



**Domínio catalítico da enzima
fosfodiesterase 5 humana: síntese da
região codificante, clonagem,
expressão e purificação**

Bruna Pelegrim Selbach



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Domínio catalítico da enzima fosfodiesterase 5 humana: síntese da região codificante, clonagem, expressão e purificação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Autor
Bruna Pelegrim Selbach

Orientador
Prof. Diógenes Santiago Santos

Co-orientador
Prof. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre, RS
Março, 2008

Índice

Resumo	iv
Abstract	vi
Capítulo 1	
1.1 Introdução	7
1.2 Hipótese	21
1.3 Objetivos	22
Capítulo 2	
Manuscrito	23
2.1 Abstract	24
2.2 Introduction	25
2.3 Materials and Methods	27
2.4 Results and Discussion	31
2.5 References	38
Capítulo 3	
3.1 Considerações finais e Perspectivas	42
Anexo I	
Mapa do vetor de clonagem pCRBlunt	43
Anexo II	
Mapa do vetor de expressão pET23a(+)	44
1.4 Referências bibliográficas	45

Resumo

Fosfodiesterase (PDE) é uma super família de enzimas responsáveis pela degradação dos segundos mensageiros intracelulares adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Como reguladoras essenciais na sinalização de segundos mensageiros cíclicos com diversas funções fisiológicas as PDEs são alvo de drogas para o tratamento de diversas doenças. Dentre estas estão insuficiência cardíaca, depressão, asma, inflamação e disfunção erétil. Dentre as 11 famílias de genes de PDE, a fosfodiesterase 5 (PDE5) é específica para GMPc, sendo responsável pela atividade de hidrólise que sofre o GMPc dentro dos tecidos dos corpos cavernosos penianos dos homens. A PDE5 é amplamente conhecida por ser alvo de diversas drogas utilizadas no tratamento da disfunção erétil, como por exemplo, o sildenafil (Viagra[®]). Este trabalho tem por objetivo a síntese da região codificante, clonagem, expressão e purificação do domínio catalítico da PDE5 humana. A síntese da região codificante do polipeptídeo alvo foi realizada através da técnica de *overlap*, utilizando 24 oligonucleotídeos que foram unidos através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A construção foi clonada em vetor pCRBlunt[®] e sequenciada para confirmar sua identidade e a ausência de mutações. O fragmento foi subclonado em vetor de expressão pET23a(+) com sítios de restrição *NdeI* e *BamHI*, para o N terminal e C terminal, respectivamente. Células eletrocompetentes de *E. coli* Rosetta (DE3) foram transformadas com o plasmídeo recombinante, a região que codifica para o domínio catalítico da PDE5 foi expressa em sua forma solúvel e ativa na presença de 0,1 mM do indutor IPTG. Quando o domínio catalítico da PDE5 foi isolado, um rendimento de 2,39 mg.mL⁻¹ foi obtido através de 3 passos de purificação. O domínio

catalítico da PDE5 puro permitirá a realização de uma triagem de extratos vegetais oriundos da biodiversidade brasileira. Com o intuito de buscar novos compostos que possam se tornar possíveis inibidores de PDE5, e assim serem utilizados no tratamento da disfunção erétil.

Palavras – chave: AMPc, GMPc, disfunção erétil, fosfodiesterase 5.

Abstract

Phosphodiesterases (PDEs) are a super family of enzymes which degrade the intracellular second messengers cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP). As essential regulators in cyclic nucleotide signaling with diverse physiological functions, PDEs are drug targets for the treatment of various diseases including heart failure, depression, asthma, inflammation, and erectile dysfunction. Among the eleven PDE gene families, the cGMP-specific PDE5 is the principal cGMP-hydrolyzing activity in the human *corpus cavernosum* tissue. It is well known as the target of many drugs used in the treatment of erectile dysfunction, like sildenafil. This work aims the synthesis of the coding region, cloning, expression and purification of the catalytic domain of human *PDE5* gene which encodes the phosphodiesterase 5. The synthesis of the coding region of the target polypeptide was accomplished by using 24 primers, which were ligated by overlap extension using the polymerase chain reaction. The construction was cloned into pCRBlunt[®] vector and sequenced to confirm its identity and the absence of mutations. The fragment was subcloned into pET23a(+) expression vector with *NdeI* and *BamHI* restriction sites. *Escherichia coli* Rosetta (DE3) electrocompetent cells were transformed with the recombinant plasmid and the coding region of the catalytic domain of the PDE5 was expressed in its soluble form with 0.1mM of IPTG induction. The purification yielded 2.39 mg.mL⁻¹ through 3 steps of purification. The pure catalytic domain of PDE5 will allow screening for the discovery of new natural inhibitors from the brazilian biodiversity that could be used in the treatment of erectile dysfunction.

1. Capítulo 1

1.1 Introdução

1.1.1 Disfunção erétil e Ereção

A Disfunção Erétil (DE), popularmente conhecida por impotência, é a incapacidade de se obter ou manter uma ereção adequada para a prática da relação sexual. Não deve ser confundida com a falta ou diminuição da libido, nem com a dificuldade em ejacular ou em atingir o orgasmo. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), sugerem que 30% da população economicamente ativa manifesta algum tipo de DE, o que no Brasil representa cerca de 11 a 15 milhões de homens.

A ereção é um fenômeno hemodinâmico, dependente do relaxamento do músculo liso cavernoso e das arteríolas do corpo cavernoso, levando a um aumento do fluxo sanguíneo para o espaço sinusoidal. O aumento do fluxo arterial distende o espaço lacunar dos sinusóides, comprimindo, passivamente, as vênulas entre os sinusóides e a túnica albugínea dos corpos cavernosos. A relativa ausência de distensão da túnica albugínea resulta na veno-oclusão, que eleva a pressão intracavernosa até valores próximos à pressão arterial média, gerando uma ereção plena [1]. Após o estímulo sexual, o óxido nítrico (NO) é liberado por terminações nervosas parasimpáticas e pelas células endoteliais que possui as isoformas neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) da óxido nítrico sintase [2,3]. O óxido nítrico por ser gasoso se difunde nas células da musculatura lisa vascular no corpo cavernoso do pênis, interfere na conformação da guanilil ciclase solúvel tornando-a ativa e aumentando os níveis de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) nessas células [4]. Este processo leva à ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG), à fosforilação de outras proteínas e à diminuição de cálcio por seqüestro intracelular ou à redução da

sensibilidade por cálcio via ativação de canais de potássio, o que resulta em um relaxamento da musculatura lisa [3]. Sabe-se que os níveis intracelulares do GMPc são regulados pelo equilíbrio entre a guanilil ciclase, que sintetiza GMPc e a fosfodiesterase 5 (PDE5), responsável pela degradação deste segundo mensageiro [5]. Essa cascata de reações químicas é mostrada na figura 1.

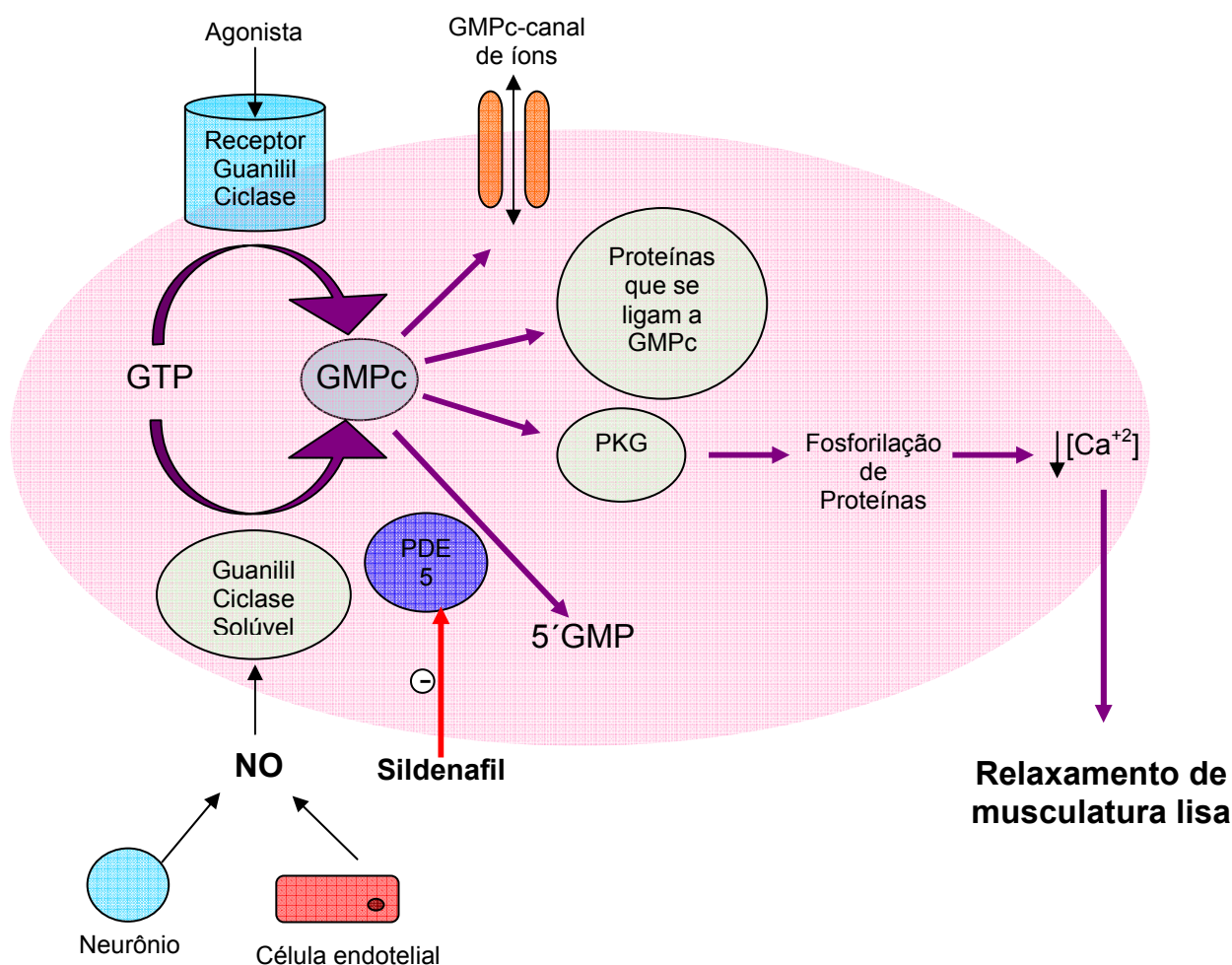


Fig 1: Rota de sinalização NO/GMPc. A figura mostra o estímulo promovendo a síntese de GMPc, seguido da sinalização intracelular dos alvos modulados por GMPc e o papel das fosfodiesterases no consumo de GMPc. Essa rota mostra o relaxamento da musculatura lisa vascular e ereção peniana mediados pelo estímulo sexual.

Relaxamento de musculatura lisa é em parte mediado pela ativação de PKG, subsequente abertura dos canais de potássio e a redução nos níveis de cálcio por seqüestro intracelular. PDE5 é o alvo para sildenafil assim como para outros inibidores utilizados no tratamento de disfunções vasculares crônicas.

1.1.2 Fosfodiesterases

As fosfodiesterases (PDEs) pertencem a uma grande família de 11 diferentes genes. Essas enzimas são estruturalmente relacionadas, porém funcionalmente distintas, e altamente reguladas [6]. São fosfohidrolases que seletivamente catalisam a hidrólise de ligações 3' de fosfato cíclico de adenosina e/ou guanosina 3', 5'-monofosfato cíclico.

Logo após a descoberta da adenosina monofosfato cíclica (AMPc) por Sutherland e colaboradores a atividade de PDE sobre nucleotídeos cíclicos foi descrita [7]. Com a descoberta do GMPc observou-se que tanto o AMPc quanto o GMPc podiam ser hidrolisados pelo mesmo tipo de atividade, por exemplo, a hidrólise da ligação 3' do fosfato cíclico. Baseado nos estudos de competição por substratos tornou-se claro que pelo menos algumas dessas atividades deviam ter o mesmo sítio catalítico. De fato, muitos dos estudos preliminares em nucleotídeos cíclicos foram direcionados para entender a atividade PDE, pois, na época era mais fácil medir a atividade da PDE do que as atividades de AMPc ou GMPc, ou mesmo das enzimas que catalisavam suas sínteses. Com o aprimoramento dos ensaios biológicos utilizando substratos radioativos tornou-se clara a existência de múltiplas formas de PDEs com diferentes propriedades cinéticas e regulatórias [8,9].

Devido à complexidade do sistema de nucleotídeos cíclicos de PDE fez-se necessário adotar abordagens mais sofisticadas e complexas para entender o papel

das PDEs na regulação de GMPc e AMPc na célula. Hoje está claro que um único tipo celular pode expressar diferentes PDEs e que a natureza e a localização dessas enzimas parece ser um grande regulador de GMPc e AMPc dentro da célula. As PDEs não são apenas reguladas em nível genético, mas também por diversos mecanismos bioquímicos, os quais incluem fosforilação e desfosforilação, ligação alostérica de GMPc ou AMPc, ligação de Ca^{+2} / calmodulina e diferentes interações proteína-proteína [10]. O principal conceito sobre o papel das PDEs é de que elas modulam a forma tridimensional, a amplitude e a duração dos nucleotídeos cíclicos dentro da célula que está em expansão. Algumas PDEs, sem dúvida, funcionam apenas para impedir que esses nucleotídeos se espalhem para regiões inapropriadas das células e outras servem para regular o local de acesso de receptores específicos tanto de AMPc quanto de GMPc nos locais intracelulares específicos. Acredita-se também que nem todas as PDEs funcionam controlando a hidrólise de nucleotídeos cíclicos, e sim atuem como proteínas mediadoras alterando interações proteína-proteína utilizando as mudanças alostéricas induzidas pela ligação dos nucleotídeos cíclicos. Esse último conceito é possível, porém não há nenhuma demonstração evidente de tal fato até hoje [11].

1.1.3 Famílias de PDE

A maior parte das famílias de PDE possuem de mais de um gene (~20 genes de PDE), que geram múltiplos produtos de proteínas (>50 proteínas de PDE) através de *splicing* alternativo de RNAm ou utiliza diferentes sítios iniciadores de promotores de transcrição. Grande parte das células possui múltiplos genes de famílias de PDE, porém em diferentes quantidades, proporções e localizações. As fosfodiesterases 5, por exemplo, são relativamente abundantes em musculatura lisa, incluindo vasculatura pulmonar e corpos cavernosos penianos, onde aparentemente regulam a hidrólise de GMPc que modula a vasodilatação.

As PDEs de mamíferos exibem uma organização estrutural bastante comum entre elas, com um domínio catalítico conservado nas porções C-terminal das moléculas e diferentes domínios regulatórios nas porções N-terminal. O domínio catalítico, altamente conservado entre os membros de cada família possui um motivo de assinatura, comum a todas PDEs, e domínios de ligação a metal. Além disso, os domínios catalíticos possuem seqüências específicas para cada família, que são responsáveis pelas diferentes afinidades por substratos, atividades catalíticas e também sensibilidade a inibidores específicos. Algumas famílias de PDE são relativamente específicas para AMPc, GMPc ou também podem hidrolisar ambos [12] (Tabela 1).

Tabela 1: **Especificidade de substrato para cada família de PDE**

Família PDE	Subfamília (n° de variantes)	Substrato
1	A (4), B (1), C (5)	AMPc / GMPc
2	A (3)	AMPc / GMPc
3	A (1), B (1)	AMPc / GMPc
4	A (8), B (3), C (4), D (5)	AMPc
5	A (3)	GMPc
6	A (1), B (1), C (1)	GMPc
7	A (3), B (1)	AMPc
8	A (5), B (1)	AMPc
9	A (6)	GMPc
10	A (2)	AMPc / GMPc
11	A (4)	AMPc / GMPc

1.1.4 PDEs como alvos terapêuticos

Imediatamente após a descoberta da atividade PDE, descobriu-se que a cafeína era um inibidor efetivo de PDE assim como outros análogos da mesma, como teofilina. No entanto, o princípio pelo qual a inibição da atividade de PDE seria válida como um alvo terapêutico não era claro, até porque pouco se sabia sobre esses inibidores e grande parte desses inibiam a maioria, senão todas, as PDEs nos tecidos. Uma razão importante para utilizar as PDEs como alvos terapêuticos está relacionada com o princípio farmacológico básico, de que a regulação de degradação de qualquer ligante

ou segundo mensageiro pode, freqüentemente, realizar uma maior alteração na concentração dos mesmos quando comparados com a regulação nas taxas de síntese. Isso é verdade tanto para alterações farmacocinéticas em nível de drogas ou para alterações nas quantidades de moléculas de regulação celulares endógenas ou metabólitos. Essa propriedade intrínseca estaria aumentada se o processo celular responsável pela degradação apresentar um valor de V_{max} maior do que aquele do processo de síntese. Sabe-se, que a maioria dos tecidos contém pelo menos uma ordem de magnitude maior de atividade de PDE do que atividade ciclase, tanto para AMPc quanto para GMPc e acredita-se ser improvável que a maioria das PDEs atuem abaixo do valor de V_{max} para os substratos em condições fisiológicas. A idéia atual é de que em muitos compartimentos celulares os níveis de substrato podem ser altos e, no entanto, essa grande atividade estaria presente. Outra razão para que as PDEs sejam possíveis bons alvos de drogas está relacionada com a concentração de seus substratos na célula. Normalmente os níveis de AMPc e GMPc na maioria das células é de 1 a 10 μ M. Isto significa que um inibidor competitivo não precisaria competir com altos níveis de substrato endógeno para ser efetivo [11].

A razão mais importante para o reconhecimento das PDEs como bons alvos de drogas é o fato de que existem diferentes isoformas. Em função do grande número de distintas formas de PDEs expressas em tecidos de mamíferos, há uma forte evidência de que muitas dessas PDEs estão relacionadas a diferentes funções fisiológicas no organismo, assim como a diferentes condições patológicas. Acredita-se ser possível o desenvolvimento de inibidores seletivos as isoformas, que podem ter como alvo funções específicas e condições patológicas sem a alta probabilidade de causar efeitos colaterais indesejáveis [13].

1.1.5 Estruturas de domínios catalíticos

Nos últimos quatro anos, estruturas cristalográficas para os domínios catalíticos de sete diferentes famílias de PDE foram resolvidas incluindo a PDE1B [14], a PDE3B [15], a PDE4B [16,17,18,19], a PDE4D [18,19,20,21,22,23], a PDE5A [14,18,22,24], a PDE7A [25] e a PDE9A [26]. No entanto, nenhuma estrutura de alta resolução para qualquer holoenzima de PDE foi descrita, por isso pouco se sabe sobre os detalhes moleculares de como os domínios regulatórios influenciam na catálise, porém sabe-se que de fato possuem papéis importantes em relação à especificidade por substrato e ligação de inibidores.

A maior parte dos dobramentos e dos elementos estruturais funcionais para cada domínio catalítico são bastante semelhantes, apesar de apresentarem, aproximadamente, de 25 a 35% de identidade entre elas. Todos esses domínios catalíticos contem três subdomínios compostos por 16 hélices e o sítio ativo é formado na junção das hélices por resíduos que são altamente conservados entre as PDEs. Na parte superior do bolsão de ligação do substrato está o sítio de ligação para dois metais divalentes (Fig. 2A). Os metais zinco e magnésio são coordenados por resíduos localizados em cada um dos três diferentes domínios. O sítio de ligação do metal zinco possui três resíduos de histidina e dois de aspartato que são absolutamente conservados entre todas as PDEs estudadas até hoje. Por serem resíduos de histidina e aspartato imagina-se que eles atuem para coordenar cátions divalentes, que serão necessários para a atividade dessas proteínas (Fig. 2B). O metal magnésio liga-se mais fracamente ao bolsão catalítico provavelmente em função da presença de moléculas de água que coordenam esse metal [16]. Possivelmente isso é o que ocorre nas PDEs [25,27].

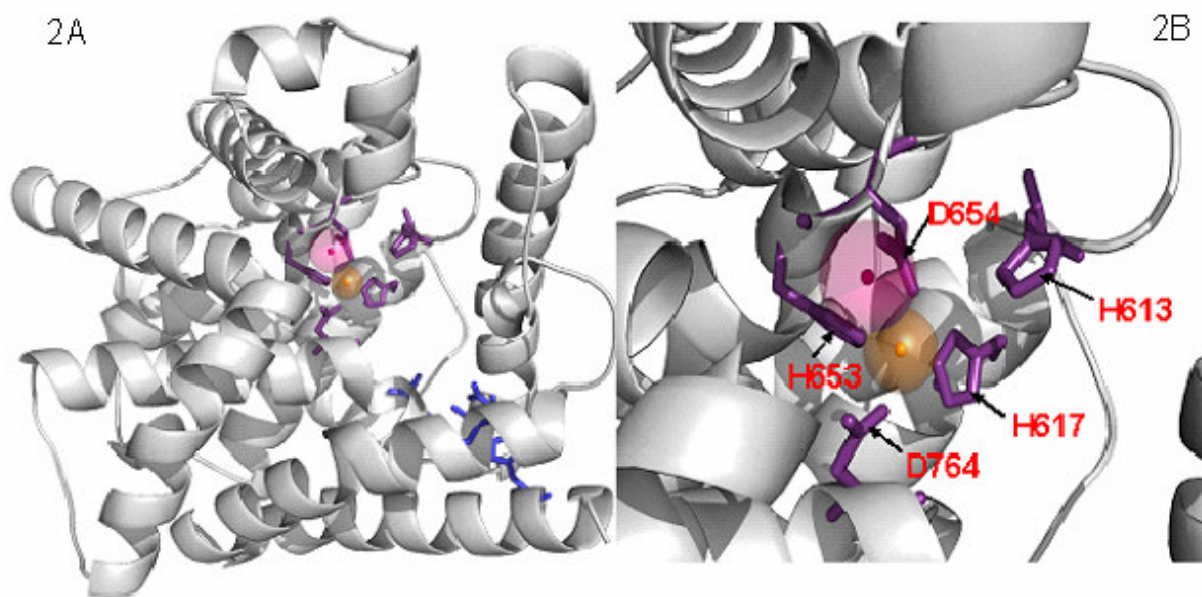


Fig.2: Estrutura terciária do domínio catalítico da PDE5. A) Bolsão de ligação do substrato. B) Sítio de ligação dos metais; Mg^{2+} (Rosa), Zn^{2+} (Laranja).

Outra idéia interessante que surgiu a partir de estudos de estrutura é a proposta para o mecanismo molecular dos nucleotídeos cíclicos para especificidade. Em cada uma das PDEs cuja estrutura foi resolvida, parece existir invariavelmente uma glutamina que estabiliza a ligação do anel purínico no bolsão de ligação [14]. Para as PDEs que são seletivas para AMPc em baixas concentrações, essa glutamina possui uma orientação, mediada por resíduos vizinhos, que favorece a ligação do AMPc. Já para as PDEs que preferem GMPc essa glutamina (Q817) está disposta em uma outra orientação que então permite a ligação do GMPc [14] (Fig. 3). No caso de PDEs que hidrolisam tanto AMPc como GMPc essa glutamina deve estar livre para se movimentar. Essa hipótese chamada de *glutamine switch* parece formar a base molecular para muitas das seletividades por substratos observadas entre as diferentes

fosfodiesterases [14]. No caso da PDE5 são essas peculiaridades em relação a orientação que determina sua especificidade por substrato [28]. Outros estudos comprovam a essencialidade de aminoácidos no sítio catalítico das PDE5 e PDE4 por mutagênese sítio direcionada e afirmam que os mesmos também podem ter influência na especificidade pelos substratos [29,30].

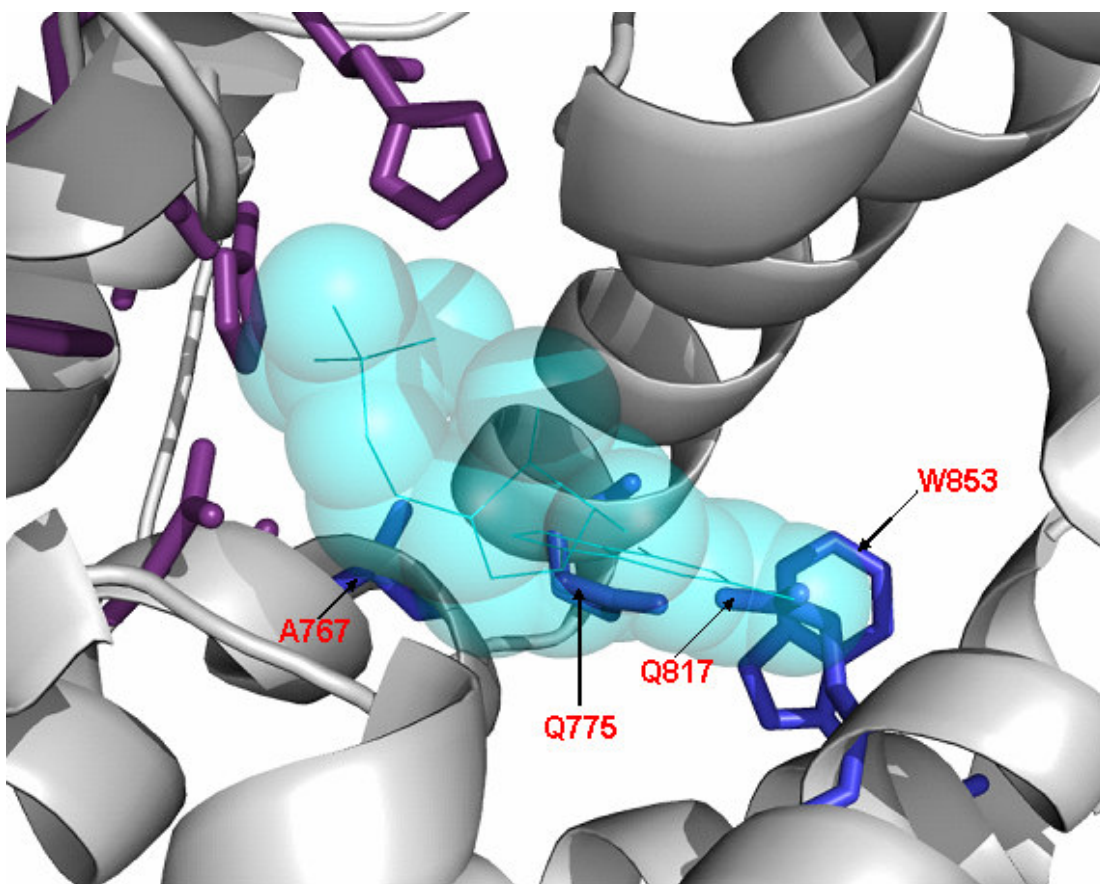


Fig 3: Estrutura terciária do domínio catalítico da PDE5. Interação do substrato 5'GMP (Azul) com diferentes resíduos no bolsão de ligação.

Muitas dessas estruturas cristalográficas publicadas possuem inibidores de PDE ligados a elas. Surge então um terceiro ponto interessante em relação aos estudos de estrutura dessas enzimas, quando os inibidores se ligam ao sítio ativo da enzima,

observa-se que ocorrem três modos diferentes desta ligação ao sítio ativo da mesma [18,31]. Estruturas cristalográficas de PDE4B, PDE4D e PDE5A com inibidores revelaram que os compostos interagem com as enzimas tanto através de ligações de hidrogênio com resíduos envolvidos na ligação de nucleotídeos, através de resíduos hidrofóbicos alinhados no canal do sítio ativo ou com íons metálicos mediados por água [18]. Esses mecanismos de ligação têm despertado a curiosidade de pesquisadores a buscarem novos possíveis inibidores para as fosfodiesterases.

1.1.6 Fosfodiesterase 5

A PDE5 foi inicialmente identificada, isolada e caracterizada de plaquetas [32] e logo após, a partir de tecido pulmonar [33]. No entanto, essa enzima não recebeu muita atenção, até que se descobriu ser reguladora de contração de musculatura lisa. A descoberta mais relevante que levou alguns pesquisadores a se interessarem por essa enzima foi o fato de ela ser o alvo de inibidores como, por exemplo, sildenafil, que hoje é utilizado para o tratamento da disfunção erétil. Acredita-se que inibidores da PDE5 também serão úteis para o tratamento de outras doenças como depressão [34] e hipertensão pulmonar [10]. Além disso, sabe-se que a PDE5 possui papel importante em funções cognitivas como aprendizado e memória [35].

A PDE5 é um homodímero onde cada monômero contém um domínio regulatório (R) e um domínio catalítico (C) que cataliza a quebra de GMPc para 5'GMP [36] (Fig.4). O domínio R possui diversos subdomínios funcionais, que inclui um sítio de fosforilação (Ser-92), sítios alostéricos de ligação de GMPc (GAFs *a* e *b*), assim como contatos de dimerização [37,38,39,40]. Não se sabe exatamente como e quais são suas influências no processo de regulação, mas parecem estar conservados em domínios regulatórios distintos. Este sítio de fosforilação da Ser-92 parece ser responsável pelo aumento na

atividade de hidrólise do GMPc. A ligação alostérica de GMPc ao domínio regulatório da PDE5 aumenta a afinidade de seu sítio catalítico pelo seu substrato GMPc, estimulando a hidrólise de GMPc [12,41,42,43,44]. Isso ocorre por uma mudança conformacional causada pela ligação de GMPc ao sítio regulatório da enzima, tendo como consequência a exposição do sítio de fosforilação da Ser-92, aumentando a atividade enzimática em decorrência do aumento de afinidade da enzima pelo seu substrato [41,45,46,47]. Os sítios de ligação GAF, cujo acrônimo deriva do nome das três primeiras classes de proteínas descobertas que este módulo possui: GMPc que se liga a PDE, Anabaena adenylyl ciclase e Escherichia coli Eh1A [39,48], pode influenciar na especificidade de ligação do GMPc a PDE5, assim como em sua atividade. A principal quinase responsável pela fosforilação da Ser-92 é a PKG [49], porém quando os níveis de GMPc estiverem altos e o domínio GAF-A já estiver ocupado pelo GMPc essa fosforilação também pode ser mediada por proteína quinase dependente de AMPc (PKA). Essa fosforilação estabiliza a atividade catalítica aumentada promovendo uma maior afinidade de ligação de GMPc ao domínio GAF-A. Este mecanismo permite que a célula prolongue a ativação de PDE5 por *feedback* na síntese de GMPc [50].

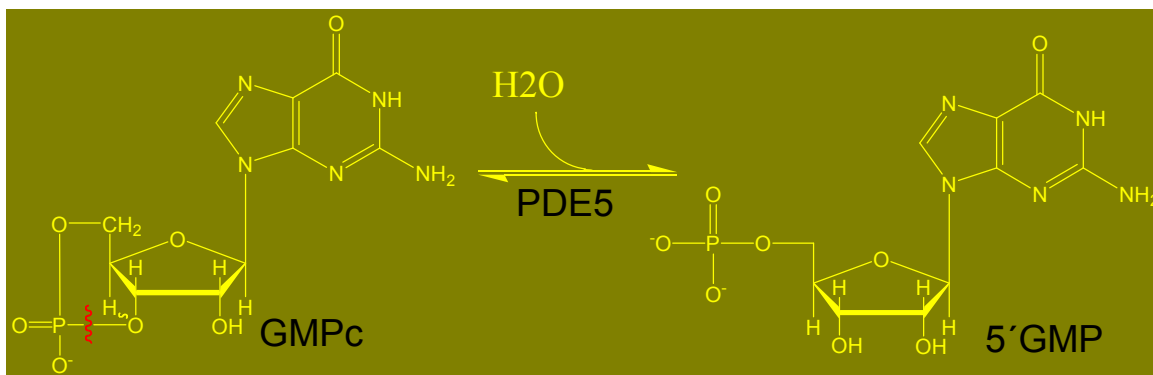


Fig 4. Reação de hidrólise catalisada pela PDE5 que converte GMPc em 5'GMP.

1.1.7 Inibidores de PDE5

Diversos compostos que inibem a PDE5 foram recentemente sintetizados, dentre estes, três são utilizados clinicamente para o tratamento da DE no homem. Após o estímulo sexual, essas drogas inibem a PDE5 gerando um acúmulo de GMPc nas células dos tecidos penianos, desencadeando uma cascata que leva à ativação da PKG, a fosforilação de outras proteínas e a diminuição de cálcio celular ou à redução da sensibilidade ao cálcio, o que resulta em relaxamento da musculatura lisa [3].

O sildenafil (Viagra[®]) foi o pioneiro desta classe de medicamentos a ser utilizado para o tratamento da DE que apresenta como mecanismo principal de ação a inibição da PDE5. Entretanto, esta droga também é promissora no tratamento de outras disfunções relacionadas à musculatura lisa, como por exemplo, a hipertensão pulmonar supracitado. Em 1998 este medicamento foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos para o tratamento da DE e, em 2002, representou 90% das vendas como medicamento para tratar a DE. As vendas mundiais do Sildenafil excederam US\$1,5 bilhões em 2001 [51]. Outros inibidores, como o Vardenafil (Levitra[®]) e o Tadalafil (Cialis[®]), foram desenvolvidos para o tratamento de DE com base no mesmo mecanismo de ação do Sildenafil (Viagra[®]). A disponibilidade desses inibidores fornece ferramentas importantes para o estudo do domínio catalítico da PDE5, abrindo assim a possibilidade de se propor novos fármacos que atuem nesse alvo terapêutico.

Efeitos adversos como distúrbios visuais em pacientes que fazem o uso de inibidores da PDE5 [52,53] refletem a necessidade de um estudo mais aprofundado do mecanismo de ação dessas drogas, assim como o desenvolvimento de novos potenciais inibidores. Estudos com extratos de plantas já demonstraram sua ação

relaxante em endotélio do corpo cavernoso de roedores [54], porém não se sabe exatamente qual é o alvo desses compostos naturais. Existe uma série de compostos e extratos potenciais a serem testados como possíveis inibidores da PDE5 [55], porém testes adicionais relacionados com mecanismo de ação, efeitos colaterais indesejáveis e toxicidade precisam ser concluídos.

1.2 Hipótese

Inibidores seletivos para diferentes famílias de PDEs estão em desenvolvimento para diversas indicações. Drogas que possuem como alvo as PDEs são fortemente consideradas por suas propriedades cardiotônica, vasodilatadora, relaxantes de musculatura lisa, antitrombótica, antiinflamatória e antiasmática. Elas também estão sendo desenvolvidas como antidepressivos e para melhorarem funções cognitivas como aprendizado e memória [35]. Inibidores de PDE5 como sildenafil, vardenafil e tadalafil estão sendo amplamente utilizados com sucesso para o tratamento de disfunção erétil em homens e recentemente foram aprovados para o tratamento de hipertensão pulmonar [10].

No entanto, um maior entendimento da topologia do bolsão catalítico será de extrema importância para o desenvolvimento de drogas mais seletivas. Este projeto visa à obtenção do domínio catalítico da PDE5 em sua forma solúvel e ativa. Com o mesmo, será possível a realização de uma triagem de extratos vegetais oriundos da biodiversidade vegetal brasileira com o intuito de buscar novos inibidores da PDE5 para o tratamento da disfunção erétil.

1.3 Objetivo Geral

O Objetivo deste trabalho é isolar o domínio catalítico da fosfodiesterase 5 em sua forma solúvel e ativa.

1.4 Objetivos específicos

1) Desenhar os oligonucleotídeos sintéticos para a construção da região codificante do domínio catalítico da PDE5;

2) Unir os *primers* para a construção da região codificante do domínio catalítico da PDE5 utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR);

3) Clonar o fragmento amplificado em pCR-Blunt[®], e posterior subclonagem em vetor de expressão de células procarióticas pET23a(+);

4) Seqüenciar o plasmídeo recombinante final para verificação da ausência de mutações;

5) Obter expressão da proteína recombinante em células de *Escherichia coli* Rosetta (DE3) utilizando como controle o vetor de expressão sem o inserto.

6) Purificação do domínio catalítico da PDE5 na sua forma homogênea;

7) Seqüenciamento N-terminal da proteína pura, análise de pureza e determinação da massa molecular da subunidade por espectroscopia de massas.

Capítulo 2 – Manuscrito a ser submetido para revista Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC).

Human phosphodiesterase 5 catalytic domain: synthesis of the coding region, cloning, expression and purification.

Bruna P. Selbach¹, Isabel Osório da Fonseca^{1,2}, Luiz Augusto Basso¹, Diógenes Santiago Santos^{1*}.

¹ Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90619-900, Brasil;

² Current address: Virginia Bioinformatics Institute, Virginia Tech, Blacksburg, VA 24061, USA.

*To whom correspondence may be addressed: E-mail: diogenes@pucrs.br Phone: +55 51 33203629.

2.1 Abstract

Phosphodiesterases (PDEs) are a superfamily of enzymes which degrade the intracellular second messengers cGMP and cAMP. As essential regulators in cyclic nucleotide signaling with diverse physiological functions, PDEs are drug targets for the treatment of various diseases including heart failure, depression, asthma, inflammation, and erectile dysfunction. Among the eleven PDE gene families, the cGMP-specific PDE5 has the main cGMP-hydrolyzing activity in the human *corpus cavernosum* tissue. It is well known as the target of many drugs used in the treatment of erectile dysfunction, like sildenafil. This work aims at the synthesis of the coding region, cloning, expression and purification of the catalytic domain of human *PDE5* gene which encodes phosphodiesterase 5. The pure catalytic domain of PDE5 will allow screening for the discovery of new natural inhibitors from the Brazilian biodiversity that can be used in the treatment of erectile dysfunction.

Key words: erectile dysfunction, PDE5, nitric oxide, cGMP, cAMP, natural inhibitors, phosphodiesterase, *corpus cavernosum*, catalytic domain, purification.

2.2 Introduction

The superfamily of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) comprises eleven known families of PDEs that vary in substrate specificity, regulatory properties, and tissue distribution [1]. PDEs play a critical role in maintaining the cellular level of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) [2]. The second messengers cAMP and cGMP, mediate the response of cells to a wide variety of hormones and neurotransmitters, and modulate many metabolic processes such as cardiac and smooth muscle contraction [3]. As essential regulators in cyclic nucleotide signaling with diverse physiological functions, PDEs are drug targets for the treatment of several diseases including heart failure, depression, asthma, inflammation and erectile dysfunction. Within the eleven PDE gene families, the cGMP-specific PDE5 is the major cGMP-hydrolyzing activity in the human *corpus cavernosum* [4].

Penile erection is a hemodynamic event that is regulated by relaxation of the *corpus cavernosum* smooth muscle cells, mediated via the NO-cGMP pathway. Upon sexual arousal, NO is the putative principal neurotransmitter released from non-cholinergic non-adrenergic parasympathetic nerve endings in the walls of the arteries and sinusoids of the penis, mediating erection [5]. NO binds to soluble guanylyl cyclase triggering increased synthesis of cGMP from guanosine triphosphate, thus elevating intracellular cGMP concentrations. This leads to activation of cGMP-dependent protein kinase (PKG), phosphorylation of several proteins, and lowering of cellular calcium level, which will be responsible for the relaxation of the smooth muscle, increased blood flow, simultaneously increased penile tumescence, and, eventually, erection [6].

It is known that cGMP relaxes vascular smooth muscle and that cellular cGMP concentration is determined by the balance between its synthesis by guanylyl cyclases and its breakdown to 5`GMP by cyclic nucleotide phosphodiesterase5 (PDE5). Therefore, modulating intracellular cGMP levels has been targeted for pharmacological intervention, for example sildenafil, in disorders directly influenced by vascular smooth muscle activity, which includes erectile dysfunction [7].

The catalytic domain of PDE5 is the direct target of PDE5 inhibitors, but the regulatory domain can influence PDE5 inhibitor actions on the enzyme in certain instances [6, 8]. In PDE5, the effect of allosteric cGMP binding is not much clear, but cGMP binding to the PDE5 regulatory domain controls phosphorylation of a specific serine that is near the amino terminus of the regulatory domain [9, 10]. Phosphorylation at this serine activates both PDE5 catalytic and allosteric cGMP-binding activities [6]. Studies of several PDEs have suggested that the isolated catalytic domain alone is sufficient for catalytic activity [3, 11].

This work presents the synthesis, cloning, sequencing, expression, and purification of the catalytic domain of human PDE5. This pure catalytic domain will allow us to perform a screening of natural plant extracts to search for new natural inhibitors from the brazilian biodiversity that could be used in the treatment of erectile dysfunction.

2.3 Materials and Methods

Construction of the coding region of the catalytic domain of PDE5

The coding region of the PDE5 catalytic domain was constructed using 24 primers which were designed based on the genomic DNA sequence of PDE5 *Homo sapiens sp* from the Gene Bank (**Gene ID: 8654**). These primers were ligated by overlap extension using the polymerase chain reaction (PCR) with *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase (*Pfu*; Stratagene) [12], which is a thermostable polymerase that exhibits low error rate, thus lowering the likelihood of introducing unwanted mutations.

Cloning of the catalytic domain of PDE5

Based on the genomic sequence of the PDE5 *Homo sapiens sp* catalytic domain the synthetic oligonucleotide primers for PCR amplification of PDE5 catalytic domain construction were designed (5'- **aacat**atggaagaacaagagagctacagtcgtagcgg -3' and 5'- a**aggat**cctcactgctgttctgcaagggcctgccatttc 3'). These primers were complementary to, respectively, the amino-terminal coding and carboxi-terminal noncoding strands of the PDE5 coding region of the catalytic domain containing 5' *Nde*I and 3' *Bam*HI restrictions sites, which are in bold. These pair of primers were used to amplify the coding region of the catalytic domain of the PDE5 (970 bp) from the constructed fragment using standard PCR conditions and the enzyme *Pfu* DNA Polymerase (Stratagene).

The PCR product was purified from the agarose gel by a ConcertTM Nucleic Acid Purification System (GIBCO BRL) kit, cloned into the pCRBlunt[®] (Invitrogen) vector and digested with the *Nde*I and *Bam*HI (GIBCO BRL). Following that, the fragment was cloned into pET23a(+) (Novagen) expression vector, which was previously digested with the same restriction enzymes. To both confirm the identity of the cloned catalytic

domain, and ensure that no mutations were introduced by the PCR amplification step, the DNA was automatically sequenced by Mega Bace 1000 (Healthcare).

Expression of the PDE5 catalytic domain

The recombinant plasmid pET23a(+)-PDE5 was transformed into electrocompetent *E. coli* Rosetta (DE3) cells (Novagen) and selected on LB agar plates containing carbenicillin 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and chloramphenicol 34 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Single colonies were used to inoculate 50 mL LB medium containing the same antibiotics and concentrations of LB solid medium, and grown at 37°C, 180 rpm until it reached the $\text{OD}_{600} = 0.7$. Then 0.1 mM of isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added for further growth at 15°C and 180 rpm for 24 h [3]. Cells were harvested by centrifugation at 12,000 g for 20 min at 4°C, and stored at -20°C. For protein expression analysis, 10 mg of stored cells were resuspended in 500 μL Buffer A (100 mM Tris-HCl, pH 7,8), disrupted by sonication, and cell debris were removed by centrifugation. Both soluble and insoluble fractions were analysed by SDS-PAGE 12% [13]. Control experiments were performed under the same experimental conditions except that *E. coli* host cells were transformed with the expression vector lacking the target gene.

Purification of recombinant PDE5 catalytic domain

All steps of the purification protocol of recombinant PDE5 were performed on ice or at 4°C. Approximately 10g of cells were collected by centrifugation (48,000 g for 20 min) from 9 L of LB medium. Frozen cells were thawed, resuspended in Buffer A (4 mL of buffer per gram of cell paste), 0.2 mg.mL^{-1} of lysozyme was added, and the mixture was stirred for 30 minutes. Cells were disrupted by sonication, and cell debris were removed by centrifugation at 48.000 g for 30 minutes. The supernatant containing

soluble PDE5 was incubated with 1% (w/v) of streptomycin sulfate for 30 min and centrifuged at 48,000 g for 30 min. The supernatant was dialyzed twice against Buffer A, using a dialysis tubing with molecular weight exclusion limit of 12000–14000 Da. This sample was clarified by centrifugation (48,000 g for 30 min) and loaded onto an FPLC Q-Sepharose fast flow column (GE Healthcare) pre-equilibrated with the same buffer. The column was washed with 5 column volumes of buffer A, and the absorbed material was eluted with a linear gradient (0–100%) of 20 column volumes of 100 mM Tris–HCl, pH 7.8, 1 M NaCl (buffer B). The PDE5-containing fractions were pooled and ammonium sulfate was added to a final concentration of 1 M, followed by centrifugation (48,000 g for 30 min). The supernatant was loaded onto a Butyl-Sepharose fast flow (GE Healthcare) column pre-equilibrated with 100 mM Tris–HCl, pH 7.8, 1M (NH₄)₂SO₄ (buffer C). The column was washed with 5 column volumes of buffer C and bounded proteins were eluted with a 20 column volume linear gradient (0–100%) of buffer A. The fractions containing PDE5 catalytic domain were pooled and concentrated to less than 4 mL using an Amicon ultrafiltration cell (MWCO 10,000 Da), and loaded onto a Sephacryl S-100 (GE Healthcare) column pre-equilibrated with buffer A. Elution profiles were followed at 280 and 215 nm. Homogeneous PDE5 catalytic domain was eluted in a total volume of 15 mL and stored at -80°C. Protein purification was monitored by SDS–PAGE [13], and the protein concentration was determined by the method of Bradford et al. [14] using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad) and bovine serum albumin as standard.

PDE5 catalytic domain enzyme assay

Enzyme activity of recombinant PDE5 catalytic domain was assayed in the forward direction by a coupled spectrophotometric method with the enzyme GMP reductase. The GMP reductase catalyzes the irreversible reductive deamination of

5'GMP to IMP ($5'GMP + NADPH + H^+ \rightarrow IMP + NH_3 + NADP^+$). This assay was coupled with the GMP reductase because the substrate and the product of the reaction catalyzed by the catalytic domain of the PDE5 (hydrolysis of the cGMP to 5'GMP) did not have significant spectrophotometric differences. All reactions were carried out at 25°C and initiated with the addition of the GMP reductase to a reaction mixture containing: 100 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM cGMP (Sigma), 180 μ M NADPH (Sigma), 130 μ g of the PDE5 catalytic domain, and the oxidation of NADPH was monitored at 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). One unit of enzyme (U) is defined as the amount of enzyme catalyzing the conversion of 1 μ mol NADPH min^{-1} at 25°C in a 1 cm optical path.

Mass spectrometry analysis

The subunit molecular mass of PDE5 catalytic domain was determined by ESI-MS, adjusting the mass spectrometer to give a peak width at half-height of 1 mass unit, and the cone sample to skimmer lens voltage controlling the ion transfer to mass analyzer was set to 38 V. About 50 pmol sample was injected into electrospray transport solvent. The ESI spectrum was obtained in the multi-channel acquisition mode, scanning from m/z 500 to 2,000 at scan time of 7 s. The mass spectrometer is equipped with MassLynx and Transform softwares for data acquisition and spectra handling.

N-terminal amino acid sequencing

The N-terminal amino acid residues of purified recombinant PDE5 catalytic domain were identified by automated Edman degradation sequencing using a PPSQ 21A gas-phase sequencer (Shimadzu).

2.4 Results and Discussion

The catalytic domain of the PDE5 was constructed using the PCR conditions and the technique of *overlapping* [12] (Fig. 1)

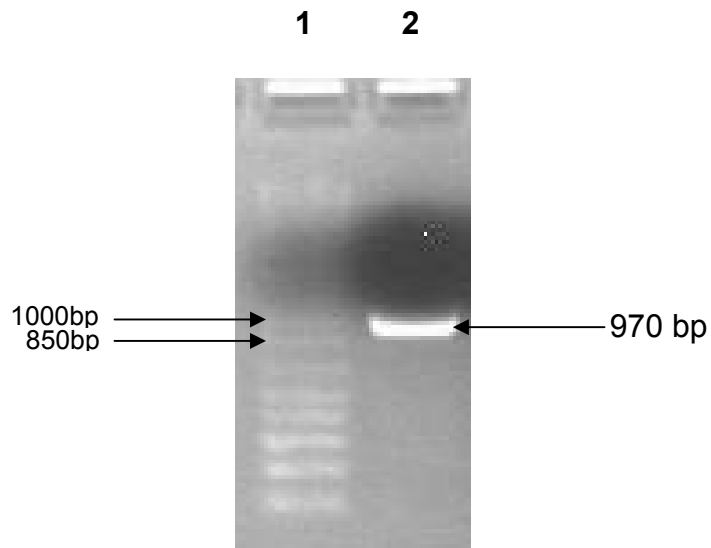


Fig.1. Agarose gel (2%) electrophoresis of PCR product from the construction of the final fragment of the coding region of the catalytic domain of PDE5. Lane 1: Molecular marker 1kb plus DNA Ladder. Life technologies. Gibco BRL; Lane 2: PCR amplification of the constructed fragment (970pb).

The PCR fragment was cloned into pCRBlunt[®] vector and digested with the restriction enzymes *Nde*I and *Bam*HI to lately be subcloned into the pET23a(+) expression vector between the *Nde*I and *Bam*HI restriction sites (Fig. 2). Automatic sequencing by Mega Bace 1000 (Healthcare) confirmed the identity of the cloned PCR product and showed that no mutations were introduced by the construction and DNA amplification steps.

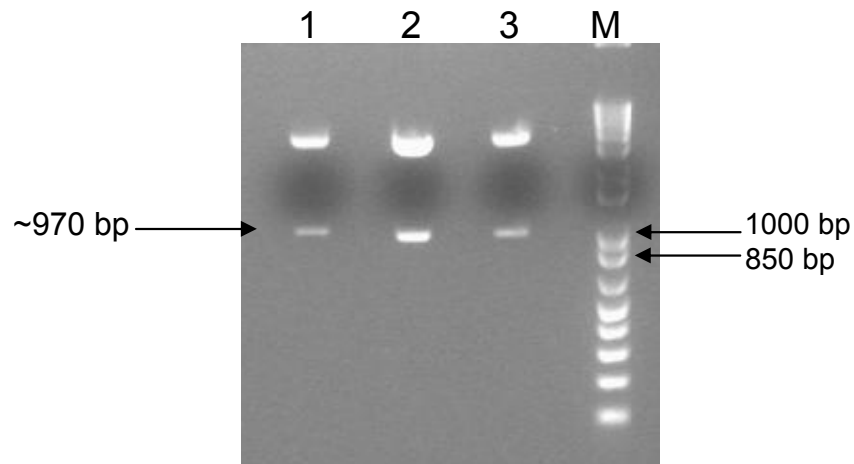


Fig 2: Agarose gel (2%) electrophoresis showing the expression vector pET23a(+)-PDE5 digested with the restriction enzymes *Nde*I and *Bam*HI. Lane 1, 2, 3: pET23a(+) and the expected fragment for PDE5 (970 bp). Lane M: Molecular marker 1kb plus DNA Ladder. Life technologies. Gibco BRL

Recombinant plasmids were introduced into *E. coli* BL21 (DE3) host cells by electroporation. Unfortunately, recombinant PDE5 catalytic domain remained in the insoluble fraction (data not shown). Since one of the goals of this work was to obtain the pure and active catalytic domain of the PDE5, efforts were made to express recombinant PDE5 catalytic domain in its soluble, active form avoiding unfolding and refolding protocols because they cannot guarantee large amounts of biologically active product [16]. In addition, a number of protocols were tested to obtain the PDE5 catalytic domain in the soluble fraction, including buffer additives (urea, Triton X-100, and high NaCl concentrations) and reduced cultivation temperature (25 and 30 °C). In practice, it is usually worthwhile to test several different vector/host combinations to obtain the best

possible yield of protein in its desired form. Accordingly, a number of commercially available strains of *E. coli* host cells were tested in an attempt to produce PDE5 catalytic domain in the soluble fraction. Since the human catalytic domain of PDE5 has nine cysteine residues, which might be involved in disulfide bonds, a less reducing cytoplasmic environment could improve PDE5 catalytic domain solubility. The Origami *E. coli* host strains (Novagen) have mutations in both the thioredoxin reductase (*trxB*) and glutathione reductase (*gor*) genes, which greatly enhance disulfide bond formation in the cytoplasm [17,18]. Unfortunately, this protocol did not yield soluble PDE5 catalytic domain. Analysis of the relationship between codon preference and expression level led to the classification of *E. coli* genes into three main classes [19]. Class II genes, which correspond to genes highly and continuously expressed during exponential growth that is likely to resemble the tRNA population available for recombinant protein expression, have a number of avoided codons with frequencies of less than 6%. Insufficient tRNA pools can lead to premature translational termination, translation frameshifting or amino acid misincorporation that might result in expression of nonproperly folded recombinant protein [20]. Rare codons, especially at the N-terminus of a coding sequence can have a severe effect on heterologous expression in *E. coli* [21]. Three rare codons for heterologous gene expression in *E. coli* are present near the N-terminus of the PDE5 catalytic domain. To test whether these rare codons may have any effect on PDE5 catalytic domain expression, *E. coli* Rosetta (DE3) strain harboring tRNA genes for AGG, AGA, AUA, CUA, CCC and GGA rare codons on a chloramphenicol-resistant plasmid was transformed with pET23a(+)-PDE5 recombinant plasmid. SDS-PAGE analysis showed the expression of recombinant PDE5 catalytic domain protein in its soluble form with the expected molecular mass (~35 kDa) could be achieved using the Rosetta (DE3) cells grown at 15°C for 24 h with IPTG induction (Fig. 3). The underlying

reason for this result is unclear because other *E. coli* strains with the availability to express rare codons were tested and the results were not satisfactory (data not shown). However, it underscores the need for optimization of vector/host combinations to achieve soluble recombinant protein expression before attempting any unfolding / refolding protocols.

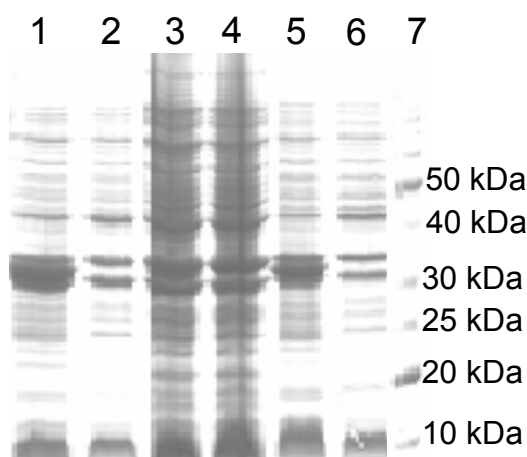


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of soluble protein extracts, 24 h growth at 15°C. Lane 1: Rosetta (DE3) pET23a(+)-PDE5 with 0.1mM of IPTG. Lane 2: Rosetta (DE3) pET23a(+) with 0.1mM of IPTG. Lane 3: Rosetta (DE3) pET23a(+)-PDE5 without IPTG. Lane 4: Rosetta (DE3) pET23a(+) without IPTG. Lane 5: Rosetta (DE3) pET23a(+)-PDE5 with 0.4mM of IPTG. Lane 6: Rosetta (DE3) pET23a(+) with 0.4mM of IPTG. Lane 7: BenchMark Protein Ladder (GIBCO).

It should be pointed out that a screening of experimental conditions was carried out to obtain high yield of recombinant protein expression, including temperature of growth, culture aeration, medium type, hours of growth after IPTG induction, and hours

of growth in the absence of IPTG. The best results were obtained from Rosetta (DE3) *E. coli* cells grown for 24 h at 15°C in LB medium with the IPTG induction. The pET system makes use of the powerful T7 RNA polymerase, under control of IPTG-inducible *lacUV5* promoter, to transcribe target genes of interest [22]. The IPTG binds to the repressor protein *LacI*, stopping its activity, making it possible for the T7 RNA polymerase to activate the transcription of the gene. Besides this, the high processing of this RNA polymerase makes high concentrations of mRNA, consequently the production of the protein of interest is also high, reaching 40 to 50% from the total protein extract [16].

Enzyme activity measurements demonstrated that there was a 141-fold- increase in specific activity for PDE5 catalytic domain when crude extracts from Rosetta (DE3) *E. coli* harboring pET23a(+)-*PDE5* were compared with those containing pET23a(+) only (Table 1), indicating that the catalytic domain of PDE5 was expressed in its soluble and functional form. The purification protocol of the recombinant PDE5 catalytic domain, enzyme assay, and SDS-PAGE analysis were as described in Materials and methods. Recombinant PDE5 catalytic domain was purified to electrophoretic homogeneity (Fig. 4). The purification protocol yielded approximately 1.5 mg of homogeneous protein. The purification comprised of three steps, where the first column was a Q-sepharose FF (anionic change), the second was a Butyl Sepharose FF (hydrophobic interaction), and the third was a Sephacryl S100 (size exclusion). In the SDS-PAGE analysis, no other bands were significantly present, making it possible to assume that the PDE5 catalytic domain was homogeneous.

Table 1

Measurements of recombinant PDE5 catalytic domain enzyme activity

Cell extract ^a	Specific activity ^b (SA, U mg ⁻¹)	SA cloned / SA control
Control	0.0007	1
PDE5 catalytic domain	0.0987	141

^a Crude cell extract in 100 mM Tris-HCl, pH 7.0.

^b U mL⁻¹/mg mL⁻¹.

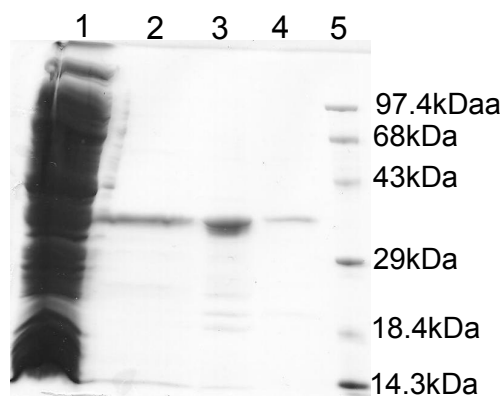


Fig. 4. SDS-PAGE (12.5%) analysis of pooled fractions from the various steps of the purification protocol of PDE5 catalytic domain . Lane 1, crude extract; lane 2, Q-Sepharose fast flow ion exchange; lane 3, Butyl-Sepharose hydrophobic interaction; lane 4, Sephacryl S-200 gel permeation; lane 5, MW marker high Range (Gibco).

The subunit molecular mass of the active catalytic domain of PDE5 was determined to be 35164.3 Da by ESI-MS, consistent with the post translational removal of the N-terminal methionine residue from the full length gene product (predicted mass: 35295.43Da). The first 15 N-terminal amino acids residues of the recombinant protein

were identified as EETRELQSLAAAVVP by the Edman degradation chemistry protocol. This result unambiguously identifies the homogeneous recombinant protein as the catalytic domain of PDE5 and confirms the removal of the N-terminal methionine residue, a common co/post-translational modification of proteins synthesized in prokaryotic cells in modification at their N-termini. Methionine aminopeptidase catalyzed cleavage of initiator methionine is usually directed by the penultimate amino acid residues with the smallest side chain radii of gyration (glycine, alanine, serine, threonine, proline, valine and cysteine) [23]. According to the amino acid sequence, this is not valid for the PDE5, since the penultimate amino acid is a glutamate (Glu), considered as a large amino acid. Some middle sized amino acids can also undergo N-terminal processing (Asn, Asp, Leu, and Ile) [24] but this is not the case either.

The major intracellular receptors for cGMP, for example PDE5, are abundant in vascular smooth muscle cells, including those of the penis. Because cGMP elevation is known to relax vascular smooth muscle, there has been interest in developing inhibitors of PDE5 that would block cGMP degradation. To this end, PDE5 has been used to screen for potentially potent and selective PDE5 inhibitors. The homogeneous PDE5 catalytic domain will provide protein in quantities necessary for the screening of natural plant extracts from the Brazilian biodiversity. This screening will allow us to research for a natural and specific inhibitor for the catalytic domain of PDE5 and hopefully develop a new drug for erectile dysfunction with reduced side effects.

2.5 References

[1] S.H. Francis, E.P. Bessay, J. Kotera, K.A. Grimes, L. Liu, W.J. Thompson, and J.D. Corbin Phosphorylation of Isolated Human Phosphodiesterase-5 Regulatory Domain Induces an Apparent Conformational Change and Increases cGMP Binding Affinity, *J. Biol. Biochem* (2002) 277: 47581-47587.

[2] G.L. Card *et al.* Structural Basis for the Activity of Drugs that Inhibit Phosphodiesterases, *Structure* (2004)12: 2233-2247.

[3] Q. Huai *et al.* Crystal Structures of Phosphodiesterases 4 and 5 in Complex with Inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine Suggest a Conformation Determinant of Inhibitor Selectivity, *J. Biol. Biochem* (2004) 279: 13095-13101.

[4] D. Rotella Phosphodiesterase 5 Inhibitors: Current Status and Potencial Applications, *Nat. Rev. Drug. Discov* (2002) 1: 647-682.

[5] J.D. Corbin and S.H. Francis Cyclic GMP Phosphodiesterase-5: Target of Sildenafil, *J. Biol. Chem* (1999) 247: 13728-13732.

[6] J.D. Corbin, I.V. Turko, A. Beasley, S.H. Francis Phosphorylation of Phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities, *Eur. J. Biochem* (2000) 267: 2760-2767.

[7] J.D. Corbin, S.H. Francis, D.J. Webb Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic Target in Erectile Dysfunction, *Urology* (2002) 60: (supplement 2B) 4-11.

[8] J.D. Corbin *et al.* [³H] Sildenafil Binding to Phosphodiesterase-5 Is Specific, Kinetically, and Stimulated by cGMP, *Mol. Pharmacol* (2003) 63: 1364-1372.

[9] M.K. Thomas, S.H. Francis, and J.D. Corbin Substrate and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP, *J. Biol. Chem* (1990) 265: 14971-14978.

[10] V.I. Turko, S.H. Francis, and J.D. Corbin Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation, *Biochem. J* (1998) 329: 505-510.

[11] T.L. Fink, S.H. Francis, A. Beasley, K.A. Grimes, J.D. Corbin Expression of an Active, Monomeric Catalytic Domain of the cGMP-binding cGMP-specific Phosphodiesterase (PDE5), *J. Biol. Chem* (1999) 274: 34613-34620.

[12] S.N. Ho, H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen and L.R. Pease Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene* (1989) 77: 51-59.

[13] U.K. Laemmli Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (1970) 227: 680-685.

[14] M.M. Bradford, R.A. McRorie, W.L. Williams A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem* 72 (1976) 248-254.

[15] H. Chassaigne, R. Lobinski, Characterization of horse kidney metallothionein isoforms by electrospray MS and reversed-phase HPLC-electrospray MS, *Analyst* 123 (1998) 2125-2130.

[16] C.H. Schein, Production of soluble recombinant proteins in bacteria, *Bio/technology* 7 (1989) 1141-1149.

[17] W.A. Prinz, F. Aslund, A. Holmgren, J. Beckwith, The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in redox-facilitate attempts at crystallizing and elucidating the protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm, *J. Biol. Chem* 272 (1997) 15661-15667.

[18] F. Baneyx, Recombinant protein expression on *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotechnol* 10 (1999) 411-421.

[19] A. Hénaut, A. Danchin, Analysis and predictions from *Escherichia coli* sequences, or *E. coli* in silico, in: F.C. Neidhardt (Ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, ASM Press, Washington, DC, 1996, pp. 2047-2066.

[20] C. Kurland, J. Gallant, Error of heterologous protein expression, *Curr. Opin. Biotechnol* 7 (1996) 489-493.

[21] Y. Nakamura, T. Gojobori, T. Ikemura, Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 292.

[22] K.C. Kelley, K.J. Huestis, D.A. Austen, C.T. Sanderson, M.A. Donoghue, S.K. Stickel, E.S. Kawasaki, M.S. Osburne Regulation of CD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in *Escherichia coli*. *Gene* (1995) 156: 33-36.

[23] W.T. Lowther, B.W. Matthews, Structure and function of the methionine aminopeptidases, *Biochim. Biophys. Acta* 1477 (2000) 157-167.

[24] P.H. Hirel, J.M. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, S. Blanquet, Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side chain length of the penultimate amino acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 8247-8251.

Capítulo 3

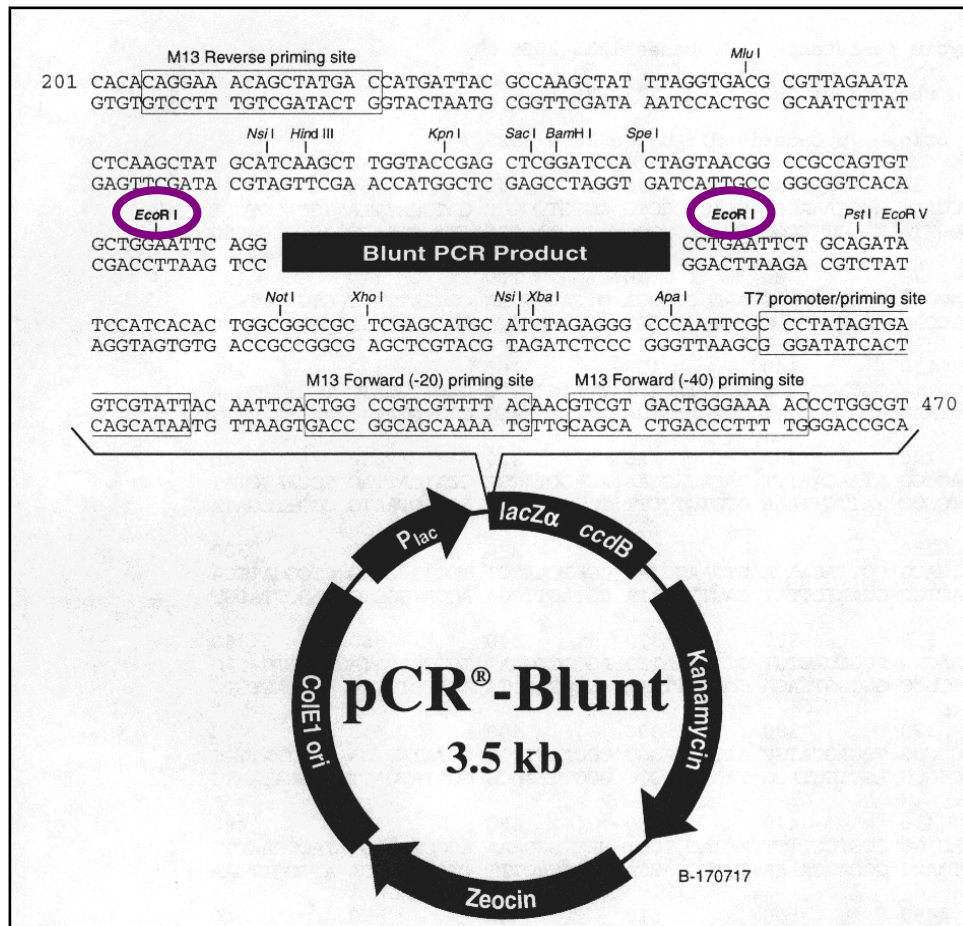
3.1 Considerações Finais e Perspectivas

A região codificante do domínio catalítico da fosfodiesterase 5 foi sintetizado utilizando a técnica de *overlapping* por PCR. O fragmento desejado foi clonado em vetor de expressão pET23a(+) e seqüenciado para confirmação da ausência de mutações. Uma triagem de diversos experimentos como testes de diferentes cepas *E. coli* para expressão de proteínas heterólogas, aeração, pH, composição de meio de cultura e temperatura foram realizados com o intuito de se obter o domínio catalítico da PDE5 em sua forma homogênea e ativa. O plasmídeo recombinante foi transformado em células de *E. coli* Rosetta (DE3) e apresentou expressão na fração solúvel. Com a obtenção do domínio catalítico da PDE5 em sua forma solúvel testes espectrofotométricos confirmaram sua atividade. Sabendo que este domínio era expresso em sua forma solúvel e ativa iniciou-se a determinação de seu protocolo de purificação. Através de três etapas de purificação, utilizando colunas de troca iônica, interação hidrofóbica e de exclusão por tamanho o domínio catalítico da PDE5 foi obtido em sua forma homogênea.

Como perspectivas neste trabalho tem-se a utilização do BIACORE, equipamento que utiliza a técnica de ressonância plasmônica de superfície, onde se utilizará a proteína pura para realização de uma triagem, utilizando extratos de plantas já conhecidos da biodiversidade brasileira, em busca de possíveis candidatos a inibidores naturais para a fosfodiesterase 5, plantas como por exemplo a catuama são fortes candidatas a serem testadas [54].

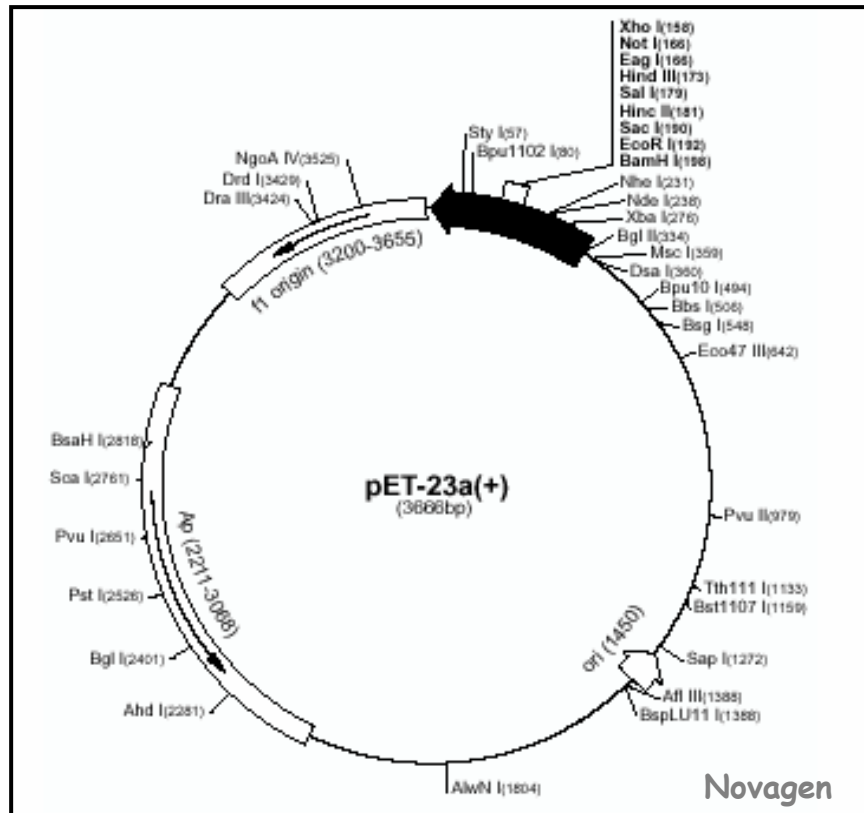
Anexo I

Mapa do vetor de clonagem pCR-Blunt.



Anexo II

Mapa do vetor de expressão pET23a(+).



1.5 Referências Bibliográficas

[1] Corbin JD, Francis SH and Webb DJ. Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic Target in Erectile Dysfunction. *Urology*. 2002; 60 Suppl 2B: 4-11.

[2] Champion HC, Bivalacqua TJ, Takimoto E, Kass DA and Burnett AL. Phosphodiesterase - 5A dysregulation in penile erectile tissue is a mechanism of priapism. *PNAS*. 2005; 102: 1661-1666.

[3] Corbin JD, Beasley A, Blount, MA and Francis SH. Vardenafil: structural basis for higher potency over sildenafil in inhibiting cGMP-specific phosphodiesterase-5 (PDE5). *Neurochem Int*. 2004; 45: 859-863.

[4] Loughney K, Hill TR, Florio VA, Uher L, Rosman GJ, Wolda SL, et al. Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene*. 1998; 216: 139-147.

[5] Stacey P, Rulten S, Dapling A and Phillips SC. Molecular Cloning and Expression of Human cGMP-binding cGMP-specific Phosphodiesterase (PDE5). *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 247: 249-254.

[6] Francis SH, Turko and Corbin JD. Cyclic Nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001; 65: 1-52.

[7] Butcher RW, Sutherland EW. Adenosine 3',5' - phosphate in biological materials. J Biol Chem. 1962; 237: 1244-1250.

[8] Thompson WJ, Terasaki WL, Epstein PM and Strada SJ. Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterase and resolution of multiple molecular forms of the enzyme. Adv Cyclic Nucleotide Res. 1979; 10: 69-92.

[9] Beavo JA, Hansen RS, Harrison SA, Hurwitz RL, Martins TJ and Mumby MC. Identification and properties of cyclic nucleotide phosphodiesterase. Mol Cell Endocrinol. 1982; 28: 387-410.

[10] Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. Nat Rev Drug Discov. 2006; 5 (8): 689-702.

[11] Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular Regulation to clinical use. Pharmacol Rev. 2006; 58: 488-520.

[12] Corbin JD and Francis SH. Cyclic GMP Phosphodiesterase-5: Target of Sildenafil. J Biol Chem. 1999; 274: 13728-13732.

[13] Lin G, Xin ZC, Lue TF, Lin CS. Phosphodiesterase – 5 isoforms: differential cyclic guanyl monophosphate binding and cyclic guanyl monophosphate catalytic activities, and inhibitory effects of sildenafil and vardenafil. J Urol. 2006; 176 (3): 1242-1247.

[14] Zhang KY, Card GL, Suzuki Y, Artis DR, Fong D, Gillette S, et al. A Glutamine Switch Mechanism for Nucleotide Selectivity by Phosphodiesterases. *Mol Cell*. 2004; 15: 279-286.

[15] Scapin G, Patel SB, Chung C, Vernerin JP, Edmondson SD, Mastracchio A, et al. Crystal Structure of human phosphodiesterase 3B: atomic basis for substrate and inhibitor specificity. *Biochemistry*. 2004; 43: 6091-6100.

[16] Xu RX, Hassell AM, Vanderwall D, Lambert MH, Holmes WD, Luther MA, et al. Atomic structure of PDE4: insights into phosphodiesterase mechanism and specificity. *Science*. 2000; 288: 1822-1825.

[17] Xu RX, Rocque WJ, Lambert MH, Vanderwall DE, Luther MA, and Nolte RT. Crystal structures of the catalytic domain of phosphodiesterase 4B complexed with AMP, 8-Br-AMP, and rolipram. *J Mol Biol*. 2004; 337: 355-365.

[18] Card GL, England BP, Suzuki Y, Fong D, Powell B, Lee B, et al. Structural Basis for the Activity of Drugs that Inhibit Phosphodiesterases. *Structure*. 2004; 12: 2233-2247.

[19] Card GL, Blasdel L, England BP, Zhang C, Suzuki Y, Gillette S, et al. A family of phosphodiesterase inhibitors discovered by cocrystallography and scaffold-based drug design. *Nat Biotechnol*. 2005; 23: 201-207.

[20] Lee ME, Markowitz J, Lee JO and Lee H. Crystal Structure of phosphodiesterase 4D and inhibitor complex. *FEBS Lett*. 2000; 530: 53-58.

[21] Huai Q, Wang H, Sun Y, Kim HY, Liu Y and Ke H. Three-dimensional structures of PDE4D in complex with roliprams and implication on inhibitor selectivity. *Structure*. 2003; 11: 865-873.

[22] Huai Q, Liu Y, Francis SH, Corbin JD and Ke H. Crystal Structures of Phosphodiesterases 4 and 5 in Complex with Inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine Suggest a Conformation Determinant of Inhibitor Selectivity. *J Biol Chem*. 2004; 279: 13095-13101.

[23] Huai Q, Colicelli J and Ke H. The crystal structure of AMP-bound PDE4 suggests a mechanism for phosphodiesterase catalysis. *Biochemistry*. 2003; 42: 13220-13226.

[24] Sung BJ, Hwang KY, Jeon HJ, Lee J, Heo YS, Kim JH, et al. Structure of the catalytic domain of human phosphodiesterase 5 with bound drug molecules. *Nature*. 2003; 425: 98-102.

[25] Wang H, Liu Y, Chen Y, Robinson H and Ke H. Multiple elements jointly determine inhibitor selectivity of cyclic nucleotide phosphodiesterases 4 and 7. *J Biol Chem*. 2005; 280: 30949-30955.

[26] Huai Q, Wang H, Zhang W, Colman RW, Robinson H and Ke H. Crystal structure of phosphodiesterase 9 shows orientation variation of inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine binding. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 9624-9629.

[27] Ke H. Implications of PDE4 structure on inhibitor selectivity across PDE families. *Int J Impot Res.* 2004; 16 Suppl 1: S24-S27.

[28] Zoraghi R, Corbin JD and Francis SH. Phosphodiesterase-5 Gln-817 is critical for cGMP, vardenafil, or sildenafil affinity: its orientation impacts cGMP but not cAMP affinity. *J Biol Chem.* 2006; 281: 5553-5558.

[29] Turko VI, Francis SH and Corbin JD. Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation. *Biochem J.* 1998; 329: 505-510.

[30] Zoraghi R, Francis SH, Corbin JD. Critical amino acids in phosphodiesterase 5 catalytic site that provide for high affinity interaction with cyclic guanosine monophosphate and inhibitors. *Biochemistry.* 2007; 46: 13554-13563.

[31] Jeon YH, Heo YS, Kim CM, Hyun YL, Lee TG, Ro S and Cho JM. Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 1198-1220.

[32] Coquil JF, Franks DJ, Wells JN, Dupuis M and Hamet P. Characteristics of a new binding protein distinct from the kinase for guanosine 3',5'-monophosphate in rat platelets. *Biochim Biophys Acta.* 1980; 631: 148-165.

[33] Francis SH, Lincoln TM and Corbin JD. Characterization of a novel cGMP binding protein from rat lung. *J Biol Chem.* 1980; 255: 620-626.

[34] Campos MM, Fernandes ES, Ferreira J, Bortolanza LB, Santos AR, Calixto JB. Pharmacological and neurochemical evidence for antidepressant-like effects of the herbal product catuama. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004; 78: 757-764.

[35] Prickaerts j, Sik A, van Staveren WC, Koopmans G, Steinbusch HW, van der Staay FJ, et al. Phosphodiesterase type 5 inhibition improves early memory consolidation of object information. *Neurochem Int.* 2004; 45: 915-928.

[36] Corbin JD and Francis SH. Cyclic GMP Phosphodiesterase-5: Target of Sildenafil. *J Biol Chem.* 1999; 274: 13728-13732.

[37] Thomas MK, Francis SH, Beebe SJ, Gettys TW, Corbin JD. Partial mapping of cyclic nucleotide sites and studies of regulatory mechanisms of phosphodiesterases using cyclic nucleotide analogues. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1992; 25: 45-53.

[38] McAllister-Lucas LM, Haik TL, Colbran JL, Sonnenburg WK, Seger D, Turko IV, et al. An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of a cGMP specific phosphodiesterase. *J Biol Chem.* 1995; 270: 30671-30679.

[39] Zoraghi R, Bessay EP, Corbin JD and Francis SH. Structural and functional features in human PDE5A1 regulatory domain that provide for allosteric cGMP binding, dimerization, and regulation. *J Biol Chem.* 2005; 280: 12051-12063.

[40] Blount MA, Zoraghi R, Ke H, Bessay EP, Corbin JD and Francis SH. A 46-amino acid segment in phosphodiesterase 5 GAF-B domain provides for high vardenafil potency over sildenafil and tadalafil and is involved in PDE5 dimerization. *Mol Pharmacol.* 2006; 70: 1822-1831.

[41] Thomas MK, Francis SH, Corbin JD. Substrate and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *J Biol Chem.* 1990; 265: 14971-14978.

[42] Corbin JD, Blount MA, Weeks II JL, Beasley A, Kuhn KP, Ho YSJ, et al. [³H] Sildenafil Binding to Phosphodiesterase-5 Is Specific, Kinetically, and Stimulated by cGMP. *Mol Pharmacol.* 2003; 63: 1364-1372.

[43] Mullershausen F, Russwurm M, Thompson WJ, Liu L, Koesling D and Friebe A. Rapid nitric oxide-induced desensitization of the cGMP response is caused by increase activity of phosphodiesterase 5 paralleled by phosphorylation of the enzyme. *J Cell Biol.* 2001; 155: 271-278.

[44] Rybalkin SD, Rybalkina IG, Feil R, Hofmann F and Beavo JA. Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2002; 277: 3310-3317.

[45] Murthy KS. Activation of phosphodiesterase 5 and inhibition of guanylate cyclase by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle cells. *Biochem J.* 2001; 360: 199-208.

[46] Mullershausen F, Friebe A, Feil R, Thompson JW, Hofmann F, Koesling D. Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. *J Cell Biol.* 2003; 160 (5): 719-727.

[47] Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res.* 2003; 93(4): 280-291.

[48] Corbin JD and Francis SH. Molecular biology and pharmacology of PDE5-inhibitor therapy for erectile dysfunction. *J Androl.* 2003; 24 Suppl 6: S38-S41.

[49] Corbin JD, Turko IV, Beasley A and Francis SH. Phosphorylation of Phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 2760-2767.

[50] Blount MA, Beasley A, Zoraghi R, Sekhar KR, Bessay PB, Francis SH and Corbin JD. Binding of Tritiated Sildenafil, Tadalafil, or Vardenafil to the Phosphodiesterase-5 Catalytic Site Displays Potency, Specificity, Heterogeneity, and cGMP Stimulation. *Mol Pharmacol.* 2004; 66: 144-152.

[51] Rotella D. Phosphodiesterase 5 Inhibitors: Current Status and Potential Applications. *Nature Review.* 2002; 1: 647-682.

[52] Pomeranz HD and Bhavsar AR. Nonarteretic ischemic optic neuropathy developing soon after use of sildenafil (Viagra): A report of seven new cases. *J Neuro-Ophthalmol.* 2005; 25: 9-13.

[53] Sowka JW, Neiberg MN and Vollmer L. Optic atrophy after sildenafil use. *Optometry.* 2007; 78: 122-128.

[54] Calixto JB, Cabrini DA. Herbal medicine catuama induces endothelium-dependent and –independent vasorelaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. *Phytother Res.* 1997; 11: 32-38.

[55] Drewes SE, George J, Khan F. Recent findings on natural products with erectile-dysfunction activity. *Phytochemistry.* 2003; 62 (7): 1019-1025.

[56] Lewinsohn TM e Prado PI. *Biodiversidade Brasileira: Síntese do estado atual do conhecimento.* 2002; 1ª edição. Editora Contexto, São Paulo.