

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia



Deyse de Souza Dantas

“CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA DA HIPOXANTINA-GUANINA-XANTINA FOSFORRIBOSILTRANSFERASE”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
DEYSE DE SOUZA DANTAS
Deyse de Souza Dantas
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica da UNICAMP

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Co-Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier Medrano Martín

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Medrano".

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D235c	<p>Dantas, Deyse de Souza Caracterização estrutural e bioquímica da Hipoxantina-Guanina-Xantina Fosforribosiltransferase / Deyse de Souza Dantas. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientadores: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Francisco Javier Medrano Martín. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Caracterização Estrutural. 2. Hipoxantina Fosforribosiltransferase. 3. <i>Pyrococcus horikoshii</i>. 4. <i>Schistosoma mansoni</i>. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães. II. Martín, Francisco Javier Medrano. III. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(scs/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Biochemical and structural characterization of the hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase.

Palavras-chave em inglês: Structural characterization; Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase; *Pyrococcus horikoshii*; *Schistosoma mansoni*.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Marcos Antonio de Oliveira, Cláudio Miguel da Costa Neto, Marcelo Brocchi, José Camillo Novello.

Data da defesa: 28/08/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.


Campinas, 28 de Agosto de 2008

BANCA EXAMINADORA

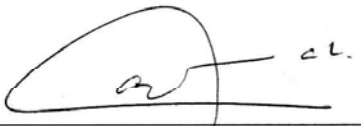
Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
(Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira


Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Miguel Costa Neto


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi


Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes

Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Fernandes Formighieri

Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Assinatura

Dedico este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

Iniciei o doutorado em 2005, naquela época já sabia o quanto esta etapa da minha vida seria importante, morar em uma cidade nova, um laboratório novo, novas amizades. Tinha o medo do desconhecido, mas sabia que precisava estar aqui.

Comecei a trabalhar com a equipe do LGE, sob a orientação de Prof. Gonçalo e foi uma das mais gratificantes convivências que já tive.

Por isto antes de começar a agradecer, saibam que todos vocês do LGE são importantes para mim.

Inicialmente agradeço a Deus, por não somente ter me dado habilidades vitoriosas, mas também por ter me dado à oportunidade de conhecer pessoas especiais que de alguma forma me ajudaram a crescer e pular obstáculos.

A Universidade Estadual de Campinas e a Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela oportunidade e pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Gonçalo pela orientação, apoio e exemplo de liderança no laboratório.

Ao Prof. Javier, com quem convivo profissionalmente há 4 anos, pela incalculável co-orientação, pelo exemplo de trabalho, profissionalismo e dedicação.

Ao núcleo estrutural do Javier: Bruna e Gustavo, que estão iniciando na pesquisa.

Ao Prof. Cláudio M. Costa Neto pela ajuda e obtenção no material necessário para clonagem.

Ao grupo das “MARAS” do laboratório: Ana, Alinne, Marcela, Melline, Sílvia, Sulamita, Carol Scatolin, meninas todas vocês estão no meu coração.

Aos amigos e colegas do grupo do LGE pela boa convivência, e por ajudar na minha formação profissional.

Agradeço a todos os membros de minha banca de defesa pela participação e valiosas sugestões a esse trabalho.

As pessoas especiais: Mário, Eliana, Sidney, Yeda, Cida, Vera, Conceição.

A minha família, que mesmo estando longe, sempre esteve presente.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação e a realização deste trabalho.

Muito Obrigada

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”

Albert Einstein

SUMÁRIO

	Página
Capa	i
Ficha Catalográfica	ii
Banca examinadora	iii
Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Epígrafe	vi
Sumário	vii
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xii
Resumo	1
Abstract	2
INTRODUÇÃO	3
Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT)	4
Reação enzimática	4
Sítio ativo	5
Loop I	6
Loop II	7
Loop III	8
Loop IV	8
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	9
<i>Schistosoma mansoni</i>	9
Novas seqüências de HGPRT	10
OBJETIVOS	14
MATERIAIS E MÉTODOS	16
Meios de cultura	17
Enzimas	17
Oligonucleotídeos	17
Vetores	17
Linhagens bacterianas	18
Reação de polimerase em cadeia (PCR)	18
PCR de colônia	18
Purificação de DNA plasmidial	18
Digestão com endonucleases de restrição	19
Ligação	19

Transformação	19
Obtenção de bactérias competentes	19
Transformação por choque térmico	20
Eletroforese em géis de agarose	20
Eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS- PAGE)	20
Ensaio de expressão de proteínas	21
Expressão de proteínas em larga escala	21
Purificação de proteínas	21
Concentração de proteínas	22
Dicroísmo circular	22
Estimação da estrutura secundária	23
Comparação de seqüências	23
Alinhamento de seqüências	23
Cinética enzimática	24
Ligação a GMP-agarose	24
Ligação a pirofosfato	24
Fluorescência	24
Apagamento de fluorescência	25
Desnaturação química	25
Proteólise limitada	26
Gel filtração	26
Espalhamento dinâmico de luz	26
Espalhamento de raios-X a baixo ângulo	27
RESULTADOS	28
HGXPRT de <i>Pyrococcus horikoshii</i>	29
Clonagem	29
Expressão e purificação	30
Dicroísmo circular	31
Cinética enzimática	34
Ligação a GMP-agarose	35
Ligação de pirofosfato	36
Fluorescência	37
Apagamento de fluorescência	38
Desnaturação química	39
Proteólise limitada	43
Gel filtração	44

Espalhamento dinâmico de luz	45
Caracterização estrutural por SAXS	45
HGPRT de <i>Schistosoma mansoni</i>	47
Clonagem	47
Expressão e purificação	47
Caracterização estrutural por SAXS	48
DISCUSSÃO	50
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	51
Estrutura secundária	51
Cinética	51
Oligomerização	52
Localização dos resíduos de triptofano	53
Desnaturação	54
Loops	55
<i>Schistosoma mansoni</i>	61
CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	64
ANEXO	71

Lista de figuras

	Página
Figura 1.- Reação enzimática catalisada pela HGPRT.	5
Figura 2.- Sítio ativo da HGPRT de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	6
Figura 3.- Alinhamento da seqüência de PhHGXPRT.	11
Figura 4.- Produto da amplificação do gene <i>Ph0095</i> de <i>P. horikoshii</i> .	29
Figura 5.- Gel SDS-PAGE da expressão da proteína recombinante PhHGXPRT em <i>E. coli</i> .	31
Figura 6.- Espectros de dicroísmo circular da PhHGXPRT e da HPRT de <i>T. cruzi</i> .	33
Figura 7.- Predição da estrutura secundária da proteína PhHGXPRT	33
Figura 8.- Ligação da PhHGXPRT a GMP-agarose na temperatura de 75°C.	35
Figura 9.- Efeito do pirofosfato sobre a fluorescência intrínseca da proteína PhHGXPRT.	35
Figura 10.- Espectro de emissão de fluorescência da proteína PhHGXPRT.	37
Figura 11.- Efeito da acrilamida sobre a fluorescência intrínseca da proteína PhHGXPRT.	38
Figura 12.- Gráficos de Stern-Volmer para o apagamento de fluorescência intrínseca da proteína PhHGXPRT produzido pelo iodeto de potássio (A) e cloreto de cézio (B).	39
Figura 13.- Efeito do cloreto de guanidina (GdnHCl) na fluorescência da PhHGXPRT.	40
Figura 14.- Efeito do cloreto de guanidina sobre o estado aparente de enovelamento da PhHGXPRT.	40
Figura 15.- Efeito da uréia na fluorescência da PhHGXPRT.	41
Figura 16.- Efeito da uréia sobre o estado aparente de enovelamento da PhHGXPRT.	42
Figura 17.- Desnaturação química da Ph-HGXPRT com cloreto de guanidina.	42
Figura 18.- Proteólise limitada da PhHGXPRT.	44
Figura 19.- Filtração em gel da proteína recombinante PhHGXPRT.	44
Figura 20.- Espalhamento dinâmico de luz da PhHGXPRT.	45
Figura 21.- Espalhamento de raios X a baixo ângulo da PhHGXPRT.	45

Figura 22.- Modelo da PhHGXPRT.	46
Figura 23.- Amplificação do gene <i>Smhpt</i> de <i>S. mansoni</i> .	47
Figura 24.- Expressão e purificação da proteína SmHPRT de <i>S. mansoni</i> .	48
Figura 25.- Espalhamento de raios X a baixo ângulo da SmHPRT.	48
Figura 26.- Modelo da SmHPRT.	49
Figura 27. Localização dos resíduos de triptofano da PhHGXPRT.	54
Figura 28. Estrutura cristalográfica da PhHGXPRT.	59

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1.- Oligonucleotídeos de DNA específicos para clonagem em vetores de expressão.	17
Tabela 2.- Linhagens de <i>E. coli</i> utilizadas neste estudo, com seus respectivos genótipos.	18
Tabela 3.- Estimação da estrutura secundária da HGXPRT de <i>P. horikoshii</i> e da HPRT de <i>T. cruzi</i> .	32
Tabela 4.- Parâmetros cinéticos do estado estacionário para reação de formação do nucleotídeo catalisada pela HGXPRT de <i>P. horikoshii</i> .	35
Tabela 5.- Ponto médio de desnaturação da PhHGXPRT por cloreto de guanidina.	43

RESUMO

Os genes que codificam para a 6-oxopurina fosforribosiltransferase (HPRT, EC 2.4.2.8) dos organismos *Pyrococcus horikoshii* e *Schistosoma mansoni* foram clonados em vetores de expressão. As proteínas foram expressas e purificadas em larga escala no sistema de expressão de *Escherichia coli*.

Estudos cinéticos mostraram que a enzima de *P. horikoshii* é capaz de usar hipoxantina, guanina e xantina. Os dois primeiros substratos apresentam uma eficiência catalítica semelhante. A xantina apresenta um valor menor (ao redor de 20 vezes mais baixo), mas a constante catalítica é comparável com a da hipoxantina. A proteína não foi capaz de se ligar a GMP-agarose, mas sim pode ligar o outro substrato da reação reversa, pirofosfato inorgânico, com baixa afinidade ($K_d = 4,7 \pm 0,1$ mM). Os dados de espalhamento dinâmico de luz, gel filtração e espalhamento de raios X a baixo ângulo mostram que esta proteína é um homohexâmero em solução. Este hexâmero é compacto e resistente à ação limitada de enzimas proteolíticas. Estudos de estabilidade frente a agentes químicos mostraram que a proteína é bastante estável resistindo os efeitos da uréia sem desenovelar completamente com a maior concentração do agente (8,0 M). Os dados obtidos com cloreto de guanidina mostraram que a proteína possui, no mínimo, um estado intermediário de desnaturação, como mostram os diferentes perfis obtidos com as diferentes técnicas usadas nos estudos de desnaturação.

Os dados preliminares obtidos com a HPRT de *S. mansoni* mostraram que, na presença da cauda de histidinas, a proteína está presente como um octâmero alongado. Mas, muito provavelmente ela deve ser um tetrâmero. A presença de caudas fusionadas nas proteínas recombinantes pode afetar a estrutura e função das proteínas.

ABSTRACT

The genes that code for the 6-oxopurine phosphoribosyltransferase (HPRT, EC 2.4.2.8) from the organisms *Pyrococcus horikoshii* and *Schistosoma mansoni* were cloned in expression vectors. The proteins were expressed and purified in large scale in the de *Escherichia coli* expression system.

Kinetic studies showed that the enzyme from *P. horikoshii* is able to use hypoxanthine, guanine and xanthine. The first two substrates show a similar catalytic efficiency. Xanthine show a lower value (around 20 times), but the catalytic constant is comparable to that of hypoxanthine. The protein was unable to bind to GMP-agarose, but was able to bind the other substrate of the reverse reaction, inorganic pyrophosphate, with low affinity ($K_d = 4.7 \pm 0.1$ mM). Dynamic light scattering, gel filtration and small angle X-ray scattering data show that the protein is a homohexamer in solution. This hexamer is compact and resistant to the limited action of proteolytic enzymes. Stability studies with chemical agents showed that the protein is very stable being able to stand the effects of urea without unfolding completely at the highest agent concentration (8.0 M). Data obtained with guanidine hydrochloride showed that the protein presents, at least, one unfolding intermediate state, as can be seen with the different profiles obtained with different techniques used in the unfolding studies.

Preliminary data obtained from HPRT from *S. mansoni* showed that in the presence of the histidine tag, is present as a long octamer. But, most likely it should be a tetramer. The presence of histidine tag fused to the recombinant proteins could affect the structure and function of proteins.

INTRODUÇÃO

Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT)

Os nucleotídeos purínicos, necessários no metabolismo celular, podem ser obtidos através de duas vias. Em uma primeira via, denominada síntese “*de novo*”, as bases são sintetizadas a partir de aminoácidos, dióxido de carbono e amônia. Em uma segunda via, recuperação de bases purínicas, as bases procedentes do metabolismo são reutilizadas, nesta última via existe uma grande economia de energia (Lehninger, 1993).

As enzimas relacionadas com a via de recuperação de bases purínicas tornaram-se alvo de intenso estudo devido ao fato dos protozoários parasitas não apresentarem a síntese de novo de purinas e, portanto, necessitarem fazer a recuperação das bases purínicas para sobreviver. É relevante destacar também que, em humanos, o mau funcionamento de enzimas dessa via é responsável pela artrite gotosa e pela síndrome de Lesch-Nyhan (Berens *et al.*, 1995).

Reação enzimática

As reações que envolvem a recuperação das bases purínicas existentes nas células são catalisadas por diferentes fosforribosiltransferases (PRTs). A hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT) catalisa a síntese de mononucleotídeos 6-oxopurínicos (inosina monofosfato, IMP, e guanosina monofosfato, GMP) através da transferência de uma base nitrogenada para a posição 1- β da ribose do 5'-fosfo- α -D-ribosil-1-pirofosfato (PRPP) com a liberação de pirofosfato (PPi). Essa reação é dependente dos íons Mg^{2+} e está esquematizada na figura 1 (Keough *et al.*, 1999). O IMP formado é um precursor comum, tanto para a formação de GMP como para a formação de adenosina monofosfato (AMP) os quais, por sua vez, podem ser transformados em nucleotídeos trifosfato, GTP e ATP, respectivamente. As HGPRTs de alguns organismos também podem utilizar a xantina produzindo xantosina monofosfato (XMP), que pode ser posteriormente convertida em GMP. O resultado desse processo é que todas as bases purínicas podem ser recuperadas em nucleotídeos (Lehninger, 1993).

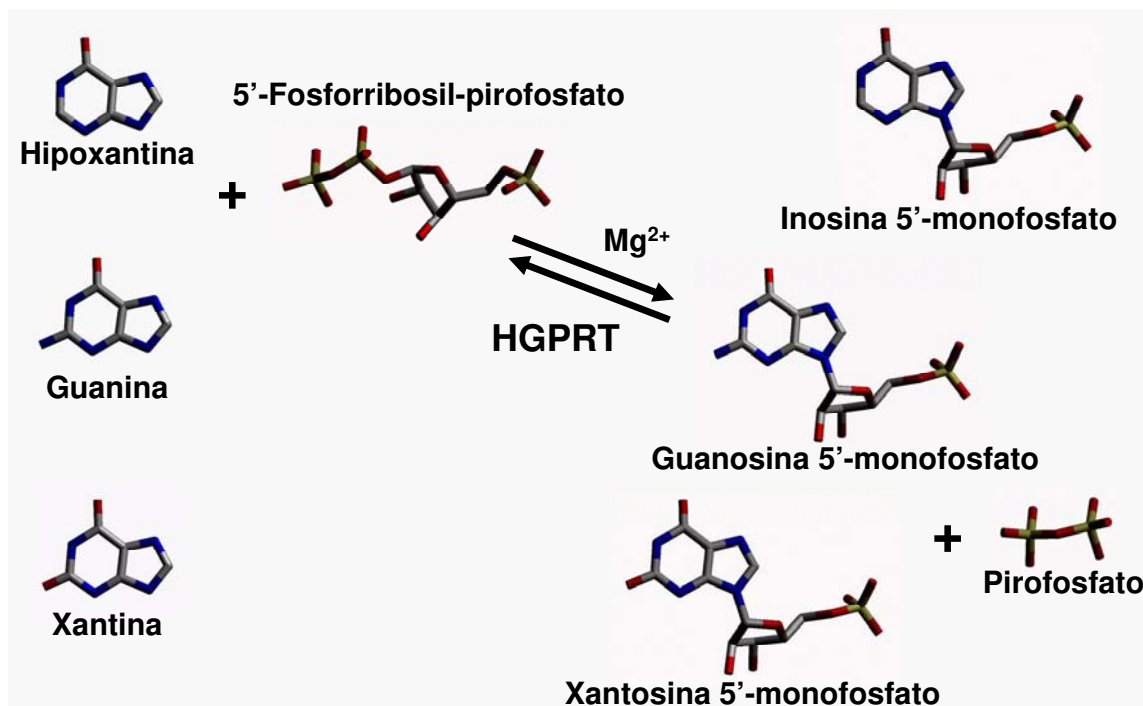


Figura 1. Reação enzimática catalisada pela HGPRT. Na reação direta a enzima pode utilizar um dos 3 substratos: hipoxantina, guanina e xantina, ou os 3 substratos. A enzima também pode fazer a reação reversa chamada pirofosforólise.

Sítio ativo

As estruturas tridimensionais de HGPRTs de vários organismos já foram resolvidas (Balendiran *et al.*, 1999; Canyuk, 2000; Chin *et al.*, 1994; Eads *et al.*, 1994; Focia *et al.*, 1998a; Focia *et al.*, 1998b; Héroux *et al.*, 1999a; Héroux *et al.*, 1999b; Héroux *et al.*, 2000; Munagala *et al.*, 1998; Page *et al.*, 1999; Schumacher *et al.*, 1996; Shi *et al.* 1999a; Shi *et al.*, 1999b; Shi *et al.*, 2000; Sommer *et al.*, 1996; Somoza *et al.*, 1996). Uma detalhada observação destas estruturas mostra que o sítio ativo das HGPRTs está formado, em parte, por quatro *loops*. Na figura 2 está representado o sítio ativo da HPRT de *Trypanosoma cruzi*.

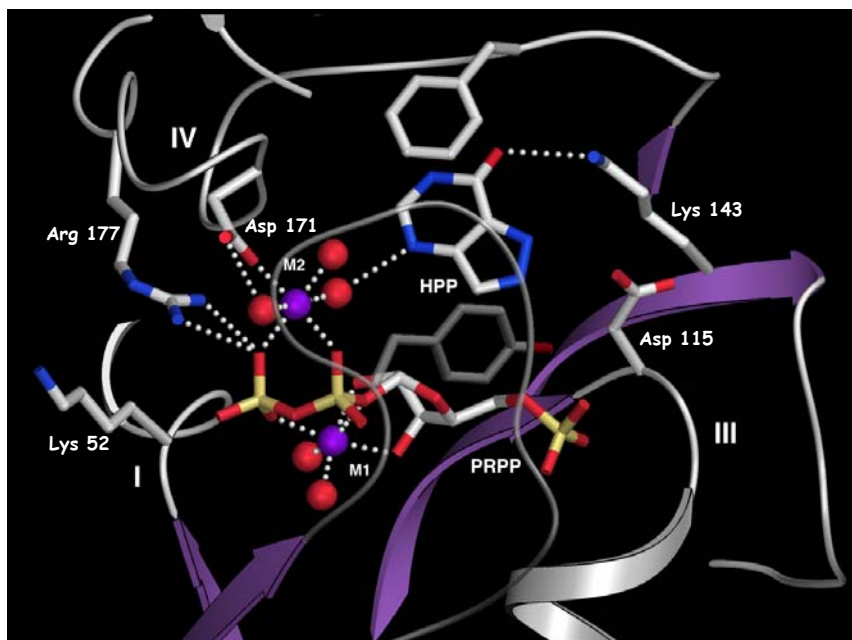


Figura 2. Sítio ativo da HPRT de *Trypanosoma cruzi*. Mostrando alguns aminoácidos dos loops I, II, III e IV da proteína que fazem parte do sítio ativo.

Loop I

Este *loop* está composto por três aminoácidos, Leu51, Lys52 e Gly53 (a numeração corresponde a enzima de *T. cruzi*), que se apresentam conservados em grande parte das espécies. A ligação peptídica entre os dois primeiros aminoácidos deste *loop*, Leu51 e Lys52, apresenta uma conformação em *cis*, favorecendo a interação dos grupos amida de ambos os aminoácidos com os oxigênios do grupo fosfato do PRPP. Os resíduos deste *loop* não participam diretamente na catálise enzimática e seu papel tem sido relacionado às interações entre as subunidades da enzima e ao correto posicionamento dos substratos dentro do sítio ativo (Butterworth *et al.*, 2004; Focia *et al.*, 1998a; Schumaker *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1999a; Shi *et al.*, 2000).

Os aminoácidos Leu51 e Gly53 estão conservados em um grande número de espécies, mostrando uma grande pressão evolutiva. O resíduo Lys52 não apresenta esse grau de conservação sendo possível observar diferentes aminoácidos nesta posição, mas sempre possuindo uma cadeia lateral polar.

Estudos realizados através de mutações sítio-dirigidas na enzima de *T. cruzi* mostram que esses resíduos contribuem para o correto posicionamento dos substratos

no sítio ativo, na manutenção do estado de oligomerização (dímero) e na comunicação entre os monômeros (Butterworth *et al.*, 2004; Canyuk *et al.*, 2004). O resíduo Leu51 só pôde ser substituído por metionina e o resíduo Gly53 por serina sem afetar em grande medida a estabilidade da proteína, mas esses mutantes apresentam constantes de Michaelis-Menten, Km, maiores que a enzima selvagem (Butterworth *et al.*, 2004). Mutações no resíduo Lys52 não comprometem a estabilidade da proteína, mas tem grande efeito sobre a ligação do GMP, reduzindo muito a afinidade da enzima por este substrato (Canyuk *et al.*, 2004).

Loop II

O *loop* II é longo e flexível, contendo de 11 a 14 aminoácidos. Dobra-se sobre os substratos fechando o sítio ativo no estado de transição da reação (Focia *et al.*, 1998a; Héroux *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 1999b; Shi *et al.*, 2000). Este *loop* protege os substratos do solvente, contribui também para o correto posicionamento deles contribuindo na eficiência catalítica e participando na ligação e na liberação do PPI (Focia *et al.*, 1998a; Lee *et al.*, 2001; Munagala *et al.*, 2001). As análises das mutações sítio-dirigidas realizadas em *T. cruzi* e *Leishmania donovani* evidenciam a participação deste *loop* na atividade enzimática, apesar da mesma não ter ocorrido em estudos com outros organismos (Jardim & Ullman, 1997; Lee *et al.*, 2001; Medrano *et al.*, 2003; Munagala *et al.*, 2001). Quando realizada a eliminação de sete aminoácidos do *loop* em *T. cruzi* verificou-se que, mesmo com o sítio ativo exposto ao solvente, a enzima apresenta atividade catalítica, porém reduzida quando comparada a da enzima selvagem. Esse fato nos mostra que este *loop* não é o único agente responsável pela catálise, sendo sua atuação melhor representada pelo correto posicionamento dos substratos dentro do sítio ativo no início do estado de transição da reação e pela ligação ou liberação do PPI (Lee *et al.*, 2001). O fechamento deste *loop* facilita a formação de uma ponte de hidrogênio entre o nitrogênio N7 da base purínica e o aspartato 115 do *loop* III (Canyuk *et al.*, 2001). Análises dos efeitos de mutações em 12 resíduos deste *loop* mostraram que os aminoácidos Ser81, Tyr82 e Ser88 têm um papel fundamental na catálise, além do papel no correto posicionamento dos substratos. Qualquer mudança no resíduo

Ser81 leva a uma grande redução da atividade enzimática, a Tyr82 só pode ser substituída por outro aminoácido aromático sem sofrer uma perda significativa da eficiência catalítica e a posição 88 só pode acomodar resíduos pequenos (Gly e Ala) que permitem manter a conformação correta do *loop* (Medrano *et al.*, 2003).

Loop III

O *loop* III forma uma cavidade de ligação para a ribose e o 5'-fosfato do PRPP ou do nucleotídeo purínico. Os aminoácidos deste *loop* compreendem o domínio mais conservado das fosforribosiltransferases (PRTs) sendo referido como o motivo de ligação do fosfato. No final do *loop* está o Asp115, este resíduo está conservado em todas as seqüências de HGPRTs e foi proposto como sendo a base geral da reação enzimática. Ele faz uma ligação de ponte de hidrogênio com o nitrogênio da posição 7 da base (Canyuk *et al.*, 2001). Estudos de mutagênese sítio-dirigida deste resíduo mostram que só é necessária a presença da ponte de hidrogênio para manter grande parte da atividade catalítica (Canyuk *et al.*, 2001).

Loop IV

O *loop* IV participa na ligação da base purínica e porções purínicas dos nucleotídeos. Este *loop* contém três resíduos importantes para a atividade catalítica da enzima (Phe164, Asp171 e Arg177). A Phe164 participa na ligação da base purínica por interações de tipo empilhamento (stacking). Nesta posição só ocorrem aminoácidos aromáticos capazes deste tipo de interações. O Asp171 forma uma ligação direta com um dos magnésios (Focia *et al.*, 1998a). Este metal contribui para a formação do domínio de ligação à purina através da fixação do átomo de magnésio que, por sua vez, liga uma água que forma uma ponte de hidrogênio com o átomo N3 da base (Focia *et al.*, 1998a). A Arg177 está envolvida na ligação de um dos oxigênios do grupo fosfato do PRPP ou PPI, fixando a posição do substrato (Focia *et al.*, 1998a).

Mutações no resíduo Asp171 para Asn mostra uma atividade enzimática muito reduzida e em humanos leva ao desenvolvimento da síndrome de Lesh-Nyham (Berens *et al.*, 1995). Mutações na Arg177 mostram um aumento nos valores da Km indicando

uma ligação deficiente do substrato ou um mau posicionamento deste no sítio ativo. Esta região parece estar envolvida na especificidade pelas diferentes bases purínicas (Héroux *et al.*, 1999a; Raman *et al.*, 2004). A substituição de 22 resíduos do *loop* IV da HGPRT de *Toxoplasma gondii* pelos aminoácidos correspondentes da enzima humana mostra que a atividade frente à xantina foi significativamente reduzida (Héroux *et al.*, 1999a). A mutação do resíduo Phe36 para Leu na HGPRT humana faz que a enzima possa utilizar xantina com muito mais eficiência que a enzima selvagem, este efeito também acontece com a enzima de *Plasmodium falciparum*. Este resíduo não se encontra no *loop* IV, estando na base do sítio ativo, perto dos resíduos deste *loop*. Estes dados evidenciam o papel desta região na modulação da especificidade da enzima (Raman *et al.*, 2004).

Pyrococcus horikoshii

O organismo de *P. horikoshii* é um organismo do domínio Archaea. Ele foi isolado da fossa oceânica de Okinawa, nordeste do Oceano Pacífico, a 1395 m de profundidade. Sua morfologia apresenta-se em cocos irregulares, tufo polar de flagelo, cresce em temperatura de 80°C a 102°C (98°C), é um organismo hipertermófilo, que cresce em um ambiente com salinidade de 2,4% NaCl e pH entre 5,0 e 8,5. (González *et al.*, 1998). Teve seu genoma seqüenciado em 2001. O gene que codifica a proteína anotada como fosforribosiltransferase deste organismo possui 462 nucleotídeos, codificando uma proteína que possui 153 aminoácidos. Por este organismo crescer em condições extremas pode nos fornecer informações importantes a respeito do comportamento e estabilidade destas proteínas.

Schistosoma mansoni

É um parasita trematódeo de sexo separado e nítido dimorfismo sexual. Causa esquistossomose intestinal em humanos. Possui o ciclo de vida heteroxênico. (Yuan *et al.*, 1990). Teve seu genoma seqüenciado em 2003. O gene anotado como fosforribosiltransferase possui 696 nucleotídeos que codifica uma proteína de 231 aminoácidos. A proteína anotada como fosforribosiltransferase deste organismo foi

escolhida para ser estudada, por ser um alvo para desenho de novas drogas mais sítio-dirigidas do que os inibidores usualmente utilizados.

Novas seqüências de HPRTs

Nestes últimos anos a comunidade científica observou o surgimento da seqüência completa de genomas de muitos e variados organismos. Isto fornece uma grande oportunidade para estudar aspectos evolutivos em proteínas.

A observação detalhada das seqüências das HPRTs depositadas nos bancos de dados para alguns destes genomas mostrou a presença de resíduos diferentes em algumas das posições que em numerosas espécies são conservados e que não admitem mutações sem perda de atividade.

A figura 3 mostra o alinhamento das seqüências protéicas de várias HPRTs junto com a dos dois organismos escolhidos para este estudo *Pyrococcus horikoshii* e *Schistosoma mansoni*.

A análise detalhada do alinhamento dos resíduos que formam os diferentes *loops* mostra a presença de mudanças em posições importantes para a catálise, ligação dos substratos e estabilidade da proteína.

```

P. horikoshii      -----MDKVY-LTWWQVDRAIFALAEKL---REYKP-----D-VIIG
T. tengcongensis -----MPSPMEDIEEIL-ITEEQLKAKVKELGEMIT-RDYEGK-----DVLVLIG
H. sapiens        -----MATRSPGGVISDDEPGYDLDLFCIPNHYAEDLERFV-IPHGLIMDRTERLARLAVM-KEMGGH-----HIVALC
T. cruzi          -----MPREYFAEKIL-FTEEEIRTRIEKAVAKRIA-DDYKGGKLRPYVNPVLVLIS
P. falciparum     -----MPIPNNPGAGENAEDPVFVNDGDDYDLSFMI PAHYKKYLTKVL-VPNGVIKRIEKLAYDI--KKVYNN-----EEFHILC
S. mansoni        MLTSLITSSTTVTLTSLQIYYIILDIAAGFLISVLVWMMSSVLDNGNHSNPQIRDMSSNMKADCVVIEDSFRGFPTTEYFCTSPRYDECLDYVL-IPNGMIKDRLEKMSMDIV--DYEACNA---TSITLMC
X. axonopodis     -----MSTLTISQALAQADLL-VDRPAIDAAVATIADAIA-RDYAGE-----VPVYLT
X. fastidiosa     -----MMSNFTISQILARADLL-VDRPSIDVAIAHIADDIA-QDYQGD-----VPLFVT
C. violaceum      -----MPNIAEARGLINSSDVL-FTAEQVSAAVDRMAVEIT--EKLGE-----YPLVLS
E. coli           -----MSEKYIVTWDMLQIHAR--KLASRLMPSE-QWKG-----IIA-
S. typhimurium    -----MSEKYVVTWDMLQIHAR--KLASRLMPSE-QWKG-----IIA-

```

```

                                loop II                loop III                loop III                loop IV
P. horikoshii      VARGGLIPAVRLSHILG-----DIPLKV--IDVKFY-KGIDERGEKPVITIPHGDLKDKRVVIVDDVSDTGKTLVEVVEEVKLGKAKEIKIACLAMKP---WTS-VVPDYVVFRT--EKWIVFPW
T. tengcongensis  VLKGAIMFMSDLSRAI-----DLPLSID-FMAVSSYGSSTKSSGIVKIIK-DHDIDIEGKDVLLIVEDIIDSGLTLAYLRETLGRKPRSLKICTILDKPERREAD-VKVDYCGFK-IPDKFVVGYG
H. sapiens        VLKGGYKFFADLLDYIKALNRNS--DRSIPMTVD-FIRLKS-NDQSTGDIKVIIGDGLSTLTGKNVLIVEDIIDTGKTMQTLTSLVRQYNPKMVKVASLLVKRTPRSVG-YKPDFVGF-IPDKFVVGYA
T. cruzi          VLKGSFMFTADLCRALC-----DFNVPVRME-FICVSSYGEGLTSSGQVRMLL-DTRHSIEGHHVLIVEDIVDTALTNLNYLHYMYFTRRPASLKTVVLLDKREGRRVP-FSADYVVAN-IPNAFVIGYG
P. falciparum     LLKGSRGFFTALLKHLRSRIHNSAVETSKPLFGEHYVRVKS-NDQSTGTGLEIVS-EDLSCLKGKHVLIVEDIIDTGKTLVKFCEYLKFKFEIKTVAIACLFIKRTPLWNG-FKADFVGF-IPDHFVVGYS
S. mansoni        VLKGGFKFLADLV-DGLERTVRRAR-GIVLPMSE-FVRVKS-VNDVSIHEPILTGL-GDPSEYKDKNVLVVEDIIDTGKTIKTLISHLDSLSTKSVKVASLLVKRTPRNDYRPD-VGFE-VPNRFFVVGYA
X. axonopodis     IMHGALPFSGQLALEL-----GARGQDLQFD-YLHATRY-RGETTGGELVWKH-RPATALFGRRVILVDDILDEGYTLQGVQRWCLEQGATDVRVAIVTKRHRDRCVPGVTADYVGV-VPDRYVFGFG
X. fastidiosa     IMHGALPFSGQLALEL-----GARGQDLQFD-YLHATRY-RGETTGGELVWKH-RPATALFGRRVILVDDILDEGYTLQGVQRWCLEQGATDVRVAIVTKRHRDRCVPGVTADYVGV-VPDRYVFGFG
C. violaceum      VMGGAVVFTGQLLPRLL-----AFPLDFD-YVHVSRY-GDKTHGGELVWKQ-APKEDVRDRVVLVDDILDEGYTLQGVQRWCLEQGATDVRVAIVTKRHRDRCVPGVTADYVGV-VPDRYVFGFG
E. coli           VSRGGLVPGALLARELG-----IRHVD-TVCISSYDHDNQRLEKVL---KRAEGDGEFIVIDDLVDTGGTAVAIREMPK---AHFVTIFAKPAG--RP-LVDDYVVDI-PQDTWIEQPW
S. typhimurium    VSRGGLVPGALLARELG-----IRHVD-TVCISSYDHDNQRLEKVL---KRAEGDGEFIVIDDLVDTGGTAVAIREMPK---AHFVTIFAKPAG--RP-LVDDYVVDI-PQDTWIEQPW

```

```

                                loop IV
P. horikoshii      EEFVIEKE-----
T. tengcongensis  LDYAEKRYRNLFFIGVLKPELYK-----
H. sapiens        LDYNEYFRDLNHVCVISETGKAKYKA-----
T. cruzi          LDYDDTYRELDRDIVVLRPEVYAEAREARQKKQRAIGSADTDRDAKREFHSKY
P. falciparum     LDYNEIFRDLHCCLVNDEGKKYKATSL-----
S. mansoni        LDYNDNFRDLHHICVINEVGQKKFVSPCTSKPV-----
X. axonopodis     MDVNEQLRGLPAIYAMKQ-----
X. fastidiosa     MDIAGQLRGLPAIYAMRQ-----
C. violaceum      MDVIRGAWRNLPAIYALK-----
E. coli           -DMGVVFPPIISGR-----
S. typhimurium    -DMGVVFPPIISGR-----

```

Figura 3. Alinhamento da sequência de PhHGXprt de *P. horikoshii* e SmHprt de *S. mansoni* com as proteínas 6-oxopurina fosforribosiltransferase de *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Homo sapiens*, *T. cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xylella fastidiosa*, *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* Typhimurium. Os resíduos coloridos pertencem aos loops I, II, III e IV do sítio ativo. Em amarelo estão representados aminoácidos importantes para a atividade enzimática. Em cinza estão representados os aminoácidos conservados que não pertencem aos loops do sítio ativo.

A proteína do organismo hipertermófilo *P. horikoshii* apresenta o maior número de mudanças nos resíduos dos diferentes *loops*. Algumas destas mudanças são conservativas e outras não. No *loop* I a Leu51 está trocada por uma alanina, no *loop* II na posição da Ser81 existe uma fenilalanina e o *loop* IV não pode ser definido de forma clara por a proteína ter um menor número de aminoácidos e por não existir um alinhamento claro da seqüência.

Já a proteína do parasita *S. mansoni*, é uma proteína que possui maior quantidade de aminoácidos na região n-terminal, porém diferentemente da proteína de *P. horikoshii*, a proteína de *S. mansoni* apresenta-se bem conservada quando comparadas as outras proteínas visualizadas no alinhamento. Algumas mudanças podem ser observadas, porém em menor quantidade.

As bactérias *X. fastidiosa*, *X. axonopodis* e *Chromobacterium violaceum* mostram uma grande similaridade de seqüência entre si e uma maior semelhança com a proteína humana e de *T. cruzi* em comparação com a proteína de *P. horikoshii*. As mudanças mais significativas nestas bactérias estão nos *loops* I e II, e não existem mudanças significativas nos *loops* III e IV. No *loop* I o primeiro resíduo, Leu, está substituído por uma metionina. Esta mudança conserva o caráter hidrofóbico do resíduo e o volume ocupado pela cadeia lateral. Esta mesma mudança em *T. cruzi* gera uma proteína mutante com uma atividade enzimática reduzida (Butterworth *et al.*, 2004). Neste mesmo *loop* o segundo resíduo está mudado para histidina ou glicina, este resíduo apresenta uma maior variabilidade ao longo das seqüências conhecidas e pode não ter grande significância. A mudança mais significativa acontece no *loop* II, na posição da Ser81 encontra-se uma arginina, o resíduo com a cadeia lateral mais comprida de todos. Esta posição não é capaz de acomodar nenhuma mudança em *T. cruzi* sem grande perda de eficiência catalítica (Medrano *et al.*, 2003). Este *loop* parece ser do mesmo tamanho que na proteína humana (11 resíduos) e menor que na proteína de *T. cruzi* (12 resíduos).

A presença destas mudanças gera dúvidas quanto ao real funcionamento dessas proteínas. Elas foram anotadas como fosforribosiltransferases de bases purínicas, mas isto deve ser comprovado experimentalmente. Embora modificações estruturais locais

possam vir a ser observadas espera-se, todavia, que tais proteínas apresentem a mesma estrutura global. O estudo da relação estrutura-função das HPRTs desses organismos em solução forneceria dados relevantes sobre o comportamento e estabilidade destas proteínas, o que poderia servir de base para a sua aplicação com fins tanto terapêuticos quanto biotecnológicos.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é caracterizar estrutura-função das proteínas fosforribosiltransferases de *P. horikoshii* e *S. mansoni*. Em *P. horikoshii*, a proteína HGXPRT forneceria dados relevantes sobre o comportamento e estabilidade destas proteínas, e em *S. mansoni*, o estudo com esta proteína forneceria uma base de conhecimento que pode permitir o desenho de inibidores específicos para esta proteína, que constitui um alvo para drogas antiparasitárias. Logo, o estudo de proteínas anotadas como fosforribosiltransferases destes organismos poderia servir de base para a sua aplicação com fins tanto biotecnológicos quanto terapêuticos.

Para se aproximar deste objetivo o trabalho se propõe a estudar duas proteínas anotadas como fosforribosiltransferases:

A proteína HGXPRT de *Pyrococcus horikoshii*:

- Clonagem, expressão e purificação em larga escala;
- Estudos cinéticos e de especificidade de substrato;
- Análises estruturais:
 - i. Características estruturais;
 - ii. Estabilidade.

A proteína HPRT de *Shistosoma mansoni*:

- Clonagem, expressão e purificação em larga escala;
- Análises estruturais preliminares

MATERIAIS E MÉTODOS

Meios de cultura

Os meios de cultura usados para crescer a bactéria *Escherichia coli* foram: Terrific Broth (TB): 12 g/L Triptona, 24 g/L Extrato de levedura, 4 ml/L Glicerol, 0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4 e o Luria Bertani (LB): 10 g/L Triptona, 5 g/L Extrato de levedura, 0,17 M NaCl pH 7,0.

Enzimas

As enzimas para a manipulação do DNA (endonucleases de restrição, DNA ligase do bacteriófago T4) foram obtidas da Fermentas.

Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos (tabela 1) utilizados na amplificação dos genes selecionados foram sintetizados pela empresa Invitrogen Brasil Custom Primers / Life Technologies.

Tabela 1. Oligonucleotídeos de DNA específicos para clonagem em vetores de expressão. Os sítios de restrição estão destacados em vermelho.

Gene	Nº de pb	Sítios de restrição	Seqüência
<i>Ph0095</i>	462	NdeI/XhoI	F 5'-CATATGGACAAGGTCTATCTAACC-3'
			R 5'-CTCGAGTTACTCTTTCTCAATTACTGGG-3'
<i>Smhpt</i>	696	NdeI/HindIII	F 5'-CATATGTCTAGTAACATGATAAAAGCTGACTGTG-3'
			R 5'-AAGCTTTTAAACAGGTTTTGATGTACAGGG-3'

Vetores

Os plasmídeos utilizados para as clonagens foram: pGEM-T- Easy (Promega), pET-15b (Novagen) e o pPROEX-1 (Invitrogen).

Linhagens bacterianas

Tabela 2. Linhagens de *E. coli* utilizadas neste estudo, com seus respectivos genótipos.

Linhagens	Genótipos
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacJ169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>endA⁺ gal dcm</i> (DE3)
BL21 Star TM (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)

Reação de polimerização em cadeia (PCR)

A técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR) foi usada para a clonagem dos genes correspondentes às proteínas alvos.

A reação de PCR foi feita utilizando-se 1,25 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTP's, 0,75 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,001% Tween 20, 2,5 U *Taq Polymerase* (Fermentas), 10 pmol de cada oligo (F/R) e 10 ng a 20 ng de DNA genômico da bactéria. Os ciclos utilizados foram padronizados para cada gene. Em média, a reação de PCR consistiu-se de 30 ciclos de amplificações (desnaturação a 95°C por 1 minuto; anelamento por 1 minuto, com temperatura dependente da *temperatura de melting* (TM) do oligonucleotídeo utilizado; extensão a 72°C por 1 minuto) seguidos de uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

PCR de colônia

A colônia foi transferida para 100 μ L de água destilada, submetida a 95°C por 5 minutos e centrifugada a 12,000 x g por 15 segundos. Um microlitro desta mistura foi utilizado para a realização da reação de PCR. A reação foi feita conforme a descrição do PCR.

Purificação de DNA plasmidial

Os produtos de amplificação por PCR foram purificados com o *QIAquick spin - QIAquick PCR purification kit* ou com o *QIAquick Extraction kit* (QIAGEN). Os fragmentos de interesse, produto de mini ou midipreparação de plasmídeos, contidos nos géis de

agarose, foram extraídos, eluídos e purificados com o *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN).

Digestão com endonucleases de restrição

Após a amplificação dos genes, os vetores e os produtos de amplificação por PCR foram digeridos com as endonucleases de restrição específicas para as clonagens (tabela 1), de acordo com a metodologia descrita em Sambrook & Russel (2001). Para cada μg de DNA utilizou-se 1 U (unidade) de enzima para a digestão dos vetores e dos produtos de amplificação por PCR, e as reações prosseguiram a 37°C no tempo de 2 horas.

Ligação

As reações de ligação foram realizadas utilizando a DNA ligase do bacteriófago T4 (Fermentas) utilizou-se o tampão fornecido pelo fabricante e as condições da reação utilizadas foram às recomendadas pelo mesmo. A proporção da quantidade de inserto para o vetor foi de 3:1, o tempo da reação de ligação foi de uma hora e 30 minutos. As reações de ligação foram utilizadas imediatamente na transformação de células competentes.

Transformação

Obtenção de bactérias competentes

Células competentes das linhagens DH5 α e BL21 (DE3) de *E. coli* foram preparadas de acordo com o procedimento descrito por D. Hanahan (Sambrook & Russel, 2001).

Uma cultura (300 mL) foi incubada a 37°C até atingir uma densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) de 0,4. As células foram coletadas após centrifugação (6,000 x g por 5 minutos a 4°C). Estas foram ressuspensas num volume 0,2 vezes (60 mL) do volume original em tampão de transformação gelado e incubado por 10 minutos em gelo. As células foram coletadas após centrifugação (6,000 x g por 5 minutos a 4°C). Estas

foram ressuspendidas num volume 0,04 vezes (12 mL) do volume original em tampão de transformação gelado. Adicionou-se 35 μ L de dimetil sulfóxido por mL de células (420 μ L). As células foram estocadas a -80°C . O tampão de transformação contém 100 mM RbCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM LiCl, 35 mM acetato potássico (pH 6,2) e 15 % de sacarose.

Transformação por choque térmico das bactérias competentes

A transformação de células competentes se realizou por meio de choque térmico. A reação de ligação ou 30 ng de plasmídeo foram adicionadas a 100 μ L de células competentes e incubadas por 30 minutos em gelo. Após este período, a amostra foi colocada em banho a 42°C por 1,5 minutos e novamente em gelo por cinco minutos. Adicionou-se 450 μ L de meio LB e foi incubado à 37°C por 30 minutos. Passado este tempo, as células foram plaqueadas em meio TB sólido contendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina.

Eletroforese em géis de agarose

Os géis de agarose foram preparados a 1% (p/v) em tampão TAE (40 mM Tris-HCl a pH 8,0 contendo 5,7 % ácido acético e 50 mM EDTA). Nas amostras, foi utilizada uma solução contendo os seguintes corantes: azul de bromofenol e *Xylene Cyanol FF* e Ficoll 400 para aumentar a viscosidade da solução facilitando assim a aplicação das amostras, as concentrações finais foram 0,04%, 0,04% e 2,5% (p/v), respectivamente. Durante a eletroforese os géis foram colocados em uma solução de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídio para a visualização dos fragmentos de DNA (Sambrook & Russel, 2001).

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS) foram feitos de acordo com o método de Laemmli (1970). Os extratos protéicos foram misturados com um volume de tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM, 2 % SDS, 10 % glicerol, 5 % β -

mercaptoetanol e 0,001 % de azul de bromofenol) e incubados a 95°C por 5 minutos antes de serem aplicados no gel.

Para a visualização das proteínas, os géis foram corados com azul de coomassie (Fairbanks, 1971).

Ensaio de expressão

Os ensaios de expressão de proteínas foram feitos da seguinte forma: uma colônia de *E. coli* contendo a construção do gene escolhido foi crescida em 2 mL de meio TB contendo 100 µg/mL de ampicilina a 30°C, com concentração final de 10 mM lactose ou 1 mM IPTG durante a noite a 37°C. As células foram coletadas pós centrifugação (15.000 x g por 15 minutos a 4°C) e ressuspendidas em volume de 0,1 M Tris-HCl a pH 8,0 contendo um 1% de Triton X-100. A expressão foi analisada em géis de poliácridamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

Expressão de proteínas em larga escala

Para a obtenção de grande quantidade de proteína realizou-se uma expressão a larga escala. Uma alíquota do estoque da bactéria *E. coli* contendo a construção de gene escolhido foi crescida em 500 mL de meio TB contendo 100 µg/mL de ampicilina e concentração final de 10 mM lactose ou 1 mM IPTG durante a noite a 30°C.

Purificação de proteínas

As células foram coletadas após centrifugação (15.000 x g por 15 minutos a 4°C) e ressuspendidas em 5 mL de 0,1 M Tris-HCl a pH 8,0 contendo 1% de Triton X-100. As células foram lisadas por sonicação (3 x 30 segundos, 40 % amplitude) num sonicador Sonics Vibra-cell. Adicionou-se 2% de sulfato de estreptomicina (p/v) para precipitar o DNA e a solução foi incubada por 30 minutos a 4°C. O material insolúvel foi separado por centrifugação (19.000 x g por 1 hora a 4°C). A fração solúvel foi utilizada para purificar as proteínas recombinantes: PhHGXPRT e SmHPRT. As proteínas recombinantes possuem uma cauda de seis histidinas fusionada no extremo amino-

terminal; estas foram purificadas pela técnica de cromatografia de afinidade em colunas com metal imobilizado (IMAC). Utilizou-se uma coluna *Hi-Trap Chelating* (Amersham Pharmacia Biotech) carregada com níquel.

A fração solúvel foi carregada numa coluna equilibrada em tampão 0,1 M Tris-HCl a pH 8,0 contendo 0,3 M NaCl e 5 mM imidazol. Após lavagem extensiva da coluna, esta foi lavada com um gradiente em escada de concentrações crescentes de imidazol (50, 100, 150, 200 e 500 mM). As frações coletadas foram analisadas em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes. A proteína foi eluída a uma concentração de 200 mM de imidazol.

A proteína foi concentrada e equilibrada em tampão 10 mM Tris-HCl a pH 8,0 usando filtros *Centricon* (Amicon) por meio de centrifugação de acordo com as instruções do fabricante.

Concentração de proteínas

A concentração da proteína foi medida por absorção a 280 nm usando o coeficiente de extinção calculado pelo conteúdo em tirosinas e triptofanos da proteína (Gill & von Hippel, 1989). Os coeficientes usados foram de 1,98 mL mg⁻¹ para a PhGXPRT e de 0,58 mL mg⁻¹ para a SmHPRT.

Dicroísmo circular

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados no espectropolarímetro JASCO J-810, com a temperatura controlada a 20°C através de um sistema interno de controle de temperatura (*Peltier type control system* PFD 425S, JASCO). Os espectros de dicroísmo circular no UV distante (250-190 nm) foram obtidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico, e com 0,2 mg/mL de proteína em 10 mM Tris-HCl pH 8,0 de tampão. Os espectros de UV próximos foram registrados utilizando-se uma cubeta 1 cm de caminho ótico, com 0,5 mg/mL de proteína.

Todos os espectros de dicroísmo circular foram corrigidos com a subtração dos espectros dos tampões utilizados e os dados gerados com a subtração desses

espectros foram convertidos em elipticidade molar por resíduo, $[\theta]$, dado em graus $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, calculado de acordo com a equação:

$$[\theta] = (\phi \text{ MRW}) / (10 c l)$$

onde ϕ é a elipticidade (em graus), MRW é o peso médio do resíduo, c é a concentração da proteína em g/mL e l é o caminho óptico em cm.

Estimação da estrutura secundária

O conteúdo de estrutura secundária da proteína foi estimado a partir dos espectros de dicroísmo circular na região do UV-distante usando o software CDNN (*CD Spectra Deconvolution*) (Bohm *et al.*, 1992). Este programa compara o espectro observado com um conjunto de proteínas de estrutura conhecida e ajusta o conteúdo de estrutura secundária até obter o melhor ajuste. Este programa utiliza cinco componentes de estrutura secundária (α -hélice, folha- β antiparalela, folha- β paralela, *random coil* e estrutura irregular).

Comparação de seqüências

A seqüência da proteína hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferase foi comparada com o banco de dados de proteínas com estrutura tridimensional conhecida (*Protein Data Bank*). Para a comparação utilizou-se o programa BLASTp (Altschul *et al.*, 1990) implementado no endereço de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Alinhamento de seqüências

O alinhamento da seqüência da proteína foi realizado utilizando o programa MultAlin (*Multiple alignment*) - *Network Protein Sequence Analysis* - implementado no endereço de internet <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>.

Cinética enzimática

Foi realizada cinética enzimática de estado estacionário da proteína PhHGXPRT com seus substratos para determinação dos parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-Menten (K_m) e constante catalítica (k_{cat}).

A cinética enzimática foi medida em tampão Bis-Tris-Propane 10 mM, pH 8,0 com concentrações de substrato de 5 a 20 mM diluídos em dimetil sulfóxido. A atividade foi medida em várias temperaturas: 40, 45, 50, 55, 60 e 70°C.

As medidas foram realizadas no espectrofotômetro Beckman DU 640 usando uma cubeta de quartzo de um cm de caminho óptico, lido a comprimentos variáveis entre 245 e 293 nm.

Ligação a GMP-agarose

O experimento foi realizado com a proteína PhHGXPRT na concentração de 2 mg/mL com uma resina de GMP-agarose. O tampão utilizado foi Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 contendo 6 mM $MgCl_2$. As amostras foram analisadas em géis de poli(acrilamida) em condições desnaturantes.

Ligação ao pirofosfato

A ligação do pirofosfato inorgânico (PPi) da proteína foi monitorado pelo apagamento intrínseco de fluorescência da proteína. A relação entre a fluorescência da proteína sem ligante e a fluorescência da proteína na presença de diferentes concentrações de pirofosfato foi utilizada para o cálculo da constante de ligação.

Fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro Aminco BOWMAN series 2. As fendas de excitação e emissão foram 8 e 16 nm, respectivamente. As medidas foram realizadas com uma cubeta de quartzo de 0,5 x 1 cm. A temperatura da amostra foi mantida constante a 25°C com um banho de água circulante. Todas as medidas foram conduzidas em tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,0. O

efeito de filtro interno foi minimizado usando amostras com absorção menor de 0,05. Os espectros foram corrigidos pela contribuição do tampão.

O centro de massa espectral foi calculado de acordo com procedimentos previamente publicados (Silva *et al.*, 1986). Este parâmetro é independente da intensidade de fluorescência.

Apagamento de fluorescência

Foi realizada a avaliação do apagamento de fluorescência intrínseca da proteína pela presença de apagadores conhecidos: acrilamida, cloreto de céσιο e iodeto de potássio (Eftink & Ghiron, 1976a; Lehrer, 1971).

O efeito de apagamento foi determinado pelas adições sucessivas do apagador e coletando a emissão de fluorescência da proteína. As medidas de fluorescência foram realizadas como se explica anteriormente. A concentração de proteína foi de 5 mg/mL e o tampão utilizado foi 10 mM Tris-HCl pH 8,0.

Esta técnica fornece informações sobre a acessibilidade e localização dos fluoróforos da proteína.

Os dados de apagamento de fluorescência foram tratados de acordo com a equação Stern-Volmer (Eftink & Ghiron, 1976b).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q]$$

Sendo F_0 a intensidade de fluorescência na ausência do apagador; F a intensidade de fluorescência na presença do apagador; K_{SV} a constante de Stern-Volmer e $[Q]$ a concentração do agente apagador. A constante de Stern-Volmer, K_{SV} , é um parâmetro que fornece informação sobre a acessibilidade do fluoróforo ao agente apagador.

Desnaturação química

A proteína foi incubada em diferentes concentrações de cloreto de guanidina e uréia durante 24 horas. O efeito destes agentes químicos sobre a estrutura da proteína foi determinado pelos efeitos sobre a fluorescência intrínseca da proteína e o dicróismo circular.

Proteólise limitada

A proteína PhHGXPRT foi submetida a proteólise limitada com as enzimas: proteinase K, quimiotripsina e subtilisina. A reação foi realizada a temperatura ambiente a uma concentração de 2 mg/mL (com cauda de histidinas) e a uma concentração de protease de 0,02 mg/mL durante diferentes tempos. A reação foi parada pela adição de PMSF 2 mM, misturada com um volume de tampão de amostras e submetida a 95°C durante cinco minutos. As amostras foram analisadas em géis de poli-acrilamida em condições desnaturantes.

Gel filtração

Os experimentos de gel filtração foram realizados num aparelho FPLC Äkta (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) usando uma coluna HR 10/30 Superdex 200 com um fluxo de 0.5 mL/min a temperatura ambiente. A eluição das proteínas foi monitorada pela absorção a 280 nm. Uma miligrama da proteína foi carregada na coluna usando um tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 contendo 6 mM MgCl₂ e 0,1 M NaCl. A calibração da coluna com os padrões de peso molecular foi realizada nas mesmas condições.

Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Os experimentos de espalhamento dinâmico de luz foram realizados com o equipamento DynaPro-99-E-15 (Protein Solutions). Uma concentração de 1 mg/mL de proteína foi utilizada para os experimentos. A temperatura foi mantida a 20°C durante todo o experimento. Foram realizadas 100 medidas com o objetivo de melhorar a

estatística dos resultados. Os dados foram tratados com o programa fornecido pelo fabricante.

Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

As medições de espalhamento de raios X a baixo ângulo foram realizadas na linha D11A-SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP, Brasil. Os dados foram coletados usando um detector de área MAR CCD 165 (MAR Research) e 10 min de exposição para cada medição. O comprimento de onda utilizado foi de 1,488 Å. Várias distâncias entre a amostra e o detector foram utilizadas nos diferentes experimentos. As medições foram realizadas a temperatura ambiente. O tratamento dos dados foi realizado usando o programa FIT2D (Hammersley, 1997). A intensidade dos dados foi reduzida a $I(q)$ vs q usando protocolos padrões para a correção da intensidade do feixe incidente, absorção da amostra e subtração do branco.

O programa GNOM (Svergun, 1992) foi usado para análise dos dados experimentais e para calcular a função de distribuição de partículas. Os modelos das proteínas a baixa resolução foram determinados *ab initio* a partir das curvas de espalhamento usando o programa DAMMIN (Svergun, 1999). Este programa determina a forma da proteína à baixa resolução. Calcula também o volume da partícula mediante o preenchimento do modelo calculado teoricamente com esferas densamente empacotadas de forma que satisfaça a curva de espalhamento experimental. A forma mais provável para cada molécula foi obtida a partir da média de 5 modelos *ab initio*, usando o programa DAMAVER (Volkova & Svergun, 2003).

RESULTADOS

HGXPRT de *Pyrococcus horikoshii*

Clonagem

O gene que codifica para a proteína PhHGXPRT (Ph0095) foi amplificado pela técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) usando DNA genômico de *Pyrococcus horikoshii* como molde e oligonucleotídeos correspondentes as regiões 5' e 3' do gene (figura 4). Os primers foram desenhados com base na seqüência genômica. Sítios para endonucleases de restrição foram inseridos nos oligonucleotídeos para facilitar a clonagem no vetor de expressão e a manipulação do fragmento de PCR, *Nde*I no PhF (5'-CATATGGACAAGGTCTATCTAACC-3') e *Xho*I no PhR (5'-CTCGAGTTACTCTTTCTCAATTACTGGG-3'). As seqüências reconhecidas pelas endonucleases de restrição estão na cor vermelha.

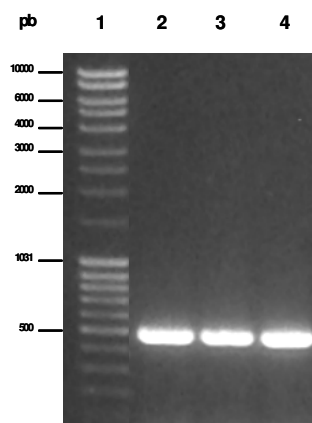


Figura 4. Produto da amplificação do gene Ph0095 de *P. horikoshii*. 1) Marcador de peso molecular. 2, 3 e 4) Produto da amplificação por PCR do gene Ph0095; amplificação das bandas no tamanho do peso molecular esperado.

O produto da reação de PCR foi purificado e clonado no vetor pGEM-T-Easy (Promega). Este plasmídeo pGEM-PhHGXPRT foi digerido com as seguintes endonucleases de restrição, *Nde*I e *Xho*I, e clonados no vetor pET15b vector (Novagen), previamente digerido com estas enzimas resultando no vetor pPhHPRT.

Essa etapa consistiu na ligação dos genes no plasmídeo, seguido da transformação de bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α para propagação dos plasmídeos recombinantes.

Expressão e purificação

A expressão foi realizada na linhagem bacteriana de *E. coli* BL21 (DE3) Star™ (Invitrogen) transformadas com o plasmídeo pPhHPRT.

O gene que codifica a proteína purina fosforribosiltransferase de *P. horikoshii* (PhHPRT) foi expresso no vetor pET15b. Este vetor contém uma cauda de poli-histidinas que facilita a purificação da proteína.

A proteína PhHGXPRT foi expressa na fração solúvel (figura 5A), pois uma banda de aproximadamente 20 kDa foi observada somente para amostras provenientes de células induzidas. A PhHGXPRT possui uma cauda de 20 aminoácidos, incluindo 6 resíduos de histidina, o que confere a ela um tamanho aproximado de 20 kDa, ao contrário dos 17,5 kDa esperados para a proteína nativa. A expressão de proteína na fração solúvel possibilitou seguir com os métodos de purificação.

O fato desta proteína ser de um organismo hipertermofílico, que possui um crescimento ótimo em altas temperaturas (98°C), permitiu fazer um processamento da amostra prévio à purificação por cromatografia de afinidade a níquel.

Este processamento consistiu em um tratamento térmico do extrato cru a temperatura de 70°C por uma hora. Durante este tratamento, muitas proteínas das células do sistema de expressão (*E. coli*) precipitam e foram separadas por centrifugação. Com isso a proteína pode ser purificada por cromatografia de afinidade a níquel, sendo obtida pura (figura 5A).

A cauda de histidinas fusionada à proteína foi eliminada por tratamento com trombina. O sítio de corte desta protease também é inserido na proteína recombinante pela estratégia de clonagem no vetor. A eliminação da cauda foi bem sucedida (figura 5B).

Após a purificação e diálise a proteína pode ser concentrada até ao redor de 30 mg/mL. Isto nos permitiu trabalhar com algumas técnicas que requerem altas concentrações de proteína.

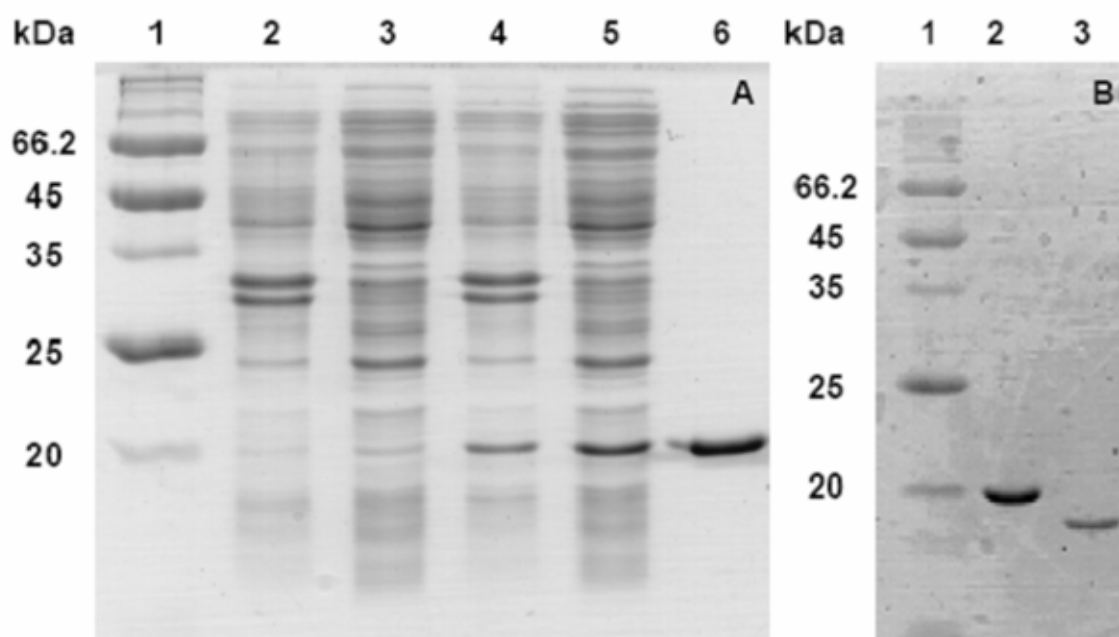


Figura 5. A) Gel SDS-PAGE da expressão da proteína recombinante PhHGXPRT de *P. horikoshii* em *E. coli*. Linha 1: Marcadores de massa molecular; linha 2: fração insolúvel antes da indução; linha 3: fração solúvel antes da indução, linha 4: fração insolúvel após a indução, linha 5: fração solúvel após a indução, e linha 6: proteína purificada, eluída da coluna com 200 mM imidazol. B) Eliminação da cauda de histidinas pela digestão com trombina. Linha 1: Marcadores de massa molecular; linha 2: proteína purificada com a cauda de histidinas; linha 3: Proteína purificada sem cauda de histidinas.

Dicroísmo circular

Na figura 6 são mostrados os espectros de dicroísmo circular da proteína PhHGXPRT nas regiões UV-distante (figura 6A) e UV-próximo (figura 6B).

O espectro de dicroísmo circular na região do UV-distante apresenta um máximo relativo a 194 nm, um mínimo relativo a 209 nm e dois ombros, 217 nm e 227 nm (figura 6A). Este espectro é diferente do da HPRT de *Trypanosoma cruzi* (figura 6A, linha vermelha) que apresenta um mínimo a 221 nm. Estas diferenças no espectro de dicroísmo circular pode representar diferenças entre as conformações desta proteínas. O espectro de dicroísmo circular na região UV-próximo apresenta um relativo máximo a 280 nm e um ombro a 290 nm. Isto mostrou que a proteína recombinante está enovelada.

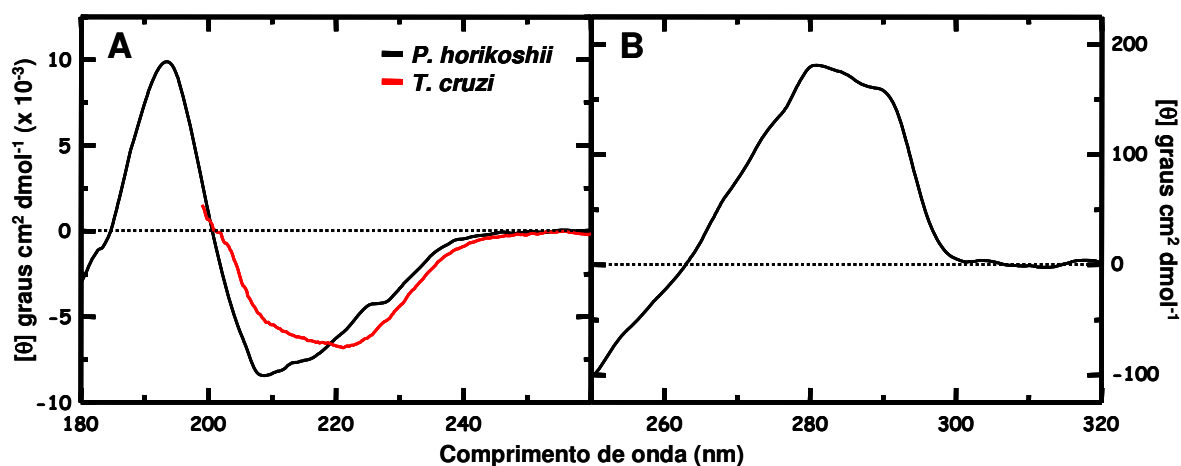


Figura 6. Espectros de dicroísmo circular da PhHGXPRT de *P. horikoshii* e da HPRT de *T. cruzi*. A) Espectro na região do UV-distante. B) Espectro na região do UV-próximo.

A estimação do conteúdo e tipo de estrutura secundária da proteína baseada no espectro de dicroísmo circular na região do UV-distante é mostrada na tabela 3.

Tabela 3. Estimação da estrutura secundária da HGXPRT de <i>P. horikoshii</i> e da HPRT de <i>T. cruzi</i> .		
	<i>P. horikoshii</i>	<i>T. cruzi</i>
α hélice	14,5%	14,9 %
β antiparalela	34,5 %	24,7 %
β Paralela	4,2 %	5,7 %
Volta - β	22,1 %	18,6 %
<i>Random-coil</i>	25,4 %	34,5 %
Total	101.8 %	98,4 %

Esta estimação foi realizada com o programa CDNN (*CD Spectra Deconvolution*, Bohm *et al.*, 1992). O programa realiza o cálculo da estrutura secundária usando as informações provenientes de proteínas com estrutura tridimensional conhecida.

Comparando-se o espectro da PhHGXPRT com o de HPRT de *T. cruzi*, (figura 6) foram notadas algumas diferenças. Um enovelamento diferente em algumas partes das proteínas poderia causar esse fato. Isso poderia explicar parcialmente as diferenças

nas condições de atuação de cada uma das enzimas, uma vez que um organismo vive em temperaturas próximas de 37°C enquanto o outro vive a 98°C.

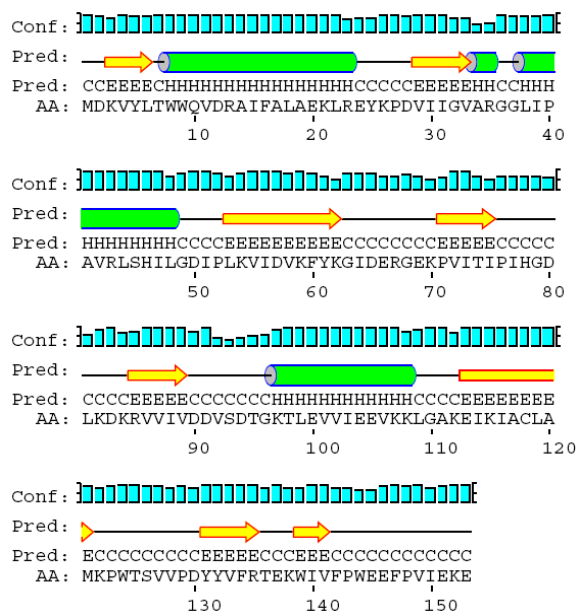


Figura 7. Predição da estrutura secundária da proteína PhHGXPRT de *P. horikoshii*. A predição da estrutura secundária da proteína HGXPRT, calculada pelo programa PSIPRED (Jones, 1999; McGuffin *et al.*, 2000). Os barras em verde referem-se a estrutura de α -hélice, as setas amarelas referem-se a folhas β , as linhas entre essas estruturas são *random-coil*.

A estimativa da estrutura secundária da proteína usando o espectro na região UV distante mostra um conteúdo 14,5% de α -hélice, 34,5% de folhas β -anti-paralelas, 4,2% de folhas β -paralelas, 22,1% de folhas β e 25,4% de *random coil*. A predição da estrutura secundária contida usando o programa PSIPRED (Jones, 1999; McGuffin *et al.*, 2000), mostrada na figura 7, têm um conteúdo de 30,1% de α -hélice, 27,5% de folhas β e 42,4% de *random coil*. Discrepâncias entre estimativa e predição da estrutura secundária de proteínas são esperadas, principalmente devido à pobre acurácia no procedimento executado usando dados de dicroísmo circular. Estimativa é baseada na existência de diferentes componentes que contribuem no espectro. O número de componentes presentes na estrutura da proteína que contribui para o dicroísmo circular é alto do que aqueles usados na predição dos programas, e isto contribuem para dificultar esta estimativa. Outros componentes, incluindo aminoácidos aromáticos e pontes de dissulfeto.

Cinética enzimática

Foi realizada cinética enzimática de estado estacionário para determinação da especificidade da proteína e de seus parâmetros cinéticos, constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) e constante catalítica (k_{cat}).

Estes parâmetros foram determinados para as 3 bases 6-oxopurínicas (hipoxantina, guanina e xantina) e PRPP em diferentes temperaturas, de 40 a 70°C. Estes resultados são resumidos na tabela 4. Os valores medidos para a constante aparente de Michaelis-Menten não mostra mudança significativa com o aumento da temperatura. Os valores da constante catalítica, k_{cat} , aumentam com a temperatura para todos os substratos. Este aumento está entre 3 e 4 vezes para hipoxantina e xantina e próximo de 7 vezes para guanina, na escala de temperatura entre 50 a 70°C. Não foi medida a temperatura ótima de crescimento de *P. horikoshii*, 98 °C, mas pode-se esperar que os valores de k_{cat} aumentem ainda mais. A eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) era quase o mesmo para hipoxantina e guanina mostrando que esta enzima trabalha bem com estes substratos. Por outro lado, a proteína tem eficiência catalítica para xantina ao redor de 20 vezes mais baixa que a obtida para as outras bases 6-oxopurínicas. A taxa de *turnover* desta base é similar que as outras duas bases, mas o valor K_m é considerado alto. Isto indica que a hipoxantina e a guanina são os substratos preferidos, e esta enzima pode usar igualmente a base xantina, embora, com menos eficiência.

A purina fosforribosiltransferase de *P horikoshii* mostrou que pode utilizar as três bases nitrogenadas: hipoxantina, guanina e xantina, sendo uma hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferase - PhHGXPRT.

Tabela. 4. Parâmetros Cinéticos do estado estacionário para reação de formação do nucleotídeo catalisada pela HGXPRT de *P. horikoshii*

Temperatura (°C)	Variável Hipoxantina			Variável PRPP		
	Km (μM)	kcat (min ⁻¹)	kcat/Km (μM ⁻¹ min ⁻¹)	Km (μM)	kcat (min ⁻¹)	kcat/Km (μM ⁻¹ min ⁻¹)
40	3,88±0,33	22,5±0,5	5,79	42,8±0,9	39,7±1,9	0,93
50	7,02±1,04	49,7±2,2	7,08	41,2±1,6	28,5±0,9	0,69
60	4,83±0,49	83,0±2,0	17,19	28,2±1,5	100,7±3,7	3,57
70	6,10±1,43	189,5±4,7	31,07	36,9±2,4	183,0±4,3	4,96
Temperatura (°C)	Variável Guanina			Variável Xantina		
	Km (μM)	kcat (min ⁻¹)	kcat/Km (μM ⁻¹ min ⁻¹)	Km (μM)	kcat (min ⁻¹)	kcat/Km (μM ⁻¹ min ⁻¹)
50	4,85±0,56	12,7±0,3	2,62	101,2±10,1	40,7±2,5	0,40
70	3,26±0,29	85,7±1,2	26,31	95,0±8,4	131,8±4,7	1,39

Neste trabalho também foram realizados experimentos de reação de pirofosforólise (formação de PRPP e base purina) em ordem para determinar os parâmetros cinéticos desta reação. Não foi observada nenhuma mudança no sinal de absorção usado no seguimento da reação em altas concentrações de substrato, 500 μM, ou na escala de temperatura usada, 40 a 70°C (dados não mostrados). Assim, podemos supor que a PhHGXPRT é incapaz de realizar esta reação.

Ligação a GMP-agarose

É descrito na literatura que a proteína HPRT de *Salmonella typhimurium* (Lee *et al.*, 1998; Lee, 1999) não liga a resina GMP-agarose, isto ocorre devido à presença de um resíduo de arginina no loop I que confere a não ligação ao GMP. Qualquer outro aminoácido nesta posição não impede a ligação do GMP (Lee *et al.*, 1998; Lee, 1999; Canyuk *et al.*, 2004).

Neste experimento foi verificado que a proteína HGXPRT de *P. horikoshii* não liga a GMP-agarose (figura 8), o experimento foi realizado nas temperaturas de 25 e 75°C, e isto ocorre porque no loop I existe uma arginina.

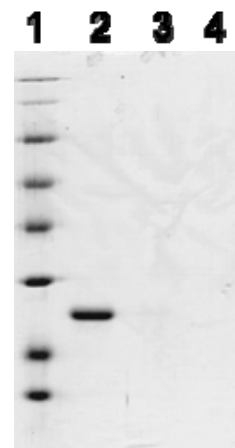


Figura 8. Ligação da PhHGXPR T de *P. horikoshii* a GMP-agarose na temperatura de 75°C. Linha 1: Marcador de peso molecular, linha 2: proteína sem ligar na resina, linha 3: lavado da coluna com tampão sem GMP e linha 4: lavado da coluna com 5 mM GMP.

Ligação de pirofosfato

Na figura 9 mostra-se o efeito do pirofosfato sobre a fluorescência intrínseca da proteína. A adição de pirofosfato leva a uma redução da fluorescência intrínseca da proteína. As concentrações menores usadas têm um efeito mínimo sobre a fluorescência, concentrações maiores levam a uma redução da fluorescência da proteína em aproximadamente um terço do valor inicial. Concentrações maiores de 20 mM não têm mais efeito sobre a fluorescência restante (figura 9A).

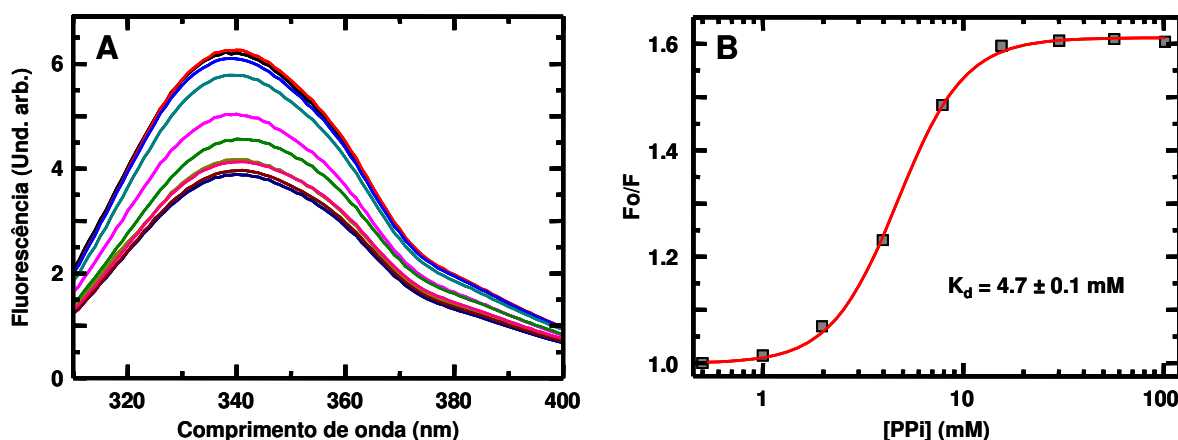


Figura 9. Efeito do pirofosfato sobre a fluorescência intrínseca da proteína PhHGXPR T de *P. horikoshii* A) As concentrações de pirofosfato usadas foram: preto: 0,0 mM, vermelho: 0,5 mM, verde: 1,0 mM, azul escuro: 2,0 mM, azul claro: 4,0 mM, rosa: 7,9 mM, amarelo: 15,5 mM, verde-musgo: 30,1 mM, cinza: 56,7 mM, roxo: 101,9 mM. B) Isotherma de ligação do pirofosfato a proteína PhHGXPR T de *P. horikoshii*.

O máximo de emissão de fluorescência da proteína não sofre nenhuma alteração com a adição do pirofosfato. Isto indica que este ligante não tem nenhum efeito significativo sobre a estrutura da proteína.

Na figura 9B mostra-se a isoterma de ligação. Assumindo que cada monômero tem um sítio de ligação para esta molécula, esta representação nos permite calcular a constante de dissociação do ligante. A existência de um único sítio de ligação está baseada em resultados estruturais e de interação com ligantes de várias HPRTs previamente publicadas.

No trabalho publicado por Wenck *et al.* (2004) foi obtido o valor da constante K_d de ligação de pirofosfato de 1,8 mM, mostrando que a HPRT de *T. cruzi*, possui uma maior afinidade de ligação ao pirofosfato ao ser comparada a HGXPRT de *P. horikoshii* que possui o valor da constante, K_d , de $4,7 \pm 0.1$ mM.

A figura 9 mostra que a PhHGXPRT liga-se em altas concentrações de pirofosfato. Isto mostra que a proteína mantém sua capacidade de ligação ao pirofosfato em condições saturantes, mesmo não se ligando a GMP.

Fluorescência

Na figura 10 é mostrado o espectro de emissão de fluorescência intrínseca da proteína PhHGXPRT. O espectro apresentou um máximo a 339,7 nm ($\lambda_{exc}=280$ nm) e 338,9 nm ($\lambda_{exc} = 295$ nm).

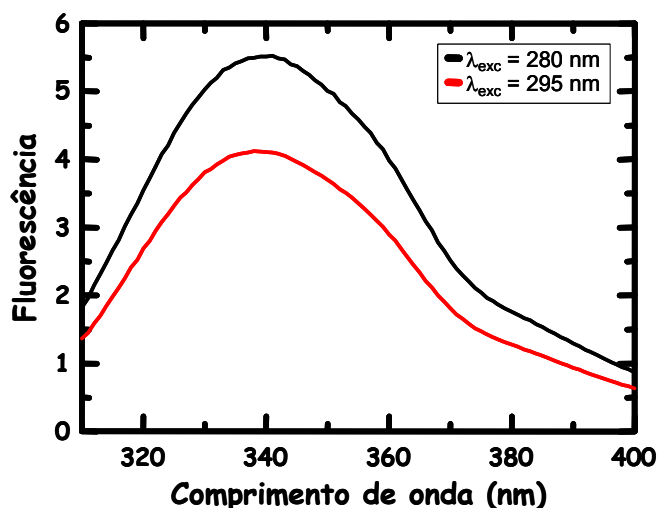


Figura 10. Espectro de emissão de fluorescência da proteína PhHGXPRT de *P. horikoshii*.

O máximo do espectro de fluorescência indica que os aminoácidos aromáticos estão relativamente expostos ao solvente.

Apagamento de fluorescência

Foram realizados estudos de apagamento da fluorescência intrínseca da proteína PhHGXPRT com a molécula apolar acrilamida, capaz de certa penetração na proteína, Cs^+ e I^- , ions carregados positiva e negativamente, respectivamente. O caráter diferente de cada molécula pode fornecer informações sobre o ambiente que rodeia os fluoróforos da proteína.

Na figura 11 é mostrado o efeito da acrilamida sobre a fluorescência da proteína. A adição de quantidades crescentes de acrilamida leva a um apagamento da fluorescência intrínseca da proteína até quase total desaparecimento (figura 11A). O gráfico de Stern-Volmer do máximo de emissão com um comprimento de onda de excitação de 295 nm (figura 11B) mostra um gráfico não-linear, indicando a existência de várias populações de triptofanos com acessibilidades diferentes ao apagador acrilamida.

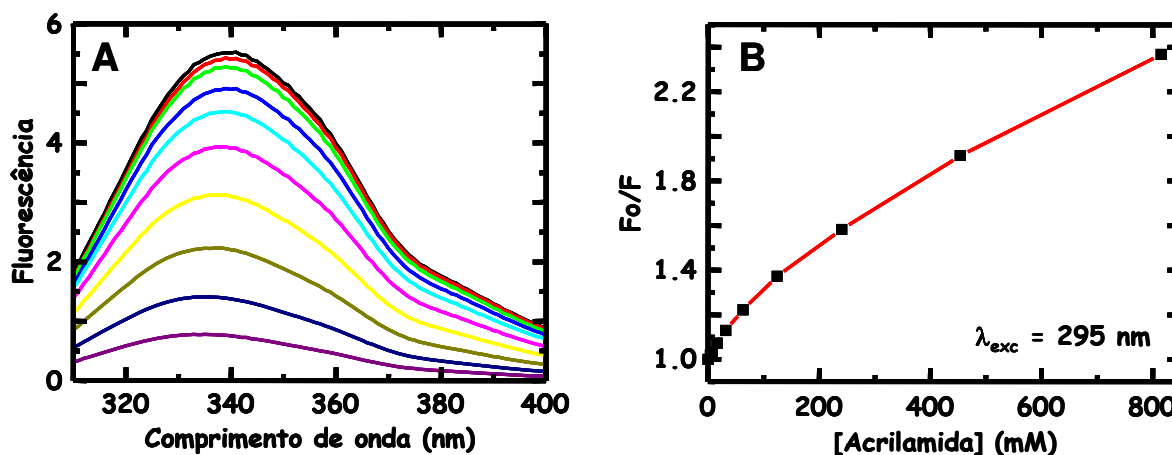


Figura 11. Efeito da acrilamida sobre a fluorescência intrínseca da proteína PhHGXPRT de *P. horikoshii*. O comprimento de onda de excitação foi de 295 nm. A) Espectros de emissão na ausência e presença de acrilamida. As concentrações de acrilamida usadas são: preto: 0,0 mM, vermelho: 3,99 mM, verde: 7,98 mM, azul escuro: 15,94 mM, azul claro: 31,75 mM, rosa: 62,99 mM, amarelo: 124 mM, verde-musgo: 240,6 mM, cinza: 453,9 mM e roxo: 815,3 mM. B) Gráfico de Stern-Volmer para o apagamento de fluorescência intrínseca da proteína produzido pela acrilamida.

Na figura 12 são mostrados os gráficos de Stern-Volmer para o efeito do iodeto de potássio (figura 12A) e do cloreto de césio (figura 12B) sobre a fluorescência intrínseca da PhHGXPRT. Estes gráficos mostram a presença de duas populações de triptofanos com sensibilidade muito diferente a estes agentes apagadores. Existe uma primeira população muito sensível ao apagador, como mostra a rápida diminuição da fluorescência a baixas concentrações e outra população muito pouco sensível que quase não é afetada pelo cloreto de césio.

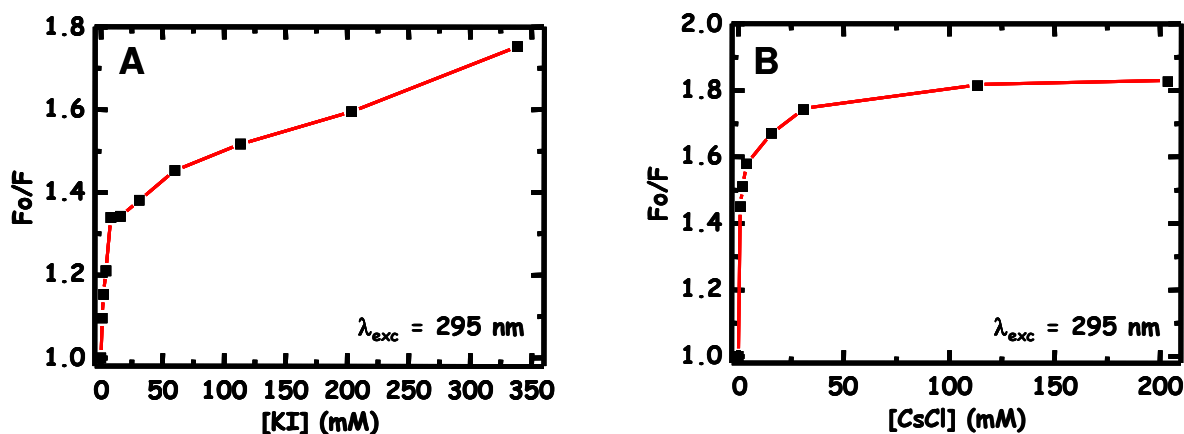


Figura 12. Gráficos de Stern-Volmer para o apagamento de fluorescência intrínseca da proteína PhHGXPRT produzido pelo iodeto de potássio (A) e cloreto de césio (B). O comprimento de onda de excitação foi de 295 nm.

Desnaturação química

Na figura 13A é mostrado o efeito do cloreto de guanidina sobre a fluorescência intrínseca da PhHGXPRT. O agente desnaturante produz dois efeitos sobre a fluorescência da proteína. Um consiste no aumento da intensidade, até uma concentração, mais ou menos, de 3,5 M seguido de uma queda da intensidade até valores semelhantes aos da proteína na ausência do agente desnaturante (figura 13B). O segundo efeito consiste no deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão, muito pequeno, com concentrações entre 0,6 e 3,0 M e muito acentuado em concentrações maiores do agente desnaturante até alcançar comprimento de onda ao redor de 350 nm indicando a exposição total dos aminoácidos aromáticos ao solvente aquoso (figura 13C).

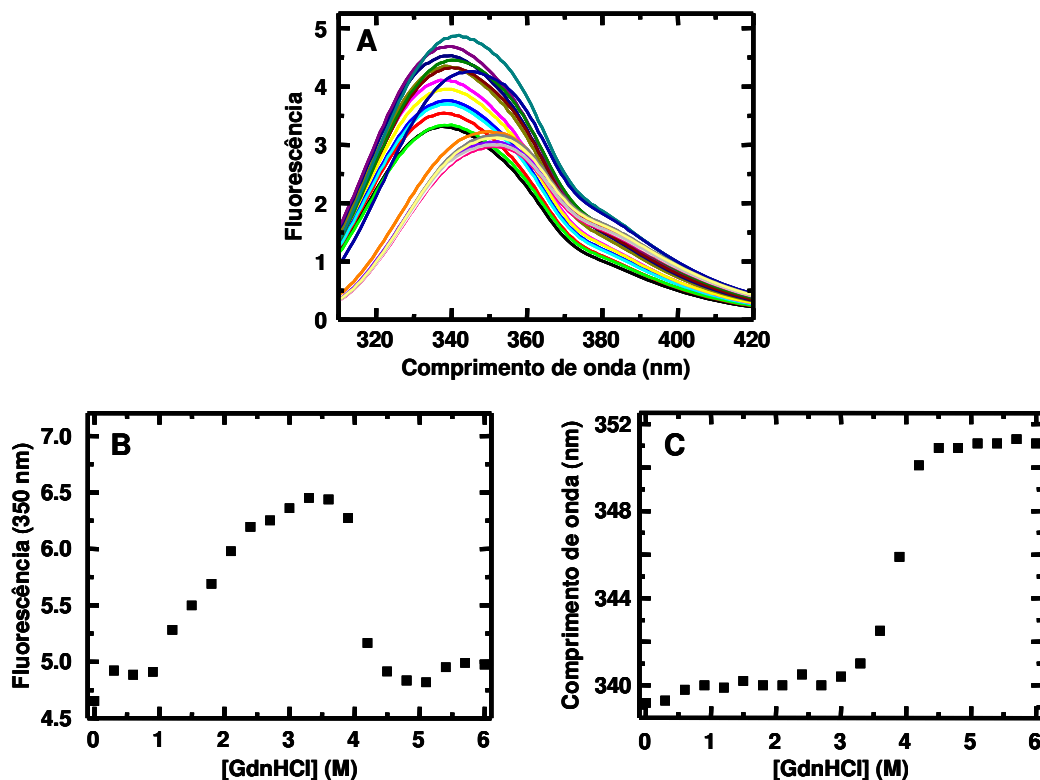
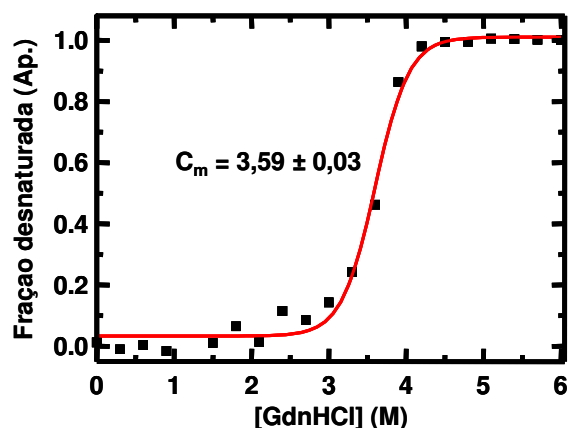


Figura 13. Efeito do cloreto de guanidina (GdnHCl) na fluorescência da PhHGXPRT de *P. horikoshii*. A) Espectro de emissão de fluorescência em concentrações crescentes de GdnHCl. B) Intensidade de fluorescência a 350 nm. C) Comprimento de onda máximo de emissão em cada uma das concentrações de GdnHCl.

Na figura 14 é mostrado o efeito do GdnHCl sobre a estrutura da proteína seguido pela dicroísmo circular a 222 nm. O sinal não muda de maneira significativa até uma concentração de 1,5 M onde se pode observar um pequeno aumento da fração desnaturada até uma concentração de 3,0 M. Concentrações maiores resultam na saturação do efeito deste agente na estrutura secundária da proteína. A faixa de concentração onde estes efeitos são observados é muito semelhante ao efeito do agente desnaturante sobre o comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência (figura 13C).

Figura 14. Efeito do cloreto de guanidina sobre o estado aparente de enovelamento da PhHGXPRT de *P. horikoshii*. As mudanças estruturais foram seguidas pelo sinal de dicroísmo circular a 222 nm.



Na figura 15A é mostrado o efeito da uréia sobre a fluorescência intrínseca da PhHGXPRT. A intensidade aumenta vagarosamente até 4,5 M e depois aumenta mais rapidamente até a concentração máxima do desnaturante (figura 15B). Um efeito similar é observado para o comprimento de onda máximo de emissão da proteína atingindo um valor de 344 nm na concentração maior de uréia (figura 15C). Nenhum dos dois sinais têm seu efeito saturado, e o fato do comprimento de onda máximo de emissão não chegar até 350 nm indica que a proteína não foi totalmente desenovelada com este tratamento.

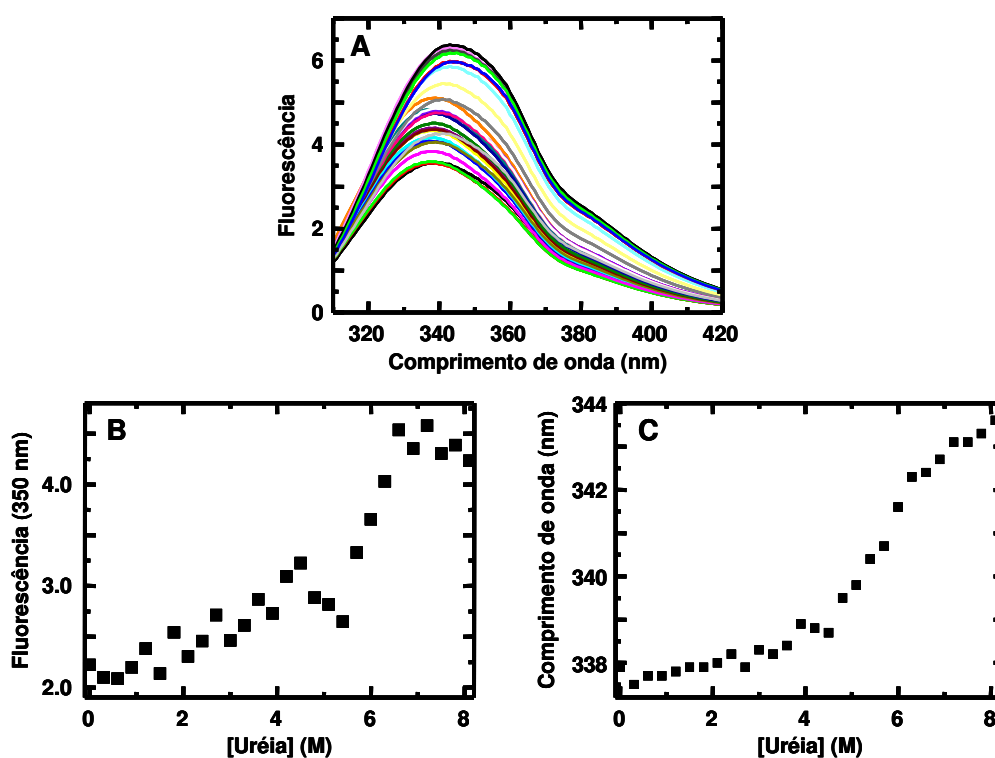


Figura 15. Efeito da uréia na fluorescência da PhHGXPRT. A) Espectro de emissão de fluorescência em concentrações crescentes de uréia. B) Intensidade de fluorescência a 350 nm. C) Comprimento de onda máximo de emissão em cada uma das concentrações de uréia.

Na figura 16 é mostrado o efeito da uréia sobre a estrutura da PhHGXPRT. Neste caso não existe nenhuma mudança significativa até uma concentração de 3,0 M. Concentrações maiores desenovelam a proteína, e o efeito satura ao redor de 4,25 M.

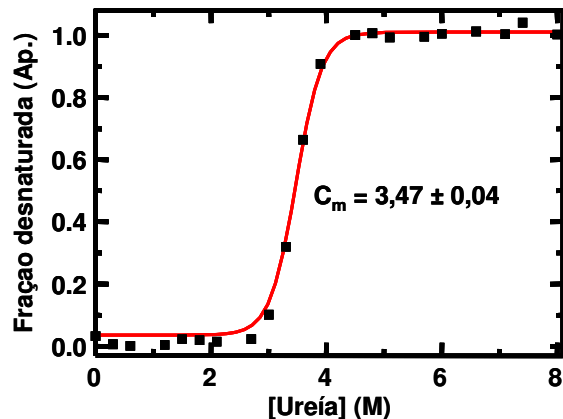


Figura 16. Efeito da uréia sobre o estado aparente de enovelamento da PhHGXPRT de *P. horikoshii*. As mudanças estruturais foram seguidas pelo sinal de dicroísmo circular a 222 nm.

Estes dados indicam que a proteína não possui apenas dois estados (nativo e desnaturado), mas que ela passa por várias etapas até ser desnaturada pelos agentes: cloreto de guanidina e uréia.

Na figura 17A é mostrado o efeito do cloreto de guanidina sobre o raio de giro da proteína obtido pela técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo. Pode-se observar que não existe mudança significativa até uma concentração de 4,0 M. Após esta concentração o raio de giro aumenta indicando o desenovelamento da proteína.

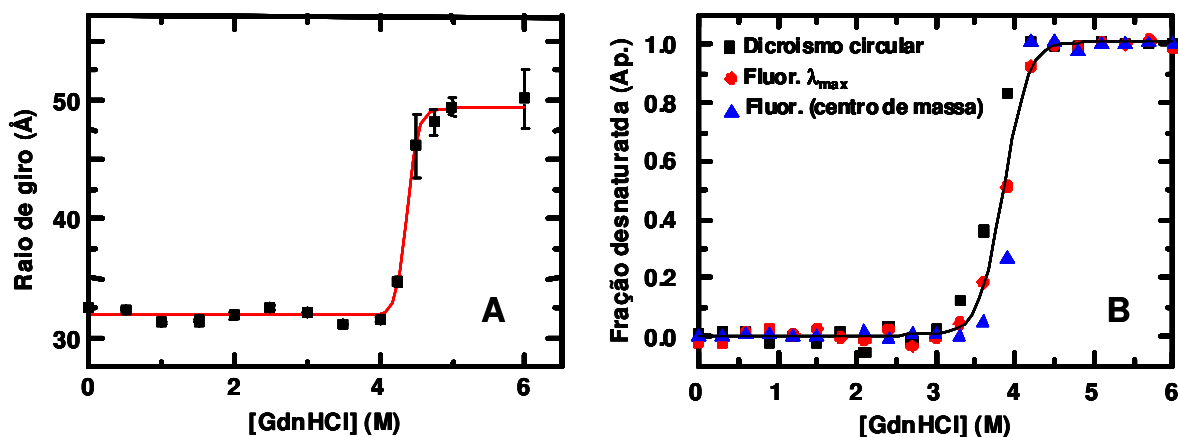


Figura 17. Denaturação química da Ph-HGXPRT com cloreto de guanidina. Painel **A**. Raio de giro obtido pelos dados de SAXS com o programa GNOM. Painel **B**. Denaturação seguida por dicroísmo circular (Quadrados pretos), e fluorescência (círculos vermelhos e triângulos azuis)

Uma comparação dos dados de desenovelamento da PhHGXPRT induzido pelo cloreto de guanidina seguido por diferentes técnicas é mostrada na figura 17B. Pode-se observar que o sinal de dicroísmo circular muda antes que os sinais de fluorescência, os quais também não mudam na mesma concentração do agente desnaturante. Isto é uma clara indicação da existência de mais de dois estados (nativo e desnaturado) no processo de desenovelamento.

Os pontos médios da denaturação (tabela 5) para cada uma destas técnicas também mostram estas diferenças mencionadas anteriormente.

Tabela 5. Ponto médio de desnaturação da PhHGXPRT por cloreto de guanidina.

Técnica	Ponto médio
SAXS	4,38 ± 0,02 M
Dicroísmo circular	3,67 ± 0,01 M
λ máxima (Fluorescência)	3,87 ± 0,01 M
Centro de massa (Fluorescência)	3,91 ± 0,01 M

Proteólise limitada

A proteína PhHGXPRT foi tratada com as seguintes proteases: proteinase K, quimiotripsina e subtilisina, e foi verificada em todos os experimentos (figura 18) a perda de um pequeno fragmento ao se passar 30 minutos, passando de 20 kDa para aproximadamente 18 kDa. Quando os géis são sobrecarregados pode-se observar a formação de bandas de menor peso molecular, mostrando uma pequena sensibilidade a estas proteases (dados não mostrados).

Destas proteases só a subtilisina foi capaz de produzir totalmente o fragmento de 18 kDa a partir das duas horas de tratamento.

Com o objetivo de comprovar que parte da proteína foi eliminada, N-terminal ou C-terminal, o produto da digestão com subtilisina foi submetido à cromatografia de afinidade a metal. A proteína clivada deste modo não foi retida na coluna. Isto indica a eliminação de um fragmento N-terminal contendo a cauda de histidinas.

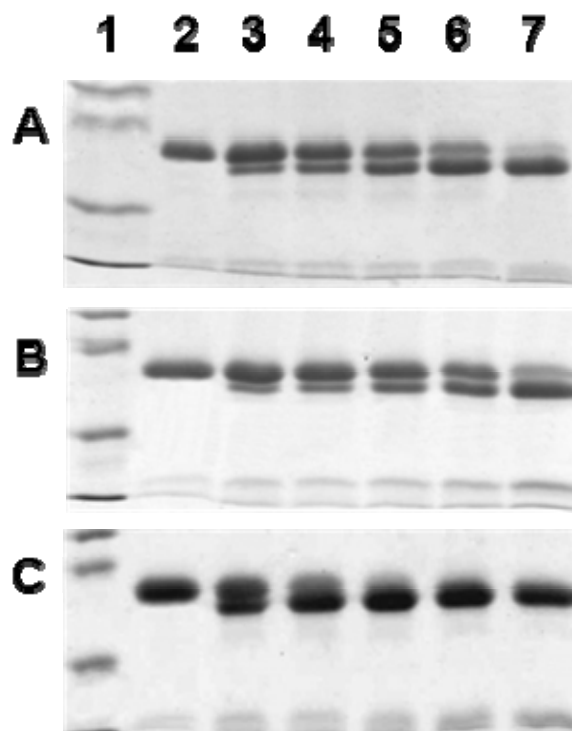


Figura 18. Proteólise limitada da PhHGXPRT de *P. horikoshii* A) proteinase K, B) quimiotripsina e C) subtilisina. 1. Marcador de peso molecular, 2. Controle, 3. 30 minutos, 4. 1 hora, 5. 2 horas, 6. 4 horas, 7. 8 horas.

Gel filtração

A gel filtração da proteína PhHGXPRT é mostrada na figura 19. Este experimento permitiu calcular o peso molecular da proteína em solução. Este peso molecular foi de $103,1 \pm 3,5$ kDa. Isto corresponde à presença de um hexâmero em solução.

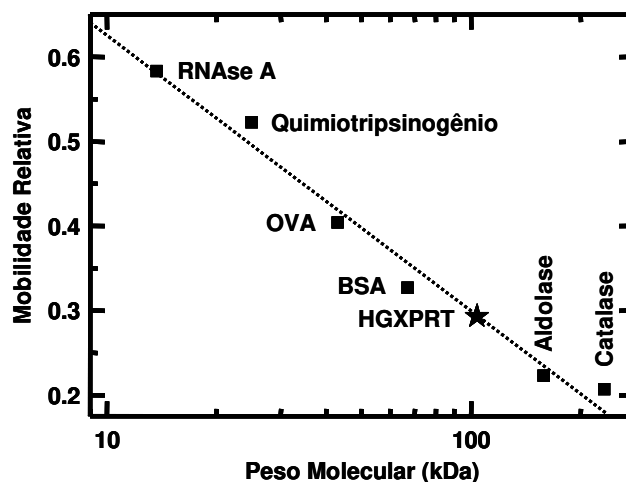


Figura 19. Filtração em gel da proteína recombinante PhHGXPRT de *P. horikoshii*. Catalase (232 kDa), aldolase (158 kDa), albumina de soro bovino (BSA, 66 kDa), ovalbumina (OVA, 43 kDa), e ribonuclease A (RNase A, 13,7 kDa) foram usadas como marcadores moleculares. O asterisco representa a proteína recombinante PhHGXPRT de *P. horikoshii*.

Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Na figura 20 é mostrado o gráfico de DLS com o qual podemos determinar o raio de giro da proteína PhHGXPRT. Também se pode observar a presença de um só pico indicando que a proteína apresenta uma única forma homogênea em solução com um raio de giro de 4,3 nm, correspondente a um peso molecular de $103,0 \pm 2,4$ kDa. Considerando um peso molecular de 17,5 kDa para o monômero pode-se dizer que esta proteína em solução se encontra na forma de hexâmero.

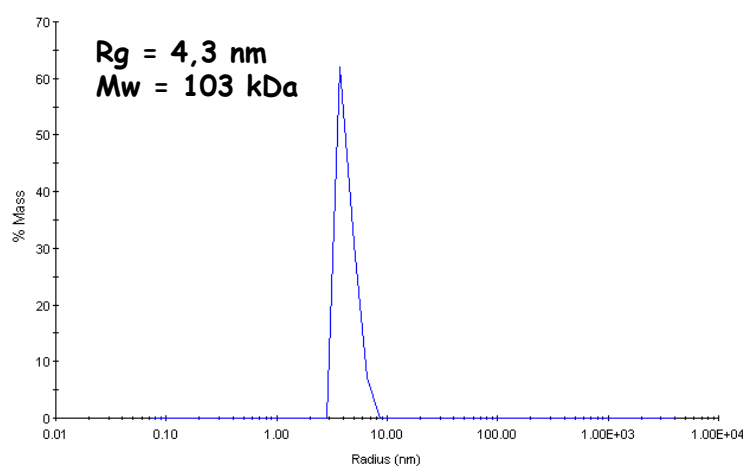


Figura 20. Espalhamento dinâmico de luz da PhHGXPRT de *P. horikoshii*.

Caracterização estrutural por SAXS.

Os dados obtidos através da técnica de Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) e seu processamento são mostrados na figura 21.

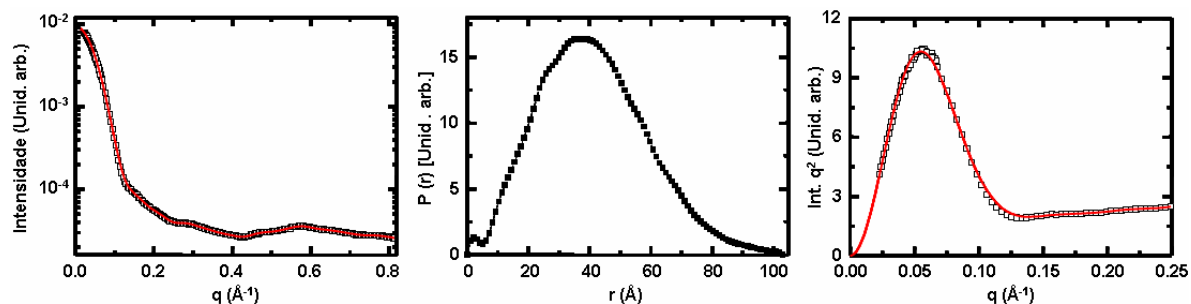


Figura 21. Espalhamento de raios X a baixo ângulo da PhHGXPRT de *P. horikoshii*. A) Perfil de espalhamento da proteína. B) Função de distribuição de partículas. C) Gráfico de Kratky. Pontos em preto representam os dados experimentais e a linha vermelha o ajuste teórico obtido com o programa GNOM.

A função de distribuição de partículas (figura 21B) nos permite calcular um raio de giro de $31,66 \pm 0,05 \text{ \AA}$ e uma dimensão máxima de 109 \AA . O gráfico de Kratky (figura 21C) mostra que a proteína está enovelada apresentando um máximo em valores baixos de q .

A forma da função de distribuição de partículas mostra que a PhHGXPRT tem uma forma assimétrica, principalmente pela relação entre o raio de giro e a dimensão máxima. O modelo calculado com o programa DAMMIN (figura 22, modelo em verde) permite observar como a proteína possui uma forma arredondada e achatada.

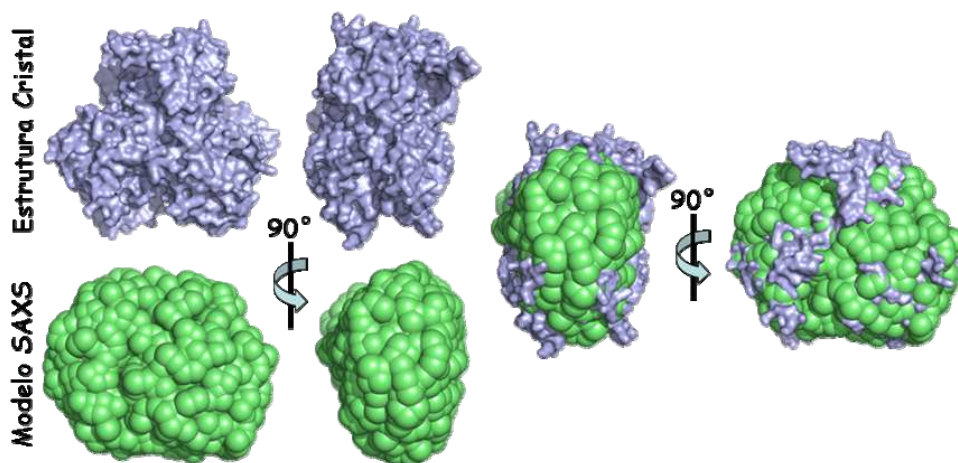


Figura 22. Modelo da PhHGXPRT de *P. horikoshii*. Verde: modelo de SAXS da proteína. Azul claro: Estrutura cristalográfica do hexâmero da proteína (PDB code 1VDM). O modelo foi obtido com o programa DAMMIN.

A sobreposição dos dois modelos (SAXS e cristalográfico) mostra que o modelo obtido pela técnica de SAXS representa a proteína em solução. Na estrutura cristalográfica foi observado um dodecâmero na unidade assimétrica. Os dados de SAXS concordam com os obtidos por DLS e gel filtração mostrando que a espécie que existe em solução para esta proteína é um hexâmero.

HPRT de *Schistosoma mansoni*

Clonagem

A amplificação do gene *Smhpt* de *S. mansoni*, foi feita utilizando-se a técnica de PCR usando o cDNA. O gene de interesse foi amplificado como mostra a figura 23.

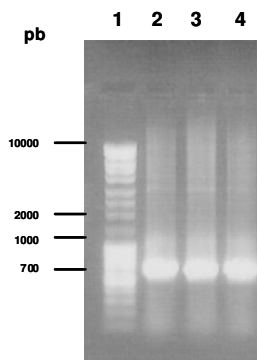


Figura 23. Amplificação do gene *Smhpt* de *S. mansoni* 1) Marcador de peso molecular. 2, 3 e 4) Produto da amplificação por PCR do gene *Smhpt*, amplificação das bandas no tamanho do peso molecular esperado.

O produto da reação de PCR foi purificado e o gene foi clonado no vetor pPROEX-1 (Invitrogen) resultando no vetor pSmHPRT. Este vetor tem o promotor lac e introduz uma cauda de histidinas e um sítio de corte com a protease do vírus do mosaico do tabaco (TEV). A presença do inserto no vetor foi confirmada por experimentos de PCR e de digestão enzimática com as endonucleases de restrição *NdeI* e *Hind III*.

Expressão e purificação

Células de *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo pSmHPRT foram crescidas a 30°C na presença de ampicilina. A expressão foi induzida pela adição de uma concentração final de 1 mM de IPTG no meio de cultura. A proteína foi expressa na fração solúvel como pode ser observado na figura 24A.

A figura 24B mostra a purificação da HPRT de *S. mansoni*, realizada pela técnica de purificação por cromatografia de afinidade a metal (Hi-Trap chelating).

Após a purificação, diálise e concentração, obteve-se a concentração de proteína de 10 mg/mL.

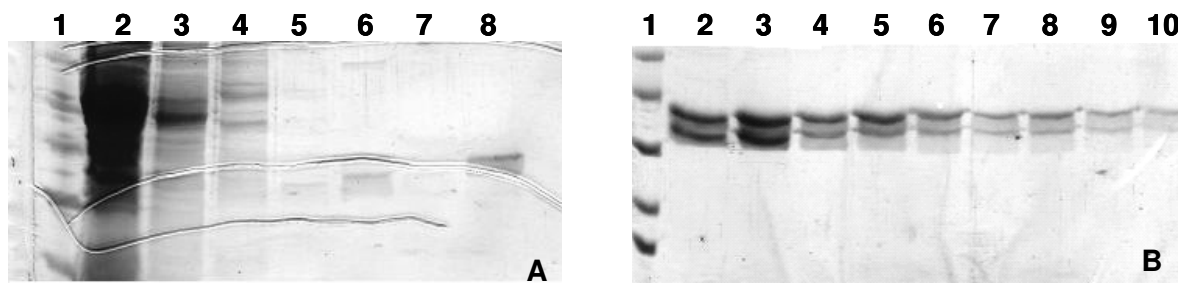


Figura 24. Expressão e purificação da proteína SmHPRT de *S. mansoni*. A) Expressão - linha 1. Marcador de peso molecular; 2. *flow-through*; 3. 5 mM de imidazol, 4. 25 mM de imidazol, 5. 50 mM de imidazol, 6. 100 mM de imidazol, e 8. 500 mM de imidazol. B. Purificação 1. Marcador de peso molecular, e as outras linhas representam a proteína eluída com 200 mM imidazol.

Caracterização estrutural da SmHPRT por SAXS

Na figura 25 são mostrados os dados de espalhamento e o seu processamento.

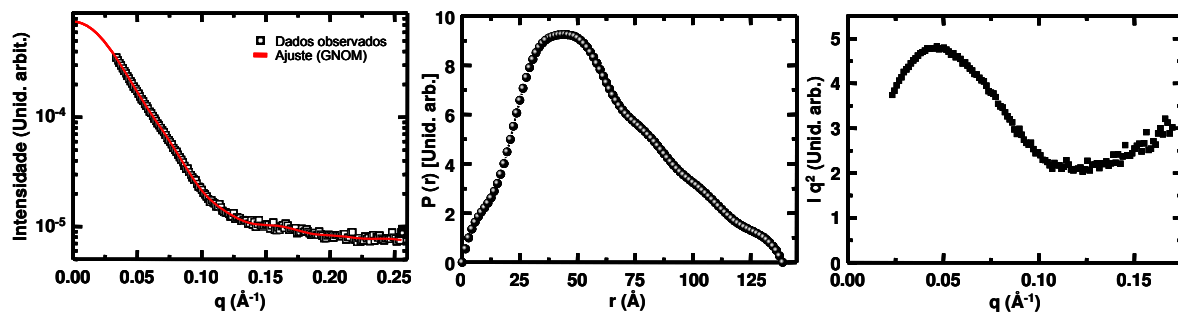


Figura 25. Espalhamento de raios X a baixo ângulo da SmHPRT. A) Perfil de espalhamento. B) Função de distribuição de partículas. C) Gráfico de Kratky. Pontos em preto representam os dados experimentais e a linha vermelha o ajuste teórico obtido com o programa GNOM.

A função de distribuição de partículas (figura 25B) nos permite calcular um raio de giro de $47,41 \pm 0,07$ Å e uma dimensão máxima de 139 Å para esta proteína. A forma deste perfil nos permite deduzir que a forma da proteína em solução é alongada, já que a dimensão máxima é quase três vezes maior que o raio de giro. O gráfico de Kratky (figura 25C) com um máximo a valores baixos de θ nos permite dizer que a proteína está enovelada.

Estes dados permitiram calcular um modelo para a estrutura da proteína em solução (figura 26). O modelo mostra uma proteína alongada formada, muito provavelmente, por dois tetrâmeros quando comparada com estruturas cristalográficas de outras fosforribosiltransferases.

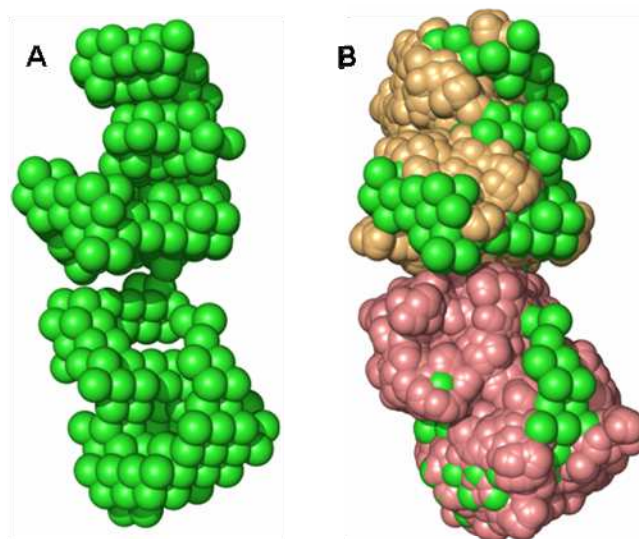


Figura 26. Modelo da SmHPRT obtida através dos dados de SAXS. A) Representação do modelo obtido para a proteína com o programa DAMMIN. B) Comparação do modelo da SmHPRT com o tetrâmero da XPRT de *E. coli* depositada no banco de dados de proteína (PDB *code* 1A95).

DISCUSSÃO

Este trabalho apresenta uma caracterização bioquímica e estrutural da proteína 6-oxopurina fosforribosiltransferase, de um organismo hipertermofílico *Pyrococcus horikoshii* (PhHGXPRT) e uma caracterização estrutural preliminar da proteína 6-oxopurina fosforribosiltransferase do parasita helminto trematódeo *Schistosoma mansoni* (SmHPRT).

Pyrococcus horikoshii

As proteínas termofílicas e hipertermofílicas são estudadas, devido sua aplicação em biotecnologia, e a informação sobre a estabilidade protéica. A PhHGXPRT foi estocada a 4°C por vários meses sem aparente perda da atividade e sem o uso de agentes estabilizantes indicando uma alta estabilidade.

Estrutura secundária

O conteúdo da estrutura secundária, obtido da estrutura tridimensional (PDB code 1VDM) é de 25,5 % de α -hélice, e 30,1 % de folha- β . Estes números estão mais perto da predição que da estimacão obtida utilizando os dados de dicróismo circular. Isto mostra que os dados de dicróismo têm que ser considerados com muita cautela com relação ao conteúdo em estrutura secundária das proteínas devido a influência de outros componentes estruturais no espectro de dicróismo circular.

Cinética

A atividade enzimática da proteína PhHGXPRT apresenta uma forte dependência com a temperatura, nada surpreendente em proteínas de organismos hipertermofílicos. A proteína apresenta uma atividade enzimática detectável na menor temperatura utilizada (40°C), mas esta atividade aumenta com a temperatura até os 70°C. A atividade deve aumentar com maiores temperaturas, considerando que a temperatura ótima de crescimento para esta archaea é 98°C (González *et. al.*, 1998). A realização de medidas de atividade acima da máxima utilizada neste estudo é difícil pela manipulação problemática das amostras e pelas mudanças rápidas de temperatura que, muito provavelmente, acontecem trabalhando nestas altas temperaturas.

A temperatura não teve um efeito significativo nos valores de K_m obtidos para a hipoxantina, guanina, xantina e PRPP (tabela 4). Hipoxantina e guanina apresentam valores de K_m similares aos dados reportados (Keough *et al.*, 1999; Sujay Subbayya *et al.*, 2000; Sujay Subbayya & Balaram, 2000; Free *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1990; Munagala *et al.*, 1998; Jardim & Ullman, 1997; Monzani *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Wenck *et al.*, 2004). A comparação dos valores de K_m para o PRPP é complicado devido a grande variação deste dado entre as diferentes espécies. No caso da enzima humana, este valor sofre mudanças de acordo com as condições usadas nas medidas cinéticas (Keough *et al.*, 1999; Sujay Subbayya *et al.*, 2000; Free *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1997).

Entretanto, os valores da constante catalítica aumentaram com a temperatura (tabela 4). Na faixa de temperatura de 50 a 70°C a k_{cat} aumenta 3,8 vezes para hipoxantina, 6,7 para guanina, 3,2 para xantina e 6,4 para PRPP. Um maior aumento pode ser esperado até a temperatura ótima de crescimento do organismo.

Foi verificado que a proteína usa xantina como substrato, mas com menor eficiência em comparação a hipoxantina e a guanina, pelo valor semelhante de k_{cat} em comparação com as outras bases 6-oxopurinicas. Estes dados parecem indicar que este substrato não liga facilmente, mas quando liga a conformação é muito favorável para a reação catalítica.

Oligomerização

As HPRTs existem em solução como dímeros ou tetrâmeros (Sinha *et al.*, 2001). Parece que o estado de oligomerização tem um papel na catálise e na estabilidade da conformação ativa bem como uma estabilidade geral da proteína. Dados obtidos neste trabalho (figuras 19 e 20) indicam que a PhHGXPRT é um homohexâmero em solução. Esta enzima consiste de somente 153 aminoácidos, sendo uma das menores HPRTs. Uma observação cuidadosa do alinhamento com outras HPRTs (figura 3) vê-se que este tamanho é devido ao desaparecimento de um pedaço da seqüência ao se comparar com outras estruturas. O estado de agregação, juntamente com este tamanho pequeno e mais compacto, deve contribuir para extrema estabilidade desta proteína.

A estrutura do cristal mostra um dodecâmero na unidade assimétrica. Este dodecâmero é composto por dois hexâmeros, e os hexâmeros são compostos por três dímeros, formando um trímero de dímeros. Uma análise detalhada da superfície de interação entre os dois hexâmeros na unidade assimétrica mostra que a maioria das interações é de caráter eletrostático. Isto, juntamente com nossos dados, indica que o dodecâmero existe somente no cristal e o único oligômero presente em solução é o hexâmero. Os dados de SAXS mostram, também, que o estado de oligomerização é mantido mesmo em altas concentrações (~ 20 mg/mL).

Localização dos resíduos de triptofano

Os dados da fluorescência intrínseca da proteína e de apagamento de fluorescência nos permitem deduzir a existência de duas populações de triptofanos, uma delas extremamente acessível ao solvente e outra bem enterrada na estrutura sem que seu sinal de fluorescência seja quase afetado pelos apagadores. Na figura 27 podemos observar a localização deste tipo de resíduos na proteína e pode-se observar como existe uma grande correlação entre a estrutura e os dados de fluorescência. Cada monômero possui quatro triptofanos. Dois deles estão localizados no loop II do sítio ativo. Este loop está muito exposto ao solvente e é muito flexível. Os outros dois resíduos estão contíguos na seqüência, Trp8 e Trp9, e situados no começo de uma α -hélice. Estes resíduos estão localizados no sítio de interação dos três dímeros e formam um *sanduíche* de aminoácidos aromáticos com interações de *stacking* entre eles que estabilizam o hexâmero. Este grupo de resíduos está bem enterrado na molécula sem quase nenhum acesso ao solvente. Estes dados mostram como uma técnica simples e rápida pode fornecer informação estrutural sem ter que fazer experimentos com técnicas muito mais complexas.

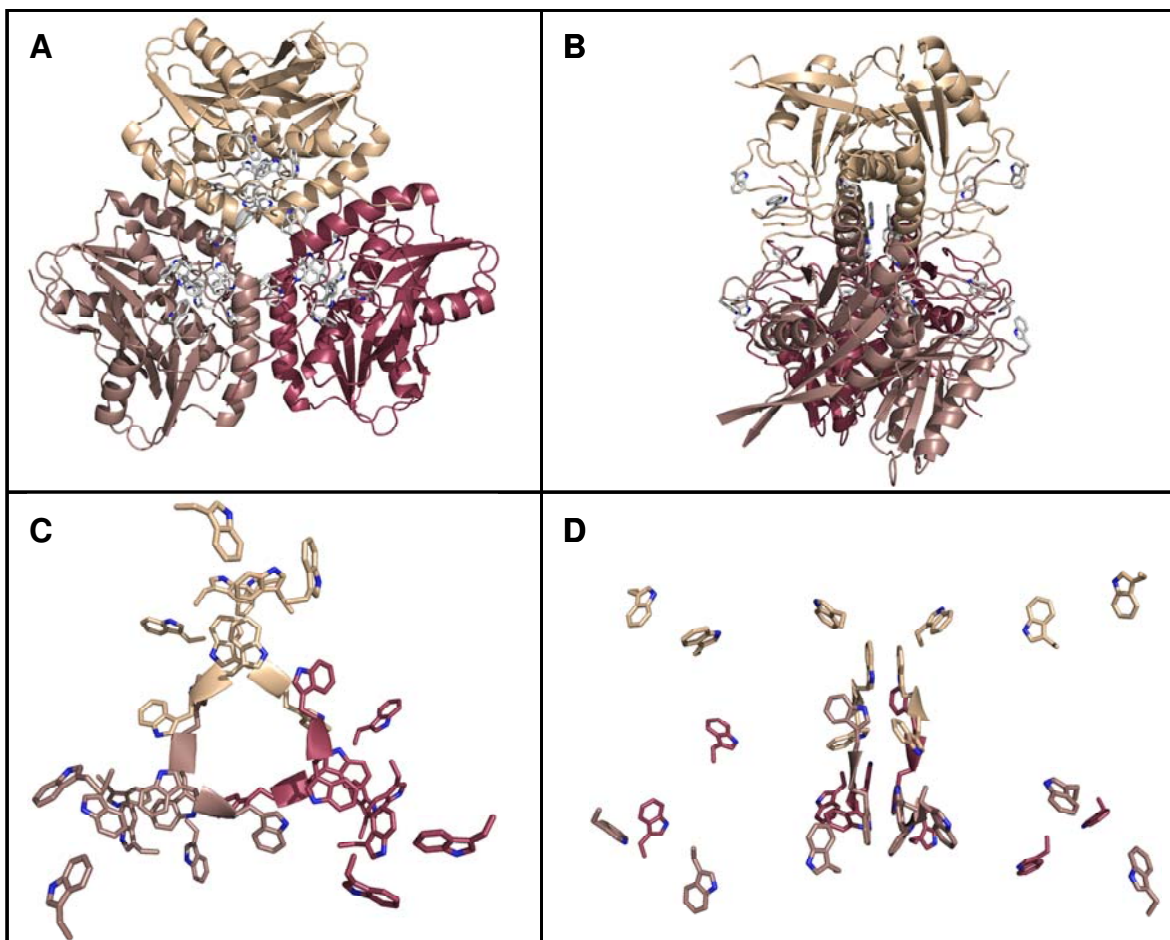


Figura 27. Localização dos resíduos de triptofano da PhHGXPRT de *P. horikoshii*. A) Hexâmero com cada dímero representado em uma cor diferente. As cadeias laterais dos triptofanos estão representadas expressamente. B) Estrutura girada 90°. C) Representação das cadeias laterais dos triptofanos D) Estrutura girada 90°. A orientação dos painéis C e D é a mesma que nos painéis A e B, respectivamente.

Desnaturação

A estabilidade conformacional de muitas proteínas pode ser determinada através de estudos de estabilidade de proteínas usando agentes desnaturantes como cloreto de guanidina e uréia. Esses compostos induzem o desenovelamento de proteínas oligoméricas realizando processos multifásicos com a estabilização de intermediários parcialmente enovelados. A proteína PhHGXPRT apresentou uma certa estabilidade química. A proteína mantém o seu enovelamento até uma concentração de 4,0 M de cloreto de guanidina, e 3,0 M de uréia. O espectro de fluorescência da proteína foi

caracterizado pelo leve deslocamento do máximo de emissão a comprimentos de onda menores, indicativo de que os aromáticos foram capazes de serem expostos na presença dos desnaturantes, todavia, ao se aumentar a concentração destes foi visto que a proteína apresenta vários estados, além do nativo e desnaturado, antes de ser desenovelada.

Loops

O alinhamento da seqüência desta proteína com várias 6-oxopurina PRTs bem caracterizadas (figura 3) mostra diferenças importantes. Algumas das características das 6-oxopurina PRTs estão presentes na seqüência da PhHGXPRT. As seqüências do loop I (A34-R35-G36, análogos com humano L67, K68 e G69), loop II (K59-E69, 11 resíduos, análogos com humano, K102-D112) e loop III (V86-T95, 10 resíduos análogos com humano V129-T138) podem ser claramente identificadas, embora com algumas diferenças significantes nos dois primeiros loops. Neste alinhamento não é possível o reconhecimento dos resíduos característicos do loop IV.

O loop I do sítio ativo é composto por 3 aminoácidos e a ligação peptídica entre os dois primeiros apresenta uma conformação *cis* (Focia *et al.*, 1998a; Focia *et al.*, 1998b; Héroux *et al.*, 1999b; Shi *et al.*, 1999). Daqueles resíduos o primeiro (humano L67) e o último (humano G69) são considerados como invariáveis. Esta conservação é importante para a função da proteína (Héroux *et al.*, 1999a; Héroux *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 1999a; Shi *et al.*, 1999b).

O primeiro resíduo deste loop é importante para a ligação de um oxigênio do PRPP ou PPI. A HPRT de *T. cruzi* pode acomodar somente Met nesta posição sem causar perda de solubilidade, mas a eficiência catalítica é reduzida de forma importante (Butterworth *et al.*, 2004). Qualquer outro resíduo, nesta posição, origina uma proteína recombinante insolúvel, indicando um papel na manutenção da estrutura da proteína (Butterworth *et al.*, 2004). A maioria das seqüências apresenta uma Leu nesta posição mostrando uma grande pressão para mantê-la. O segundo resíduo mais abundante é Met (20 em 113 espécies). Nenhum dado bioquímico está disponível para qualquer uma destas espécies, assim, permanece incerto se estas seqüências representam HPRTs

verdadeiras. Ala é encontrada em sete espécies, três delas são bactérias (*Corynebacterium diphtheriae*, *Streptomyces coelicolor* e *Thermus thermophilus*) e quatro espécies são archaea (*P. abyssi*, *P. furiosus*, *P. horikoshii* e *Thermococcus kodakarensis*). Por último, existe uma seqüência com uma valina nesta posição (*Coxiella burnetii*). Neste último caso, a seqüência característica dos outros três loops (II, III e IV) está presente, indicando que pode ser uma HPRT verdadeira. O terceiro resíduo deste loop é uma Gly (humano G36), conservada em todas as seqüências depositadas nos bancos de dados que podem ser reconhecidas como HPRTs (113 espécies). Esta conservação indica uma alta pressão nesta posição, mostrando a importância da presença de um resíduo muito pequeno e flexível nesta posição. O aminoácido do meio do loop I é um aminoácido que apresenta uma alta variabilidade. Os resíduos mais freqüentes nesta posição são Lys e Arg (humano K68). Este resíduo é importante para determinar a especificidade para o nucleotídeo monofosfato, e a existência da pirofosforólise (reação reversa). A presença de Lys permitirá que esta reação possa ocorrer, mas a presença de Arg elimina a ligação da proteína ao mononucleotídeo impedindo a reação (Lee *et al.*, 1998; Lee, 1999; Canyuk *et al.*, 2004).

A seqüência Ala-Arg-Gly está presente no loop I da seqüência da PhHGXPRT. Os experimentos de ligação a GMP-agarose (figura 8) e de atividade enzimática (dados não mostrados) mostram que a proteína não é capaz de ligar o mononucleotídeo e, conseqüentemente, apresenta falha na atividade de pirofosforólise. Estes resultados corroboram dados previamente publicados para várias HPRTs bacterianas (Lee *et al.*, 1998; Guddat *et al.*, 2002) e o estudo de mutagênese na enzima de *T. cruzi*, que mostra que a presença de Arg nesta posição pode influenciar na ligação do mononucleotídeo por meio de modificações conformacionais sutis (Canyuk *et al.*, 2004). Foi medida a ligação do substrato PPI com a proteína PhHGXPRT por apagamento da fluorescência intrínseca da proteína. O mecanismo cinético da proteína humana e de três proteínas de parasitas têm sido estudados e relatados como sendo um mecanismo bi-substrato bi-produto ordenado com o PRPP ligando antes que a base purínica e o PPI sendo liberado primeiramente seguido pelo ribonucleotídeo de purina

(Giacomello *et. al.*, 1978; Wenck *et. al.*, 2004; Xu. *et. al.*, 1997; Munagala *et. al.*, 1998). Estudos cinéticos com a enzima humana mostraram que a liberação dos produtos é, principalmente, ordenado sendo o PPI o primeiro produto em sair da enzima, mas qualquer um pode ser liberado primeiramente do complexo ternário (Xu *et. al.*, 1997). PPI é, essencialmente, o segundo substrato que liga na enzima na reação reversa, mas foi demonstrado que ele pode se ligar a enzima para formar um complexo não-produtivo “enzima-PPI-hipoxantina” (Xu *et. al.*, 1997). Foi comprovada que a afinidade de ligação deste composto é baixa, de forma semelhante às outras HPRTs (Wenck *et. al.*, 2004). Isto parece indicar que a conformação adotada pela PhHGXPRT impedindo a ligação do mononucleotídeo não afeta a ligação do PPI. Isto também pode ser uma indicação de que a PhHGXPRT segue um mecanismo de reação bi-bi ordenado.

O loop II é muito flexível e fecha-se sobre o sítio ativo durante a catálise. A característica principal deste loop é a presença de um dipeptídeo conservado, Ser-Tyr, extremamente importante para a atividade catalítica. Diversos estudos mostraram que a substituição do resíduo de Ser por qualquer resíduo torna a enzima quase inativa, e que o resíduo de Tyr pode ser somente substituído por outro resíduo aromático (Jardim *et. al.*, 1997; Medrano *et. al.*, 2003). O resíduo de Ser está muito conservado, mas não está presente em todas as seqüências da HPRTs. Existem três outros tipos de resíduo nesta posição. O segundo resíduo mais representado é Arg. Este resíduo está presente em 17 espécies, todas elas bactérias, das 113 HPRTs reconhecidas no banco de dados. Phe está presente em sete espécies, e há um organismo que tem Leu nesta posição (*Aeropyrum pernix*). O segundo resíduo deste dipeptídeo, Tyr, está conservado em todas as seqüências. Isto indica a sua importância para atividade enzimática, como indicado pelos estudos de mutagenese. Mesmo podendo ser substituído, *in vitro*, por outro resíduo aromático não existe nenhum outro resíduo nesta posição na natureza indicando que deve ter um papel crítico para a atividade. A seqüência do loop II de *P. horikoshii* apresenta o dipeptídeo Phe-Tyr. Na estrutura do cristal alguns dos resíduos deste loop não estão bem definidos na maioria dos monômeros, somente um monômero foi desenhado com todos os resíduos do loop, e estes resíduos apresentam fatores de temperatura altos, indicando uma alta flexibilidade. Esta flexibilidade é uma

característica muito importante presente, mesmo, em HPRTs de organismos termofílicos (Chen *et. al.*, 2005) e hipertermofílicos (*P. horikoshii*, 1VDM). De qualquer forma, a flexibilidade deste loop não parece ter um impacto importante na estabilidade das HPRTs. A HPRT humana pode ser considerada termoestável (Yuan *et. al.*, 1993) enquanto que a proteína de *P. falciparum* é muito pouco estável (Keough *et. al.*, 1999).

O loop III possui o motivo de ligação ao fosfato e um ácido aspártico (humano D137), importante para a catálise, e um resíduo de Lys envolvido na ligação e posicionamento da base purínica. Todos estes resíduos são bem conservados em todas as seqüências indicando a importância da integridade deste loop para a atividade enzimática.

O loop IV está formado pela porção C-terminal da proteína que forma um capuz sobre o núcleo da proteína. Este loop possui um resíduo aromático (humano F186) envolvido na ligação da base purínica, um Asp (humano D197) que liga um íon magnésio e uma Arg (humano R199) que participa da ligação do PRPP ou PPI. Estes dois últimos resíduos são importantes para a atividade catalítica e sua modificação acarreta sérios problemas ao organismo, como no caso da síndrome de Lesch-Nyhan em humanos, onde o Asp foi trocado por Asn (Lesch *et. al.*, 1964; Seegmiller *et. al.*, 1967; Jinnah *et. al.*, 2000). A maioria das seqüências possui um loop IV facilmente identificável. Existem algumas seqüências onde os resíduos que constituem o loop não podem ser identificados claramente, incluindo a HGXPRT de *P. horikoshii* que apresenta um C-terminal muito curto.

É interessante a observação de como as mudanças na seqüência dos loops, com relação à bem caracterizadas HPRTs humanas, e protozoárias acontecem concomitantemente. De acordo com a seqüência dos loops do sítio ativo às HPRTs, estas podem ser classificadas em três grupos. O primeiro grupo inclui as proteínas de mamíferos, protozoários e algumas bactérias com um típico loop I: Leu como o primeiro aminoácido, um dipeptídeo Ser-Tyr no loop II e um loop IV típico; o segundo grupo tem Met na primeira posição do loop I, um dipeptídeo Arg-Tyr no loop II e um loop IV típico; e o terceiro grupo composto por proteínas que tem Ala ou Ser na primeira posição do

loop I, um dipeptídeo Phe-Tyr no loop II e um loop IV não típico. A HGXPRT de *P. horikoshii* pertence ao terceiro grupo.

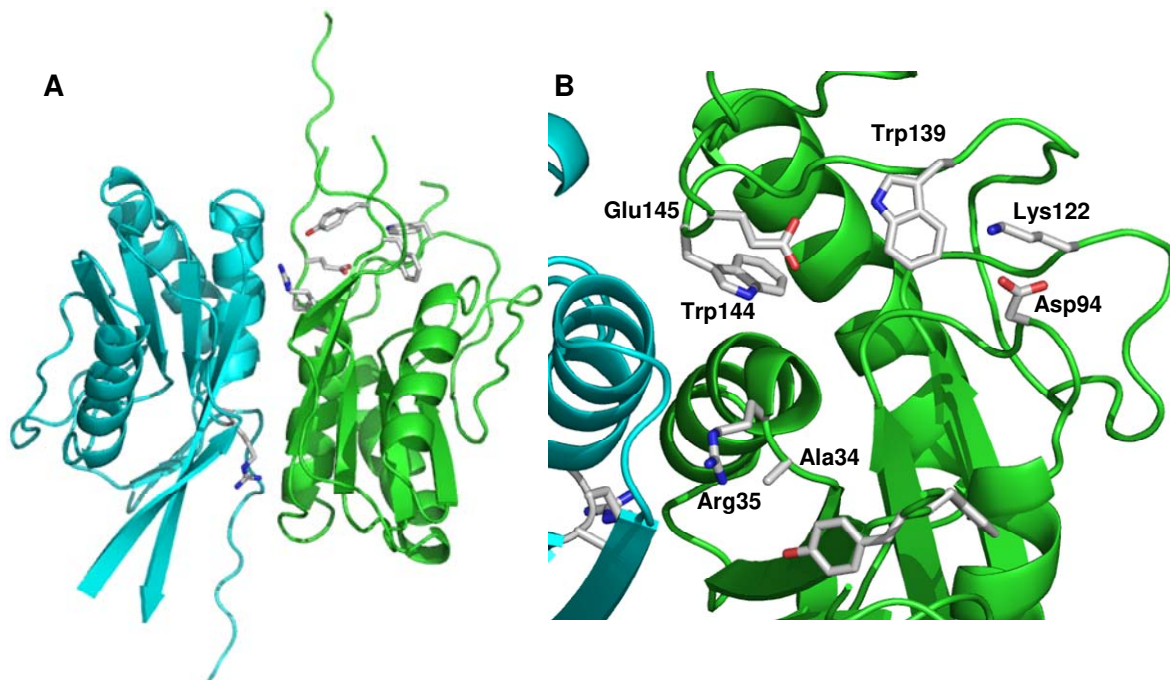


Figura 28. Estrutura cristalográfica da PhHGXPRT de *P. horikoshii* (PDB code 1VDM). A) Estrutura do dímero. B) Ampliação do sítio ativo. As cadeias laterais dos resíduos dos loops I, II, III e IV que formam parte do sítio ativo estão representadas na figura.

Os dados obtidos neste trabalho indicam que o gene *hprt* de *P. horikoshii* codifica uma 6-oxopurina fosforribosiltransferase verdadeira, capaz de catalisar a síntese de mononucleotídeos independentemente das diferenças observadas ao nível de seqüência com respeito às bem caracterizadas HPRTs humana, protozoárias e bacterianas. Isto poderia indicar que o enovelamento da proteína deve ser diferente das HPRTs de mamíferos e protozoários para acomodar as mudanças na seqüência e conservar a atividade. A figura 28 mostra a estrutura do dímero da PhHGXPRT sem nenhum substrato no sítio ativo. Pode-se observar que a configuração do loop I no dímero é diferente das HPRTs de mamíferos e protozoários. O primeiro resíduo deste loop nestas últimas HPRTs (Leu) está perto do mesmo resíduo do monômero vizinho e fazendo um contato de Van der Waals' (Butterworth *et. al.*, 2004). Em *P. horikoshii* estes loops estão mais distantes sem contato direto entre eles (figura 28). A presença da Arg como o segundo resíduo do loop faz que a proteína seja incapaz de ligar o

mononucleotídeo e, por tanto, incapaz de catalisar a reação de pirofosforólise. Estudos de mutagênese mostraram que a presença de Arg nesta posição na HPRT de *T. cruzi* faz que ela seja incapaz de ligar o mononucleotídeo em concentrações fisiológicas (Canyuk *et. al.*, 2004). Uma possível explicação deste fato é a possibilidade da existência de comunicação entre os monômeros através deste loop, devido à interação direta entre seus resíduos. Estes novos dados indicam que a comunicação entre o loop I e o outro extremo do sítio ativo, o sítio de ligação do mononucleotídeo, pode acontecer através de um único monômero. Embora, pôde ser possível que estes dois tipos de proteínas comuniquem de diferentes maneiras na presença deste resíduo no meio do loop I.

Com os presentes dados não podemos explicar como as diferenças observadas nos loops I, II e IV da proteína PhHGXPRT possam acomodar os substratos para manter a atividade enzimática típica de uma 6-oxopurina fosforribosiltransferase. A conformação que o dipeptídeo Phe-Tyr do loop II adota na estrutura do cristal coloca a cadeia lateral da Phe dentro do sítio ativo. Este loop terá que submeter-se a uma grande mudança conformacional se o modo de ligação do substrato à proteína se parece ao das HPRTs de mamíferos, protozoários e bactérias. Também, o Trp localizado no loop IV no lugar que a Arg199 (humana) ocupa e que liga o PRPP ou PPI não parece capaz de ligar estes substratos da forma que ele está na estrutura do cristal (figura 28). É possível que esta proteína ligue os substratos com uma conformação diferente para permitir a reação enzimática.

Neste trabalho foram obtidos cristais da proteína na presença de substratos, porém estes só difratavam até uma resolução de 3.6 Å, nas melhores imagens. A célula unitária desses cristais é maior da descrita no Protein Data Bank para a estrutura cristalográfica depositada. Nossos cristais parecem possuir 24 monômeros na unidade assimétrica. A informação fornecida no PDB sobre a cristalização da proteína não é completa e tentativas de reproduzir essas condições não forneceram nenhum resultado positivo.

Em resumo, foram apresentados aqui dados que identifica o produto do gene *hprt* como uma hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferase, com preferência

para o uso de hipoxantina e guanina. Estes dados nos permitem afirmar que o grupo de organismos que apresentam genes com uma seqüência semelhante, possui uma 6-oxopurina fosforribosiltransferase verdadeira. Estes organismos são as archaeas *P. abyssi*, *P. furiosus*, *P. horikoshii* e *T. kodakarensis*, e as bactérias *C. diphtheriae*, *S. coelicolor* e *T. thermophilus*.

Schistosoma mansoni

A HPRT de *S. mansoni* tem sido estudada com respeito a sua atividade enzimática e estabilidade térmica (Kanaani *et al.*, 1995; Kanaani *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1990; Yuan *et al.*, 1992; Yuan *et al.*, 1993). O objetivo deste trabalho é realizar estudos estruturais para comparar as mudanças que as HPRTs apresentam em posições importantes para a atividade catalítica.

O único resultado que se apresenta aqui é uma caracterização preliminar da proteína clonada fusionada com uma cauda de histidinas para facilitar a sua purificação usando a técnica de SAXS. Os dados mostram que a proteína está enovelada e formada por oito monômeros. O modelo que pode ser construído mostra uma configuração compatível com a presença de dois tetrâmeros interagindo entre si. Esta proteína recombinante com a cauda de histidinas mostra uma grande tendência a agregar e precipitar com o passar do tempo.

Estes dados, preliminares, parecem indicar que a proteína pode estar na forma de tetrâmero em solução, e que será necessária a remoção da cauda de histidinas para comprovar o estado real de agregação da proteína e para a continuação dos estudos de cristalização.

CONCLUSÕES

Neste trabalho foram obtidas as seguintes conclusões:

- **Para a proteína fosforribosiltransferase de *P. horikoshii*:**
 1. O gene *Ph0095* codifica uma 6-oxopurina fosforribosiltransferase funcional.
 2. A proteína codificada por este gene pode utilizar hipoxantina, guanina e xantina como substratos, sendo uma HGXPRT.
 3. A PhHGXPRT não é capaz de realizar a reação de pirofosforólise. Isto está de acordo com dados publicados onde proteínas com uma Arg no loop I não são capazes de realizar esta reação.
 4. A PhHGXPRT é um homohexâmero em solução, o que pode ser importante para sua estabilidade.
 5. A PhHGXPRT é compacta e resistente a ação de proteases em condições limitadas.
 6. A proteína possui, no mínimo, um estado intermediário quando tratada com agentes desnaturantes como cloreto de guanidina e uréia.
 7. Os dados obtidos aqui permitem comprovar que existem variantes desta proteína na natureza que, apesar de mudanças em resíduos importantes, mantém a atividade catalítica compensando estas mudanças.

- **Para a proteína fosforribosiltransferase de *S. mansoni*:**
 1. A proteína apresenta-se como um octâmero em solução devido a presença da cauda de histidinas. Mas, este estado de oligomerização não parece ser o da proteína nativa pelo excesso de agregação observada e pelo modelo obtido com dados de SAXS; logo provavelmente a sua estrutura é um tetrâmero.
 2. A eliminação da cauda de histidinas, seja por tratamento proteolítico ou clonagem do gene sem fusões, será um passo importante na obtenção de uma proteína para que se possam continuar com os estudos estruturais.

REFERÊNCIAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Balendiran, G.K., Molina, J.A., Xu, Y., Torres-Martinez, J., Stevens, R., Focia, P.J., Eakin, A.E., Sacchettini, J.C. & Craig, S.P.III (1999) Ternary complex structure of human HGPRTase, PRPP, Mg²⁺, and the inhibitor HPP reveals the involvement of the flexible loop in substrate binding. *Protein Sci.* 8, 1023-1031.
- Berens, R.L., Krug, E.C. & Marr, J.J. (1995) in *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites* (Marr, J.J. and Müller, M., Ed.) pp 89-117, Academic Press Inc., San Diego, CA.
- Bohm, G., Murh, R. & Jaenicke, R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* 5, 191-195.
- Butterworth, A.C., Medrano, F.J., Eakin, A.E. & Craig, S.P. (2004) Saturation mutagenesis, complement selection, and steady-state kinetic studies illuminate the roles of invariant residues in active site loop I of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta* 1699, 87-94.
- Canyuk, B. (2000) Structure Function Analysis of a Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase, University of North Carolina, Chapel Hill, NC.
- Canyuk, B., Focia, P.J. & Eakin, A.E. (2001) The role for an invariant aspartic acid in hypoxanthine phosphoribosyltransferases is examined using saturation mutagenesis, functional analysis, and X-ray crystallography. *Biochemistry* 40, 2754-2765.
- Canyuk, B., Medrano, F.J., Wenck, M.A., Focia, P.J., Eakin, A.E. & Craig, S.P. (2004) Interactions at the Dimer Interface Influence the Relative Efficiencies for Purine Nucleotide Synthesis and Pyrophosphorolysis in a Phosphoribosyltransferase. *J. Mol. Biol.* 335, 905-921.
- Chen, Q., Liang, Y., Su, X., Gu, X., Zheng, X. & Luo, M. (2005) Alternative IMP Binding in Feedback Inhibition of Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *J. Mol. Biol.* 348, 1199-1210.
- Chen, Q., You, D.L., Hu, M.H., Gu, X.C., Luo, M. & Lu, S.Y. (2003) Cloning, purification and characterization of thermostable hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Prot. Expr. Purif.* 32, 239-245.
- Chin, M.S. & Wang, C.C. (1994) Isolation, sequencing and expression of the gene encoding hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase of *Trichomonas foetus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63, 221-229.
- Craig, S.C. & Eakin, A.E. (2000) Purine Phosphoribosyltransferases. *J. Biol. Chem.* 275, 20231-20234.

- Craig, S.P. & Eakin, A.E. (1997) Purine salvage enzymes of parasites as targets for structure-based inhibitor design. *Parasitol. Today* 13, 238-241.
- Eads, J.C., Scapin, G., Xu, Y., Grubmeyer, C. & Sacchettini, J.C. (1994) The crystal structure of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase with bound GMP. *Cell* 78, 325-334.
- Eftink, M.R. & Ghiron, C.A. (1976a) Exposure of Tryptophanyl Residues in Proteins. Quantitative Determination by Fluorescence Quenching Studies. *Biochemistry* 15, 672-680.
- Eftink, M.R. & Ghiron, C.A. (1976b) Fluorescence quenching of indole and model micelle systems. *J. Phys. Chem.* 80, 486-493.
- Fairbanks, G., Steck, T.L. & Wallach, D.F. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10, 2606-2617.
- Focia, P.J., Craig, S.P. & Eakin, A.E. (1998a) Approaching the transition state in the crystal structure of a phosphoribosyltransferase. *Biochemistry* 37, 17120-17127.
- Focia, P.J., Craig, S.P., Nieves-Alicea, R., Fletterick, R.J. & Eakin, A.E. (1998b) A 1.4 Å crystal structure for the hypoxanthine phosphoribosyltransferase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry* 37, 15066-15075.
- Free, M.L., Gordon, R.B., Keough, D.T., Beacham, I.R., Emmerson, B.T. & de Jersey, J. (1990) Expression of active human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in *Escherichia coli* and characterisation of the recombinant enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1087, 205-211.
- Giacomello, A. & Salerno, C. (1978) Human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. Steady state kinetics of the forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem.* 253, 6038-6044.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- González, J.M., Masuchi, Y., Robb, F.T., Ammerman, J.W., Maeder, D.L., Yanagibayashi, M., Tamaoka, J. & Kato, C. (1998) *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles* 2, 123-130.
- Guddat, L.W., Vos, S., Martin, J.L., Keough, D.T. & de Jersey, J. (2002) Crystal structures of free, IMP-, and GMP-bound *Escherichia coli* hypoxanthine phosphoribosyltransferase. *Prot. Sci.* 11, 1626-1638.
- Hammersley, A.P. (1997) FIT2D: An Introduction and Overview. ESRF Internal Report, ESRF97HA02T.
- Héroux, A., White, E.L., Ross, L.J. & Borhani, D.W. (1999a) Crystal Structures of the *Toxoplasma gondii* Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase- GMP and -

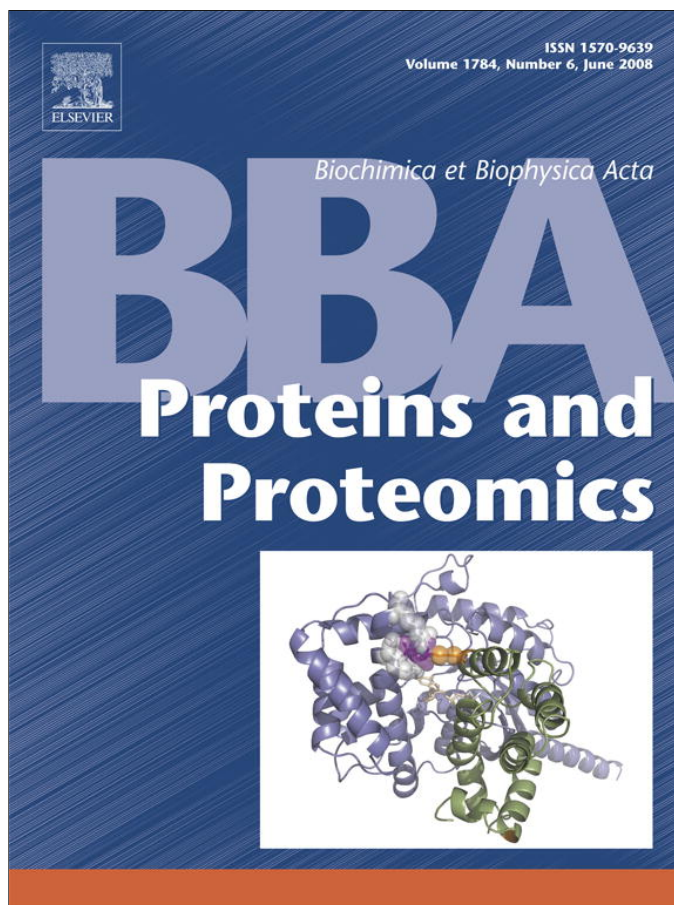
- IMP Complexes: Comparison of Purine Binding Interactions with the XMP Complex. *Biochemistry* 38, 14485-14494.
- Héroux, A., White, E.L., Ross, L.J., Davis, R.L. & Borhani, D.W. (1999b) Crystal structure of *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase with XMP, pyrophosphate, and two Mg²⁺ ions bound: insights into the catalytic mechanism. *Biochemistry* 38, 14495-14506.
- Héroux, A., White, E.L., Ross, L.J., Kuzin, A.P. & Borhani, D.W. (2000) Substrate deformation in a hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase ternary complex: the structural basis for catalysis. *Structure* 8, 1309-1318.
- Jardim, A. & Ullman, B. (1997) The conserved serine-tyrosine dipeptide in *Leishmania donovani* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase is essential for catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 272, 8967-8973.
- Jinnah, H.A., De Gregorio, L., Harris, J.C., Nyhan, W.L. & O'Neill, J.P. (2000) The spectrum of inherited mutations causing HPRT deficiency: 75 new cases and a review of 196 previously reported cases. *Mutat. Res.* 463, 309-326.
- Jones, D.T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* 292, 195-202.
- Kanaani, J., Maltby, D., Focia, P. & Wang, C.C. (1995) Identification of the Active Sites of Human and Schistosomal Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferases by GMP-2',3'-dialdehyde Affinity Labeling?. *Biochemistry* 34, 14987-14996.
- Kanaani, J., Maltby, D., Somoza, J.R. & Wang, C.C. (1997) Inactivation of *Tritrichomonas foetus* and *Schistosoma mansoni* purine phosphoribosyltransferases by arginine-specific reagents. *Eur. J. Biochem.* 244, 810-817.
- Keough, D.T., Ng, A-L, Winzor, D.J., Emmerson, B.T. & de Jersey, J. (1999) Purification and characterization of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase and comparison with the human enzyme. *Mol. Biochem. Parasitol.* 98, 29-41.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, C.C. (1999) Structure-function studies of hypoxanthine phosphoribosyltransferases. PhD thesis, University of North Carolina at Chapel Hill.
- Lee, C.C., Craig, S.P. & Eakin, A.E. (1998) A single amino acid substitution in the human and a bacterial hypoxanthine phosphoribosyltransferase modulates specificity for the binding of guanine. *Biochemistry*, 37, 3491-3498.
- Lee, C.C., Medrano, F.J., Craig, S.P. & Eakin, A.E. (2001) Investigation of the functional role of active site loop II in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1537, 63-70.

- Lehninger, A.L. (1993) Biochemistry, 2nd ed., Worth Publishers, Inc., New York.
- Lehrer, S.S. (1971). Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. Biochemistry 10, 3254-3263.
- Lesch, M. & Nyhan, W.L. (1964) A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. Am. J. Med. 36, 561-570.
- McGuffin, L.L., Bryson, K. & Jones, D.T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. Bioinformatics 16, 404-405.
- Medrano, F.J., Wenck, M.A., Eakin, A.E. & Craig, S.P. (2003) Functional roles for amino acids in active site loop II of a hypoxanthine phosphoribosyltransferase. Biochim. Biophys. Acta 1650, 105-116.
- Monzani, P.S., Alfonzo, J.D., Simpson, L., Oliva, G. & Thiemann, O.H. (2002) Cloning, characterization and preliminary crystallographic analysis of *Leishmania* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, Biochim. Biophys. Acta 1598, 3-9.
- Munagala, N., Basus, V.J. & Wang, C.C. (2001) Role of the flexible loop of hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase from *Tritrichomonas foetus* in enzyme catalysis. Biochemistry 40, 4303-4311.
- Munagala, N.R., Chin, M.S. & Wang, C.C. (1998) Steady-state kinetics of the hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase from *Tritrichomonas foetus*: the role of threonine-47. Biochemistry 37, 4045-4051.
- Page, J.P., Munagala, N.R. & Wang, C.C. (1999) Point mutations in the guanine phosphoribosyltransferase from *Giardia lamblia* modulate pyrophosphate binding and enzyme catalysis. Eur. J. Biochem. 259, 565-571.
- Raman, J., Sumathy, K., Anand, R.P. & Balaram, H. (2004) A non-active site mutation in human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase expands substrate specificity. Arch. Biochem. Biophys. 427, 116-122.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. (2001) Molecular Cloning: A laboratory Manual. Third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schumacher, M.A., Carter, D., Roos, D.S., Ullman, B. & Brennan, R.G. (1996) Crystal structures of *Toxoplasma gondii* HGXPRTase reveal the catalytic role of a long flexible loop. Nat. Struct. Biol. 3, 881-887.
- Seegmiller, J.E., Rosenbloom, F.M. & Kelley, W.N. (1967) Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. Science 155, 1682-1684.
- Shi, W., Li, C.M., Tyler, P.C., Furneaux, R.H., Cahill, S.M., Girvin, M.E., Grubmeyer, C., Schramm, V.L. & Almo, S.C. (1999a) The 2.0 Å structure of malarial purine

- phosphoribosyltransferase in complex with a transition-state analogue inhibitor. *Biochemistry* 38, 9872-9880.
- Shi, W., Li, C.M., Tyler, P.C., Furneaux, R.H., Grubmeyer, C., Schramm, V.L. & Almo, S.C. (1999b) The 2.0 Å structure of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in complex with a transition-state analog inhibitor. *Nature Struct. Biol.* 6, 588-593.
- Silva, J.L., Miles, E.W. & Weber, G. (1986) Pressure Dissociation and Conformational Drift of the p Dimer of Tryptophan Synthase? *Biochemistry* 25: 5780-5786.
- Sinha, S.C. & Smith, J.L. (2001) The PRT protein family. *Cur. Opi. Struct. Biol.* 11, 733-739.
- Sommer, J. M., Ma, H. & Wang, C. C. (1996) Cloning, expression and characterization of an unusual guanine phosphoribosyltransferase from *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 78, 185-193.
- Somoza, J.R., Chin, M.S., Focia, P.J., Wang, C.C. & Fletterick, R.J. (1996) Crystal structure of the hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase from the protozoan parasite *Tritrichomonas foetus*. *Biochemistry* 35, 7032-7040.
- Sujay Subbayya, I.N. & Balaram, H. (2000) Evidence for multiple active states of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 433-437.
- Sujay Subbayya, I.N., Sukumaran, S., Shivashankar, K. & Balaram, H. (2000) Unusual substrate specificity of a chimeric hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase containing segments from the *Plasmodium falciparum* and human enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 596-602.
- Svergun, D.I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Cryst.* 25, 495-503.
- Svergun, D.I. (1999) Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing. *Biophys. J.* 76, 2879-2886.
- Volkova, V.V. & Svergun, D.I. (2003) Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Cryst.* 36, 860-864.
- Wenck, M.A., Medrano, F.J., Eakin, A.E. & Craig, S.P. (2004) Steady-state kinetics of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta* 1700, 11-18.
- Xu, Y., Eads, J., Sacchettini, J.C. & Grubmeyer, C. (1997) Kinetic mechanism of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: rapid phosphoribosyl transfer chemistry. *Biochemistry* 36, 3700-3712.

- Yuan, L., Craig, S.P., McKerrow, J.H. & Wang, C.C. (1990) The hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase of *Schistosoma mansoni*. Further characterization and gene expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265, 13528-13532.
- Yuan, L., Craig, S.P., McKerrow, J.H. & Wang, C.C. (1992) Steady-State Kinetics of the Schistosomal Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase *Biochemistry* 31, 806-810.
- Yuan, L., Wu, C.S., Craig, S.P., Liu, A.F. & Wang, C.C. (1993) Comparing the human and schistosomal hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* 1162, 10-16.

ANEXO



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbapap

Biochemical and structural characterization of the hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase from *Pyrococcus horikoshii*

Deyse de Souza Dantas^a, Camila Ramos dos Santos^b,
Gonçalo Amarante Guimarães Pereira^a, Francisco Javier Medrano^{a,*}

^a Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução, IB - UNICAMP, Caixa Postal 6109, CEP 13083-970, Campinas, Brazil

^b Laboratório de Cristalografia de Proteínas, Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Caixa Postal 6192, CEP 13084-971, Campinas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2008
Received in revised form 6 March 2008
Accepted 7 March 2008
Available online 20 March 2008

Keywords:

Hypoxanthine-guanine-xanthine
phosphoribosyltransferase
HGXPRT
Pyrococcus horikoshii

ABSTRACT

The 6-oxopurine phosphoribosyltransferase (HPRT, EC 2.4.2.8) from the hyperthermophile *Pyrococcus horikoshii* was expressed in *Escherichia coli* and purified. Steady-state kinetic studies indicated that the enzyme is able to use hypoxanthine, guanine and xanthine. The first two substrates showed similar catalytic efficiencies, and xanthine presented a much lower value (around 20 times lower), but the catalytic constant was comparable to that of hypoxanthine. The enzyme was not able to bind to GMP-agarose, but was able to bind the other reverse reaction substrate, inorganic pyrophosphate, with low affinity (K_d of 4.7 ± 0.1 mM). Dynamic light scattering and analytical gel filtration suggested that the enzyme exists as a homohexamer in solution.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Purine nucleotides can be generated via either de novo or the salvage pathways [1,2]. These nucleotides play a critical role in a number of cell functions, including synthesis of DNA and RNA, and biogenesis such as ATP supply. The two pathways are inter-related and may impose regulation on each other. They share one common substrate, α -D-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP), which maintains a balance between the two pathways. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.8, HPRT) is a key enzyme in the salvage pathways for purine nucleotide synthesis. It catalyzes the reversible transfer of the 5-phosphoribosyl group from PRPP to the N9 in the 6-oxopurine bases hypoxanthine or guanine to form the nucleotides inosine 5'-monophosphate (IMP) or guanosine 5'-monophosphate (GMP), respectively. The enzyme of some species is able to use the purine base xanthine. This enzyme is indispensable in humans and mutations resulting in HGPR deficiency leads to Gout [3] as well as the Lesch-Nyhan syndrome [4,5]. Many parasitic organisms are deficient in de novo synthesis of purine nucleotides, and therefore must rely on the salvage pathways [6]. This makes them a good target for the design of antiparasitic drugs [7–9].

HGPRTs belong to the type I phosphoribosyltransferases that also include orotate phosphoribosyltransferases and glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferases [10]. They share a common core tertiary structure, resembling a typical Rossmann dinucleotide-

binding fold. This common core region consists of four or five-stranded parallel β -sheet sandwiched between three or four α -helices and a hood domain offers residues that complete the active site [11–14]. The active site is composed, in part, by four loops that play important roles during the reaction. Loop I is composed by three residues located at the interface between the monomers that form the dimer, and it is also involved, somehow, in the recognition of the mononucleotide [15,16]. The presence of arginine at the center position of the loop hampers the binding of the nucleotide rendering, essentially, an enzyme not capable of the pyrophosphorolysis reaction [15,16]. Any other amino acid occurring naturally at this position has no interference with this reaction. Loop II is highly flexible and closes onto the substrates during catalysis shielding the active site from the bulk solvent [17]. Loop III is the most conserved of the loops and forms the binding site for the phosphate moiety of the nucleotide or the 5'-phosphate of the PRPP. Loop IV contributes with residues that bind the nitrogenated base, one of the magnesium ions and one phosphate form of the PRPP or the inorganic pyrophosphate [17].

HGPRTs have been reported to exist as dimers; *Trypanosoma cruzi* [18] or tetramers; human [13], *Toxoplasma gondii* [19] and *Thermoanaerobacter tengcongensis* [20], in solution. In the case of the HGPR from *Plasmodium falciparum* the oligomeric state of the purified has been related to its stability and enzymatic activity [21]. The biological relevance of the tetramers has been questioned in some cases because the only indication of its presence has been inferred from the crystallographic structure.

Pyrococcus horikoshii OT3 is a hyperthermophilic archaeon that was isolated from the hot waters of the Okinawa trench in 1992 [22]. This organism is an obligate anaerobe that grows at temperatures between 88 °C and 104 °C with the optimal temperature of 98 °C in the

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3521 6651; fax: +55 19 3521 6235.
E-mail address: javier@lge.ibi.unicamp.br (F.J. Medrano).

presence of sulfur, and possessing circular genomic DNA [22]. Analysis of the 1.74 MB genome of this archaea revealed the presence of one *hprt* gene encoding a putative purine phosphoribosyltransferase. This protein has 153 amino acids presenting similarity with other members of the HGPRT family. Due to the extreme thermal stability this protein is suitable for use in an extreme environment and has potential industrial value for the production of nucleotide intermediates. The amino acid sequence of this enzyme shows some differences with respect to other members of this family (Fig. 1), especially at the loops forming the active site. This raises the question whether this gene codes for a real HGPRT or if it has a specific requirement for the purine base.

The three-dimensional structure of this protein has been solved by the Riken structural genomics/proteomics initiative from Japan and deposited in the protein data bank (access code 1VDM). This structure will help us to obtain some insights into the structure–function relationship of this protein and better understand our biochemical data.

Here we report the cloning of the *hprt* gene from *P. horikoshii*, the expression in *Escherichia coli*, purification of the recombinant protein (PhHGXPRT), and characterization of the enzymatic activity, specificity and oligomeric state of the protein. The protein is able to use hypoxanthine, guanine and xanthine characterizing it as a hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase (HGXPRT); unable to bind nucleotides but it binds inorganic pyrophosphate. In solution, the protein is present as a hexamer. In this study we try to relate the differences present at the active site loops and the biochemical characteristics of the protein.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Restriction endonucleases, T4 DNA ligase, Taq DNA polymerase, nucleotides, DNA and protein molecular-mass markers were from Fermentas (São Paulo, Brazil). Oligonucleotide primers for PCR were obtained from Invitrogen Life Technologies (São Paulo, Brazil). Genomic DNA from *P. horikoshii* was obtained from the ATCC (USA). The QIAquick PCR purification kit, QIAprep spin miniprep kit and the QIAquick gel extraction kit were from Qiagen (Hilden, Germany). Hi-Trap chelating columns were from Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). GMP-agarose was from Sigma (São Paulo, Brazil). All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Cloning of the *hprt* gene from *Pyrococcus horikoshii*

The *hprt* gene from *P. horikoshii* was amplified by PCR from purified genomic DNA obtained from the ATCC using the oligonucleotide primers 5'-CATATGGACAAGGTC-TATCTAAC-3' and 5'-CTCCAGTTACTCTTCTCAACTACTGGG-3' based on the sequence of the gene. The primers were designed to generate products with vector cohesive overhangs (underlined), for efficient cloning into expression vectors. The PCR product was cloned into the pGEM-T-Easy vector (Promega) resulting in the plasmid pGEM-PhPRT. The gene was digested out of the plasmid pGEM-PhPRT with the restriction endonucleases *Nde*I and *Xho*I, and cloned into the pET15b vector (Novagen), previously digested with the same enzymes, resulting in the plasmid pPhPRT. PCR products and plasmids were purified using the Qiagen kits according to the manufacturer's instructions. This vector is designed for the heterologous protein expression in *E. coli* producing a protein with a tag of six histidines at the amino terminus to facilitate the purification of the protein. *Escherichia coli* DH5 α was used for the propagation of recombinant plasmids. *E. coli* BL21 Star™ (DE3) cells (Invitrogen) were transformed with the plasmid pPhPRT and used for protein expression. The correct sequence of the gene cloned into the vectors was verified by DNA sequencing. All of the DNA manipulation including digestion with restriction enzymes, agarose gel electrophoresis, purification of DNA fragments, and ligation with T4 DNA ligase were performed as described by Sambrook [23].

2.3. Expression

The cells were grown in Terrific Broth medium [23] containing ampicillin (100 μ g/ml) at 30 °C, 200 rpm, for 16 h. An aliquot of 5 ml of an overnight culture of *E. coli* BL21 Star™ (DE3) strain containing the recombinant pPhPRT plasmid was used to inoculate 500 ml of the same medium. Expression of recombinant protein was induced by the addition of lactose to a final concentration of 10 mM and cultivated for 16 h at 30 °C. Cells were harvested by centrifugation at 6,000 g and 4 °C for 10 min. They were resuspended in 5 ml lysis buffer (0.1 M Tris-HCl buffer at pH 8.0 containing 1% Triton X-100 (v/v)). Protein expression was analyzed using gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to Laemmli [24] and stained with Coomassie brilliant blue R-250 [25].

2.4. Purification

The recombinant protein carrying a 6xHis tag was purified by Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) using a Hi-Trap chelating column loaded with Ni²⁺ as the affinity metal. Cells were broken using a sonifier (Sonic Vibra-cell) at 40% maximum intensity (3 \times 30 s). Streptomycin sulfate, 2% (w/v), was added to the cell extract and incubated for 30 min at 4 °C with continuous stirring to precipitate the nucleic acids. The extract was then treated at 70 °C for 1 h. Insoluble material was removed by centrifugation at 38,000 g for 1 h at 4 °C. The soluble extract was loaded into the column pre-equilibrated with buffer A (0.1 M Tris-HCl at pH 7.5 containing 0.5 M NaCl and 5 mM imidazole), the column was washed until no protein came out of

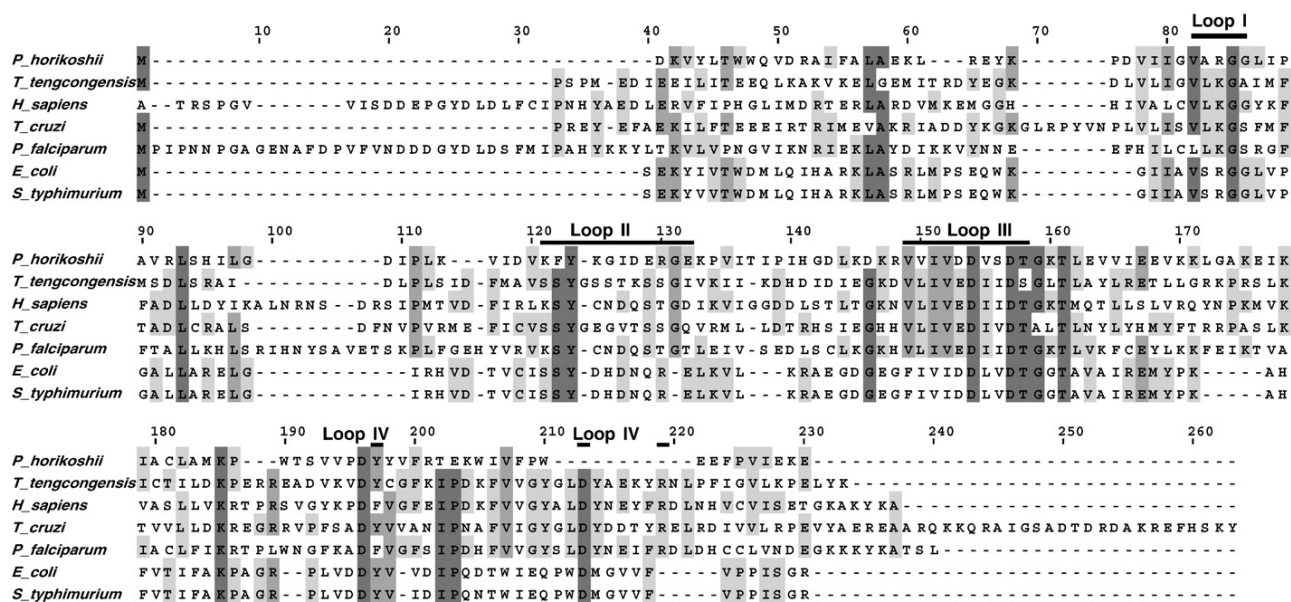


Fig. 1. Alignment of the amino acid sequence of PhHGXPRT with those sequences from the 6-oxopurine phosphoribosyltransferases from *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Homo sapiens*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Residues highlighted in dark grey represent conserved residues. Position of loop I (A34–R35–G36, analogous with human L67, K68 and G69), loop II (K59–E69, 11 residues, (analogous with human K102–D112) and loop III (V86–T95, 10 residues, analogous with human V129–T138) are indicated by a line on top of the sequence. Loop IV cannot be identified in the sequence of PhHGXPRT, but the residues that make this loop in the mammalian and protozoan enzyme are labelled by a line on top of the sequence.

it, additional washes with 25, 50 and 100 imidazole in buffer A were performed, and the PhHGXPRT protein was eluted with 200 mM imidazole. Purity of the protein was analyzed by SDS-PAGE.

2.5. Elimination of the histidine tag

The histidine tag was cleaved out of the recombinant protein with thrombin, 1% (w/w). The digestion was carried out in 10 mM Tris–HCl buffer at pH 7.5 for 2 h at room temperature. The reaction was stopped by the addition of PMSF (1 mM). The cleaved histidine tag was removed by a second metal affinity chromatography. The protein without the tag was eluted without imidazole. The tag and the undigested protein remained in the column and were eluted with 200 mM imidazole.

2.6. Protein determination

The concentration of the recombinant protein without the histidine tag was determined using the absorption at 280 nm using an extinction coefficient of $1.98 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ calculated on the basis of its amino acid composition [26]. There was no significant difference between the absorption of the protein in 10 mM Tris–HCl buffer at pH 7.5 in the absence or in the presence of 6 M guanidine hydrochloride. Therefore, the absorption of the protein was measured, routinely, in the absence of the denaturant.

2.7. Enzymatic activity

A continuous spectrophotometric assay was used for PhHGXPRT activity studies [16,27,28]. Data were collected using a Beckman DU 640 spectrophotometer equipped with a kinetics accessory. The formation of inosine monophosphate (IMP), guanosine monophosphate (GMP) and xanthosine monophosphate (XMP) were monitored continuously by the change in absorbance at 245, 257.5 and 252 nm, respectively. All measurements were carried out in 100 mM Tris–HCl, pH 7.5, and 12 mM MgCl_2 . Under these conditions, the extinction coefficients for IMP, GMP and XMP were 3020, 5340 and $5660 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectively. The final volume of the assay mixture was 1 ml, containing 25 μg in the 40 and 50 °C experiments or 5 μg in the 60 and 70 °C experiments of the wild type enzyme, plus various concentrations of substrates. Forward, purine salvage, reactions were monitored for 30 s.

Apparent K_m and V_{max} values were determined by non-linear regression assuming Michaelis–Menten kinetics. Calculations were carried out using the program Origin from Origin Lab Corporation.

2.8. GMP-agarose binding

Binding experiments to GMP-agarose were performed at 25 and 75 °C. The protein was in 10 mM Tris–HCl buffer at pH 7.5 containing 6 mM MgCl_2 . Pure protein (2 μg in 100 μl) was loaded onto the GMP-agarose column, and then the column was washed with 10 mM Tris–HCl buffer at pH 7.5 containing 6 mM MgCl_2 . The bound protein was eluted with the same buffer containing 5 mM GMP. Fractions were analyzed by SDS-PAGE.

2.9. Pyrophosphate binding

Binding of inorganic pyrophosphate (PPi) to the protein was monitored by the quenching of the intrinsic fluorescence of the protein. Fluorescence measurements were carried out in an Aminco BOWMAN series 2 spectrofluorometer. Excitation and emission bandwidths were 8 and 16 nm, respectively. The fluorescence cell (1 × 0.4 cm)

was mounted on a thermostated holder. The excitation wavelength used was 280 nm and the emission spectra were recorded between 310 and 400 nm. All measurements were performed in 100 mM Tris–HCl, pH 7.5 containing 6 mM MgCl_2 at 25 °C and a protein concentration of 0.02 mg/ml. The ratio between the fluorescence from the unquenched protein (no ligand) and the fluorescence of the quenched protein in the presence of different concentrations of the ligand was used to calculate the binding constant.

2.10. Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism measurements were carried out on a JASCO J-810 spectropolarimeter, equipped with a Peltier-type temperature controller and a thermostated cell holder, interfaced with a thermostatic bath. The far-UV spectrum was recorded in a 0.1 cm path length quartz cell at a protein concentration of 0.1 mg/ml, and near-UV spectrum was recorded in a 1 cm path length quartz cell at a protein concentration of 0.5 mg/ml. The protein was in 10 mM Tris–HCl buffer at pH 7.5. Five consecutive scans were accumulated and the average spectra stored. The data were corrected for the baseline contribution of the buffer and the observed ellipticities were converted into the mean residue ellipticities $[\theta]$ based on a mean molecular mass per residue of 115 Da. Secondary structure was estimated from fitted far-UV CD spectra using the CDNN software package [29].

2.11. Dynamic light scattering

Dynamic light scattering experiments were carried out using a DynaPro instrument (Protein Solutions Inc.). The measurements were carried out at 25 °C. A solution of protein with a concentration of 0.5 mg/ml in 10 mM Tris–HCl buffer at pH 7.5 containing 6 mM MgCl_2 was used. The protein solution was centrifuged at 20,000 g at 4 °C for 1 h before DLS analysis. The software provided by the manufacturer was used to calculate the hydrodynamic parameters of the protein assuming a spherical shape. At least 500 measurements of 10 s were acquired for the sample.

2.12. Size exclusion chromatography

Gel filtration experiments were carried out using a HR 10/30 Superdex 200 column in an Äkta FPLC apparatus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) at a flow rate of 0.5 ml/min at room temperature and the absorbance was monitored at 280 nm. 1 mg of the protein in 0.1 M Tris–HCl buffer at pH 7.5 containing 6 mM MgCl_2 and 0.1 M NaCl was loaded onto the column previously equilibrated in the same buffer. The column was calibrated using protein molecular-mass standards under the same conditions.

3. Results

3.1. Expression and purification

The gene coding for the purine phosphoribosyltransferase from *P. horikoshii* (PhHGXPRT) was cloned into the expression vector pET15b. This vector adds a tag containing six histidines in order to facilitate the purification of the protein. The protein was expressed in the soluble fraction of BL21 Star™ (DE3) strain of *E. coli* (Fig. 2A). The fact that this protein comes from an extreme thermophilic organism,

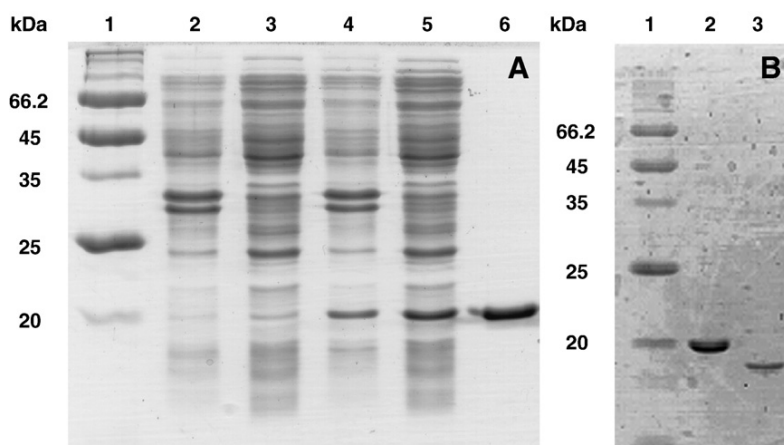


Fig. 2. Left panel – SDS-PAGE of the expression of the recombinant PhHGXPRT in *E. coli*. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, insoluble fraction before induction; lane 3, soluble before induction; lane 4, insoluble fraction after induction; lane 5, soluble fraction after induction; and lane 6, purified protein, eluted from the column with 200 mM imidazole. Right panel – Elimination of the histidine tag by thrombin digestion. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, purified protein with the histidine tag; lane 3, purified protein without the histidine tag.

optimum growth temperature of 98 °C [22], allowed us to have one purification step before the metal affinity column. It consisted of a thermal treatment of the crude cell extract at 70 °C for 1 h. During this treatment most of the expression host proteins precipitated and could be removed easily by centrifugation. After the affinity column a very pure recombinant protein was obtained (Fig. 2A).

The cloning vector also introduces a specific cleavage site for the protease thrombin. This allowed us to remove efficiently most of the amino acids of the tag introduced in the cloning step (Fig. 2B).

3.2. Steady-state kinetics

Kinetic parameters were determined for three 6-oxopurine bases (hypoxanthine, guanine and xanthine) and PRPP at different temperatures, ranging from 40 up to 70 °C. The results are summarized in Table 1. The values measured for the apparent Michaelis–Menten constant, K_m , did not change significantly with temperature for any of the substrates. The values for the catalytic constant, k_{cat} , increased with temperature for all substrates. This increase was between 3 and 4 fold for hypoxanthine and xanthine, and nearly 7 fold for guanine, going from 50 to 70 °C. We did not measure at the optimum growth temperature of *P. horikoshii*, 98 °C, but it might be expected that the values for k_{cat} will increase even more. The catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) was nearly the same for hypoxanthine and guanine showing that this enzyme works as well with any of these substrates. On the other side, the catalytic efficiency for xanthine was around 20 times smaller than that obtained for the other 6-oxopurine bases. The turnover rate for this base is similar to that of the other two bases, but the value of K_m is considerable higher. This indicates that hypoxanthine and guanine are the preferred substrates, and that the enzyme should be able to use also xanthine, although, with less efficiency.

We also carried out experiments for the pyrophosphorolysis reaction (formation of PRPP and purine base) in order to determine the kinetic parameters. We were not able to observe any significant change in the absorption signal used to follow up the reaction even at the highest concentration of the substrates, 500 μ M, or at the temperature range used, 40 to 70 °C (data not shown). Thus, we are assuming that the PhHGXPRT is unable to carry out this reaction.

3.3. Binding to GMP-agarose

The PhHGXPRT was unable to bind to a resin of GMP-agarose (Fig. 3). The protein went through the column and eluted on the first fraction of the chromatography. The temperature of the experiment did not make any difference. The protein was not able to bind to the column at the two temperatures tested, 25 and 75 °C. Binding of mononucleotides by the 6-oxopurine phosphoribosyltransferases, and consequently, carrying out the pyrophosphorolysis of mononucleotides depends on the amino acid present on the second position of active site loop I. This enzyme presents an Arg at this position (Fig. 1).

Table 1

Steady-state kinetic parameters for nucleotide formation reaction catalyzed by the HGXPRT from *P. horikoshii*

Temperature (°C)	Variable hypoxanthine			Variable PRPP		
	$K_m(\mu\text{M})$	$k_{cat}(\text{min}^{-1})$	$k_{cat}/K_m(\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1})$	$K_m(\mu\text{M})$	$k_{cat}(\text{min}^{-1})$	$k_{cat}/K_m(\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1})$
40	3.88±0.33	22.5±0.5	5.79	42.8±0.9	39.7±1.9	0.93
50	7.02±1.04	49.7±2.2	7.08	41.2±1.6	28.5±0.9	0.69
60	4.83±0.49	83.0±2.0	17.19	28.2±1.5	100.7±3.7	3.57
70	6.10±1.43	189.5±4.7	31.07	36.9±2.4	183.0±4.3	4.96
	Variable guanine			Variable xanthine		
50	4.85±0.56	12.7±0.3	2.62	101.2±10.1	40.7±2.5	0.40
70	3.26±0.29	85.7±1.2	26.31	95.0±8.4	131.8±4.7	1.39

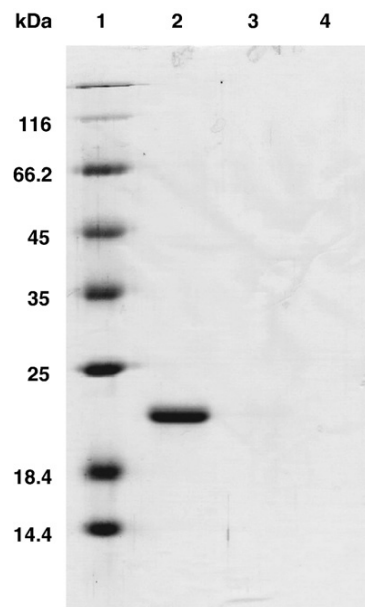


Fig. 3. Binding of PhHGXPRT to GMP-agarose analyzed by SDS-PAGE. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, flow-through eluate (unbound fraction); lane 3, first wash (without GMP); and lane 4, eluate with 5 mM GMP.

This amino acid is only present in the HPRTs of a few Gram-negative bacteria [15].

3.4. Binding to inorganic pyrophosphate

Inorganic pyrophosphate (PPi) is the second substrate in the pyrophosphorolysis reaction, together with a 6-oxopurine mononucleotide (IMP, GMP or XMP) for this type of enzymes. Fig. 4 shows the binding of this substrate to PhHGXPRT measured by the quenching of the intrinsic fluorescence of the protein. PPi showed a weak binding to the enzyme with an apparent K_d of 4.7 ± 0.1 mM.

3.5. Oligomerization

Fig. 5 shows the result of the size exclusion chromatography for the PhHGXPRT. The molecular weight of the enzyme was 103.1 ± 3.5 kDa. This corresponds to the presence of a hexamer. Dynamic light scattering

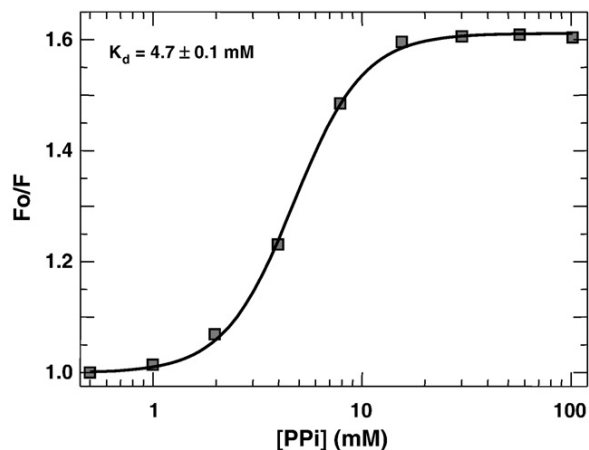


Fig. 4. Binding isotherm of PPi to PhHGXPRT. Intrinsic fluorescence quenching data. The line represents the fit to these data obtained using the program ORIGIN.

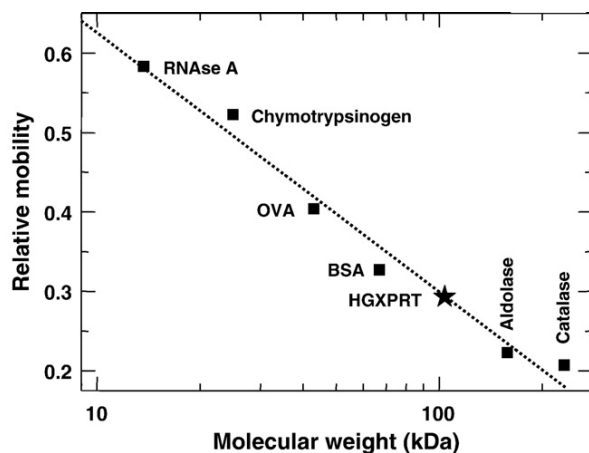


Fig. 5. Size exclusion chromatography of the recombinant PhHGXPRT. Catalase (232 kDa), aldolase (158 kDa), bovine serum albumin (BSA, 66 kDa), ovalbumin (OVA, 43 kDa), and ribonuclease A (RNase A, 13.7 kDa) were used as molecular weight standards. The star represents the recombinant PhHGXPRT.

performed with the protein showed a radius of gyration of 4.3 nm that corresponds also to a molecular weight of 103.0 ± 2.4 kDa. Because both techniques gave the same result we are assuming that this enzyme is present as a hexamer in solution.

3.6. Circular dichroism

The far-UV circular dichroism spectrum of PhHGXPRT (Fig. 6A, solid line) presents one relative maximum at 194 nm, one relative minimum at 209 nm and two shoulders at 217 and 227 nm. This spectrum looks very different to that of *Trypanosoma cruzi* (Fig. 6A, broken line) that present one minimum at 221 nm. These differences in the circular dichroism spectra might represent a different conformation between both proteins. The near-UV circular dichroism spectrum of PhHGXPRT is shown in Fig. 6B. The spectrum presents a relative maximum at 280 nm and a shoulder at 290 nm. This showed that the recombinant protein is folded.

An estimation of the secondary structure content of the protein using the far-UV spectrum showed a 14.5% of α -helix, 34.5% of anti-parallel β -sheet, a 4.2% of parallel β -sheet, a 22.1% of β -turns and 25.4% of random coil. The prediction of the secondary structure content using the program PSIPRED [30] gave a content of 30.1% of α -helix, 27.5% of β -sheet and 42.4% of random coil. Discrepancies between estimation and prediction of the secondary structure of proteins are

expected, mainly due to the poor accuracy in the estimation procedure performed using circular dichroism data. This estimation is based on the existence of five different components contributing to the spectrum. The number of components present in proteins that contribute to the circular dichroism spectra is higher than those used by the estimation programs, and its contribution is very difficult to estimate. Other components include aromatic amino acids and disulfide bridges.

4. Discussion

Here we present the initial biochemical and structural characterization of a hyperthermophilic 6-oxopurine PRT from the hyperthermophilic archaea *P. horikoshii*. This is the first study of a hyperthermophilic HPRT. Thermophilic and hyperthermophilic proteins are being studied for its applications in biotechnology, and for the information they provide about protein stability. PhHGXPRT could be stored at 4 °C for several months without any apparent loss of activity, and without the use of any stabilizing agents, indicating a great stability.

The secondary structure content of this protein, obtained from its three-dimensional structure (access code 1VDM), is composed by 25.5% of α -helix and 30.1% of β -sheet. These numbers are closer to the computer prediction than to the estimation of the secondary structure content obtained from the CD data. This shows that CD data should be taken very carefully in relation to the secondary structure due to the influence of many other components of protein structure and composition on the CD spectra.

The enzymatic activity of the PhHGXPRT presented a strong dependence with temperature, as can be expected for proteins from hyperthermophilic organisms. The protein presented a measurable activity at the lower temperature assayed (40 °C). This activity increased as the temperature was raised, up to 70 °C. This activity is expected to increase with a further increase in temperature, considering that the optimal temperature growth for this archaea is 98 °C [22]. Measurements above the highest temperature used here are difficult due to the problematic handling of the samples and to the quick temperature shifts that can, most likely, take place working at these high temperatures. The temperature did not have a significant effect on the K_m values obtained for hypoxanthine, guanine, xanthine and PRPP (Table 1). Hypoxanthine and guanine presented values of K_m similar to most of those reported [21,31–40]. The comparison of the K_m values for PRPP is complicated due to the fact that it varies a lot among the different species and, as is the case for the human enzyme, this value changes with the experimental conditions used to measure it [21,32,34,35]. However, the values of the catalytic constant increased markedly with the temperature (Table 1). In the 50 to 70 °C temperature range the k_{cat} increased 3.8 times for hypoxanthine, 6.7

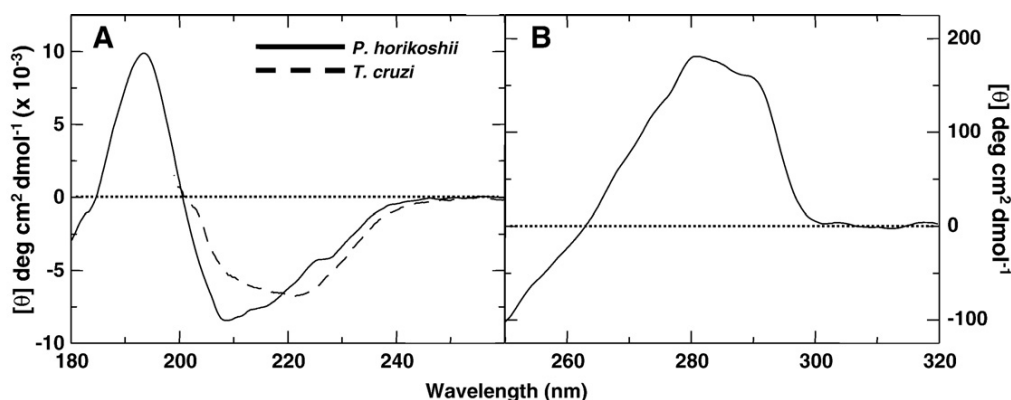


Fig. 6. Circular dichroism spectra of PhHGXPRT (continuous line), and HPRT from *T. cruzi* (dashed line). Panel A, Far-UV region, and panel B, Near-UV region.

times for guanine, 3.2 times for xanthine and 6.4 times for PRPP. A further increase might be expected up to the optimal growth temperature of the organism.

We consider that the protein is able to use xanthine as a substrate, even with much less efficiency in comparison to hypoxanthine and guanine, because of the similar k_{cat} presented by this substrate to the other 6-oxopurine bases. These data would indicate that the substrate does not bind easily but when it binds the conformation is very favorable for the catalytic reaction.

HPRTs exist in solution as dimers or tetramers [10]. It seems that the oligomerization state of the HPRTs might have a role in catalysis and stabilization of the active conformation as well as in the overall stability of the protein. Our data (Fig. 5) indicates that the PhHGXPRT is a homohexamer in solution. This enzyme consists of only 153 amino acids, one of the smallest HPRTs. A closer look at the alignment (Fig. 1) with other HPRTs showed that this small size is due to the elimination of loops present in the other structures. The aggregation state, together with this small and more compact size should contribute to the extreme thermal stability of this protein. The crystal structure has a dodecamer in the asymmetric unit. This dodecamer is made up by two hexamers and these are composed by three dimers, being a trimer of dimers. A close inspection of the surface interaction between the two hexamers in the asymmetric unit shows that most of the interactions are electrostatic. This, together with our data, indicates that the dodecamer exists only in the crystal and the only oligomer present in the solution is the hexamer. Preliminary SAXS data indicate that this oligomerization state is maintained even at high concentrations (~20 mg/ml, data not shown).

The alignment of the sequence of this protein with several well characterized 6-oxopurine PRTs shows marked differences. Some of the characteristics of a purine PRT are present in the sequence. Sequence motifs of loop I (A34–R35–G36, analogous with human L67, K68 and G69), II (K59–E69, 11 residues, analogous with human K102–D112) and III (V86–T95, 10 residues, analogous with human V129–T138) can be clearly identified, although, with some significant differences at the first two loops. In this alignment it is not possible to recognize the residues characteristic of loop IV.

Active site loop I is composed of three amino acids with the peptide bond between the first two in *cis* conformation [43–46]. Of those residues the first (Human L67) and the last (Human G69) were considered to be invariant, this conservation being important for its function [17,18,41]. The first residue of this loop is important for the binding of one oxygen from the PRPP or PPI. The HPRT from *T. cruzi* was able to accommodate only Met at this position without losing its solubility, but its catalytic efficiency was greatly reduced [41]. Any other residue, at this position, rendered the recombinant protein insoluble, indicating a role in maintaining the structure of the protein [41]. Most of the sequences present a Leu at this position showing a big pressure to maintain it. The second most abundant residue is Met (20 out of 113 species). No biochemical data are available for any of these species, so, it remains uncertain if these sequences represent true HPRTs. Alanine is found in seven species, three of them are bacteria (*Corynebacterium diphtheriae*, *Streptomyces coelicolor* and *Thermus thermophilus*) and four species of the archaea (*P. abyssi*, *P. furiosus*, *P. horikoshii* and *Thermococcus kodakarensis*). Finally, there is one sequence with a valine present at this position (*Coxiella burnetii*). In this last case all the other sequences characteristic of loop II, III and IV are present indicating that it might be a real HPRT. The third residue of the loop is a Gly (human G36), conserved in all sequences deposited in the data banks that can be recognized as HPRTs (113 species). This conservation indicates a strong pressure on this position, showing the importance of the presence of a small residue at this position. The amino acid in the middle of loop I is the one presenting the highest variability. The most frequent residues at this position are Lys and Arg (human K68). This residue is important to determine the specificity towards the nucleotide monophosphate, and the existence of the

pyrophosphorolysis (reverse) reaction. The presence of Lys will allow this reaction to take place, but Arg at this position will prevent the protein from binding the mononucleotide hampering the reaction [15,16].

The sequence ARG is present in the loop I sequence of PhHGXPRT. GMP-agarose binding (Fig. 3) and enzymatic activity experiments (not shown) show that the protein is not able to bind and, consequently, fails to present pyrophosphorolysis activity. This result corroborates previously published data on several bacterial HPRTs [15,42], and the mutagenesis study on the *T. cruzi* enzyme that the presence of Arg at this position influences the binding of the mononucleotide by subtle long range conformational changes [16]. We were able to measure the binding of the substrate PPI to the protein by the intrinsic fluorescence quenching of the protein. The kinetic mechanism of the human and three parasites have been studied, and reported as being an ordered bi–bi reaction mechanism in which the PRPP binds before the purine base, and then pyrophosphate (PPI) is released, followed by the purine ribonucleotide [27,31,35,37]. Kinetic studies with the human enzyme showed that product release is largely ordered with PPI leaving the enzyme first, but either product could be release from the ternary complex [35]. PPI is, essentially, the second substrate to bind to the enzyme, but it has been demonstrated that it can bind to the enzyme and form an “enzyme–PPI–hypoxanthine” dead-end complex [35]. We can see that the binding affinity of this compound is low and similar to other HPRTs [31]. This indicates that the conformation HPRTs adopt that hampers the binding of the nucleotide does not affect the binding of the PPI. Also, it might be an indication that PhHGXPRT follows an ordered bi–bi reaction mechanism.

Active site loop II is very flexible and closes over the active site during the catalytic reaction. The main feature of this loop is the presence of a conserved dipeptide, Ser104–Tyr105, extremely important for the catalytic activity. Several studies showed that the substitution of the Ser for any residue renders a very inactive enzyme, and that the Tyr105 can only be substituted by another aromatic residue [38,47]. Ser104 is much conserved, but not present in all sequences of HPRTs. There are three other residues at this position. The second residue more represented is Arg104. This residue is present in 17 bacterial species (out of 113). Phe104 is present in seven species, and there is one organism that has a Leu104 at this position (*Aeropyrum pernix*). The second residue of this dipeptide, Tyr105, is conserved in all sequences. This indicates its importance for the enzymatic activity, as indicated by the mutagenesis studies. Even being able to be substituted by another aromatic residue *in vitro*, there is no other type of residue present at this position in nature, indicating its critical role for the activity. The sequence of loop II from *P. horikoshii* presents the dipeptide Phe104–Tyr105. In the crystal structure some of the residues of the loop are not well defined in most of the monomers, only one monomer was designed with all the residues in the loop, and those residues present in the pdb file have high temperature factors, indicating high flexibility. This flexibility is a very important characteristic that is present, even, in HPRTs from thermophilic [20] and hyperthermophilic organisms (*P. horikoshii*, 1VDM). In any case, the flexibility of this loop does not appear to have an important impact on the stability of HPRTs. Human HPRT can be considered thermostable [49] while that from *P. falciparum* is poorly stable [21].

Active site loop III consists of a phosphate binding motif and one aspartic acid (human D137), important for catalysis, and a Lys residue (human K165) involved in binding and positioning of the purine base. All this residues are very well conserved in all sequences indicating the importance of the integrity of this loop for the enzymatic activity.

Active site loop IV is made up of the C-terminal end of the protein that forms a hood over the core of the protein. This loop carries one aromatic residue (human F186) involved in the binding of the purine base, one Asp (human D197) that binds one magnesium ion, and one Arg (human R199) that participates in the binding of the PRPP or PPI.

The last two residues are important for maintaining the catalytic activity and its modification leads to serious problems for the organism, as is the case of the Lesch–Nyhan syndrome in humans, where the Asp197 has been changed to Asn197 [4,5,48]. Most of the sequences present an identifiable loop IV except for some sequences, including *P. horikoshii* HGXPRT, which present a very short C-terminal end. The important residues of loop IV cannot be identified clearly.

It is interesting to note that changes in the sequence of the loops with respect to the well characterized human and protozoan HPRTs happens at the same time. Looking at the sequences of the loops the HPRTs can be placed in three different groups. The first group is made up of mammals, protozoa and most of the bacteria with a typical loop I, with the first amino acid being Leu67, with the Ser104–Tyr105 dipeptide in loop II, and a typical loop IV; the second group has a Met67 at the first position of loop I, together with a dipeptide Arg104–Tyr105 in loop II and a typical loop IV; and the third group is composed of proteins that have Ala67 or Ser67 at the first position of loop I, a dipeptide Phe104–Tyr105 in loop II, and no typical loop IV. HGXPRT from *P. horikoshii* belongs to this third group.

Our data indicates that the gene *hpert* from *P. horikoshii* codes for a proper 6-oxopurine phosphoribosyltransferase capable of catalyzing the synthesis of mononucleotides independently of the differences observed at the sequence level with respect to the well characterized human, protozoan and bacterial HPRTs. This should indicate that the folding of the protein have to be different to that of the mammalian and protozoan HPRTs in order to accommodate the changes in sequence, and still conserve its activity. Fig. 7 shows the structure of the dimer of the PhHGXPRT without substrates bound in the active site and the configuration of the residues of the active site. One can see that the configuration of loop I in the dimer is different from that of the mammalian and protozoan HPRTs. The first residue of this loop in the latter HPRTs is closer to its counterpart of the neighboring monomer and in Van der Waals' contact [41]. In *P. horikoshii* both loops are further away without direct contact between them. The presence of Arg as the second residue of the loop makes the protein unable to bind the mononucleotide and, hence, catalyze the pyrophosphorolysis reaction.

Mutagenesis studies showed that the presence of Arg at this position makes the *T. cruzi* HPRT incapable of binding the mononucleotide at physiological concentrations [16]. A possible explanation for this fact was the possibility of a communication between the monomers through this loop, due to the direct interaction between its residues. These new data point to the direction that communication between this loop and the other end of the active site, the binding site for the mononucleotide, might be through the same monomer. Although, it might be possible that both type of proteins would communicate in different ways the presence of this residue in the middle of loop I.

With the present data we cannot explain how the observed differences in loops I, II and IV will be able to compensate and accommodate the substrates in order to carry out the catalytic reaction. The conformation that the Phe104–Tyr105 dipeptide from loop II adopts in the crystal structure places the side chain of the Phe104 inside the active site. This loop will have to undergo a big conformational change if the substrate binding mode of this protein resembles the way its mammalian, protozoan and bacterial HPRTs counterparts bind them. Also the Trp located at the site of loop IV Arg199 that binds the PRPP or PPI does not look as being able to bind any of these substrates the way it is in the crystal structure. It looks possible that this protein binds the substrates in a different conformation in order to allow the catalytic reaction to take place. We have tried to obtain crystals of the protein in the presence of substrates, and we were successful, but unfortunately the crystals we have diffracted only up to 3.6 Å in the best images. The unit cell of our crystals is bigger than that reported in the pdb entry for this protein, accounting for 24 monomers in the asymmetric unit. We tried to reproduce the conditions reported, but they lack all the necessary information.

In summary, we present here data that identify the product of the *hpert* gene as a hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase, with preference for hypoxanthine and guanine. This data let us say that the group of organisms presenting similar protein sequences is, indeed, proper 6-oxopurine phosphoribosyltransferases. These organisms are the archaea *P. abyssi*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*

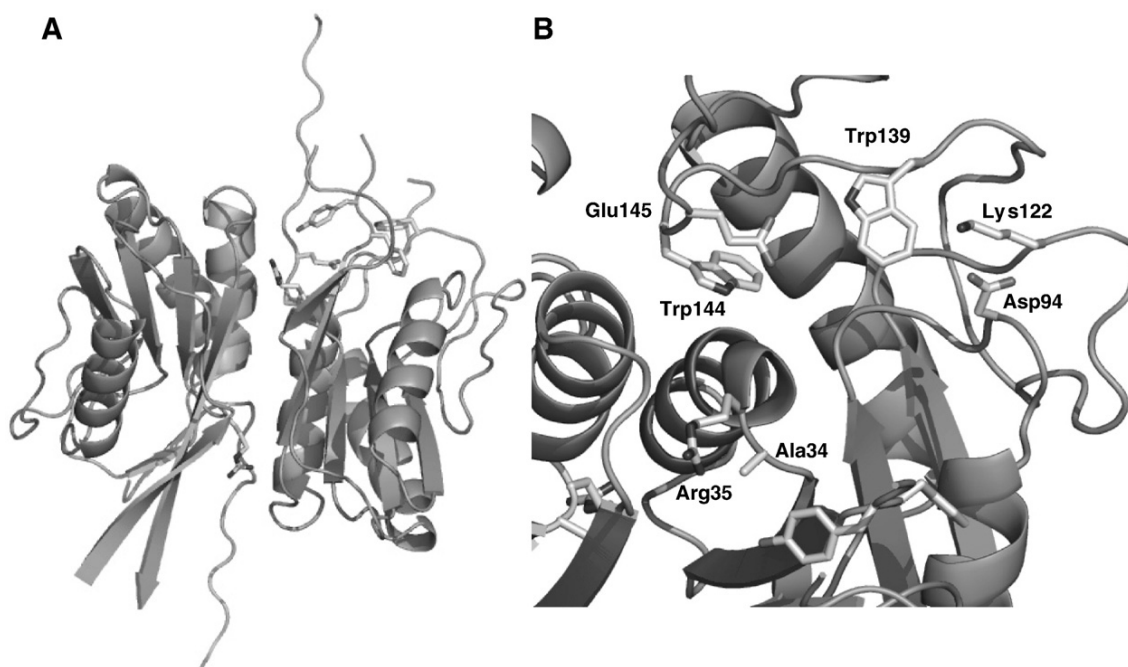


Fig. 7. Structure of PhHGXPRT (PDB access code 1VDM). Panel A, overall structure of one of the dimers. Panel B, close up of the active site. In ball and stick representation are the residues from loops I, II, III, and IV forming the active site.

and *T. kodakarensis*, and the bacteria *C. diphtheriae*, *S. coelicolor* and *T. thermophilus*.

Acknowledgements

This work was supported by grant 2003/07800-0 and the SMoIBNet and CEPID/CBME programs from the Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP). D.S. Dantas and C.R. Santos are recipients of FAPESP pre-doctoral fellowships. We would like to thank the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) for the use of the Spectroscopy and Calorimetry Laboratory.

References

- [1] D.G. Sculley, P.A. Dawson, B.T. Emmerson, R.B. Gordon, *Hum. Genet.* 90 (1992) 195–207.
- [2] A.L. Lehninger, *Biochemistry*, 2nd ed. Worth Publishers, Inc., New York, 1993.
- [3] W.N. Kelley, M.L. Greene, F.M. Rosenbloom, J.F. Henderson, J.E. Seegmiller, Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency in gout, *Ann. Intern. Med.* 70 (1969) 155–206.
- [4] M. Lesch, W.L. Nyhan, A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function, *Am. J. Med.* 36 (1964) 561–570.
- [5] J.E. Seegmiller, F.M. Rosenbloom, W.N. Kelley, Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis, *Science* 155 (1967) 1682–1684.
- [6] R.L. Berens, E.C. Krug, J.J. Marr, in: J.J. Marr, M. Müller (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*, Academic Press Inc., San Diego, CA, 1995, pp. 89–117.
- [7] C.C. Wang, Parasite enzymes as potential targets for antiparasitic chemotherapy, *J. Med. Chem.* 27 (1984) 1–9.
- [8] B. Wang, D. Carter, Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase as a therapeutic target in protozoal infections, *Infect. Agents Dis.* 4 (1995) 29–40.
- [9] S.P. Craig, A.E. Eakin, Purine salvage enzymes of parasites as targets for structure-based inhibitor design, *Parasitol. Today* 13 (1997) 238–241.
- [10] S.C. Sinha, J.L. Smith, The PRT protein family, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001) 733–739.
- [11] S.C. Craig, A.E. Eakin, Purine phosphoribosyltransferases, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 20231–20234.
- [12] G. Scapin, C. Grubmeyer, J.C. Sacchettini, Crystal structure of orotate phosphoribosyltransferase, *Biochemistry* 33 (1994) 1287–1294.
- [13] J.C. Eads, G. Scapin, Y. Xu, C. Grubmeyer, J.C. Sacchettini, The crystal structure of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase with bound GMP, *Cell* 78 (1994) 325–334.
- [14] S. Vos, J. de Jersey, J.L. Martin, Crystal structure of *Escherichia coli* xanthine phosphoribosyltransferase, *Biochemistry* 36 (1997) 4125–4134.
- [15] C.C. Lee (1999) Structure–function studies of hypoxanthine phosphoribosyltransferases. PhD thesis, University of North Carolina at Chapel Hill.
- [16] B. Canyuk, F.J. Medrano, M.A. Wenck, P.J. Focia, A.E. Eakin, S.P. Craig, Interactions at the dimer interface influence the relative efficiencies for purine nucleotide synthesis and pyrophosphorylation in a phosphoribosyltransferase, *J. Mol. Biol.* 335 (2004) 905–921.
- [17] P.J. Focia, S.P. Craig, A.E. Eakin, Approaching the transition state in the crystal structure of a phosphoribosyltransferase, *Biochemistry* 37 (1998) 17120–17127.
- [18] P.J. Focia, S.P. Craig, R. Nieves-Alicea, R.J. Fletterick, A.E. Eakin, A 1.4 Å crystal structure for the hypoxanthine phosphoribosyltransferase of *Trypanosoma cruzi*, *Biochemistry* 37 (1998) 15066–15075.
- [19] A. Héroux, E.L. White, L.J. Ross, D.W. Borhani, Crystal structures of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-GMP and -IMP complexes: comparison of purine binding interactions with the XMP complex, *Biochemistry* 38 (1999) 14485–14494.
- [20] Q. Chen, Y. Liang, X. Su, X. Gu, X. Zheng, M. Luo, Alternative IMP binding in feedback inhibition of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *J. Mol. Biol.* 348 (2005) 1199–1210.
- [21] D.T. Keough, A.-L. Ng, D.J. Winzor, B.T. Emmerson, J. de Jersey, Purification and characterization of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase and comparison with the human enzyme, *Mol. Biochem. Parasitol.* 98 (1999) 29–41.
- [22] J.M. González, Y. Masuchi, F.T. Robb, J.W. Ammerman, D.L. Maeder, M. Yanagibayashi, J. Tamaoka, C. Kato, *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough, *Extremophiles* 2 (1998) 123–130.
- [23] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- [24] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [25] G. Fairbanks, T.L. Steck, D.F. Wallach, Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane, *Biochemistry* 10 (1971) 2606–2617.
- [26] S.C. Gill, P.H. von Hippel, Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal. Biochem.* 182 (1989) 319–326.
- [27] A. Giacomello, C. Salerno, Human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. Steady state kinetics of the forward and reverse reactions, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 6038–6044.
- [28] L. Yuan, S.P. Craig, J.H. McKerrow, C.C. Wang, Steady-state kinetics of the schistosomal hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, *Biochemistry* 31 (1992) 806–810.
- [29] G. Bohm, R. Murh, R. Jaenicke, Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks, *Protein Eng.* 5 (1992) 191–195.
- [30] D.T. Jones, Protein secondary structure prediction based on position specific scoring matrices, *J. Mol. Biol.* 292 (1999) 195–202.
- [31] M.A. Wenck, F.J. Medrano, A.E. Eakin, S.P. Craig, Steady-state kinetics of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi*, *Biochim. Biophys. Acta* 1700 (2004) 11–18.
- [32] I.N. Sujay Subbaya, S. Sukumaran, K. Shivashankar, H. Balaram, Unusual substrate specificity of a chimeric hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase containing segments from the *Plasmodium falciparum* and human enzymes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272 (2000) 596–602.
- [33] I.N. Sujay Subbaya, H. Balaram, Evidence for multiple active states of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279 (2000) 433–437.
- [34] M.L. Free, R.B. Gordon, D.T. Keough, I.R. Beacham, B.T. Emmerson, J. de Jersey, Expression of active human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in *Escherichia coli* and characterisation of the recombinant enzyme, *Biochim. Biophys. Acta* 1087 (1990) 205–211.
- [35] Y. Xu, J. Eads, J.C. Sacchettini, C. Grubmeyer, Kinetic mechanism of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: rapid phosphoribosyl transfer chemistry, *Biochemistry* 36 (1997) 3700–3712.
- [36] L. Yuan, S.P. Craig, J.H. McKerrow, C.C. Wang, The hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase of *Schistosoma mansoni*. Further characterization and gene expression in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 13528–13532.
- [37] N.R. Munagala, M.S. Chin, C.C. Wang, Steady-state kinetics of the hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase from *Trichomonas foetus*: the role of threonine-47, *Biochemistry* 37 (1998) 4045–4051.
- [38] A. Jardim, B. Ullman, The conserved serine-tyrosine dipeptide in *Leishmania donovani* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase is essential for catalytic activity, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 8967–8973.
- [39] P.S. Monzani, J.D. Alfonzo, L. Simpson, G. Oliva, O.H. Thiemann, Cloning, characterization and preliminary crystallographic analysis of *Leishmania* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, *Biochim. Biophys. Acta* 1598 (2002) 3–9.
- [40] Q. Chen, D.L. You, M.H. Hu, X.C. Gu, M. Luo, S.Y. Lu, Cloning, purification and characterization of thermostable hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Prot. Expr. Purif.* 32 (2003) 239–245.
- [41] A.C. Butterworth, F.J. Medrano, A.E. Eakin, S.P. Craig, Saturation mutagenesis, complement selection, and steady-state kinetic studies illuminate the roles of invariant residues in active site loop I of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi*, *Biochim. Biophys. Acta* 1699 (2004) 87–94.
- [42] L.W. Guddat, S. Vos, J.L. Martin, D.T. Keough, J. de Jersey, Crystal structures of free, IMP-, and GMP-bound *Escherichia coli* hypoxanthine phosphoribosyltransferase, *Prot. Sci.* 11 (2002) 1626–1638.
- [43] A. Héroux, L. Ross, L.J. Ross, R.L. Davis, D.W. Borhani, Crystal structure of *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase with XMP, pyrophosphate, and two Mg²⁺ ions bound: insights into the catalytic mechanism, *Biochemistry* 38 (1999) 14495–14506.
- [44] A. Héroux, E.L. White, L.J. Ross, A.P. Kuzin, D.W. Borhani, Substrate deformation in a hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase ternary complex: the structural basis for catalysis, *Structure* 8 (2000) 1309–1318.
- [45] W. Shi, C.M. Li, P.C. Tyler, R.H. Furneaux, C. Grubmeyer, V.L. Schramm, S.C. Almo, The 2.0 Å structure of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in complex with a transition-state analog inhibitor, *Nat. Struct. Biol.* 6 (1999) 588–593.
- [46] W. Shi, C.M. Li, P.C. Tyler, R.H. Furneaux, S.M. Cahill, M.E. Girvin, C. Grubmeyer, V.L. Schramm, S.C. Almo, The 2.0 Å structure of malarial purine phosphoribosyltransferase in complex with a transition-state analogue inhibitor, *Biochemistry* 38 (1999) 9872–9880.
- [47] F.J. Medrano, M.A. Wenck, A.E. Eakin, S.P. Craig, Functional roles for amino acids in active site loop II of a hypoxanthine phosphoribosyltransferase, *Biochim. Biophys. Acta* 1650 (2003) 105–116.
- [48] H.A. Jinnah, L. De Gregorio, J.C. Harris, W.L. Nyhan, J.P. O'Neill, The spectrum of inherited mutations causing HPRT deficiency: 75 new cases and a review of 196 previously reported cases, *Mutat. Res.* 463 (2000) 309–326.
- [49] L. Yuan, C.S. Wu, S.P. Craig, A.F. Liu, C.C. Wang, Comparing the human and schistosomal hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta* 1162 (1993) 10–16.