

Determinação Estrutural da Proteína Tirosina Fosfatase B de *Mycobacterium tuberculosis*: Um Alvo Molecular Promissor para o Planejamento Baseado em Estruturas

Fernando V. Maluf ^{*1} (PG), Angela Menegatti ² (PG), Javier Vernal ² (PQ),
Hernán Terenzi ² (PQ), Adriano D. Andricopulo ¹ (PQ), Rafael V. C. Guido ¹ (PQ)

*fernandovmaluf@ursa.ifsc.usp.br

¹Laboratório de Química Medicinal e Computacional – LQMC, Instituto de Física de São Carlos, IFSC – USP; ²Centro de Biologia Molecular Estrutural, Departamento de Bioquímica, CEBIME-UFSC

Palavras Chave: tuberculose, tirosina fosfatase, cristalização

Introdução

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que 1/3 da população mundial está atualmente infectada. No ano de 2009 a doença vitimou 1,7 milhões de pessoas. A situação tem-se agravado com surgimento de cepas resistentes ao tratamento com quimioterápicos de primeira classe, especialmente pacientes imunodeprimidos e outras enfermidades associadas. Os avanços no entendimento do metabolismo e processos intracelulares essenciais do *M. tuberculosis* permitiram a identificação de novos alvos moleculares para o planejamento de quimioterápicos, dentre eles, destaca-se as proteínas tirosina fosfatases A e B (PtpA e PtpB, respectivamente). Essas biomoléculas estão associadas à modulação de atividade de proteínas do hospedeiro atuando como fatores de virulência do *M. tuberculosis*.¹ Tendo em vista o desenvolvimento de novos inibidores seletivos para a PtpA e PtpB, trabalhos integrados de biologia estrutural e química medicinal vêm sendo realizados rotineiramente numa colaboração entre os pesquisadores da UFSC e IFSC-USP.² Neste trabalho foram estabelecidas com sucesso as condições para expressão, purificação, cristalização, coleta de dados e determinação da estrutura 3D da PtpB. O estabelecimento desses parâmetros permite a aplicação de estratégias modernas em química medicinal para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos.

Resultados e Discussão

Um sistema de expressão em *Escherichia coli* BL21(DE3) foi construído e otimizado para produção de PtpB. Em seguida, foi desenvolvido um protocolo de purificação robusto e reprodutivo que incluiu cromatografias de afinidade (Ni-NTA, Qiagen) e gel filtração (Superdex 200 10/300 GL, GE Health Science). A proteína PtpB pura foi utilizada para os ensaios de cristalização (Figura 1).

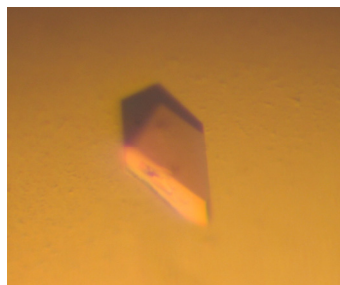


Figura 1. Cristal representativo de PtpB obtido nas condições de cristalização 50 mM KH₂PO₄ pH 5,5, 20% (m/v) PEG 8.000, 10 mM acetato de sódio, PtpB 5 mg/mL, 4 °C.

Os cristais congelados em nitrogênio líquido na presença de agente crioprotetor (20% de glicerol) foram transportados para o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) para coleta de dados cristalográficos.

Dados de difração de raios-X dos cristais de PtpB foram coletados na linha MX-2 e processados com o programa Imsflm. Os conjuntos de dados obtidos apresentaram estatísticas adequadas e altas resoluções (2.1 – 1.9 Å). As estruturas foram resolvidas por substituição molecular utilizando como modelo de busca a estrutura PDB ID, 1YWF e o programa PHASER. A construção dos modelos 3D e refinamento no espaço real foram realizadas com o programa COOT. Os dados cristalográficos coletados permitiram a determinação da posição espacial dos resíduos de aminoácidos da PtpB (Fig. 2A).

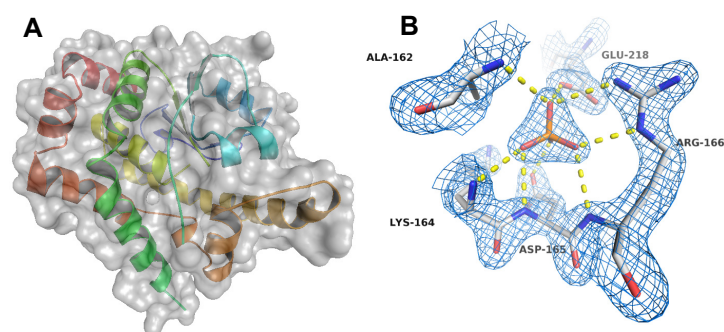


Figura 2. (A) Estrutura 3D da PtpB de *M. tuberculosis*. (B) Densidade eletrônica dos resíduos de aminoácido do sítio catalítico.

A análise detalhada dos modelos 3D construídos indicou a presença de um íon fosfato ligado numa cavidade central da estrutura. A presença desse íon, proveniente das condições de cristalização, permitiu a identificação dos resíduos de aminoácido constituintes do sítio catalítico da PtpB (Fig. 2B). Baseado nessas informações estruturais, novos ensaios de cristalização da PtpB na presença de inibidores conhecidos² serão realizados para a elucidação do modo de ligação e planejamento de novas moléculas bioativas mais potentes e seletivas.

Conclusões

A integração de estratégias modernas de biologia estrutural e química medicinal é extremamente útil para a descoberta e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos. O estabelecimento de condições adequadas de purificação e cristalização é fundamental para estudos estruturais por difração de raios-X. Esses dados permitirão que novos ensaios de cristalização sejam realizados na presença de inibidores conhecidos de PtpB para a elucidação das bases estruturais responsáveis pelo reconhecimento molecular e afinidade de ligação, bem como para guiar o planejamento de novos agentes quimioterápicos contra tuberculose.

Agradecimentos

CNPq, FAPESP, LNLS

- Bialy, L.;H. Waldmann. Inhibitors of protein tyrosine phosphatases: next-generation drugs? *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, *44*, 3814-3839.
- Mascarello, A., et al. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: Kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 3783-3789.