

Bazzo, Natália Laís^{1,2}; Previdelli, Thayane¹; Scorsato, Valéria¹; Pereira, Mariana¹; de Oliveira, Caio¹;

Fonseca, Emanuella M. B. ¹; Trivella, Daniela B. B. ¹; Aparicio, Ricardo^{1,3}

¹LABORATÓRIO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL E CRISTALOGRAFIA – INSTITUTO DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, UNICAMP

² natlbaz.ph@gmail.com ³ aparicio@iqm.unicamp.br

Palavras-Chaves: Câncer - Inibidores de Fosfatase - Biologia Estrutural

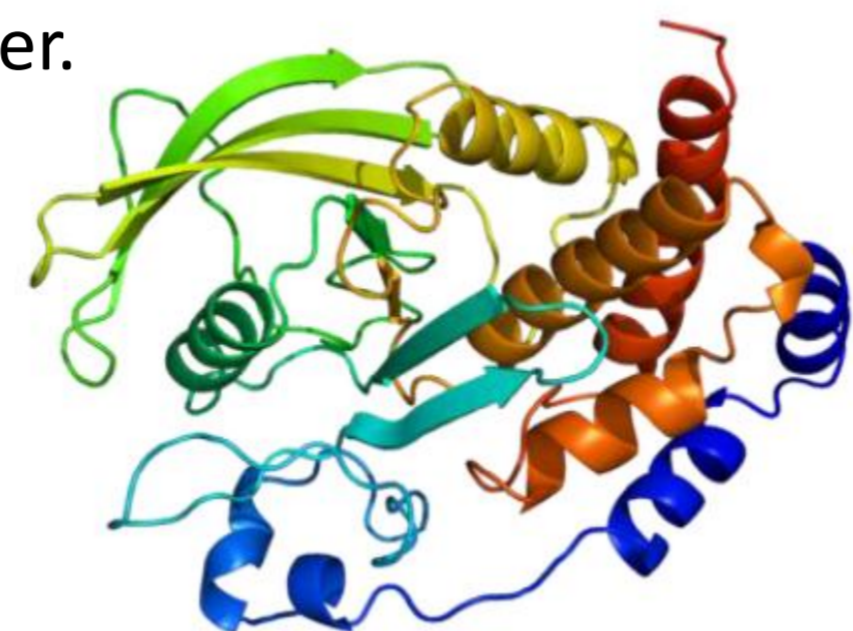
Apoio:



INTRODUÇÃO

A LMW-PTP (*low molecular weight protein phosphatase*) desempenha papéis-chave no controle da proliferação celular por desfosforilar/inativar receptores de tirosina quinases e proteínas ligadoras, as quais apresentam atividade de adesão e transcrição [1]. Sua superexpressão foi observada em neoplasias de mama, cólon, pulmão, neuroblastoma, sarcomas, bexiga, pâncreas, rim e adenocarcinoma [1,2,3]. Alguns estudos recentes demonstraram que a LMW-PTP está

relacionada à malignidade e agressividade de tumores e iniciação de metástases [2,3,4], de modo que sua inibição é considerada uma estratégia promissora para o desenvolvimento de terapias anticâncer.



METODOLOGIA

A purificação da proteína LMW-PTP foi realizada por cromatografia de afinidade em resina de níquel, utilizando-se eluições com concentrações crescentes de Imidazol. Os procedimentos foram acompanhados por controles de atividade enzimática, eletroforese com gel SDS/PAGE e dosagem de concentração da proteína. Para obtenção da LMW-PTP purificada, fez-se necessária também a cromatografia por exclusão de molecular como etapa final (Figura 1).

Testes de cristalização em sistema de gota suspensa foram realizados utilizando-se kits comerciais e a condição descrita na literatura. As gotas de cristalização eram constituídas de 1 µL da solução do poço e 1 µL da solução de proteína a 5-10 mg/ml. Cada poço era constituído por uma combinação diferente de tampão, sais, precipitantes, etc.. As caixas de cristalização foram mantidas a 18°C e os cristais apareceram após 3-5 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PURIFICAÇÃO

A proteína de interesse elui majoritariamente a uma concentração final de imidazol de 100 mM. Como etapa final da purificação foi realizada cromatografia por exclusão molecular (Figura 1) após clivagem da cauda de histidina. O rendimento final da purificação foi de 10 mg de proteína por litro de cultura.

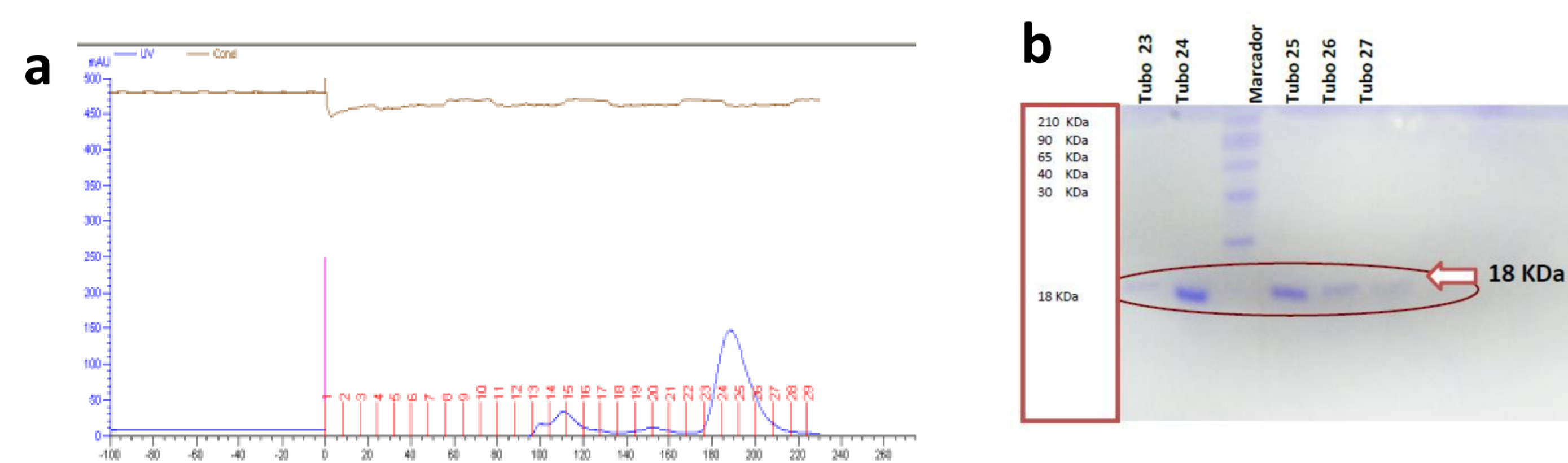


Figura 1 – Purificação da LMW-PTP. (a) Cromatografia de exclusão molecular em resina superdex 75. (b) fracos eluídos na SD-75 e analisadas em gel PAGE/SDS.

Como pode-se verificar na Figura 1 a LMW-PTP é produzida de forma pura e com a massa molecular esperada 18 kDa). Ensaios de atividade enzimática também indicam que a enzima está na forma ativa e com Km e Vmax de acordo com o esperado e já reportado na literatura [5] (dados não mostrados).

Tabela 1: Principais parâmetros relacionados ao conjunto de dados do cristal de LMWPTP coletado. Os dados entre parênteses referem-se à camada de maior resolução.

Conjunto LMW_PMSF	
Resolução	2.40
Redundância	4.0 (3.6)
Completeza	98.2 (93.3)
I/ sigma (I)	9.2 (2.2)
Rfree	0.2490
Rfactor	0.1984

CRISTALIZAÇÃO

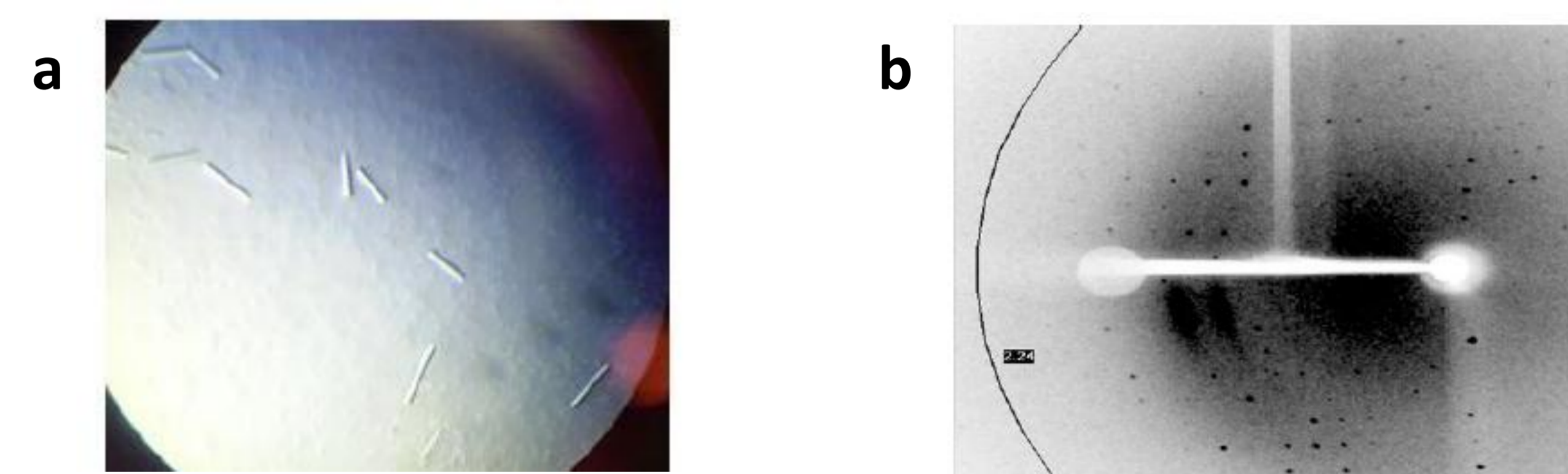


Figura 2 – Cristalização da LMW_PTP. (a) Cristais de LMW-PTP obtidos na condição PEG 5000 30% e MES pH 6,6. (b) Padrão de difração da LMW-PTP. Os dados foram coletados em difratômetro Bruker ApexII do IQ, UNICAMP.

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

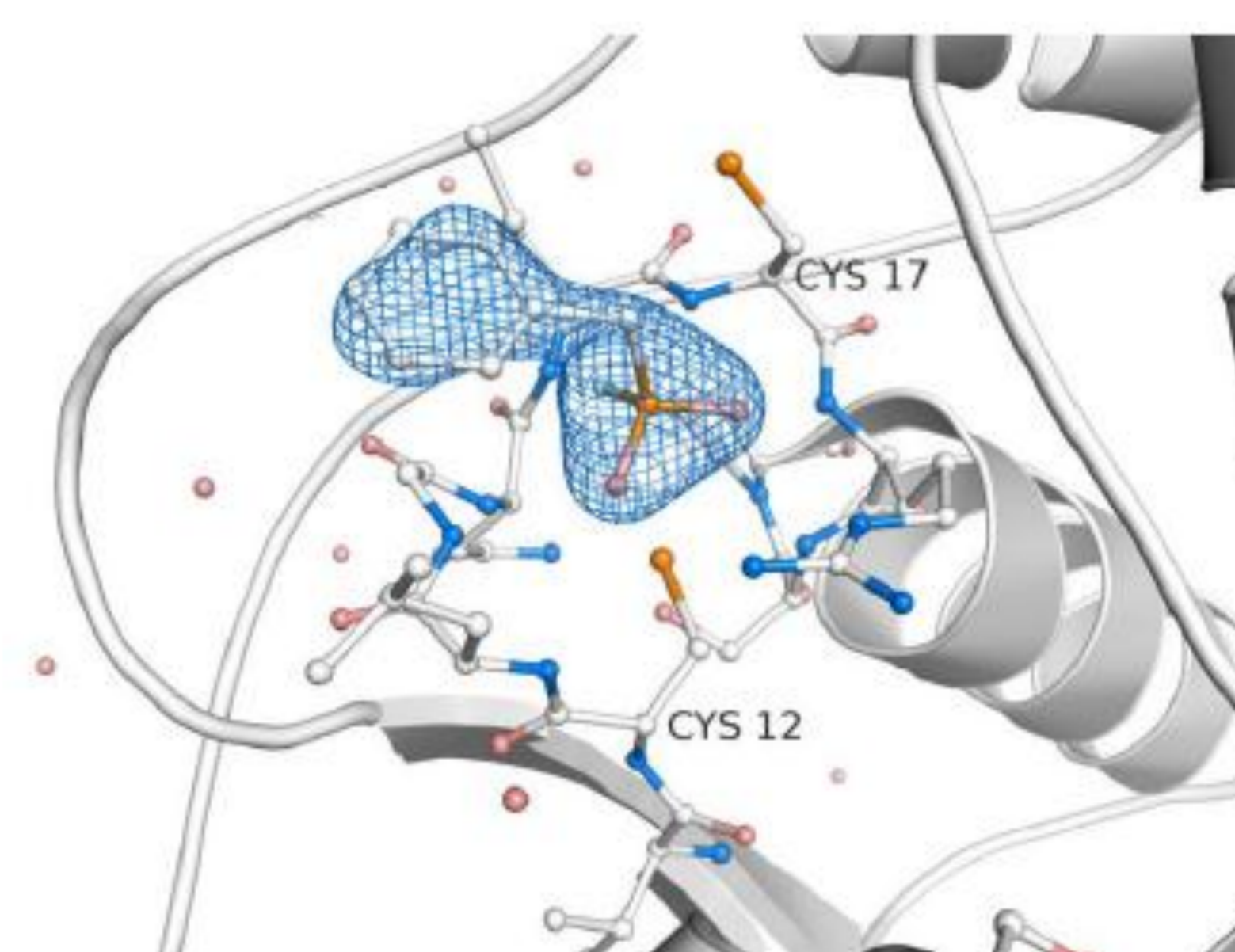


Figura 3: Estrutura cristalográfica da LMW-PTP em complexo com PMSF. O sítio catalítico é mostrado e a densidade eletrônica referente ao ligante está contornada pelo mapa de omissão com sigma=1,5. Figura preparada com o programa Pymol.

Através da análise da estrutura cristalográfica da LMW-PTP em complexo com PMSF pode-se verificar que o inibidor é reconhecido pelas amidas da cadeia principal dos resíduos de aminoácido que compõe o *loop* catalítico da enzima e pelos nitrogênios da cadeia lateral da arginina em posição 18. Nesta situação, os átomos de oxigênio e flúor do inibidor estão em distâncias ideais para formar interações de hidrogênio com estes átomos de nitrogênio.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Guerra, M.R., Gallo, C.V.d.M., Azevedo, G. and Mendonça, S. (2005). Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia* 51, 227-234.
- [2] Malentacchi, F., Marzocchini, R., Gelmini, S., Orlando, C., Serio, M., Ramponi, G. and Raugei, G. (2005). Up-regulated expression of low molecular weight protein tyrosine phosphatases in different human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 875-83.
- [3] Pasquale, E.B. (2010). Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nature Reviews Cancer* 10, 165-180.
- [4] Forghieri, M. et al. (2009). Synthesis, activity and molecular modeling of a new series of chromones as low molecular weight protein tyrosine phosphatase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 17, 2658-72.
- [5] Miranda et al., (2006). Differential effects of flavonoids on bovine kidney low molecular mass protein phosphatase. *J Enzyme Inhib Med Chem* 21(4): 419-25.

CONCLUSÃO

Durante o desenvolvimento deste projeto estabeleceu-se os protocolos de expressão, purificação e cristalização da LMW-PTP. A partir destes protocolos será possível obter cristais de complexos da LMW-PTP com inibidores identificados no âmbito do *Projeto Temático Biologia Química: novos alvos moleculares naturais e sintéticos contra o câncer. Estudos estruturais, avaliação biológica e modo de ação* (Fapesp 2009/51602-5), coordenado pelo Prof. Dr. Ronaldo A. Pilli, associado a esta pesquisa. Pretende-se, ainda, estabelecer uma nova condição de cristalização com o sítio catalítico livre (sem ligante e não ocluído por outras moléculas de proteína no cristal), viabilizando, assim a possibilidade de *soaking* com inibidores da LMW-PTP como alternativa para obtenção dos complexos cristalográficos da LMW-PTP com inibidores.