91.4% of the residues are found to occur in the most favored regions, 8.0% in the additional allowed regions, and just 4 residues (0.6%) in the disallowed regions of the plot. Analysis of the electron-density map ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$) agrees with the Thr209, of the three monomers, and His68, of monomer A, positioning.

The final model of the MtPNP · PO₄ and the MtPNP complexes (MtPNP · ImmH · PO₄, MtPNP · IR · 9dHX · PO₄) were superposed. Finally, the MtPNP · PO₄ and the *Homo sapiens* PNP (HsPNP · SO₄) were also superposed using the program PROFIT [23].

Table 2
Assessment of the final structure

MtPNP · PO ₄	
<i>Procheck</i>	
Most favored regions	91.4%
Additional allowed regions	8.0%
Disallowed regions	0.6%
<i>Parmodel</i>	
3D Profile ideal score	121.29
3D Profile score	124.06
Main chain <i>B</i> -factor (Å ²)	18.39
Side chain <i>B</i> -factor (Å ²)	21.99
Average protein <i>B</i> -factor (Å ²)	20.16
Average water <i>B</i> -factor (Å ²)	26.10

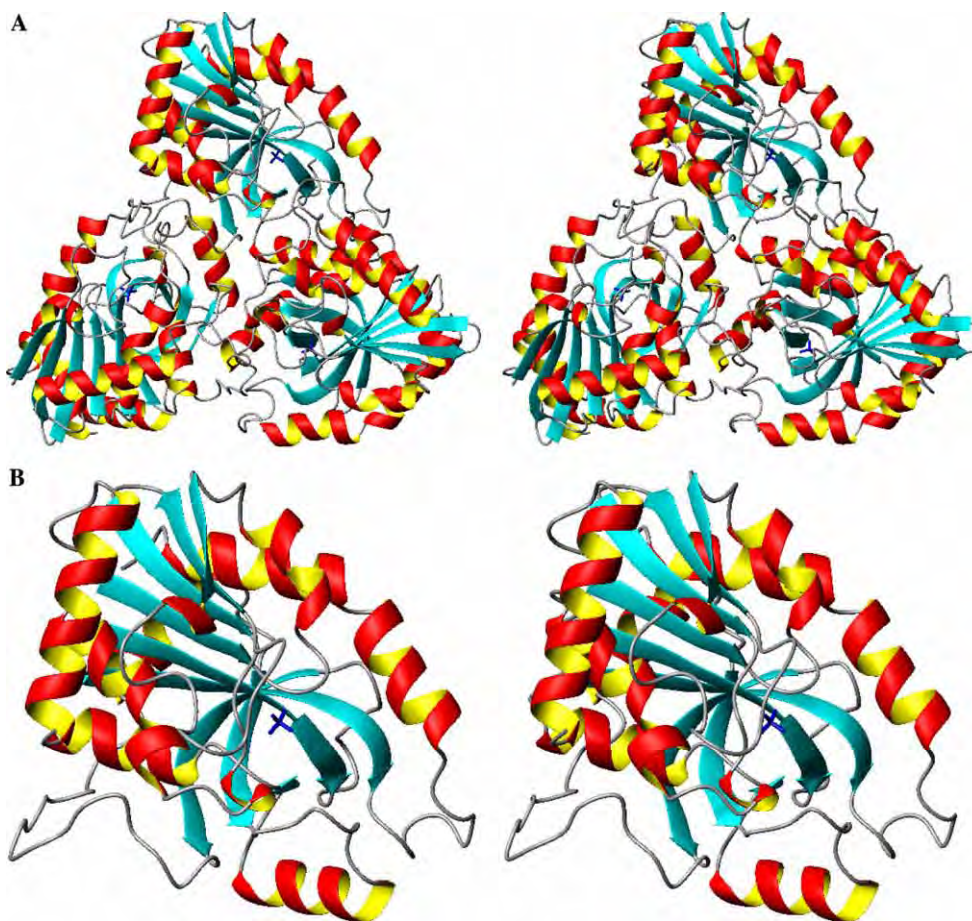


Fig. 1. Ribbon diagrams of the *M. tuberculosis* PNP trimer of the asymmetric unit (A) and monomer (B). The active sites are located near the trimer interfaces. These figures and the others were generated using MOLMOL [24].

Results and discussion

Overall structure of MtPNP · PO₄ apoenzyme

The protein is a symmetrical homotrimer with a triangular arrangement of subunits similar to the mammalian trimeric PNPs. Each monomer of the protein is folded into an α/β -fold consisting of 11 β sheet sur-

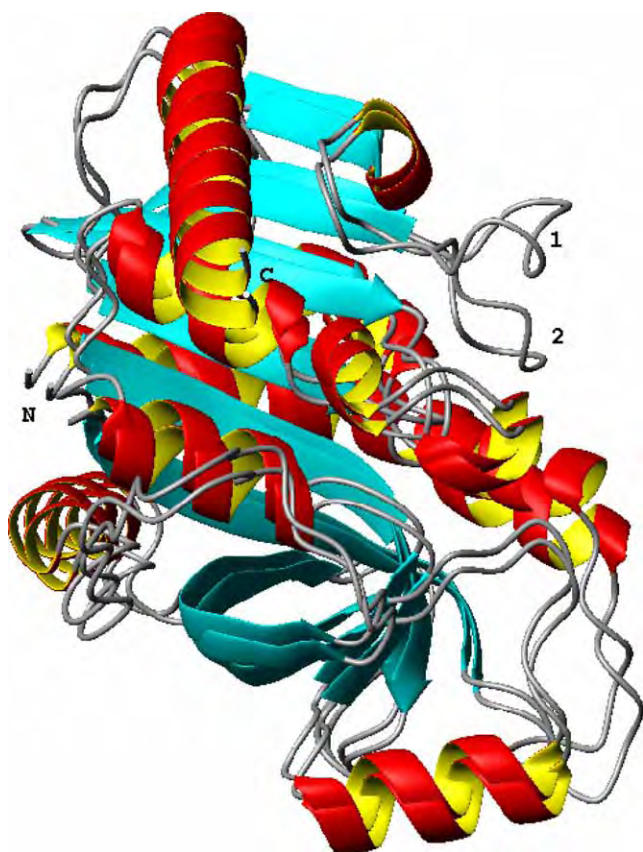


Fig. 2. Ribbon diagram of the superposition of the MtPNP · PO₄ (1) and MtPNP · ImmH · PO₄ (2) lid region.

rounded by eight α helices (Fig. 1). The structure of MtPNP · PO₄ shows clear electron-density peaks for three phosphate groups, which is present in high concentration in the crystallization experimental condition.

The three independent active sites lie near the subunit interfaces (Fig. 1A). Each active site is composed of five residues, Tyr92, Glu189, Met207, Asn231, and His243, which show a considerable different positioning in comparison with the MtPNP · ImmH · PO₄ complex. Each one of the three active sites contains one phosphate molecule.

Comparison of the MtPNP · PO₄ and the MtPNP · ImmH · PO₄ complex

A significant structural change is observed when both structures are superposed (Fig. 2), showing a kind of lid for the ligand. It is strongly believed that this change in the positions of residues from Pro62 to Gly70 is caused by the different crystallographic packing of the proteins, since the diffraction of the complex MtPNP · ImmH · PO₄ was consistent with the space group *P*3₂21, different from the MtPNP · PO₄ space group, *P*2₁2₁2.

In a superposition of both structures, using the program PROFIT, a RMS deviation of 2.381 Å was observed. Fitting just the binding sites the observed RMS deviation was of 1.370 Å, showing that the catalytic site is more compact in the MtPNP · ImmH · PO₄ complex than in the MtPNP · PO₄ apoenzyme. The interaction forces of the residues Tyr92–Glu189–Met207–Asn231–His243 with the Immucillin-H molecule provide this compression.

The water molecule positions also show substantial differences and the phosphate groups are shifted because of the missing ligand, but the side chains of Arg88 and His90 continue participating in the hydrogen bond with the O1 of the phosphate, while Ser36 interacts with both O4 and O3 through side chain backbone atoms.

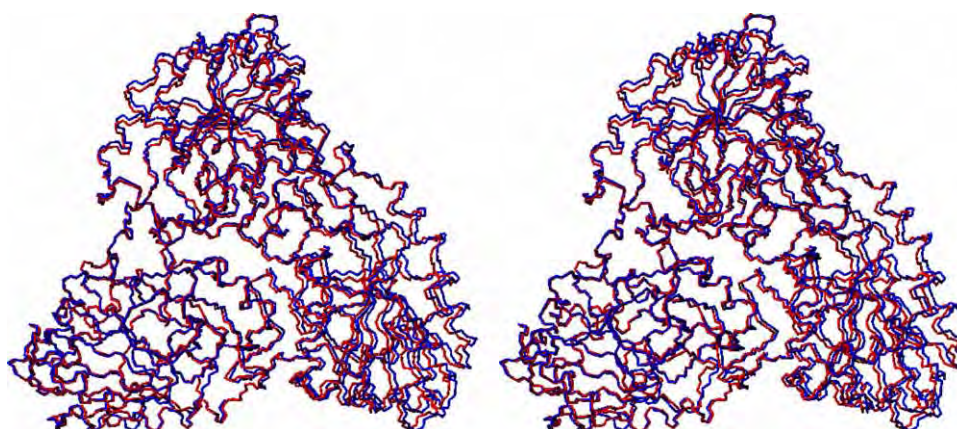


Fig. 3. Stereo diagram of the superposition of the MtPNP · PO₄ apoenzyme and the MtPNP · IR · 9dHX · PO₄ complex.

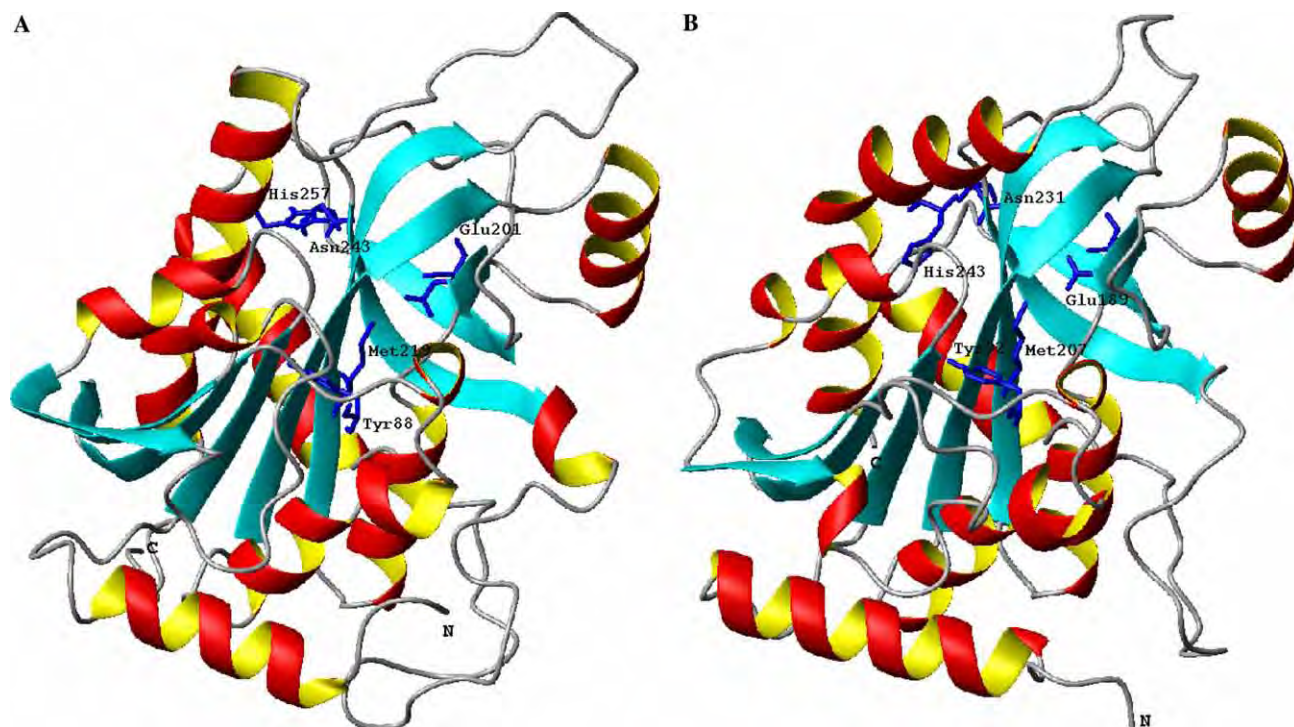


Fig. 4. Comparison of monomers from the HsPNP · SO₄ (A) and the MtPNP · PO₄ (B), and the residues of the active sites of both structures.

Comparison of the MtPNP · PO₄ apoenzyme and the MtPNP · IR · 9dHX · PO₄ complex

The region of the lid, residues from Pro62 to Gly70, fits perfectly, showing that the complete Immucillin-H provides much more influence over these residues than the 9-deazahypoxantine (Fig. 3). In a superposition of both structures the observed RMS deviation was of 0.654 Å, which corroborates with the idea of non-influence of the IR · 9dHX complex over the protein structure.

Comparison of the MtPNP · PO₄ and the HsPNP · SO₄

Even being from different origins, both PNPs show the mammalian trimeric structures. The active sites of the *M. tuberculosis* PNP and the human PNP are formed just by the same residues and show identical folding (Fig. 4). In a superposition of the structures, the observed RMS deviation was of 2.517 Å, and the lid regions agree perfectly, even with the changes of some residues, which are Val61 to Pro57–Pro62 to Arg58–Pro63 to Ser59–Ala65 to Val61 and Ala66 to Pro62.

Conclusions

This paper establishes that conformational differences between two stages of the same protein, com-

plexed and apoenzyme, can be used to develop studies to improve the design of new more powerful inhibitors. The significance of this knowledge is that both structures can now be explored in attempts to ascend higher studies over rational drug design. The protein structure described here is one of the most important targets for drug development to treat tuberculosis.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPESP (SMOLBNet, Proc. 01/07532-0, 02/04383-7, and 04/00217-0), CNPq, CAPES, and Instituto do Milênio (CNPq-MCT). W.F.A., D.S.S., M.S.P., and L.A.B. are researchers awardees from the National Research Council of Brazil–CNPq.

References

- [1] L.A. Basso, D.S. Santos, W. Shi, R.H. Furneaux, P.C. Tyler, V.L. Schramm, J.S. Blanchard, Purine nucleoside phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*. Inhibition by a transition-state analogue and dissection by parts, *Biochemistry* 40 (2001) 8196–8203.
- [2] W.F. deAzevedo Jr., F. Canduri, D.M. dosSantos, R.G. Silva, J.S. deOliveira, L.P.S. deCarvalho, L.A. Basso, M.A. Mendes, M.S. Palma, D.S. Santos, Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase at 2.3 Å resolution, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308 (2003) 545–552.

- [3] A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar, Purine nucleoside phosphorylase: properties, functions and clinical aspects, *Pharmacol. Ther.* 88 (2000) 349–425.
- [4] A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar, Properties of purine nucleoside phosphorylase (PNP) of mammalian and bacterial origin, *Z. Naturforsch. Sect. C* 45 (1990) 59–70.
- [5] A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar, C. Bing-yi, B. Lindborg, N.G. Johansson, Acyclonucleoside analogue inhibitors of mammalian purine nucleoside phosphorylase, *Biochem. Pharmacol.* 41 (1991) 1791–1803.
- [6] A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar, Formycins A and B and some analogues: selective inhibitors of bacterial *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase, *Biochim. Biophys. Acta* 1120 (1992) 239–247.
- [7] A. Bzowska, A.V. Ananiev, N. Ramzaeva, E. Alksins, J.A. Maurins, E. Kulikowska, D. Shugar, Purine nucleoside phosphorylase: inhibition by purine *N*(7)- and *N*(9)-acyclonucleosides; and substrate properties of 7- β -D-ribofuranosylguanine and 7- β -D-ribofuranosilhypoxanthine, *Biochem. Pharmacol.* 48 (1994) 937–947.
- [8] S.E. Ealick, S.A. Rule, D.C. Carter, T.J. Greenhough, Y.S. Babu, W.J. Cook, J. Habash, J.R. Helliwell, J.D. Stoeckler, R.E. Parks Jr., S.-F. Chen, C.E. Bugg, Three-dimensional structure of human erythrocytic purine nucleoside phosphorylase at 3.2 Å resolution, *J. Biol. Chem.* 265 (3) (1990) 1812–1820.
- [9] S.E. Ealick, Y.S. Babu, C.E. Bugg, M.D. Erion, W.C. Guida, J.A. Montgomery, J.A. Secrist III, Application of crystallographic and modeling methods in the design of purine nucleoside phosphorylase inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1991) 11540–11544.
- [10] J.A. Montgomery, Purine nucleoside phosphorylase: a target for drug design, *Med. Res. Rev.* 13 (3) (1993) 209–228.
- [11] S.T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.A. Rajan-dream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J.E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, B.G. Barrell, Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature* 393 (1998) 537–544.
- [12] Editorial, *Nat. Struct. Biol.* 7, 2000, 87–88.
- [13] D. Avarbock, J. Salem, L. Li, Z. Wang, H. Rubin, Cloning and characterization of a bifunctional RelA/SpoT homologue from *Mycobacterium tuberculosis*, *Gene* 233 (1999) 261–269.
- [14] V.L. Schramm, Enzymatic N-riboside scission in RNA precursors, *Curr. Opin. Chem. Biol.* (1997) 323–331.
- [15] V.L. Schramm, Enzymatic transition-state analysis and transition-state analogs, *Methods Enzymol.* 308 (1999) 301–355.
- [16] W. Shi, L.A. Basso, D.S. Santos, P.C. Tyler, R.H. Furneaux, J.S. Blanchard, S.C. Almo, V.L. Schramm, Structures of purine nucleoside phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* in complexes with Immucillin-H and its pieces, *Biochemistry* 40 (2001) 8204–8215.
- [17] Collaborative Computational Project, Number 4, The CCP4 suite: programs for protein, *Acta Crystallogr. D* 50 (1994) 760–763.
- [18] J. Navaza, AmoRe: an automated package for molecular replacement, *Acta Crystallogr. A* 50 (1994) 157–163.
- [19] D.E. McRee, XtalView/Xfit—aversatile program for manipulating atomic coordinates and electron density, *J. Struct. Biol.* 125 (1999) 156–165.
- [20] A.T. Brünger, X-PLOR Version 3.1: A System for Crystallography and NMR, Yale University Press, New Haven, 1992.
- [21] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.K. Smith, D.T. Jones, E.G. Hutchinson, A.L. Morris, D. Naylor, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK v.3.0-program to check the stereochemistry quality of the protein structures-operating instructions, 1994.
- [22] Parmodel, A web server for comparative modeling and quality assessment of proteins structures. Available from: <<http://www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br/tools/parmodel/index.php>>.
- [23] A.C.R. Martin, Scitech Software ProFit, 1992–2001.
- [24] R. Koradi, Institut fuer Molekularbiologie und Biophysik, ETH Zurich Spectrospin AG, Faellanden, Switzerland, MOLMOL 2.6, 2003.