

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

CANDIDA DEVES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA TIMIDINA FOSFORILASE
HUMANA COMO ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE NOVOS
CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA A QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER**

Porto Alegre

2013

CANDIDA DEVES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA TIMIDINA FOSFORILASE
HUMANA COMO ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE NOVOS
CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA A QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutor pelo Programa
de Pós-Graduação em Medicina e Ciências
da Saúde da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre

2013

D491c Deves, Candida

Caracterização bioquímica da enzima timidina fosforilase humana como alvo para o desenvolvimento racional de novos candidatos a fármacos para a quimioterapia do câncer / Candida Deves. –

Porto Alegre, 2013.

166 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos.

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

1. Medicina. 2. Oncologia. 3. Quimioterapia. 4. Enzimas -
Estudo. 5. Medicamentos - Desenvolvimento. I. Santos, Diógenes
Santiago. II. Basso, Luiz Augusto. III. Título.

CDD 615.1

Ficha Catalográfica elaborada por Loiva Duarte Novak – CRB10/2079

CANDIDA DEVES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA TIMIDINA FOSFORILASE
HUMANA COMO ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE NOVOS
CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA A QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutor pelo Programa
de Pós-Graduação em Medicina e Ciências
da Saúde da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul

Aprovada em: _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro – UFRJ

Dra. Najda Schroder – PUCRS

Dra. Denise Cantarelli Machado – PUCRS

Dr. Osmar Norberto de Souza – PUCRS

Porto Alegre

2013

Dedico esta tese aos meus pais,

Estela e Alexandre,

por todo o amor, carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos, pela oportunidade, pela confiança, pelos ensinamentos e pelos conselhos ao longo destes oito anos de trabalho;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luiz Augusto Basso, pelos ensinamentos, pela paciência e pela revisão do manuscrito;

Aos Professores Dr. Pablo Machado e Dr. Cristiano Bizarro, por me ajudarem a desenvolver parte deste trabalho, pela paciência, pelas sugestões e pela amizade;

Aos colegas, Dr. Rafael Cáceres e Luís Fernando Saraiva, pela realização de uma parte deste trabalho e pela amizade;

Aos colegas e amigos, Diana Rostirolla, Daiana Renck e Leonardo Martinelli, pela ajuda, por todas as sugestões relevantes, pelos ensinamentos e principalmente pela amizade;

Aos queridos colegas e amigos, Valnês Rodrigues Jr, Anne Drumond Villela, Priscila Wink, Zilpa Adriana Quitian, pelo apoio, pelas conversas, pelos desabafos, enfim, por tornarem a execução deste trabalho mais fácil e agradável;

Às amigas, Paula Kellermann e Gabriela Lucas pela amizade, pela dedicação, pelos desabafos, pelos momentos de descontração;

Ao meu noivo, Gustavo Roth, pela paciência e pelo incentivo diário;

À minha família pelo constante apoio e carinho.

“Happiness is only real when shared.”

*“A felicidade somente é real quando
compartilhada.”*

Christopher McCandless

RESUMO

A Timidina fosforilase humana (hTP), também conhecida como PD-ECGF e gliostatina, é uma enzima importante no metabolismo de nucleotídeos. A hTP é um alvo molecular para o desenho de inibidores enzimáticos com possível uso na terapia do câncer, visto que essa enzima encontra-se superexpressa em alguns tipos de tumores sólidos e sua atividade catalítica é essencial para promoção da angiogênese. Esta tese descreve a amplificação, clonagem, expressão heteróloga em *E. coli*, purificação e caracterização bioquímica do precursor e da proteína madura hTP. Análises de espectrometria de massa confirmaram a identidade das proteínas recombinantes e ensaios de cromatografia de exclusão por tamanho revelaram que ambas as enzimas encontram-se como dímeros em solução. Estudos cinéticos permitiram a determinação das constantes cinéticas aparentes e verdadeiras para a reação direta e mostraram que as enzimas apresentam inibição pelo substrato timidina. Estudos espectrofotométricos de velocidade inicial e estudos de ligação por microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC) sugerem que a catálise enzimática segue um mecanismo cinético bi-bi aleatório de rápido equilíbrio. As constantes termodinâmicas e o perfil de discriminação termodinâmica permitiram a identificação dos modos de interação dos substratos/produtos naturais das enzimas com seus sítios de ligação. Além disto, esses estudos revelaram diferenças nas constantes cinéticas e nos parâmetros termodinâmicos entre o precursor e a proteína madura e tais diferenças foram evidenciadas por meio da análise estrutural de ambas as enzimas. O perfil de pH mostrou que a atividade enzimática máxima foi obtida em valores de pH baixos, e que grupamentos funcionais com valores de pK de 5,1 – 5,2 e 9,0 – 9,2 estão envolvidos na ligação à timidina e grupamentos com valores de pK de 6,1 – 6,2 e 7,8 – 8,6 estão envolvidos na ligação ao fosfato. Os resultados da caracterização da enzima fornecem dados adicionais que podem ser úteis para o desenho racional de novos inibidores da hTP. Os compostos químicos planejados e sintetizados como possíveis inibidores da atividade da hTP foram ativos em ambas as formas da enzima, sendo que o composto **5g** apresentou o melhor potencial inibitório. O composto **5g** foi caracterizado como um inibidor não competitivo em relação aos substratos naturais timidina e fosfato. O mecanismo de inibição não competitiva sugere a existência de um sítio de ligação alostérico na hTP, diferente dos sítios de ligação aos substratos, podendo ser considerado um alvo molecular importante para a busca de inibidores potentes e seletivos para hTP.

ABSTRACT

Human thymidine phosphorylase (hTP) also known as platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) or gliostatin, has an important role in nucleotide metabolism. hTP is a molecular target for anticancer drug development since it is overexpressed in certain solid tumours, and its catalytic activity has been shown to be essential to promote angiogenesis. This work describes amplification, cloning, and recombinant expression in *E. coli*, purification to homogeneity of both precursor and mature protein hTP. Mass spectrometry analysis confirmed the identity of homogeneous hTP and size exclusion chromatography showed that hTP proteins are a dimer in solution. Kinetic studies allowed the determination of apparent and true kinetic constants for forward reaction, and showed that enzymes displayed substrate inhibition for thymidine. Initial velocity and isothermal titration calorimetry (ITC) studies suggested that hTP catalysis follows a rapid-equilibrium random bi-bi kinetic mechanism. Thermodynamic constants and discrimination profile allowed natural enzyme's substrates/products binding patterns identification. Additionally, these studies showed differences in the kinetic constants and the thermodynamic parameters between the precursor and the mature protein and these differences were revealed by structural analysis using molecular modeling. The pH-rate profiles suggested that maximal enzyme activity was achieved at low pH values, and functional groups with a pK values of 5.1 – 5.2 and 9.0 – 9.2 are involved in thymidine binding, and groups with pK value of 6.1 – 6.2 and 7.8 – 8.6 are involved in phosphate binding. The enzyme characterization provides additional data that may be useful for the rational design of novel inhibitors hTP. Chemical compounds designed and synthesized as potential inhibitors against hTP activity were active in both forms of the enzyme, whereas the compound **5g** showed the best inhibitory potential. The compound **5g** was characterized as noncompetitive inhibitor towards hTP substrates thymidine and phosphate. The noncompetitive inhibition mechanism points to the existence of an allosteric binding site at hTP, different from the substrate binding sites. This allosteric site could be considered an important molecular target for the development of potent and selective hTP inhibitors.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2dR: 2-desoxi-D-ribose

2dR1P: 2-desoxirribose 1-fosfato

5-FU: 5-fluorouracil

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida

AGE: produtos finais da glicação avançada, do inglês “*advanced glycation end products*”

ATP: adenosine-5'-trifosfato

cDNA: DNA complementar

CEP: Comitê de Ética envolvendo Seres Humanos

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CTP: citidina 5'-trifosfato

CV: volume de coluna

DMEM: meio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxinucleosídeos trifosfato

DO: densidade óptica

dR-5-P: 2-desoxirribose-5-fosfato

dThd: timidina

Ei: complexo binário enzima:inibidor

ES: complexo binário enzima:substrato

ESI: complexo ternário enzima:substrato:inibidor

FdUDP: fluorodesoxiuridina difosfato

FdUMP: fluorodesoxiuridina monofosfato

FdUTP: fluorodesoxiuridina trifosfato

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

FUMP: fluorouridina monofosfato

FUR: fluorouridina

FUTP: fluorouridina trifosfato

GTP: guanosina-5'-trifosfato

(h)TP: timidina fosforilase (humana)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

INCT-TB: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose

IPTG: isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

I-Tasser: *Iterative Threading Assembly Refinement*

ITC: microcalorimetria de titulação isotérmica

KIN59: inibidor derivado de purina 5'-O-tritilinosina

LABIO: Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas

LB: meio de cultura Luria-Bertani

mRNA: RNA mensageiro

MS: espectrometria de massa

MTT: método colorimétrico com brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dimetiltetrazólio

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPRT: orotato fosforribosil transferase

ORF: fase de leitura aberta, do inglês “*Open Reading Frame*”

PCR: reação em cadeia da polimerase

PDB: banco de dados de proteínas, do inglês “*Protein Data Bank*”

PD-ECGF: fator de crescimento celular endotelial derivado de plaquetas

P_i: fosfato inorgânico

PUCRS: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

PyNP: pirimidina nucleosídeo fosforilase

RNA: ácido ribonucleico

ROS: espécies reativas de oxigênio

RT-PCR: reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

SDS-PAGE: eletroforese vertical em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TAS-102: designação do composto químico que tem a combinação de TPI e TFT

TB: meio de cultura *Terrific Broth*

TFT: 5-trifluortimidina

TK: timidina quinase

TPI: 5-cloro-6-[1-(2-iminopirrolidinil)metil]uracil hidrocloreto

TYMP: gene codificante da enzima timidina fosforilase humana

UK: uridina quinase

UMP: uridina 5'-monofostato

UP: uridina fosforilase

UPRT: uracil fosforribosil transferase

USP: Universidade de São Paulo

UTP: uridina 5'-trifosfato

SUMÁRIO

Capítulo 1

1. Introdução.....	15
1.1 O câncer e seus dados epidemiológicos.....	15
1.2 A angiogênese como alvo para o tratamento do câncer.....	17
1.3 Metabolismo de nucleotídeos.....	19
1.4 Metabolismo de nucleotídeos pirimídicos.....	20
1.5 A enzima timidina forforilase humana (hTP).....	23
1.6 A estrutura da hTP.....	26
1.7 hTP e o câncer.....	27
1.8 Inibidores da hTP.....	29
2. Justificativa.....	31
3. Objetivos.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32

Capítulo 2

4. Metodologia.....	34
4.1 Obtenção do cDNA a partir do RNA isolado de tecido colorretal tumoral por RT-PCR.....	34
4.2 Amplificação do gene TYMP que codifica a enzima hTP.....	34
4.3 Clonagem do gene TYMP no vetor pCR-Blunt®.....	35
4.4 Subclonagem do gene TYMP em vetor de expressão pET-23a(+)......	36
4.5 Sequenciamento dos fragmentos clonados no vetor pET-23a(+)......	36
4.6 Expressão das proteínas recombinantes hTP.....	37

4.7 Purificação das proteínas recombinantes hTP.....	38
4.8 Quantificação total das proteínas recombinantes hTP.....	39
4.9 Identificação das proteínas recombinantes hTP por espectrometria de massa (MS).....	39
4.10 Determinação do estado oligomérico em solução das proteínas recombinantes hTP.....	40
4.11 Teste de atividade das enzimas hTP e determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ).....	40
4.12 Determinação das constantes cinéticas aparentes.....	41
4.13 Determinação das constantes cinéticas verdadeiras e do padrão de intersecção das retas.....	42
4.14 Microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	42
4.15 Estudos de perfil de pH.....	43
4.16 Modelagem Molecular.....	43
4.17 Planejamento dos inibidores enzimáticos.....	44
4.18 Efeito inibitório tempo-dependente.....	48
4.19 Determinação da IC_{50} dos compostos sintetizados.....	48
4.20 Determinação da constante inibitória (K_i).....	49
4.21 Docagem molecular e análises dos volumes das cavidades da enzima hTP.....	50
5. Análise de dados.....	51

Capítulo 3

6. Resultados e discussão.....	55
6.1 Amplificação, clonagem e sequenciamento do gene TYMP.....	55
6.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes hTP.....	55
6.3 Identificação das proteínas recombinantes hTP por MS.....	58
6.4 Determinação do estado oligomérico das proteínas recombinantes hTP.....	60

6.5 Determinação das constantes cinéticas aparentes.....	61
6.6 Determinação das constantes cinéticas verdadeiras e do padrão de intersecção das retas.....	62
6.7 ITC.....	64
6.8 Estudos de perfil de pH.....	70
6.9 Modelagem molecular.....	74
6.10 Síntese dos compostos planejados.....	76
6.11 Determinação da IC ₅₀ dos compostos sintetizados.....	78
6.12 Determinação do K _i	82
6.13 Docagem molecular.....	86
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88

REFERÊNCIAS.....	94
-------------------------	-----------

ANEXO A: Carta de aprovação pelo Comitê de Ética, PUCRS.....	103
ANEXO B: Manuscrito submetido no periódico <i>Molecular Biosystems</i>	105
ANEXO C: Manuscrito publicado no periódico <i>Journal of Periodontal Research</i> , 2010.....	147
ANEXO D: Manuscrito publicado no periódico <i>Virchow Archives</i> , 2011.....	149
ANEXO E: Manuscrito publicado no periódico <i>Bone</i> , 2013.....	151
ANEXO F: Participação na dissertação de mestrado.....	153
ANEXO G: Citotoxicidade do composto 5g	155
ANEXO H: Dados espectroscópicos e espectrométricos dos compostos 3c e 5g	159

Capítulo 1

Introdução

Justificativa

Objetivos

1. Introdução

1.1 O câncer e seus dados epidemiológicos

Câncer é um conjunto de doenças que podem afetar qualquer órgão do corpo humano e é causado por células que adquirem algumas características (*hallmarks*) biológicas durante o desenvolvimento dos tumores. Estas características incluem: contínua sinalização para proliferação celular, evasão de supressores tumorais, resistência à morte celular, replicação ilimitada, indução de angiogênese, ativação da invasão e metástase. Recentemente, outras duas características foram atribuídas às células cancerosas, a capacidade de reprogramação do metabolismo energético a fim de suprir o crescimento e a proliferação celular contínua; e a evasão da destruição imunológica, em particular, de linfócitos T e B, macrófagos e células *natural killer* (1, 2).

A instabilidade genômica e a inflamação são fatores que facilitam a aquisição das características biológicas típicas das células cancerosas. Primeiramente, a instabilidade genômica das células cancerosas favorece as alterações genéticas e a mutabilidade levando à progressão tumoral. Outro fator relevante está relacionado à inflamação gerada por células do sistema imune que, a fim de combater infecções, podem levar ao desenvolvimento tumoral em consequência da resposta inflamatória (1). A presença de células do sistema imune em neoplasias já foi demonstrada por técnicas de coloração histoquímica (3). Além disto, estas células podem liberar agentes químicos, como espécies reativas de oxigênio, os quais são agentes mutagênicos e conduzem às alterações genéticas em direção à malignidade (4).

As células normais que migram e, posteriormente, constituem o ambiente tumoral contribuem ativamente para a doença, o desenvolvimento e a expressão das características biológicas do câncer. O ambiente tumoral contribui diretamente na tumorigênese, visto que sua constituição e suas interações via sinalização celular são cruciais para o fenótipo do câncer. Em resumo, os fenótipos adquiridos durante o desenvolvimento tumoral permitem a sobrevivência, a proliferação e a disseminação das células cancerosas; estas funções podem ser vistas em diferentes tipos tumorais, através de mecanismos distintos e em diferentes momentos durante a tumorigênese. O conhecimento e a identificação de alvos moleculares específicos

que coordenam as diversas características adquiridas pelas células tumorais representam uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novas terapias que tenham atividade inibitória sobre os fenótipos do câncer (1).

Inicialmente, o câncer foi considerado uma doença de países desenvolvidos e com amplos recursos financeiros. Há aproximadamente quatro décadas, a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos. Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, no ano 2030, ocorram 27 milhões de casos de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito deste aumento vai incidir em países com baixa e média rendas (5).

De acordo com a *World Health Statistics 2012*, o número de mortes anuais causadas pelo câncer aumentará de 7,6 milhões para 13 milhões no período entre 2008 a 2030. Os dados relatados compreendem um levantamento de casos diagnosticados entre os 194 países membros da OMS (6).

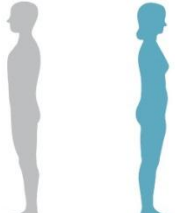
Em países ricos, predominam os cânceres de pulmão, mama, próstata e cólon, enquanto que em países de baixo e médio recursos, os cânceres predominantes são os de estômago, fígado, cavidade oral e colo do útero. No entanto, atualmente, vem sendo observado um aumento progressivo nos cânceres de pulmão, mama e cólon e reto em países de baixa renda, os quais, não apresentavam essa importância e magnitude. O câncer e outras doenças crônicas não transmissíveis vêm se tornando cada vez mais comuns no mundo todo. No Brasil, processos de transição têm produzido importantes mudanças no perfil das enfermidades que acometem a população, observando-se que a partir do ano de 1960, as doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte, sendo substituídas pelas doenças do aparelho circulatório e pelas neoplasias (5).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 são válidas também para o ano de 2013 e estas apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma. Sem considerar os casos de câncer da pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. Os tipos mais incidentes são os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma,

mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino. Espera-se um total de 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Confirma-se a estimativa de que o câncer da pele do tipo não melanoma (134 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (**Figura 1**).

A distribuição dos casos novos de câncer segundo o tipo de tumor e segundo as cinco regiões do país, para o sexo masculino, mostra-se heterogênea entre Estados e capitais do país. As regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste, as menores. As taxas da região Centro-oeste apresentam um padrão intermediário (5).

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma*.

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual	
Próstata	60.180	30,8%		Homens	Mama Feminina	52.680	27,9%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Mulheres	Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%				Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%				Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%				Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%				Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%				Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%				Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%				Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%				Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

Fonte: INCA (2012) (5).

Nota: *Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

1.2 A angiogênese como alvo para o tratamento do câncer

A angiogênese consiste em um processo onde ocorre a formação de novos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes. Para que ocorra a angiogênese, é necessária uma atividade coordenada de diversos componentes vasculares, tais como: divisão de células endoteliais, degradação de membranas vasculares e da matriz extracelular e migração de células endoteliais (7). A angiogênese é requerida tanto em condições fisiológicas normais do organismo, como na reprodução, embriogênese, diferenciação de órgãos e reparo tecidual, quanto em patologias, tais como: no câncer, principalmente naqueles em que ocorre a formação de tumores sólidos, e na doença inflamatória crônica (7, 8).

Em condições fisiológicas normais, este evento se inicia por sinais de hipóxia, hipoglicemia e isquemia. A angiogênese tumoral, no entanto, é

descontrolada e permanece ativa devido a um desequilíbrio entre fatores proangiogênicos e antiangiogênicos, assim como entre proteínas tumorais e não tumorais do hospedeiro. O crescimento tumoral torna-se possível devido ao ambiente formado, caracterizado pela hipóxia, levando à formação de vasos sanguíneos ao redor do tecido tumoral (7).

Inicialmente, o crescimento tumoral é mantido por vasos sanguíneos localizados próximos ao tumor. Uma vez que o tumor aumenta de tamanho, novos vasos sanguíneos são requeridos para que este continue crescendo. A habilidade de um tumor induzir a vascularização pode ocorrer em diferentes estádios da progressão, dependendo do tipo e do ambiente tumoral (9).

Em 1971, a hipótese proposta do Dr. Judah Folkman, publicada no *New England Journal of Medicine*, mostrando que o crescimento tumoral e a metástase são dependentes da angiogênese e que tumores sólidos levam a formação de novos vasos sanguíneos através da secreção de fatores pro-angiogênicos pelas células tumorais, representou o início de pesquisas relacionadas à angiogênese e hipóxia, e suas funções no câncer. Além disso, a hipótese sugeriu que o bloqueio da angiogênese poderia representar uma nova estratégia para cessar o crescimento tumoral visto que o início desse processo pode ser identificado como um passo essencial na progressão do câncer (10). Dessa forma, há mais de quatro décadas, o desenvolvimento de inibidores da angiogênese tem sido visto como um alvo desejável na terapia do câncer, já que com o possível uso desta estratégia de tratamento poderia resultar em menos efeitos colaterais aos pacientes (11). Tendo em vista que a inibição da angiogênese provavelmente dificultaria a progressão e a nutrição tumoral, tal fato despertou grande interesse de indústrias farmacêuticas em pesquisas para o desenvolvimento de uma nova classe de fármacos. Consequentemente, surgiram diversos agentes terapêuticos, conhecidos como fármacos antiangiogênicos, dos quais, alguns foram aprovados para o uso clínico enquanto que outros se encontram, atualmente, em testes para o uso em uma terapia combinada com outros quimioterápicos (8). Neste contexto, o entendimento de mecanismos regulatórios que controlam a angiogênese continua sendo uma estratégia para a identificação de alvos moleculares para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para o tratamento do câncer. Vias moleculares que promovem a angiogênese são possíveis alvos devido ao papel importante que possuem no crescimento e progressão do câncer (11).

1.3 Metabolismo de nucleotídeos

Os nucleotídeos são as unidades monoméricas do ácido desoxirribonucleico (DNA) e do ácido ribonucleico (RNA) que participam de diversos processos bioquímicos. Dentre estes, a promoção de reações termodinamicamente desfavoráveis através do acoplamento dessas reações com a hidrólise das ligações fosfoanídricas dos nucleotídeos adenosina-5'-trifosfato (ATP) e guanosina-5'-trifosfato (GTP); regulação de vias metabólicas através do controle dos níveis de ATP e GTP e efeitos na sinalização celular em resposta a sinais hormonais (12).

Os nucleotídeos são formados por ésteres de fosfato de um açúcar de cinco átomos de carbono (pentose), nos quais uma base nitrogenada está covalentemente ligada ao C1' do resíduo de açúcar. Os ribonucleotídeos constituem as unidades monoméricas do RNA, no qual a pentose é a D-ribose, enquanto que os desoxirribonucleotídeos possuem a 2'-desoxi-D-ribose como pentose e constituem as unidades monoméricas do DNA (13).

As bases nitrogenadas são moléculas planas, aromáticas e heterocíclicas, derivadas de purinas ou pirimidinas. Os nucleotídeos são classificados como purínicos e pirimídicos. Os principais componentes purínicos dos ácidos nucleicos são os resíduos de adenina (A) e guanina (G); os resíduos pirimídicos são os de citosina (C), uracila (U), que ocorrem principalmente no RNA, e timina (T), que ocorre no DNA (14).

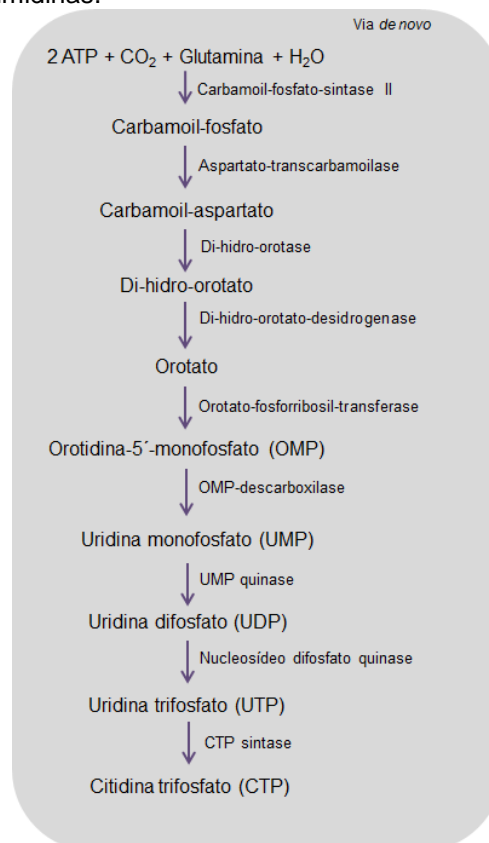
A biossíntese de nucleotídeos é um processo biológico fundamental para a proliferação celular e para quase todas as outras atividades fisiológicas da célula. Há duas rotas principais para a biossíntese dos nucleotídeos: a via *de novo* e a via de salvamento. Na via *de novo*, a síntese de nucleotídeos inicia a partir de precursores simples, como aminoácidos, ribose-5-fosfato, CO₂ e NH₃, enquanto que na via de salvamento, as bases livres e os nucleosídeos formados no catabolismo de nucleotídeos são utilizados diretamente (reciclados) para a síntese de ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos (15). A reciclagem de bases pirimídicas e purínicas pela rota de salvamento é preferencialmente utilizada, pois demanda menos energia (16).

1.4 Metabolismo de nucleotídeos pirimídicos

A via de biossíntese de nucleotídeos pirimídicos representa uma via molecular alvo para o tratamento do câncer visto que algumas de suas enzimas apresentam uma função importante na progressão tumoral. A uridina 5'-monofosfato (UMP) é o nucleotídeo comum formado em ambas as vias (via *de novo* e via de salvamento), e a partir deste composto são formados os demais nucleotídeos pirimídicos (17).

A via de novo para biossíntese de nucleotídeos pirimídicos resulta na formação de uridina 5'-trifosfato (UTP) e citidina 5'-trifosfato (CTP) (Figura 2). A biossíntese do UMP se dá através de uma rota de seis reações químicas, onde a primeira é catalisada pela enzima carbamoilfosfato sintase a partir dos substratos glutamina e CO_2 . Através de quatro reações seguintes, orotato é sintetizado e convertido em orotidina 5'-monofosfato e, posteriormente, em UMP. Por fim, UTP é formado a partir da fosforilação de UMP a uridina 5'-difosfato e, posteriormente, a UTP, o qual é metabolizado para produzir CTP, por meio da adição de um grupamento amina a partir de um aminoácido glutamina (18).

Figura 2 - Via *de novo* de pirimidinas.

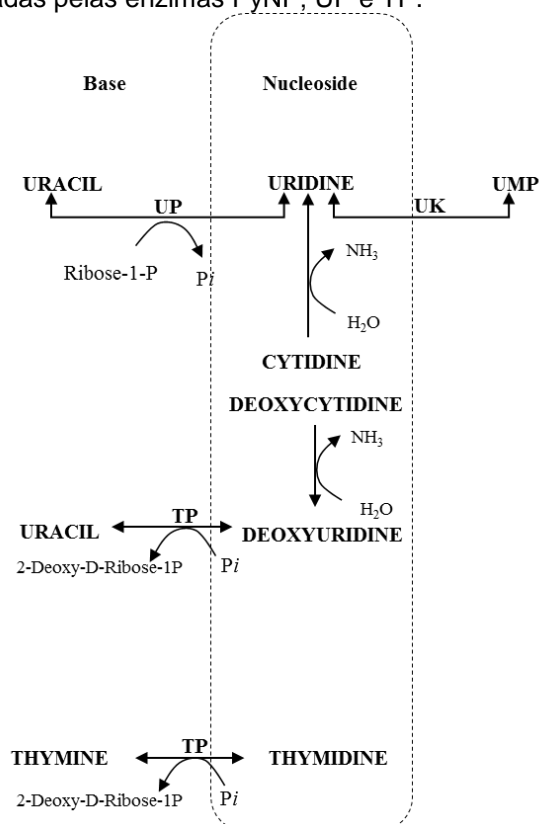


Fonte: Adaptado de Voet e Voet (2006) (13).

As pirimidina nucleosídeo fosforilases (PyNP) são enzimas chave na via de salvamento de pirimidinas uma vez que estas enzimas promovem uma via alternativa à via *de novo* para obtenção de nucleosídeos pirimídicos. Há dois tipos de PyNP presente em mamíferos e em diversas bactérias como a *Escherichia coli* (*E. coli*): a uridina fosforilase (UP) e a timidina fosforilase (TP) (19). A UP na presença de fosfato inorgânico (P_i), catalisa a fosforólise reversível de uridina em sua base livre e ribose 1-fosfato (R1P); e a TP na presença de P_i , catalisa a fosforólise reversível de timidina (dThd) ou 2'-desoxiuridina em suas bases livres e 2-desoxirribose 1-fosfato (2dR1P) (Figura 3) (19, 20).

A TP faz parte da segunda família de Nucleosídeo Fosforilases (NP-II) e é específica para 2'-desoxirribonucleosídeos de timina, enquanto que a UP, membro da primeira família de Nucleosídeo Fosforilases (NP-I), além de ser específica para nucleosídeos de uridina, também reconhece os 2'-desoxinucleosídeos pirimídicos. A principal diferença entre as enzimas TP e UP é a elevada especificidade da TP pela porção 2'-desoxirribose (19).

Figura 3 - Reações catalisadas pelas enzimas PyNP; UP e TP.



Fonte: Adaptado de Villela et al. (2011) (21).

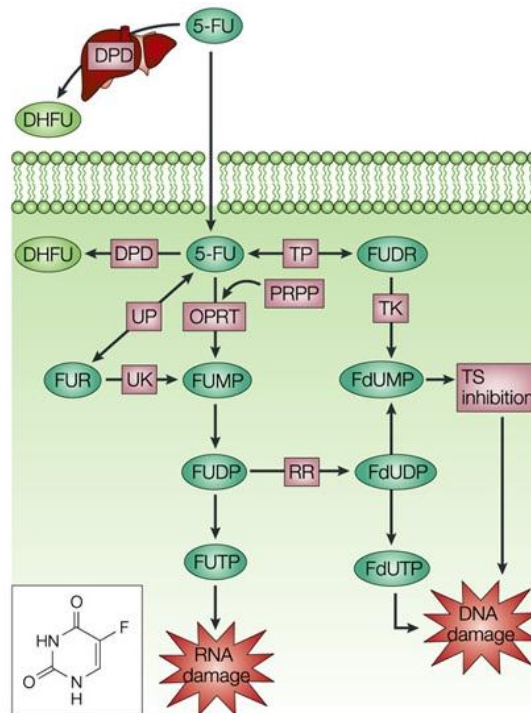
Nota: Enzimas: UP, uridina fosforilase; TP, timidina fosforilase; UK, uridina quinase UMP, uridina 5'-monofosfato.

Por outro lado, alguns micro-organismos como *Bacillus stearothermophilus* possuem somente uma PyNP, a qual reconhece ambos os substratos dThd e uridina e esta não apresenta seletividade para ribonucleosídeos ou desoxirribonucleosídeos. Essa enzima foi classificada como uma NP-II (19).

A via de salvamento de pirimidinas consiste, também, em um importante alvo para o tratamento de neoplasias, doenças virais e parasitárias visto que as enzimas que constituem esta via são responsáveis pela ativação de alguns fármacos utilizados no tratamento destas patologias (18). Do mesmo modo, as enzimas PyNP são consideradas alvos moleculares importantes para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento do câncer, visto que as células cancerosas utilizam preferencialmente a via de salvamento para proliferação celular (22).

No câncer, o tratamento que utiliza o quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) se dá através da incorporação de metabólitos citotóxicos no *pool* de nucleotídeos os quais podem agir diretamente interferindo na síntese de DNA e RNA ou via inibição da enzima timidilato sintase (TS) (**Figura 4**). O 5-FU é convertido em três metabólitos ativos: fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) e fluorouridina trifosfato (FUTP). O principal mecanismo de ativação do 5-FU é a sua conversão em fluorouridina monofosfato (FUMP), diretamente pela orotato fosforribosil transferase (OPRT) utilizando fosforribosil pirofosfato (PRPP) como cofator ou indiretamente pela sua conversão em fluorouridina (FUR), através da ação sequencial das enzimas UP e uridina quinase (UK). O FUMP é posteriormente fosforilado a fluorouridina difosfato (FUDP), o qual pode ser fosforilado ao metabólito ativo FUTP ou pode ser convertido a fluorodesoxiuridina difosfato (FdUDP) pela ribonucleotídeo redutase (RR). O FdUDP pode ser fosforilado ou desfosforilado para gerar os metabólitos ativos FdUTP e FdUMP. O 5-FU pode ser convertido a fluorodesoxiuridina (FUDR) através de uma via de ativação alternativa mediada pela enzima TP e fosforilado ao metabólito ativo FdUMP pela timidina quinase (TK) (23).

Figura 4 - Metabolismo do 5-FU.



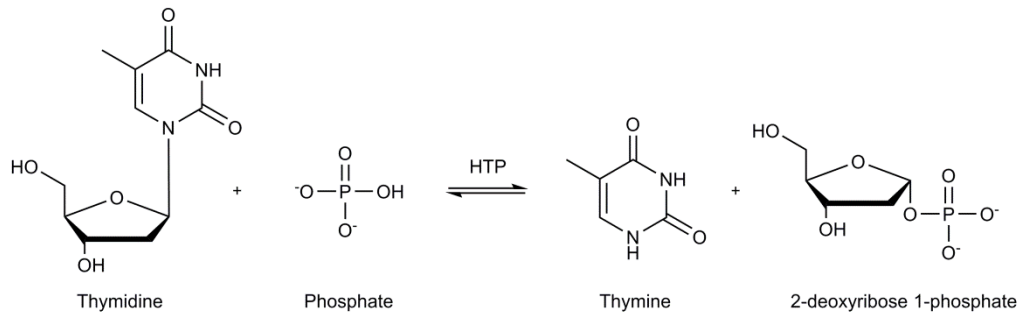
Fonte: Longley et al. (2003) (23).

Nota: DPD(dihidropirimidina dehidrogenase); TP(timidina fosforilase); UP(uridina fosforilase); OPRT(otato fosforibosiltransferase); TK(timidina quinase); UK(uridina quinase); TS(timidilato sintase); RR(ribonucleotídeo redutase).

1.5 A enzima timidina fosforilase humana (hTP)

A enzima TP foi primeiramente identificada em 1954 como uma enzima importante na via de salvamento de pirimidinas (24), a qual realiza a reciclagem de nucleosídeos pirimídicos que são formados durante a degradação do RNA ou DNA. A TP catalisa a conversão de dThd e 2'-desoxiuridina em suas bases pirimídicas respectivas e 2dR1P (Figura 5). Esta reação é reversível, entretanto, sua função metabólica mais importante é no catabolismo de pirimidinas (25).

Outra função atribuída à TP é relativa à sua atividade desoxirribosil transferase, onde a enzima realiza a transferência do grupamento desoxirribosil de um nucleosídeo pirimídico a uma base pirimídica, resultando na formação de um novo nucleosídeo pirimídico, ressaltando sua importância também na homeostase da concentração de desoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs) (26).

Figura 5 - Reação catalisada pela hTP.

Fonte: Adaptado de Iltzsch et al. (1985) (25).

Nota: A TP catalisa a fosforólise reversível de timidina, na presença de fosfato inorgânico, resultando nos produtos timina e 2-desoxirribose-1-fosfato.

Em 1987, uma “nova” proteína foi isolada de plaquetas humanas (27) e denominada de fator de crescimento celular endotelial derivado de plaquetas, do inglês *platelet-derived endothelial cell growth factor* (PD-ECGF). Este nome foi dado devido à sua função de estimular o crescimento celular endotelial, induzir a migração de células endoteliais *in vitro* e promover angiogênese *in vivo* (28). Alguns anos após essa descoberta verificou-se que a PD-ECGF recombinante possuía atividade de TP (29) e, através da análise da sequência de aminoácidos, revelou-se que essas duas proteínas eram idênticas (30). A TP é descrita também como gliostatina, uma proteína isolada de um neurofibroma humano e considerada um inibidor do crescimento de astrócitos e astrocitomas (31). TP, PD-ECGF e gliostatina são consideradas proteínas idênticas baseando-se nas suas propriedades químicas e biológicas. Na literatura, o uso de TP e PD-ECGF é o mesmo enquanto que o nome gliostatina é restrito para estudos envolvendo artrite reumatóide e doenças neurológicas (32).

O gene que codifica a hTP (Gene ID: 1890) (33) está localizado no cromossomo 22 do genoma humano, na localização citogenética 22q13.33, consistindo de 10 exons dispostos em uma região de 4,3 kb. Foram identificadas 5 variantes transcricionais resultantes de splicing alternativo (34). Na variante transcricional 3, não ocorre a remoção da sequência correspondente ao primeiro íntron das demais variantes, resultando em um transcrito mais longo. Entretanto, este transcrito codifica a mesma cadeia polipeptídica das variantes transcricionais 1, 2 e 4, correspondente à isoforma-1 da pró-proteína timidina fosforilase humana, de 482 aminoácidos. A variante transcricional 5 codifica a isoforma-2 da pró-proteína timidina fosforilase (P19971-2) (35), que difere da isoforma-1 pela inserção da

sequência de aminoácidos “APLPA” na posição 386, resultando em uma cadeia polipeptídica de 487 aminoácidos. Esta isoforma é resultante de um evento de splicing alternativo do penúltimo éxon do transcrito que ocorre especificamente na variante transcricional 5. Esta isoforma alternativa da timidina fosforilase não foi caracterizada experimentalmente até o momento e, portanto não se sabe se ela desempenha funções específicas na célula.

A região promotora do gene apresenta um conteúdo de aproximadamente 75 % de bases nitrogenadas G e C (G+C), seis motivos de ligação para o fator de transcrição sp1 e nenhuma sequência TATA ou CCAAT *box*, sequência reconhecida pela RNA polimerase II e presente na maior parte dos genes de eucariotos (32, 36, 37). O fator de transcrição sp1 apresenta uma expressão onipresente e está envolvido na transcrição de vários genes, ligando-se principalmente em sequências GC-*boxes* e a CT-*boxes* e também a GT-*boxes*, no entanto, com menor afinidade. A atividade transcricional do sp1 é regulada tanto por modificações pós-tradução quanto por interações com outras proteínas, dentre elas destacam-se supressores tumorais e oncogenes (38). Além do sítio de ligação para o fator de transcrição sp1, a região promotora do gene TYMP contém sítios de ligação para outros fatores de transcrição, tais como o elemento responsivo estimulado por interferon (ISRE) e o elemento sequencia γ -ativado *like* (GAS) (32).

O sequenciamento peptídico de uma preparação homogênea do fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas (PD-ECGF, hTP), a partir de plaquetas humanas, revelou que a proteína madura inicia a partir do décimo primeiro aminoácido após o sítio de início de tradução (28). Dessa forma, sugeriu-se, nesse mesmo estudo, que a sequência codificadora de 482 aa [1-482] produz uma pré-proteína que sofre uma etapa de processamento proteolítico limitado após sua síntese, resultando na produção da proteína madura de 472 aa [11-482]. Entretanto, a natureza desse processamento permanece desconhecida. Estudos do proteoma humano mostraram também a ocorrência desse processamento na região N-terminal por espectrometria de massa (LC-MS/MS), onde a identificação do peptídeo correspondente aos aminoácidos 11-34 (APPAPGDFSGEGSQGLPDPSPEPK) da hTP foi detectada principalmente em lisados de plaquetas (39). Por outro lado, estudos do proteoma humano evidenciam também a existência da forma precursora *in vivo* em linhagens de células tumorais. Análises proteômicas de tecidos humanos identificaram o peptídeo correspondente aos aminoácidos 2-34

(AALMTPGTGAPPAPGDFSGEGSQGLPDPSPPEPK) da hTP (39). Essas evidências sugerem que a forma da hTP não clivada, suposta forma precursora, pode representar também uma forma biologicamente ativa importante nesses tecidos.

Além das formas precursora e madura, a hTP encontra-se em grandes quantidades na placenta, onde outras duas formas alternativas da enzima são detectadas. A primeira variante da hTP compreende uma proteína de 27 kDa, resultado de um *splicing* alternativo (32), enquanto que na outra forma, a proteína é clivada na treonina6 (Thr6) ao invés de ser clivada na Alanina11 (Ala11) (40). A hTP está presente em diversos tecidos normais e em células, apresentando níveis altos de expressão em macrófagos, células estromais, gliais, reticulócitos, alguns epitélios, tecidos do trato digestivo, glândulas salivares, cérebro, bexiga, baço e pulmão. No interior da célula, ela está presente tanto no núcleo como no citoplasma, além disso, a hTP pode ser detectada no plasma e no soro, provavelmente, devido a danos ou renovação celular (32).

1.6 A estrutura da hTP

A enzima TP foi, primeiramente, purificada de bactérias como *E. coli* e *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) (41, 42) e, anos mais tarde, a hTP foi extraída do tecido corio-amniótico (43). A sequência de aminoácidos da enzima se manteve altamente conservada durante a evolução, apresentando 39 % de similaridade em relação à sequência de aminoácidos da TP de *E. coli*. A TP de diferentes organismos apresenta-se como um homodímero, consistindo de duas subunidades idênticas que se associam não covalentemente. O dímero apresenta uma massa molecular que varia de 90 kDa em *E. coli* a 110 kDa em mamíferos (32).

Em 1990, a estrutura cristalográfica da TP de *E. coli* foi determinada com uma resolução de 2.8 Å e as análises cristalográficas revelaram que cada subunidade é composta de um domínio α -helicoidal e de um domínio α/β , separados por uma fenda. O sítio ativo da enzima consiste do sítio de ligação para o substrato dThd no domínio α , e do sítio de ligação para o fosfato P_i no domínio α/β (44). Em 2004, a estrutura cristalográfica da hTP foi determinada complexada com um substrato análogo, um potente inibidor da enzima, o 5-cloro-6-[1-(2-iminopirrolidinil)metil] uracil hidrocloreto (TPI), com uma resolução de 2.1 Å (45). Em 2006, uma nova estrutura da hTP foi determinada, complexada com o produto timina. Diferentemente da

estrutura do complexo TP:TPI, a nova estrutura corresponde a uma proteína não tripsinizada (46).

As resoluções estruturais da hTP mostram os resíduos de aminoácidos que participam na catálise enzimática e na ligação aos substratos, fornecendo as possíveis interações que ocorrem entre a enzima e o ligante. Além disso, as estruturas cristalográficas da hTP mostram que presença dos substratos nos sítios ativos da enzima leva a uma mudança de conformação estrutural, de uma forma aberta para uma forma fechada, e o movimento dessa estrutura formada parece ser fundamental para atividade enzimática (45 – 48).

1.7 hTP e o câncer

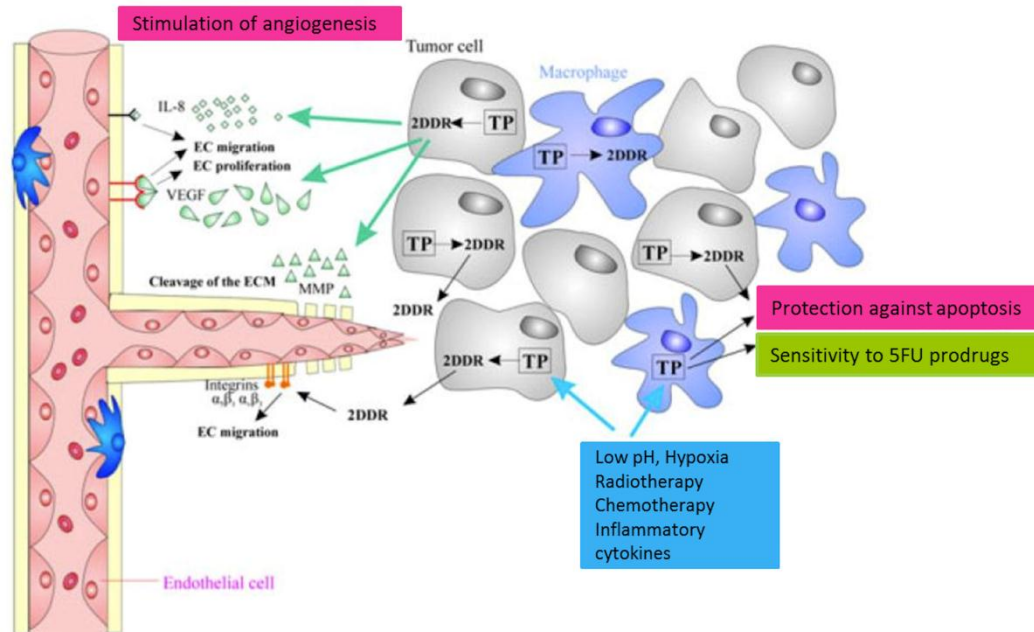
A expressão de hTP em tumores é regulada por diversas situações de estresse celular, tais como: radioterapia, quimioterapia, citocinas inflamatórias, hipóxia e diminuição do pH intracelular. Níveis altos da expressão de hTP são encontrados em diversos tipos de tumores sólidos em relação ao tecido não neoplásico correspondente e no plasma. Estes níveis de expressão elevados também podem ser observados em tumores não sólidos, como no linfoma de Hodgkin e em outras patologias como aterosclerose e doenças inflamatórias. A expressão de hTP é correlacionada com uma densidade de microvasos elevada, um estágio tumoral avançado e metástase. Na maioria dos casos de câncer, a expressão associa-se, também, a um prognóstico ruim da doença (32, 49).

Uma das principais funções atribuídas à hTP no câncer é associada ao seu potencial angiogênico no crescimento e na progressão tumoral. Análises de mutagênese sítio-dirigida revelaram que a atividade enzimática da TP é essencial para que ocorra a angiogênese (50, 51). Além disso, a TP está envolvida na migração de células endoteliais, na expressão e/ou secreção de fatores angiogênicos, na indução de metástase e na proteção de células cancerosas contra apoptose (49, 52). O mecanismo pelo qual a hTP promove a angiogênese é ainda incerto, no entanto, sugere-se que os produtos da reação catalisada por esta enzima sejam os responsáveis pelas propriedades angiogênicas (51, 53).

A migração de células endoteliais mediada pela TP depende do catabolismo intracelular da dThd e subsequente liberação de um dos produtos, o 2-desoxi-D-ribose (2dR), considerado ser o responsável pela atividade angiogênica da enzima.

Enquanto a enzima permanece intracelular, o metabólito 2dR atravessa a membrana celular formando um gradiente quimiotático, exercendo um papel biológico sobre outras células. O 2dR age como um quimioatrativo, principalmente, induzindo a migração de células endoteliais para o ambiente tumoral, levando a formação de novos vasos sanguíneos (**Figura 6**) (32).

Figura 6 – A função da hTP na promoção da angiogênese.



Fonte: Adaptado de Bronckaers et al. (2009) (32).

Estudos têm demonstrado possíveis vias intracelulares que podem estar relacionadas à indução de angiogênese mediada pela hTP. Os primeiros produtos formados através da fosforólise da dThd pela hTP são 2dR1P e timina. Após ser formado, o 2dR1P desaparece rapidamente, possivelmente pela sua conversão em 2dR ou 2'-desoxirribose-5-fosfato (dR-5-P). dR-5-P pode ser convertido, então, em gliceraldeído-3-fosfato (G3P), o qual é um intermediário da via da pentose-fosfato ou da via glicolítica. O 2dR pode formar produtos finais glicosados, do inglês *advanced glycation end products* (AGE), ou espécies reativas de oxigênio (ROS). As reações para formação destes produtos produzem radicais livres e, conseqüentemente, a formação de AGE a partir destas reações pode ser responsável pela atividade angiogênica da hTP. Neste contexto, o metabolismo intracelular do 2dR induz estresse oxidativo em células tumorais que expressam TP, o que resulta na secreção de fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e interleucina-8 (IL-8) (53).

Diante das propriedades angiogênicas relatadas, a hTP tornou-se um potencial alvo molecular de pesquisa para o desenvolvimento de compostos inibidores da sua atividade enzimática. Tais compostos representariam uma nova alternativa para diminuir a angiogênese e a progressão tumoral.

1.8 Inibidores da hTP

A enzima hTP é um alvo molecular de estudos para o desenvolvimento de inibidores enzimáticos com potencial utilização na terapia do câncer. A terapia que tem como alvo a hTP utiliza fármacos ou outras substâncias a fim de interromper a progressão tumoral induzida pela formação de novos vasos sanguíneos (54). Além disso, visto que as células tumorais utilizam preferencialmente a via de salvamento para divisão celular, sugere-se que a inibição desta via, através da inibição da atividade da hTP, resultaria na redução do crescimento tumoral (22, 46).

Os inibidores promoveriam a inibição de funções biológicas mediadas pela hTP, tais como: estimulação da angiogênese, inibição da apoptose, promoção da metástase, assim como levariam ao aumento da atividade antitumoral dos derivados de nucleosídeos (os compostos 2'-desoxipirimidinas) que são rapidamente inativados pela hTP, como o análogo de nucleosídeo 5-trifluortimidina (TFT) (49). No entanto, as quimioterapias que adotam pró-drogas como o 5-FU no regime terapêutico seriam incompatíveis com os inibidores da hTP visto que uma das vias de ativação do 5-FU depende da atividade enzimática da hTP (Ver **Figura 5**) (55). Neste contexto, os inibidores da hTP poderiam representar um tratamento alternativo aos tumores que apresentam resistência às fluoropirimidinas.

Há mais de 30 anos os análogos de pirimidinas derivados da uracila, 6-aminotimina e 6-amino-5-bromouracil são compostos conhecidos com capacidade de inibir a enzima hTP (55). O derivado de pirimidina mais potente, o TPI, possui uma IC₅₀ (concentração que inibe 50 % da atividade da enzima) de 35 nM, sendo capaz de inibir diversas funções biológicas mediadas pela hTP, podendo ser considerado um novo potencial agente antimetastático (56). Compostos como os análogos de purinas, as pró-drogas que inibem a atividade da hTP em condições de hipóxia e o estereoisômero 2-desoxi-L-ribose representam outras classes de inibidores da hTP em estudo para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer (32, 49).

Considerando que os inibidores da hTP podem ser úteis na prevenção da degradação de análogos de nucleosídeos com propriedades citotóxicas, a combinação do TPI com o TFT, designado TAS-102, encontra-se em ensaios clínicos de Fase II no tratamento de pacientes com câncer colorretal metastático (57). Espera-se que a combinação dos fármacos não somente aumente a eficácia biológica do análogo de nucleosídeo com propriedade antitumoral, mas também, que o TPI exerça uma atividade antiangiogênica e previna a metástase (58).

Tendo em vista a importância do desenvolvimento de novos inibidores da hTP, compostos químicos com ação inibitória da atividade enzimática podem ser obtidos a partir de análogos estruturais aos substratos, aos produtos ou ao estado de transição da reação enzimática (59). O desenho de inibidores análogos ao estado de transição resulta em uma interação mais forte ao sítio ativo da enzima em relação aos análogos de substrato; desta forma, o conhecimento do estado de transição representa uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novos fármacos mais potentes. Um inibidor análogo ao estado de transição compreende uma molécula quimicamente estável, com características semelhantes ao estado de transição, tais como: comprimento de ligação, ângulos e densidade eletrônica (60).

A maioria dos inibidores identificados para hTP compete pelo sítio de ligação do substrato pirimídico, denominados inibidores competitivos (55, 61, 62). Os inibidores multissubstrato que se ligam em ambos os sítios ativo da enzima e inibidores que se ligam em outro sítio de interação (alostérico) na hTP também já foram identificados e apresentam diferentes mecanismos de inibição enzimática (55). Apesar de alguns desses inibidores serem promissores para quimioterapia do câncer, nenhum composto foi aprovado para o uso clínico até o presente momento. Dessa forma, a hTP é ainda considerada um alvo molecular atrativo para a busca de novos inibidores da sua atividade enzimática. O planejamento e síntese de novos compostos que tenham como alvo o sítio de ligação dos substratos ou o possível sítio alostérico na hTP podem levar ao desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos, candidatos a fármacos para o tratamento do câncer.

2. Justificativa

A importância da enzima hTP na quimioterapia do câncer está baseada no fato de sua atividade catalítica ser fundamental na promoção da angiogênese através da estimulação da migração de células endoteliais no ambiente tumoral. Além disto, o fato de a hTP estar envolvida na progressão do câncer e na metástase reforça a hipótese de que esta enzima seja um potencial alvo para o desenvolvimento de novos compostos para o tratamento do câncer.

A relevância da hTP na quimioterapia do câncer, há mais de 30 anos, tem gerado um grande interesse no desenvolvimento de novos compostos inibidores da sua atividade enzimática, visto que todos os compostos propostos até o presente momento, não foram aprovados para uso clínico. A busca por novos inibidores da hTP tem como perspectiva o desenvolvimento de um novo candidato a fármaco antiangiogênese que possa ter ação também sobre a concentração intracelular de análogos de nucleosídeos, como o TFT, com propriedades citotóxicas, porém degradados pela hTP.

Este trabalho, portanto, pretende realizar a caracterização bioquímica do precursor e da proteína madura hTP. O estudo de ambas as enzimas foi proposto visto que existem algumas evidências de que a forma precursora exista *in vivo* e, desta forma, pode representar também um alvo terapêutico importante para o desenvolvimento de inibidores da sua atividade. Além disso, buscou-se identificar novos compostos inibidores que possam, posteriormente, servir como base para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos e seu possível uso na quimioterapia do câncer.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo geral a caracterização bioquímica da enzima hTP (precursor e proteína madura), assim como a busca por compostos inibidores desta enzima.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos compreendem:

- Amplificação da sequência genômica que codifica a hTP, clonagem do fragmento amplificado em vetor de clonagem e subclonagem em vetor de expressão.
- Expressão e purificação das enzimas hTP (precursor e proteína madura) recombinantes.
- Análise da estrutura primária e confirmação da identidade da proteína.
- Caracterização cinética das enzimas em estudo.
- Estudos termodinâmicos da ligação dos substratos e produtos às hTPs.
- Modelagem molecular das enzimas hTPs.
- Planejamento e síntese de possíveis compostos inibidores da atividade enzimática das hTPs.
- Avaliação do potencial inibitório dos compostos químicos sintetizados sobre a atividade enzimática das enzimas hTP.

Capítulo 2

Metodologia

Análise de Dados

4. Metodologia

4.1 Obtenção do cDNA a partir do RNA isolado de tecido colorretal tumoral por RT-PCR.

No presente trabalho foi utilizado o remanescente de uma amostra de RNA total isolado de um tecido colorretal tumoral utilizado em outro trabalho desenvolvido e publicado pelo nosso grupo (63). Tal estudo havia sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da PUCRS (CEP 07/03601) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). No entanto, para reutilização do RNA, o presente projeto foi submetido e aprovado pelo CEP (Número de Protocolo 11/05429; **Anexo A**).

Previamente, o RNA total foi isolado de tecido colorretal tumoral proveniente do Hospital São Lucas de Porto Alegre a partir de um tumor enucleado na rotina do Serviço de Oncologia. O tecido foi armazenado em uma solução de estabilização de RNA (RNA later™ RNA Stabilization Reagent, Ambion). Aproximadamente 30 mg de tecido foram utilizados para o isolamento do RNA total. A porção do tecido selecionada foi macerada após imersão em nitrogênio líquido e solubilizada com tampão de lise. O tecido lisado foi transferido para colunas de afinidade cromatográfica, processado de acordo com o protocolo de isolamento do RNA (RNeasy® Protect Qiagen) e armazenado a -80 °C. A verificação da concentração total de RNA e a densidade óptica (OD) 260 nm/280 nm foram verificadas utilizando um espectrofotômetro UV-VIS. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA total isolado (remanescente) utilizando oligonucleotídeos sintéticos (*primers*), dNTPs, cloreto de magnésio (MgCl₂) e a enzima derivada do vírus da leucemia mielóide aviária (MultiScribe™ Reverse Transcriptase, TaqMan® Reverse Transcription Reagents, Roche Molecular). O cDNA sintetizado foi armazenado a -20 °C.

4.2 Amplificação do gene TYMP que codifica a enzima hTP

A amplificação do gene TYMP (NM_001953.4) que codifica o precursor e a proteína madura da hTP consistiu no desenho de *primers* complementares às

regiões flanqueadoras 5' e 3' da ORF (*Open Reading Frame*) a partir do mRNA variante 2 humano encontrada na base de dados NCBI (NM_001953.4), contendo sítios para enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII*, respectivamente.

O desenho do *primer* direto para a amplificação do precursor da hTP teve início no códon que codifica para Metionina1 e tem como sequência de nucleotídeos: 5' **GACATATGGCAGCCTTGATGACCCCGGGAACC** 3'; o *primer* direto para amplificação da proteína madura teve início no códon que codifica a Ala11 e tem como sequência: 5' **GACATATGGCCCCACCCGCGCCTGGTACTT** 3', ambos com sítio de restrição para enzima *NdeI*; e o *primer* reverso, tem como sequência: 5' **AAAAGCTTTCATTGCTGCGGCGGCAGAACGAGC** 3' com sítio de restrição para a enzima *HindIII*.

Esses oligonucleotídeos foram utilizados para amplificar o gene TYMP, a partir do cDNA obtido do RNA total isolado de tecido colorretal tumoral, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando a enzima DNA polimerase de *Pyrococcus furiosus*, *Pfu*® Turbo DNA Polymerase (Stratagene), que possui atividade de exonuclease 3'–5' e confere alta fidelidade de amplificação. A mistura de reação final (50 µL) continha: DNA polimerase de *Pyrococcus furiosus*, *Pfu*® Turbo DNA Polymerase (Stratagene); tampão de reação 10x *Pfu* Turbo® DNA Polymerase (Stratagene), dNTPs, *primers* sintéticos e a fonte de cDNA. As condições para a obtenção dos produtos de amplificação esperados foram otimizadas variando-se fatores como temperatura de anelamento e presença de aditivos, como dimetilsulfóxido (DMSO).

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 % contendo brometo de etídeo, isolados do gel (QIAquick Gel extraction Kit, Qiagen) e armazenados para a ligação no vetor de clonagem pCR®-Blunt (Invitrogen) e, posteriormente, subclonagem em vetor de expressão pET23a(+) (Novagen).

4.3 Clonagem do gene TYMP no vetor pCR-Blunt®

Os fragmentos purificados foram clonados em vetor de clonagem pCR-Blunt® (Invitrogen), utilizando a enzima T4 DNA ligase. Este *kit* realiza a clonagem de fragmentos de PCR de extremidades cegas, selecionando os vetores recombinantes, pois a ligação do fragmento ao vetor interrompe a expressão de um

gene letal para a célula, o *ccdB*. Os vetores recombinantes (pCR-Blunt::TYMP) foram posteriormente transformados em células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B, através de eletroporação (Gene Pulser II; Capacitance Extender II; Pulse Controller II, BIO-RAD) seguida de posterior crescimento em placas de cultura (meio Lúria-Betani – LB) contendo canamicina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ – antibiótico de resistência do vetor – para a seleção das células recombinantes e subsequente inoculação em meio LB líquido contendo canamicina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, para crescimento. Após, foi feita a extração do DNA plasmidial (Qiaprep Spin Miniprep – Qiagen) e clivagem com a enzima de restrição *EcoRI* (Cenbiot Enzimas) para confirmação da ligação dos fragmentos correspondentes às sequências dos genes de interesse (1448 pb para o precursor e 1415 pb para a proteína madura) ao vetor. Os fragmentos foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1 %.

4.4 Subclonagem do gene TYMP em vetor de expressão pET-23a(+)

Para realizar a transferência dos genes de interesse para um plasmídeo de expressão heteróloga, os vetores pCR-Blunt::TYMP obtidos anteriormente, foram clivados com enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII*. Uma clivagem com as mesmas enzimas foi realizada no vetor de expressão pET-23a(+) (Novagen) a fim de gerar extremidades coesivas entre o vetor e os fragmentos. Os fragmentos clivados foram então inseridos no vetor de expressão pET-23a(+), na presença da enzima T4 DNA ligase. Os vetores de expressão recombinantes foram introduzidos por eletroporação em células *E. coli* DH10B, e inoculados para crescimento em meio LB líquido (com adição do antibiótico) para posterior extração do DNA plasmidial (Qiaprep® Spin Miniprep – Qiagen). Os produtos obtidos nessa etapa são denominados plasmídeos pET-23a(+):TYMP. A confirmação da presença dos insertos em vetor de expressão pET-23a(+) foi realizada pela clivagem dos plasmídeos recombinantes com as mesmas enzimas de restrição e visualização da liberação dos insertos após eletroforese em gel de agarose 1 %.

4.5 Sequenciamento dos fragmentos clonados no vetor pET-23a(+)

Os DNAs plasmidiais, contendo os insertos (pET-23a(+):TYMP), foram quantificados no espectrofotômetro Ultrospec 3100 pro (Amersham Biosciences)

utilizando o programa *DNA quantification*, que mede a absorbância em dois comprimentos de onda, 260 nm e 280 nm. A leitura em 260 nm permite o cálculo da concentração de ácidos nucleicos na amostra, em que uma OD de 1 corresponde a aproximadamente $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ para DNA dupla fita. A relação entre as leituras a 260 nm e 280 nm ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) proporciona uma estimativa de pureza de ácidos nucleicos. Preparações puras de DNA possuem valores de OD de 1,8.

Os DNAs plasmidiais contendo os insertos pET-23a(+):TYMP foram sequenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano pertencente ao Instituto de Biociências da USP, a fim de verificar a identidade da sequência e a ausência de mutações.

4.6 Expressão das proteínas recombinantes hTP

Os plasmídeos recombinantes pET-23a(+):TYMP foram transformados em diferentes cepas de *E. coli*, onde diferentes meios de cultivos e temperaturas de crescimento foram testados bem como a presença ou não do indutor isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A indução por IPTG facilita a expressão de proteínas sob controle do promotor do bacteriófago T7, uma vez que o mesmo é um análogo da lactose (64).

Diferentes cepas de *E. coli* (Novagen) foram transformadas com os DNAs plasmidiais pET-23a(+):TYMP e, paralelamente, com o vetor pET-23a(+) (controle negativo) por eletroporação. As células transformadas foram então semeadas em placas de Petri contendo meio LB sólido e antibiótico(s) apropriado(s) e armazenadas em estufa a 37 °C, por 16 h. Após o crescimento, os pré-inóculos foram realizados através da adição de uma colônia em meio LB líquido contendo antibiótico, que, subsequentemente, foram utilizados para a realização dos inóculos em meio de cultura que apresentou o melhor resultado. Uma vez que os inóculos foram preparados, eles foram incubados a 37 °C, sob agitação (180 rpm) em agitador orbital (*shaker*) até as culturas atingirem OD_{600} entre 0,4 e 0,6, (Ultrospec 3100 pro – Amersham Biosciences). Atingindo a OD_{600} desejada, um controle positivo pET-23a(+):TYMP e um controle negativo pET-23a(+) de cada proteína foram induzidos com IPTG. As culturas foram incubadas (30 °C e 37 °C) para crescimento e a superexpressão das proteínas de interesse foi verificada através da realização de coletas periódicas. As amostras resultantes das diferentes coletas

foram rompidas por ultrassom (Vibra cell, SONICS) e centrifugadas para separação das frações. As frações solúveis (sobrenadantes) foram separadas das frações insolúveis (*pellet*) e todas as amostras foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 12 %) corado com Comassie Blue.

4.7 Purificação das proteínas recombinates hTP

Para a purificação das proteínas recombinantes, realizou-se um crescimento celular em maior escala com as melhores condições de expressão para obtenção das proteínas na fração solúvel. Posteriormente, as células de *E. coli* foram rompidas e as proteínas alvo contidas nas frações solúveis foram purificadas utilizando o sistema de purificação ÄKTA (GE HealthCare) através de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Todos os passos da purificação foram realizados a 4 °C e a eluição das proteínas foram monitoradas por UV. Primeiramente, as células foram ressuspensas (10 mL g⁻¹ célula) em tampão Tris 50 mM pH 7,5 (tampão A) e tratadas com lisozima (0,2 mg mL⁻¹) para facilitar o rompimento celular, seguido de agitação por 30 min a 4 °C. Após agitação, as células foram rompidas por ultrassom e centrifugadas, para separação das frações. Ao sobrenadante, foi adicionado sulfato de estreptomicina para precipitação dos ácidos nucleicos, a uma concentração final de 1 %, seguido de agitação por 30 min a 4 °C, e centrifugação. A fração solúvel foi dialisada contra o tampão A até atingir uma concentração mínima de sulfato de estreptomicina. A amostra dialisada foi aplicada em uma coluna de troca aniônica Q Sepharose Fast Flow. Para a eluição, foi utilizado um gradiente linear (0 – 100 %) de 20 volumes de coluna (CV) do tampão Tris 50 mM + cloreto de sódio (NaCl) 500 mM pH 7,5 (tampão B). Após a análise por SDS-PAGE 12 %, as frações contendo a enzima recombinante foram coletadas e a amostra foi dialisada novamente contra o tampão A para diminuir a concentração de sal. Em seguida, a amostra foi tratada com 1,4 M de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) sob agitação, até atingir a concentração final de 700 mM, imersa em gelo por 1 h e centrifugada. A amostra foi aplicada em uma segunda coluna cromatográfica de interação hidrofóbica HiLoad Phenyl Sepharose HP 16/10. Para a eluição, foi utilizado um gradiente linear de 20 CV do tampão Tris 50 mM + (NH₄)₂SO₄ 700 mM pH 7,5 (tampão C). Após a eluição, as frações contendo a

proteína recombinante foram coletadas e dialisadas contra o tampão A, para a retirada do sal remanescente. As proteínas recombinantes homogêneas foram analisadas através de SDS-PAGE 12 % e armazenadas a -80 °C.

4.8 Quantificação total das proteínas recombinantes hTP

Para determinação da concentração total de proteína foi utilizado o kit Bio-Rad Protein Assay (BIORAD), o qual se baseia na técnica desenvolvida por Bradford (65). A curva-padrão foi realizada utilizando albumina de soro bovino. Todos os pontos da curva e amostras das proteínas recombinantes foram analisados em triplicata, em espectrofotômetro Ultrospec 3100pro.

4.9 Identificação das proteínas recombinantes hTP por espectrometria de massa (MS)

Determinação da massa molecular intacta: Para a determinação da massa molecular intacta e realização do mapeamento peptídico, amostras das proteínas homogêneas foram dessalinizadas em colunas de resina de cromatografia de fase reversa (POROS R2-50 resin) (Applied Biosystems, USA). A determinação da massa molecular foi conduzida utilizando amostras homogêneas e dessalinizadas do precursor e da proteína madura hTP reconstituídas em 50 % acetonitrila/ácido fórmico 0,1 % e diretamente injetadas na fonte de ionização por *eletrospray* IonMax. Os espectros completos da faixa de 600 a 2.000 da relação entre massa e carga (m/z^{-1}) foram coletados por tempos de 10 a 60 min, com e sem microvarreduras por varredura, em um espectrômetro de massas híbrido LTQ-Orbitrap Discovery (Thermo, USA) com uma resolução de 30.000 em $400 m/z^{-1}$, usando valor de cargas de 106 no controle de ganho automático em *Fourier transformer*. A média dos espectros foi processada utilizando o programa *MagTran* (66) para a deconvolução dos estados de carga.

Mapeamento peptídico: Amostras das proteínas homogêneas foram submetidas à digestão com tripsina e os peptídeos gerados foram submetidos à análise por cromatografia líquida associada à espectrometria de massa com fragmentação induzida por colisão (LC-MS/MS) (67). Os espectros de fragmentação foram interpretados para a identificação das sequências dos peptídeos através do

programa proteome Discoverer 1.3 (Thermo, USA) e comparados com espectros teóricos obtidos da digestão triptica *in silico* do proteoma humano (68) a fim de confirmar a identidade da proteína recombinante.

Os ensaios foram realizados no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (PUCRS) utilizando os espectrômetros de massas LTQ-XL e LTQ Orbitrap Discovery (Thermo), sob a coordenação do Dr. Cristiano V. Bizarro.

4.10 Determinação do estado oligomérico em solução das proteínas recombinantes hTP

As massas moleculares das proteínas homogêneas biologicamente ativas em solução foram realizadas pela técnica de HPLC, utilizando uma coluna de exclusão por tamanho Superdex 200 (HR 10/30) (GE Healthcare) pré-equilibrada com Tris 50 mM pH 7,5 contendo 200 mM de NaCl a um fluxo de 0,4 mL min⁻¹. Foi realizada uma curva de calibração com diferentes proteínas-padrão de massa molecular conhecida (ferritina, catalase, aldolase, albumina, ovalbumina, quimiotripsinogênio A e ribonuclease A – LMW e HMW Gel Filtration Calibration Kit – GE Healthcare) (69, 70), medindo seus volumes de eluição e calculando os correspondentes coeficientes de partição, plotando estes valores *versus* o logaritmo de suas respectivas massas moleculares. Blue dextran 2000 (Ge Healthcare) foi utilizado para determinar o volume morto. A eluição das proteínas foi monitorada a 215, 254 e 280 nm.

4.11 Teste de atividade das enzimas hTP e determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ)

A atividade catalítica das enzimas hTP foi determinada para todas as etapas da purificação. O ensaio de atividade direto e contínuo foi determinado pela mudança da absorbância detectada pelo espectrofotômetro (UV-2550 UV/Visible spectrophotometer; Shimadzu) a 290 nm, 37 °C em Tris 50 mM pH 7,5 (71) por 60 s, sob condições de velocidade inicial em estado estacionário. Este ensaio enzimático é baseado na máxima diferença de absorbância a 290 nm entre o substrato dThd e o produto timina, no qual se observa um decréscimo em absorbância quando dThd é convertida em timina pela ação enzimática da hTP. Uma unidade de hTP é definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1 μ mol de dThd em timina

por minuto, em um caminho óptico de 1 cm. Reações na ausência das enzimas foram monitoradas a fim de subtrair possíveis artefatos químicos gerados durante a leitura de reação.

O coeficiente de absorvidade molar (ϵ) foi determinado de acordo com a lei de Beer-Lambert, através da medida das diferenças de absorbância correspondente às diferentes concentrações entre o produto e o substrato a 290 nm, 37 °C em Tris 50 mM pH 7,5. As concentrações de produto e substrato *versus* as diferenças de absorbâncias foram plotadas em um gráfico gerando uma função linear, onde o valor da inclinação correspondeu ao ϵ . A determinação do ϵ foi realizada para sua posterior utilização nos cálculos das constantes cinéticas descritas nos itens a seguir.

4.12 Determinação das constantes cinéticas aparentes

As constantes cinéticas aparentes em estado estacionário, a constante de Michaelis-Menten (K_M) e a constante catalítica (k_{cat}), foram determinadas para cada um dos substratos, onde o K_M é definido como a concentração de substrato na qual a velocidade inicial (v) é igual à metade da velocidade máxima (V_{max}) da reação enzimática, ou ainda, o K_M representa a concentração de substrato em que metade dos sítios ativos da enzima estão ocupados (saturados) pelas moléculas do substrato. O valor do k_{cat} refere-se ao número de ciclos (*turnover*) da enzima que ocorre por uma unidade de tempo e é definido como a velocidade máxima em que uma reação enzimática pode ocorrer em uma concentração fixa de enzima e saturante de substrato (72). Para o substrato dThd, as constantes cinéticas aparentes foram determinadas variando-se as concentrações de dThd (30 – 1.200 μ M) em concentração fixa e saturante de P_i (10 mM) para o precursor da hTP, e variando-se as concentrações de dThd (50 – 900 μ M) em concentração fixa e saturante de P_i (2 mM) para a hTP madura, nas condições de ensaio padrão. Para a obtenção das constantes cinéticas aparentes do P_i , variaram-se as concentrações de P_i (100 – 6.000 μ M) em concentração fixa e saturante de dThd (500 μ M) para o precursor da hTP, e variando-se concentrações de P_i (100 – 1.000 μ M) em concentração fixa e saturante de dThd (400 μ M) para a enzima madura.

4.13 Determinação das constantes cinéticas verdadeiras e do padrão de intersecção das retas

Os parâmetros cinéticos verdadeiros em estado estacionário (K_M e k_{cat}) para cada um dos substratos foram obtidos utilizando concentrações variadas de um substrato e diversas concentrações fixas e diferentes do outro substrato. Estes estudos possibilitaram um conhecimento inicial do mecanismo cinético enzimático. A atividade enzimática foi monitorada em dois experimentos diferentes, primeiramente para o precursor da hTP: i) variou-se a concentração de dThd (40 – 500 μM), em concentrações fixas e diferentes de P_i (100, 200, 300, 1.000, 4.000 e 6.000 μM); ii) variou-se a concentração de P_i (100 – 6.000 μM), em concentrações fixas e diferentes de dThd (40, 100, 200, 300, 400 e 500 μM). Para a hTP madura: i) variou-se a concentração de dThd (50 – 500 μM), em concentrações fixas e diferentes de P_i (70, 100, 150, 200, 400 e 1.000 μM); ii) variou-se a concentração de P_i (70 – 1.000 μM), em concentrações fixas e diferentes de dThd (50, 100, 200, 300 e 500 μM).

4.14 Microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Estudos termodinâmicos por ITC da ligação dos substratos e dos produtos às enzimas hTP foram realizados utilizando o Microcalorímetro ITC200 (MicroCal, Inc., Noryhampton, MA). Para a realização dos experimentos de ligação, foi adicionada água Milli Q na célula de referência (200 μL) e aproximadamente 100 μM de hTP na célula de amostra (200 μL). A seringa de injeção foi preenchida com os substratos (dThd e P_i) e os produtos (timina e 2dR1P) em concentrações saturantes como mostra a **Tabela 1**. As titulações foram feitas individualmente na enzima livre a 500 rpm, 37 °C. Os ensaios e o preparo das soluções contendo os ligantes foram conduzidos no mesmo tampão de armazenamento das enzimas de estudo, Tris 50 mM pH 7,5. Os controles experimentais (titulação dos ligantes em tampão) foram utilizados para subtrair os possíveis efeitos do calor de diluição do ligante. A ligação dos substratos/produtos às enzimas foi medida através da titulação direta do ligante à enzima livre. Os resultados foram analisados utilizando o software Origin 7 SR4 (Microcal, Inc.) através da integração dos picos isotérmicos gerados da subtração dos dados da titulação controle e da normalização da concentração.

Tabela 1 - Concentrações de enzima, substratos e produtos utilizadas nos experimentos de ITC.

	Precursor hTP	hTP madura
[Enzima]	64 – 102 μ M	88 – 104 μ M
[dThd]	1,0 mM	1,0 mM
[P _i]	3,0 mM	3,0 mM
[Timina]	3,0 mM	5,0 mM
[2dR1P]	5,0 mM	3,5 mM

4.15 Estudos de perfil de pH

Os estudos de pH foram realizados segundo Cook e Cleland (72), para a determinação das constantes cinéticas aparentes em estado estacionário utilizando um tampão composto (100 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid/ N-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-2ethanesulfonic acid/ 2-(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid), em uma determinada faixa de pH.

Primeiramente, as enzimas foram incubadas a 37 °C por 2 min no tampão descrito acima em uma ampla faixa de pH e suas atividades enzimáticas foram monitoradas na condição de ensaio padrão, a fim de identificar valores de pH desnaturantes e garantir a estabilidade das enzimas na faixa de pH testada.

A dependência dos parâmetros cinéticos em função da variação do pH foi determinada monitorando-se a velocidade inicial na presença de concentrações variadas de um substrato, em concentrações fixas e saturantes do outro substrato, nos seguintes valores de pH: 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, e 10,0. Os valores de k_{cat} e das constantes de especificidade (k_{cat}/K_M) para os substratos foram analisadas na forma de logaritmo *versus* os valores de pH. Tais estudos forneceram as constantes de dissociação aparentes (pK_s) de grupos funcionais das cadeias laterais de aminoácidos possivelmente envolvidos na ligação e/ou catálise.

4.16 Modelagem molecular

O I-Tasser (*Iterative Threading Assembly Refinement*) (73) é uma plataforma para predição de estrutura e funções de proteínas. A predição de estrutura tridimensional de proteínas é realizada utilizando a abordagem *threading*. Para a

predição das estruturas do precursor e da hTP madura foram seguidos os passos, descritos brevemente a seguir, do processo utilizado pelo programa I-Tasser.

No primeiro passo, definido como *threading*, foi realizado o alinhamento das sequências das proteínas alvo a uma base de dados, utilizando a ferramenta PSI-BLAST para a identificação de possíveis relações evolutivas. Através de múltiplos alinhamentos, construiu-se um perfil para a sequência de busca e sua estrutura secundária predita (aplicativo PSI-PRED). Após a obtenção do perfil e da predição de estrutura secundária, estes foram submetidos ao servidor LOMET. No servidor LOMET (74) algoritmos de *threading* foram utilizados para produzir estruturas moldes, que foram selecionadas de acordo com um ranking baseadas nas suas características estruturais.

Em seguida, iniciou-se a fase de montagem de conformações possíveis da estrutura. Os fragmentos contínuos das regiões que obtiveram bom alinhamento com as estruturas moldes foram utilizados para produzir as possíveis conformações. Nas regiões onde não há moldes, estes foram reconstruídos através de modelagem *ab initio*. As conformações geradas durante este processo foram agrupadas através de clusterização para a identificação de estados de mais baixa energia e os centróides destes clusters foram selecionados para a etapa seguinte. Na próxima etapa foram selecionadas as estruturas dos modelos e seguidas de refinamento estrutural. Nesta etapa a montagem de conformações por fragmentos foi executada novamente utilizando os centróides da etapa anterior. Esta segunda execução tem por objetivo refinar as estruturas dos modelos com o intuito de eliminar as interferências estéricas (impedimento espacial). Após esta etapa, os clusters foram gerados novamente e as conformações de menor energia foram selecionadas. Por fim, uma otimização de energia foi conduzida e, de acordo com as energias obtidas, foram selecionados os cinco melhores modelos.

A modelagem molecular foi realizada no Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas – LABIO da PUCRS, pelo Dr. Rafael Andrade Cáceres.

4.17 Planejamento dos inibidores enzimáticos

A estratégia de obtenção de novos compostos com capacidade inibitória sobre a hTP foi realizada em três fases distintas: 1) síntese de análogos ao estado de

transição do complexo ativado produzido na catálise enzimática; *ii*) a escolha de halogênios como substituintes sobre a posição 5 do anel heterocíclico uracil; *iii*) o uso de diferentes amino álcoois, mimetizando a 2dR de forma acíclica.

A obtenção, e o uso como inibidores, de compostos análogos aos estados de transição de reações catalisadas enzimaticamente têm levado ao desenvolvimento dos inibidores mais potentes que se conhece (60, 75). Essas estruturas assemelham-se ao estado de maior energia da coordenada de reação onde as ligações químicas do substrato estão sendo rompidas e novas ligações são produzidas, conduzindo às estruturas químicas dos produtos. Estas estruturas de alta energia são estabilizadas pelas cadeias laterais de resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico proteico reduzindo a energia de ativação da reação e, por conseguinte, aumentando a velocidade da conversão química. A hTP catalisa a conversão reversível de dThd à timina e 2dR1P na presença de P_i (Ver **Figura 5**). Essa reação é considerada, de um ponto de vista químico, uma reação de substituição nucleofílica que pode ser de 1ª ou 2ª ordem (S_N1 ou S_N2 , respectivamente). A reação de primeira ordem ocorre em duas etapas com a formação de um intermediário do tipo carbocátion (etapa lenta) e o conseguinte ataque do nucleófilo ao carbocátion (etapa rápida). A reação de segunda ordem ocorre de maneira concertada com o nucleófilo aproximando-se ao mesmo tempo em que o grupamento abandonador (timina) vai saindo pela face oposta.

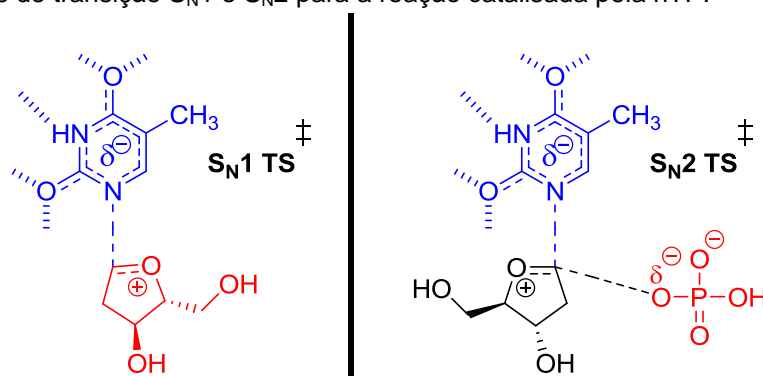
O estado de transição do complexo ativado da hTP tem sido estudado através de experimentos de efeitos isotópicos cinéticos e modelagem molecular. Nesses estudos, os agentes nucleofílicos utilizados têm sido o arsenato e a água. O P_i é o substrato utilizado na conversão catalisada pela hTP, entretanto, o monitoramento da reação por efeitos isotópicos cinéticos é complexo na presença desse íon, dificultando a elucidação do mecanismo químico e do estado de transição (76). Dois trabalhos provenientes do departamento de bioquímica do Albert Einstein College of Medicine (USA) descreveram que a arsenólise da dThd catalisada pela hTP apresenta um mecanismo concertado do tipo S_N2 (77, 78). Na primeira descrição, o mecanismo proposto foi totalmente simétrico com o nucleófilo (arsenato) e o grupo abandonador (timina) apresentando a mesma ordem de ligação (0,5) (77). Esse estudo utilizou a proteína expressa e purificada ligada a uma proteína ligadora de calmodulina que, segundo os autores, poderia modificar a interpretação dos resultados (78). Um novo estudo, publicado recentemente, corroborou o mecanismo

concertado tipo S_N2 , entretanto demonstrou que o estado de transição apresenta um caráter carbocatiônico com a formação do íon ribooxocarbenium (78). Esse fato foi explicado pelas diferentes ordens de ligação apresentadas entre a ligação 1-*N*-ribosídica ($C-N = 2,45 \text{ \AA}$) e a distância do arsenato em relação a 2dR ($C-O = 2,95 \text{ \AA}$) aproximando-se pela face oposta. A distância do nucleófilo aumenta a deficiência eletrônica sobre o C-1 da 2dR permitindo a formação do carbocátion, que recebe a assistência do grupo vizinho oxigênio para se estabilizar, conduzindo ao ribooxocarbenium.

A participação da Histidina116 (His116) no estado de transição do hTP foi também proposta. Esse resíduo, ativa o arsenato para o ataque nucleofílico e estabiliza a saída da timina como grupo abandonador. Por sua vez, a hidrólise da dThd catalisada pela hTP passa por um estado de transição do tipo S_N1 com a formação de um intermediário ribooxocarbenium sem a participação do nucleófilo (76). Nesse mecanismo a etapa determinante da velocidade da reação foi o ataque nucleofílico da água ao intermediário de reação formado. Conforme os dados provenientes da arsenólise, a His116 participa do estado de transição ativando a molécula de água para o ataque nucleofílico.

Desta forma, nosso objetivo foi sintetizar compostos que poderiam aproveitar o caráter carbocatiônico apresentado pelos estados de transição observados para a hTP (Figura 7).

Figura 7 - Estados de transição S_N1 e S_N2 para a reação catalisada pela hTP.

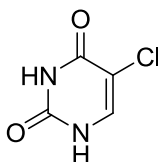


Fonte: Adaptado de Jain et al. (2010) (61).

Na sequência do planejamento procurou-se avaliar a presença de halogênios ligados na posição 5 do anel heterocíclico uracil, substituindo a metila presente nessa posição. Muitos compostos descritos como inibidores da hTP apresentam cloro (Cl), bromo (Br) ou flúor (F) ligado na posição 5 do referido anel heterocíclico

(55, 61). Um exemplo desse tipo composto halogenado com ação inibitória sobre a atividade catalítica da hTP é o 5-clorouracil (**Figura 8**).

Figura 8 - Estrutura química do derivado halogenado 5-clorouracil obtido como inibidor da hTP.



Adaptado de Pérez-Pérez et al. (2005) (55).

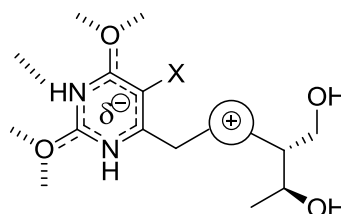
A eletronegatividade elevada dos substituintes halogenados aumenta a polarização do anel heterocíclico e reduzem o seu pK_a , uma vez que estabilizam sua base conjugada. Com o caráter ácido aumentando, os grupamentos doadores de ligações de hidrogênio formam interações mais efetivas, possibilitando uma estabilização maior do complexo através de ligações de hidrogênio mais eficientes no sítio ativo da proteína. A presença de halogênios pode, também, estabelecer interações por ligações de halogênios com grupamentos doadores de densidade eletrônica através do seu sigma-hole (79). Convém destacar que a força das interações por ligações de halogênios vão aumentando com o aumento da polarizabilidade dos mesmos e com o concomitante aumento da deficiência eletrônica sobre o sigma-hole. Assim, a força dessas interações obedecem a seguinte ordem Iodo (I) > Br > Cl > F (79).

Finalmente, a semelhança do que já foi descrito por Semeraro e por Clinch (80, 81), o uso de amino álcoois acíclicos podem mimetizar o ribooxocarboxônio formado no estado de transição catalisado pela hTP (**Figura 9**). Essa estratégia de simplificação molecular já se mostrou eficiente mantendo a eficiência inibitória e facilitando a síntese química. Além disso, elimina os centros assimétricos, sendo essa, uma característica desejável em compostos candidatos a fármacos. O pK_a elevado da cadeia lateral (NH) dos amino álcoois deve produzir um centro com carga positiva em pH fisiológico, semelhante ao ribooxocarboxônio formado no estado de transição para hTP.

O planejamento e a síntese dos compostos químicos como possíveis inibidores da hTP foram realizados no Laboratório de Química do INCT-TB da PUCRS, sob a orientação do Prof. Dr. Pablo Machado. A execução dos

experimentos de síntese e elucidação estrutural foi realizada pelo estudante de química Christiano Neves.

Figura 9 - Estruturas planejadas como inibidores da hTP.



X = Cl, Br, I

Nota: A estereoquímica dos grupamentos hidroxilas é proveniente da 2-desoxirribose de maneira apenas ilustrativa

4.18 Efeito inibitório tempo-dependente

Uma vez tendo os compostos químicos sintetizados, realizou-se, primeiramente, o ensaio de efeito inibitório tempo-dependente sobre a ação catalítica da hTP. Alguns inibidores ligam-se ou dissociam-se de enzimas alvo lentamente, ocasionando uma dependência do tempo para atingir um equilíbrio e obter-se a inibição (82). Para avaliar se o efeito inibitório dos compostos seriam dependentes do tempo, foram realizadas medidas de atividade específica da enzima em condição experimental estabelecida em um período de tempo de 0 a 30 min. Neste caso, ambos os substratos foram mantidos em concentrações não saturantes (próximas ao valor do K_M) e alíquotas de enzima incubada com o inibidor foram retiradas em intervalos de 5 min, monitorando-se a atividade enzimática através da adição dessa mistura à reação padrão.

4.19 Determinação da IC_{50} dos compostos sintetizados

O valor da IC_{50} define a concentração de inibidor necessária para saturar metade dos sítios ativos da enzima sob uma condição experimental específica e é, geralmente, utilizada como a medida de inibição relativa entre os compostos considerados possíveis inibidores (82).

A determinação da IC_{50} foi realizada para todos os compostos químicos sintetizados em ambas as enzimas hTP recombinantes. Neste experimento, utilizou-se uma concentração fixa de enzima e de substratos. O ensaio experimental foi realizado através de curvas de velocidade inicial fixando os substratos (dThd e P_i) em concentrações não saturantes e variando-se concentrações crescentes do inibidor até a atividade específica da enzima tender a zero. Primeiramente, foi realizada uma leitura da absorbância sem a adição do composto inibidor, a qual correspondeu a 100 % da atividade enzimática.

4.20 Determinação da constante inibitória (K_i)

O ensaio de determinação da K_i foi realizado para o composto que apresentou a melhor atividade inibitória (IC_{50}). O ensaio de K_i permite inferir o mecanismo cinético de inibição, uma vez que este pode ser competitivo, incompetitivo e não competitivo. Os tipos de inibidores são qualitativamente diferenciados baseando-se nos parâmetros de velocidade inicial observados na presença do inibidor e na forma ou formas em que o inibidor liga-se à enzima (72). O ensaio foi realizado fixando-se um dos substrato dThd ou P_i em uma concentração não saturante ($\sim K_M$) e variando-se a concentração do outro até a saturação, na ausência e presença de concentrações fixas e diferentes de inibidor. O padrão de intersecção das retas foi determinado através de análises de duplo-recíproco (ou *plot* de Lineweaver-Burk), e aplicou-se a equação apropriada para a determinação da constante de dissociação do complexo enzima:inibidor EI (K_i) ou enzima:substrato:inibidor ESI (K_{is}).

O valor de K_i do composto **5g** foi determinado variando-se ambos os substratos. Para cada substrato, foram realizadas quatro curvas de saturação, sendo que a primeira foi feita sem adição do inibidor e representou 100 % da atividade enzimática. As outras três curvas de saturação foram feitas com a adição de concentrações fixas e diferentes do inibidor. Para o substrato dThd, fixou-se o P_i em uma concentração de 110 μ M variando-se a dThd em uma faixa de 50 μ M – 500 μ M, sem a adição e na presença de 50 nM, 100 nM e 200 nM do inibidor. Para o substrato P_i , fixou-se a dThd em uma concentração de 70 μ M variando-se o P_i em uma faixa de 50 μ M – 800 μ M, sem a adição e na presença de 50 nM, 100 nM e 150 nM do inibidor.

4.21 Docagem molecular e análises dos volumes das cavidades da enzima hTP

Os experimentos de docagem molecular foram realizados com o intuito de analisar o modo de interação do composto **5g** assim como para propor um possível sub-sítio de ligação na enzima hTP. A enzima e o composto **5g** foram preparados com o programa AutoDockTools1.5.2, enquanto que as docagens foram realizadas com o AutoDock4.2 (83, 84), permitindo a flexibilidade do ligante. O protocolo de docagem seguiu os seguintes parâmetros: a dimensão da malha foi de 180 x 180 x 180, com espaçamento de 0.375 Å, de forma que toda a enzima estivesse dentro da malha. O algoritmo genético (AG) Lamarkiano foi empregado como o algoritmo de docagem com uma população de 150 e o número de avaliações utilizadas para o AG foi de 25.000.000.

Após as simulações de docagem molecular, as análises dos volumes das cavidades da enzima hTP foram realizadas com a finalidade de verificar quais cavidades eram condizentes com o volume do composto testado. Os programas CASTp (85) e metaPocket2.0 (86, 87) foram utilizados para essas análises.

A docagem molecular foi realizada no Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas – LABIO da PUCRS, pelo Dr. Rafael Andrade Cáceres.

5. Análise de dados

O estado oligomérico das proteínas em solução foi determinado a partir dos volumes de eluição (V_e) das proteínas padrão e seus coeficientes de partição correspondentes (K_{AV}) através da equação (1); onde V_0 corresponde o volume morto e V_t ao volume total da coluna. O K_{AV} de cada proteína foi plotada *versus* o logaritmo do seu peso molecular correspondente gerando uma função linear com os valores de intercepto e inclinação dados na equação (2) e (3):

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{Eq. 1}$$

$$K_{AV} = 0,9234 - 0,2914 \log kDa \quad \text{Eq. 2}$$

$$K_{AV} = 0,9669 - 0,3087 \log kDa \quad \text{Eq. 3}$$

Os valores dos parâmetros cinéticos e seus respectivos erros foram calculados a partir de equações apropriadas, utilizando o *software* SigmaPlot 9.0 (SPSS, Inc.).

As constantes cinéticas para o ensaio de inibição pelo substrato timidina foram obtidas através da geração de curvas de velocidade inicial plotadas variando-se a concentração do substrato *versus* a atividade específica ($U \text{ mg}^{-1}$) e aplicou-se a equação geral de inibição pelo substrato (4) (88), onde v é a velocidade inicial em estado estacionário, V_{\max} é a velocidade máxima, $[B]$ é a concentração do substrato timidina, K_M é a constante de Michaelis-Menten e K_i é a constante de dissociação para inibição pelo substrato:

$$v = \frac{V_{\max,app}[B]}{K_{MB,app} + [B] + \frac{[B]^2}{K_{IB,app}}} \quad \text{Eq. 4}$$

Curvas de saturação com perfil hiperbólico foram analisadas de acordo com a equação de Michaelis-Menten (5), onde v é a velocidade inicial em estado estacionário, V_{\max} é a velocidade máxima, $[S]$ é a concentração do substrato e K_M é a constante de Michaelis-Menten (72, 89):

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Eq. 5}$$

O padrão de intersecção das retas à esquerda do eixo y nas análises de duplo-recíproco (ou *plot* de Lineweaver-Burk) foi analisado de acordo com a equação (6), que descreve um mecanismo envolvendo a formação de um complexo ternário e ligação sequencial dos substratos; onde v é a velocidade inicial, V é a velocidade máxima, A e B são as concentrações dos substratos (dTThd e P_i), K_a e K_b são suas respectivas constantes de Michaelis Menten, e K_{ia} é a constante de dissociação para a formação do complexo binário enzima-substrato A (72, 89):

$$v = \frac{V_{AB}}{K_{ia}K_b + K_aB + K_bA + AB} \quad \text{Eq. 6}$$

Os resultados obtidos no ITC foram aplicados na equação (7), onde ΔH é a entalpia da ligação, ΔG é a energia livre de Gibbs, ΔS é a entropia, T é a temperatura experimental em Kelvin (K), R é a constante dos gases ($1,987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e K_a é a constante de associação em equilíbrio. A constante de dissociação (K_d) foi calculada como o inverso de K_a , como descrito na equação (8).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_a \quad \text{Eq. 7}$$

$$K_d = \frac{1}{K_a} \quad \text{Eq. 8}$$

As constantes de dissociação ácido base aparentes (K_a e K_b) para grupos ionizantes foram obtidas seguindo a curva *bell-shaped* através da equação (9), onde y representa a constante cinética aparente (k_{cat} ou k_{cat}/K_M), C é o valor de y independente do pH e H é a concentração de próton (72):

$$\log y = \log \left[\frac{C}{1 + \frac{H}{K_a} + \frac{K_b}{H}} \right] \quad \text{Eq. 9}$$

A análise dos valores de IC_{50} foi realizada através da concentração de inibidor *versus* a velocidade da reação, e aplicou-se a equação para determinação do valor de IC_{50} (10), onde v_i é a velocidade inicial na presença do inibidor em uma

determinada concentração de inibidor, $[I]$ é a concentração de inibidor, v_0 é a velocidade inicial na ausência do inibidor e IC_{50} é a concentração de inibidor que inibe 50 % da atividade enzimática (82):

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{IC_{50}}} \quad \text{Eq. 10}$$

Os valores das constantes de dissociação para os complexos EI ou ESI , nos estudos de inibição, foram analisados de acordo com as equações que descrevem inibição competitiva (11), inibição não competitiva (12) e inibição incompetitiva (13), onde $[I]$ é a concentração de inibidor, K_i é a constante de dissociação do complexo binário EI e K_{is} é a constante de dissociação do complexo ternário ESI (82):

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Eq. 11}$$

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{is}}\right) + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Eq. 12}$$

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{is}}\right) + K_M} \quad \text{Eq. 13}$$

Capítulo 3

Resultados e Discussão

Considerações Finais

6. Resultados e discussão

6.1 Amplificação, clonagem e sequenciamento do gene TYMP

Os fragmentos amplificados por PCR e visualizados em gel de agarose 1 % apresentaram um tamanho correspondente aos 1448 pb e 1415 pb referentes ao tamanho da sequência codificante do gene TYMP para o precursor e para a proteína madura hTP, respectivamente (dados não apresentados). As melhores condições para a amplificação continham uma concentração final de 5 % e 10 % de DMSO na mistura de reação para ambos os fragmentos. A adição de co-solventes, como o DMSO, na mistura de reação favorece a desnaturação de regiões do DNA com alto conteúdo de CG (*CG-rich*) (90), o que é consistente com os 75 % de conteúdo C+G do gene TYMP (36). Os fragmentos contendo 5 % de DMSO foram purificados do gel de agarose e ligados no vetor de clonagem pCR-Blunt[®], seguido da subclonagem através da ligação no vetor de expressão pET-23a(+). A subclonagem foi confirmada através da análise de liberação do fragmento utilizando as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* (dados não apresentados). O sequenciamento automático de DNA confirmou a identidade e a ausência de mutações nos fragmentos clonados (dados não apresentados).

6.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes hTP

Os plasmídeos recombinantes pET-23a(+):TYMP para expressão do precursor e da proteína madura foram transformados em diferentes cepas de *E. coli* e foram testadas diversas condições de crescimento para a expressão das proteínas recombinantes na sua forma solúvel, nas quais foram variadas a temperatura, meio de cultivo e adição ou não de 1 mM de IPTG. A melhor condição para a expressão do precursor da hTP na fração solúvel do extrato celular foi na cepa Rosetta (DE3) de *E. coli*, cultivadas em meio *Terrific broth* (TB), a uma temperatura de 30 °C, coletadas 24 h após atingirem uma OD_{600 nm} de 0,4 – 0,6, sem a indução com IPTG. A melhor condição para a expressão da hTP madura na fração solúvel foi semelhante a do precursor, modificando-se apenas a temperatura de cultivo para 37 °C. Em concordância com os resultados aqui demonstrados, níveis altos de

expressão de proteínas sem a presença de um indutor em um sistema pET já foram reportados (91, 92). Os genes alvos são inseridos na região *downstream* do promotor do bacteriógafo T7 (93). Tem sido proposto que na ausência de IPTG, ocorre uma expressão baixa de proteínas alvo devido ao controle exercido pelo promotor-*lac* quando as células atingem a fase estacionária em meios complexos e que adenina monofosfato cíclico, acetato e pH ácido são requeridos para uma expressão elevada (94). Entretanto, uma indução não intencional no sistema pET é devido a presença de menos de 0,0001 % de lactose no meio de cultura, resultado na expressão proteica (95). A análise através de SDS-PAGE 12 % indicou que o extrato celular continha as proteínas recombinantes na fração solúvel, com uma massa molecular aparente de aproximadamente 50 kDa, correspondente ao peso molecular predito para o precursor hTP (49,9 kDa) e hTP madura (49 kDa).

O precursor e a proteína madura foram eficientemente purificados utilizando-se duas colunas cromatográficas (**Figura 10 e 11**), sendo a primeira uma coluna de troca aniônica (Q-Sepharose Fast Flow) e a segunda, uma coluna de interação hidrofóbica (HiLoad Phenyl Sepharose High Performance). O protocolo de purificação para ambas as proteínas foi o mesmo, variando-se apenas a quantidade (em gramas) de células como ponto de partida, devido à diferença na quantidade de proteína expressa.

Para o precursor da hTP, partindo-se de 2,5 g de células úmidas, este protocolo de purificação rendeu 23 mg de proteína recombinante, indicando 69 % de rendimento proteico (**Tabela 2**). Para a hTP madura, partindo-se de 7,6 g de células úmidas obteve-se 12 mg de proteína recombinante, indicando 52 % de rendimento proteico (**Tabela 3**). O teste de atividade das enzimas hTP foi realizado em todas as etapas da purificação, confirmando que as enzimas recombinantes catalisam a fosforólise de dThd à timina.

O ϵ foi determinado experimentalmente nas mesmas condições de ensaio padrão, uma vez que se verificou que a dThd apresenta uma absorvância duas vezes maior do que a da timina, em uma mesma concentração de 100 μM , a 290 nm através de um espectro de varredura realizado no espectrofotômetro (UV-2550 UV/Visible spectrophotometer; Shimadzu). O valor do ϵ obtido foi de $2,00 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Figura 10 - Análise por SDS-PAGE 12 % das frações coletadas em cada etapa da purificação do precursor da hTP. M: marcador de peso molecular Page Ruler; 1: extrato bruto; 2: eluído da coluna Q Sepharose FF; 3: Aplicado na coluna HiLoad Phenyl HP; 4: eluído da coluna HiLoad Phenyl.

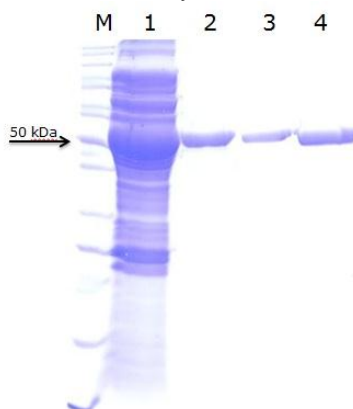


Figura 11 - Análise por SDS-PAGE 12 % das frações coletadas em cada etapa da purificação da hTP madura. M: marcador de peso molecular Page Ruler; 1: extrato bruto; 2: eluído da coluna Q Sepharose FF; 3: eluído da coluna HiLoad Phenyl.

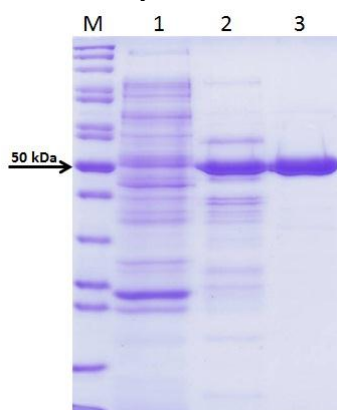


Tabela 2 - Purificação do precursor da hTP em *E. coli* Rosetta(DE3). Protocolo de purificação a partir de 2,5 g de células úmidas.

Etapa da purificação	Proteína total (mg)	Atividade enzimática total (U)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Grau de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	164,0	229,6	1,4	1,0	100
Q Sepharose FF	33,6	146,5	4,4	3,1	64
Phenyl Sepharose HP	21,3	157,6	7,4	5,3	69

Tabela 3 - Purificação da hTP madura em *E. coli* Rosetta(DE3). Protocolo de purificação a partir de 7,6 g de células úmidas.

Etapa da purificação	Proteína total (mg)	Atividade enzimática total (U)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Grau de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	410,0	98,4	0,2	1,0	100
Q Sepharose FF	24,6	47,0	1,9	8,0	48
Phenyl Sepharose HP	12,0	51,6	4,3	18,0	52

6.3 Identificação das proteínas recombinantes hTP por MS

Determinação da massa molecular intacta: Os espectros da massa molecular intacta do precursor e da proteína madura hTP foram adquiridos pelo analisador Orbitrap.

Para o precursor da hTP foi obtido um espectro com 738 scans com 10 μ scans por 62 min, no qual se observou picos correspondentes aos estados de carga de 29+ a 62+. Através da deconvolução destes dados, foram obtidas duas massas moleculares experimentais, o que indica a presença de duas formas da hTP precursora. A forma, com maior quantidade, de 49.823 Da é consistente com a massa esperada após a remoção pós-traducional da metionina inicial (49.824 Da) na porção *N*-terminal e a outra forma, com uma massa molecular de 49.750 Da, é consistente com a perda esperada da metionina e, possivelmente, a perda da alanina subsequente (**Figura 12**).

A hTP madura tem a massa molecular predita de 49.023 Da, sendo menor que a precursora, uma vez que inicia-se a partir do décimo primeiro aminoácido. Para esta proteína foram obtidos 1.000 scans em 37 min e, no espectro da média se observou picos correspondentes ao estado de carga de 26+ a 63+. A deconvolução destes dados evidenciou a massa molecular média de 48.853 Da (**Figura 13**), ou seja, 170 Da a menos do que o esperado, o que pode indicar possível perda da alanina e da prolina nas posições 11 e 12.

Figura 12 - Espectro MS da massa molecular intacta do precursor da hTP.

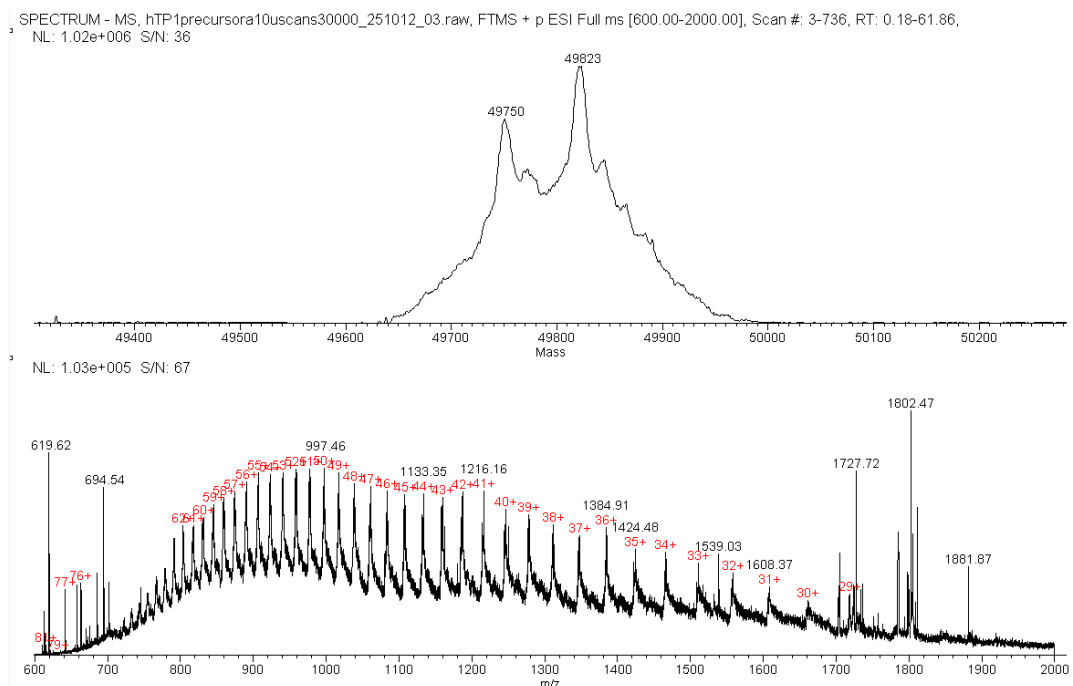
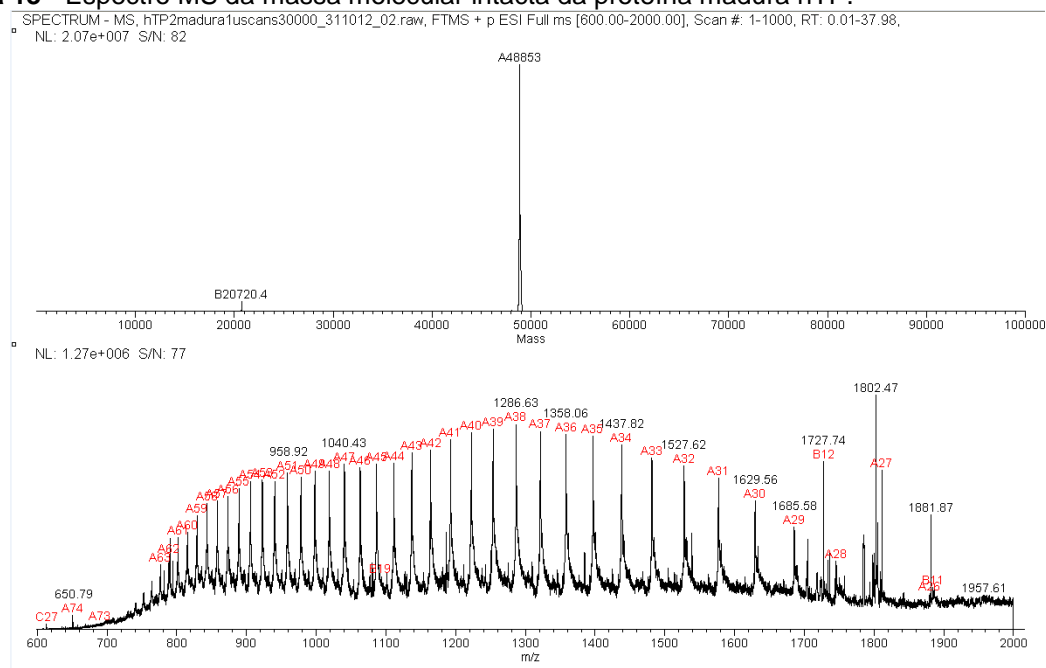


Figura 13 - Espectro MS da massa molecular intacta da proteína madura hTP.



Mapeamento peptídico: As misturas peptídicas provenientes das digestões tripticas das amostras de hTP precursora e madura foram submetidas a LC-MS/MS e comparadas ao banco de dados do proteoma humano (68) e a uma cópia deste banco acrescida das alterações propostas de perda da metionina e da alanina para

a hTP precursora; e da prolina e da alanina para a hTP madura. Através do mapeamento peptídico da hTP precursora foram identificados 48 peptídeos, cobrindo 68,6 % do total de peptídeos da proteína esperada sem a metionina inicial e 68,5 % da proteína sem a metionina e a alanina, evidenciando a presença destas duas formas na solução (dados não apresentados). Para a hTP madura, foram identificados 49 peptídeos diferentes, cobrindo 85,2 % do total de peptídeos da proteína, evidenciando a perda da alanina e da prolina. A ausência destes aminoácidos iniciais foi confirmada quando os resultados foram comparados à esta mesma alteração feita virtualmente no banco de dados, pois só assim o primeiro peptídeo foi identificado (dados não apresentados).

6.4 Determinação do estado oligomérico das proteínas recombinantes hTP

As massas moleculares em solução do precursor da hTP e da proteína madura foram determinadas através de cromatografia de exclusão por tamanho resultando em um único pico para ambas as proteínas. Os coeficientes de partição (K_{AV}) das proteínas padrões e recombinantes foram calculados de acordo com a **Eq. 1**. A dependência linear do K_{AV} em função do logaritmo das massas moleculares das proteínas-padrão geraram os valores de inclinação e de intercepto das **Eq. 2** e **Eq. 3**. O volume de eluição do pico do precursor foi de 13,07 mL e corresponde a 95,135 kDa (**Eq. 2**). A massa molecular encontrada foi dividida pela massa molecular do monômero (95,135 kDa / 49,955 kDa \approx 1,9) obtendo-se um valor próximo de 2. O mesmo experimento foi realizado para proteína madura, onde o volume de eluição do pico foi de 12,47 mL, correspondendo a 120,1 kDa (**Eq. 3**), e 120,100 kDa / 49,024 kDa \approx 2,4. Os valores encontrados sugerem que ambas as proteínas encontram-se como um dímero em solução. Esses dados são condizentes com as estruturas cristalográficas da hTP determinadas por difração de raio X, onde a enzima foi descrita como um homodímero formado por duas subunidades idênticas (45, 46, 48). Além disso, a análise das estruturas cristalográficas da TP de *E. coli* (44) e da PyNP de *Bacillus stearothermophilus* (47) demonstraram que estas proteínas são diméricas, não diferindo, estruturalmente, de eucariotos superiores.

6.5 Determinação das constantes cinéticas aparentes

A determinação das constantes cinéticas aparentes em estado estacionário foram realizadas utilizando tanto a dThd quanto o P_i como substrato variável. A dependência da velocidade em função da variação do substrato dThd, em concentração saturante de P_i , apresentou inibição pelo substrato em concentrações pós-saturantes de dThd, observando-se uma redução na atividade catalítica (**Figuras 14A e 14B**). Os dados foram analisados de acordo com a equação geral de inibição pelo substrato (**Eq. 4**), para obtenção dos valores das constantes cinéticas aparentes e dos valores de K_i do substrato timidina (**Tabela 4**).

A dependência da velocidade em função da variação do substrato P_i apresentou um perfil hiperbólico (**Figuras 14C e 14D**). Neste caso, as constantes cinéticas aparentes para o substrato P_i foram calculadas de acordo com a equação de Michaelis-Menten (**Eq. 5**) e estão representadas na **Tabela 4**.

Figura 14 - Constantes cinéticas aparentes em estado estacionário. **A)** Atividade específica ($U\ mg^{-1}$) versus [dThd] (μM) para o precursor. **B)** Atividade específica ($U\ mg^{-1}$) versus [dThd] (μM) para proteína madura. **C)** Atividade específica ($U\ mg^{-1}$) versus [P_i] (μM) para o precursor. **D)** Atividade específica ($U\ mg^{-1}$) versus [P_i] (μM) para a proteína madura.

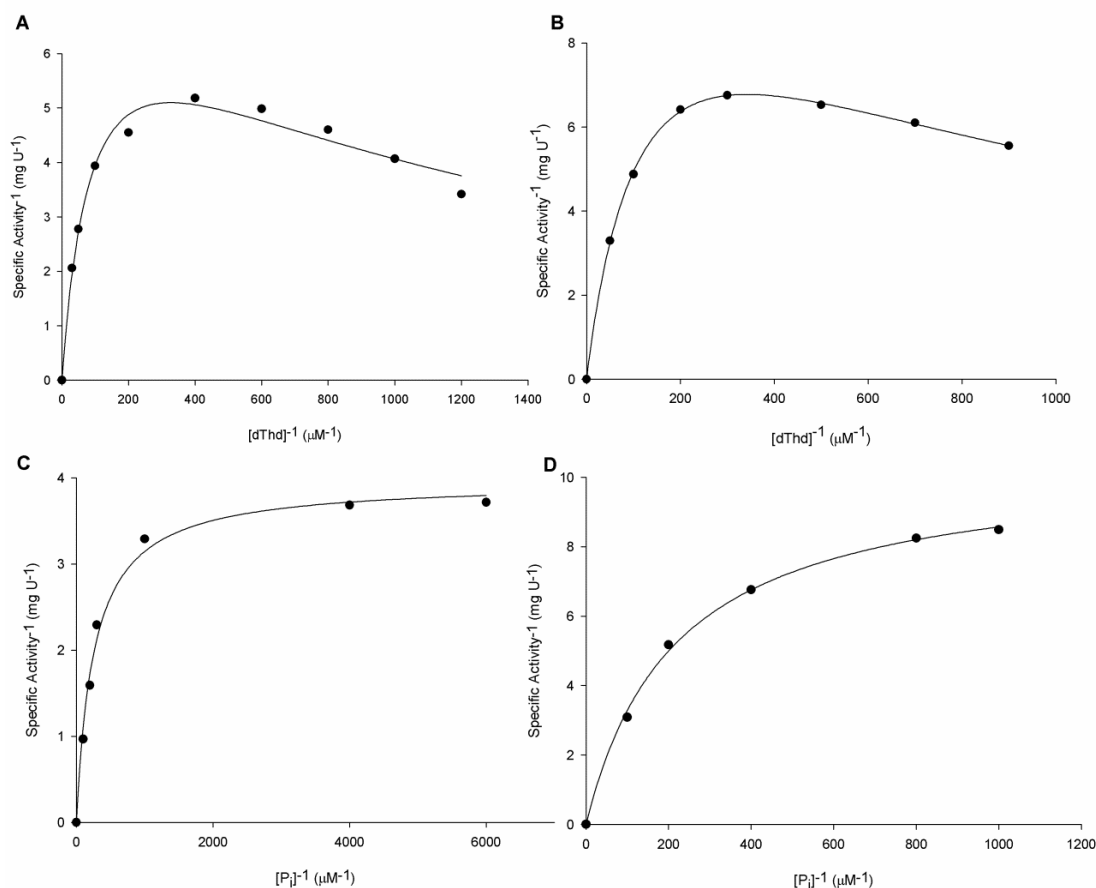


Tabela 4 - Constantes cinéticas aparentes para os substratos dThd e P_i.

	Timidina			Fosfato	
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μM)	K_i (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μM)
Precursor	6,6 ± 0,6	95 ± 20	1.121 ± 281	3,3 ± 0,1	258 ± 28
Madura	9,9 ± 0,2	130 ± 6	895 ± 48	8,7 ± 0,2	218 ± 15

Os resultados revelaram diferenças nas atividades catalíticas entre o precursor e a proteína madura, observados nos valores obtidos para o k_{cat} . A proteína madura ($k_{cat} = 9,9$ e $8,7$) parece ser cataliticamente mais eficiente em relação ao precursor ($k_{cat} = 6,6$ e $3,3$). Os K_M dos substratos não apresentaram valores muito distintos entre as proteínas (**Tabela 4**). Os valores de K_i para o substrato dThd foram $1121 (\pm 281)$ e $895 \mu\text{M} (\pm 48)$ para o precursor e proteína madura, respectivamente, o que é aproximadamente 7 – 11 vezes maior que o K_M . Não foi verificada atividade enzimática ao substituir o substrato dThd por uridina ($800 \mu\text{M}$), evidenciando a especificidade da hTP por desoxirribonucleosídeos (19).

6.6 Determinação das constantes cinéticas verdadeiras e do padrão de intersecção das retas

A fim de determinar os parâmetros cinéticos verdadeiros em estado estacionário e sugerir o mecanismo cinético enzimático do precursor e da proteína madura hTP, foram realizadas curvas de saturação variando-se as concentrações dos substratos dThd e P_i. As curvas foram analisadas em função de seus duplo-recíprocos (ou *plot* de Lineweaver-Burk). O padrão de intersecção das retas resultantes à esquerda do eixo y (**Figuras 15A – 15D**) é consistente com a formação do complexo ternário E:dThd:P_i e é um indicativo de mecanismos sequenciais; aleatório de equilíbrio rápido ou ordenado em estado estacionário. Deste modo, os parâmetros cinéticos verdadeiros foram calculados a partir da **Eq. 6** e estão apresentados na **Tabela 5**.

Os resultados revelaram novamente diferenças catalíticas entre o precursor e a proteína madura, observados nos valores obtidos nas constantes cinéticas verdadeiras. Os valores dos K_M dos substratos para o precursor são duas vezes maiores em relação à proteína madura, assim como o valor do k_{cat} da proteína madura, o qual é aproximadamente duas vezes maior em relação ao precursor. Em relação à especificidade dos substratos, é evidente que a hTP madura possui maior especificidade pelos substratos, onde os valores das constantes de especificidade

obtidos, k_{cat}/K_M , apontam uma diferença maior para a enzima madura em relação ao precursor. Os ensaios cinéticos demonstram que a proteína madura parece ser cataliticamente mais eficiente em relação ao precursor; no entanto análises estruturais talvez possam auxiliar no entendimento de tais diferenças.

Figura 15 - Padrão de intersecção das retas para o precursor da hTP (A) e proteína madura (B) em função da dThd. Padrão de intersecção das retas para o precursor da hTP (C) e proteína madura (D) em função do P_i . Cada curva representa uma concentração fixa e variada dos co-substratos.

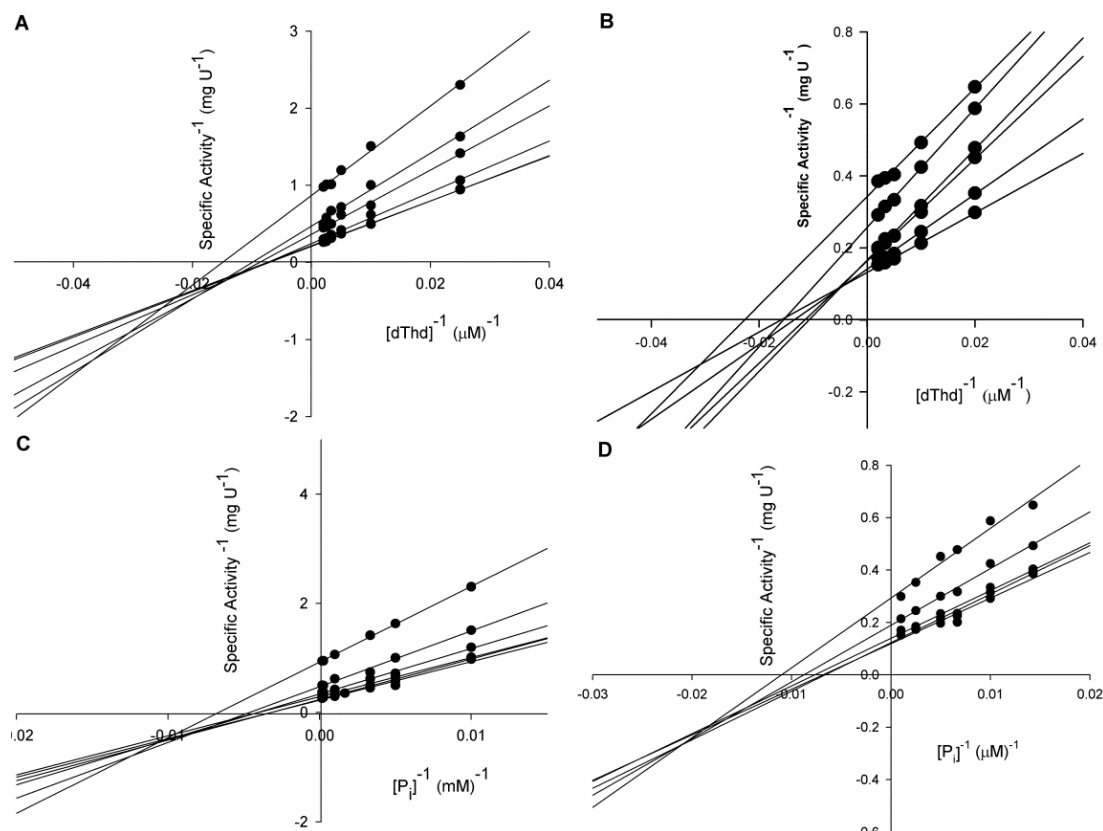


Tabela 5 - Constantes cinéticas verdadeiras para os substratos dThd e P_i .

	K_{Timidina} (μM)	K_{Fosfato} (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{cat}/K_{\text{Timidina}}$ ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	$k_{cat}/K_{\text{Fosfato}}$ ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
Precursor	144 ± 8	223 ± 9	$4,2 \pm 0,1$	$2,90 (\pm 0,10) \times 10^4$	$1,90 (\pm 0,05) \times 10^4$
Proteína madura	66 ± 5	107 ± 7	$7,2 \pm 0,2$	$1,09 (\pm 0,06) \times 10^5$	$6,70 (\pm 0,30) \times 10^4$

O padrão de intersecção das retas determinado para as hTP é similar ao observado na TP purificada de fígado de rato (25), *E. coli* (26), *S. typhimurium* (41), *Lactobacillus casei* (96) e UP humana (91). O mecanismo sequencial sugerido indica que a catálise enzimática ocorre somente quando os dois substratos encontram-se nos sítios ativo da enzima. Além disso, os mecanismos cinéticos ping-pong e ordenado de rápido equilíbrio foram excluídos, uma vez que esses mecanismos

apresentam um padrão de retas paralelas e retas que se cruzam no eixo y , respectivamente (89).

A observação da ocorrência de inibição pelo substrato permite uma melhor elucidação do mecanismo cinético. Inibição pelo substrato pode ser observada em mecanismos cinéticos ping-pong e ordenado em estado estacionário. Inibição pelo substrato também pode ser observada em mecanismos sequenciais aleatórios, quando um substrato apresenta afinidade pelo sítio de ligação do outro (72, 89). De acordo com os resultados obtidos, o mecanismo cinético ping-pong foi excluído (**Figura 15**). O padrão de intersecção das retas (**Figuras 15A e 15B**) pode sugerir que a hTP segue um mecanismo ordenado em estado estacionário, o qual apresenta inibição pelo substrato incompetitiva (72, 89). Entretanto, se a hTP apresentasse esse mecanismo, o padrão de intersecção das retas para dThd em concentrações fixas e variáveis de P_i apresentaria um perfil não linear. Esse padrão, no entanto, não foi observado para dThd (**Figuras 15A e 15B**).

Inibição pelo substrato não competitiva pode ser observada em mecanismos onde o substrato inibidor liga-se em outro sítio, um sítio efetor, resultando em uma enzima inativa (88). Inibição pelo substrato timina do tipo não competitiva já foi demonstrada para TP purificada de fígado de rato. O mecanismo de inibição não competitiva sugeriu que a ligação da timina em um sítio efetor inibiu a formação do produto, e um mecanismo cinético bi-bi aleatório de rápido equilíbrio foi proposto (25). Além disso, o inibidor derivado de purina 5'-O-tritilinosina (KIN59) apresentou inibição não competitiva nas enzimas TP humana e de *E.coli*, indicando que o KIN59 não compete pelo sítio ativo da dThd nem do P_i (97). Esses resultados evidenciam a existência de um sítio alostérico na hTP, diferente dos sítios de ligação dos substratos.

6.7 ITC

Os ensaios de ligação foram realizados com duas finalidades: primeiramente para determinar o mecanismo cinético das enzimas hTP, avaliando se ocorre ou não ordem de ligação dos substratos e de liberação dos produtos, e também, para determinar os parâmetros termodinâmicos resultantes da formação do complexo binário. Os parâmetros termodinâmicos de ligação foram determinados medindo a quantidade de calor liberado ou consumido na formação do complexo binário, a

temperatura e pressão constantes. A medida do calor liberado forneceu uma estimativa do n entre o ligante e a macromolécula, do K_a e do ΔH° da ligação.

Através desses valores, foi possível calcular o ΔS° e o ΔG° de acordo com a Eq. 7 e o K_d de acordo com a Eq. 8. O modelo *one binding site* foi aplicado em todos os ensaios de ligação, indicando que os substratos e produtos ligam-se com a mesma afinidade nos sítios ativos da hTP. Os parâmetros de ligação dos substratos e dos produtos estão listados na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros de ligação dos substratos e produtos na formação o complexo binário^a.

hTP madura						
Ligantes	n	K_a (M^{-1})	ΔH° (Kcal mol ⁻¹)	ΔS° (cal mol ⁻¹ deg ⁻¹)	ΔG° (Kcal mol ⁻¹)	K_d (μM)
dThd	0.2	2.1 (± 0.4) $\times 10^4$	- 1.2 \pm 0.5	- 20.4 \pm 8.8	- 6.1 \pm 2.6	47 \pm 9
P _i	0.93	7.0 (± 1.6) $\times 10^3$	- 3.3 \pm 1.1	7.0 \pm 2.3	- 5.5 \pm 1.8	142 \pm 32
Timina	1	6.4 (± 0.6) $\times 10^3$	- 7.1 \pm 0.3	- 5.4 \pm 0.5	- 5.4 \pm 0.5	155 \pm 9
2dR1P	1	4.4 (± 1.0) $\times 10^4$	- 4.0 \pm 0.2	8.2 \pm 1.9	- 6.6 \pm 1.6	23 \pm 5
Precursor da hTP						
Ligantes	n	K_a (M^{-1})	ΔH° (Kcal mol ⁻¹)	ΔS° (cal mol ⁻¹ deg ⁻¹)	ΔG° (Kcal mol ⁻¹)	K_d (μM)
P _i	1	3.8 (± 0.3) $\times 10^3$	- 6.3 \pm 0.2	- 3.8 \pm 0.3	- 5.1 \pm 0.3	261 \pm 18
Timina	1	6.4 (± 0.6) $\times 10^3$	- 10.2 \pm 0.4	- 15.6 \pm 1.5	- 5.4 \pm 0.5	155 \pm 15
2dR1P	1	1.1 (± 0.1) $\times 10^3$	- 29.6 \pm 2.5	- 81.4 \pm 10.6	- 4.3 \pm 0.6	909 \pm 118

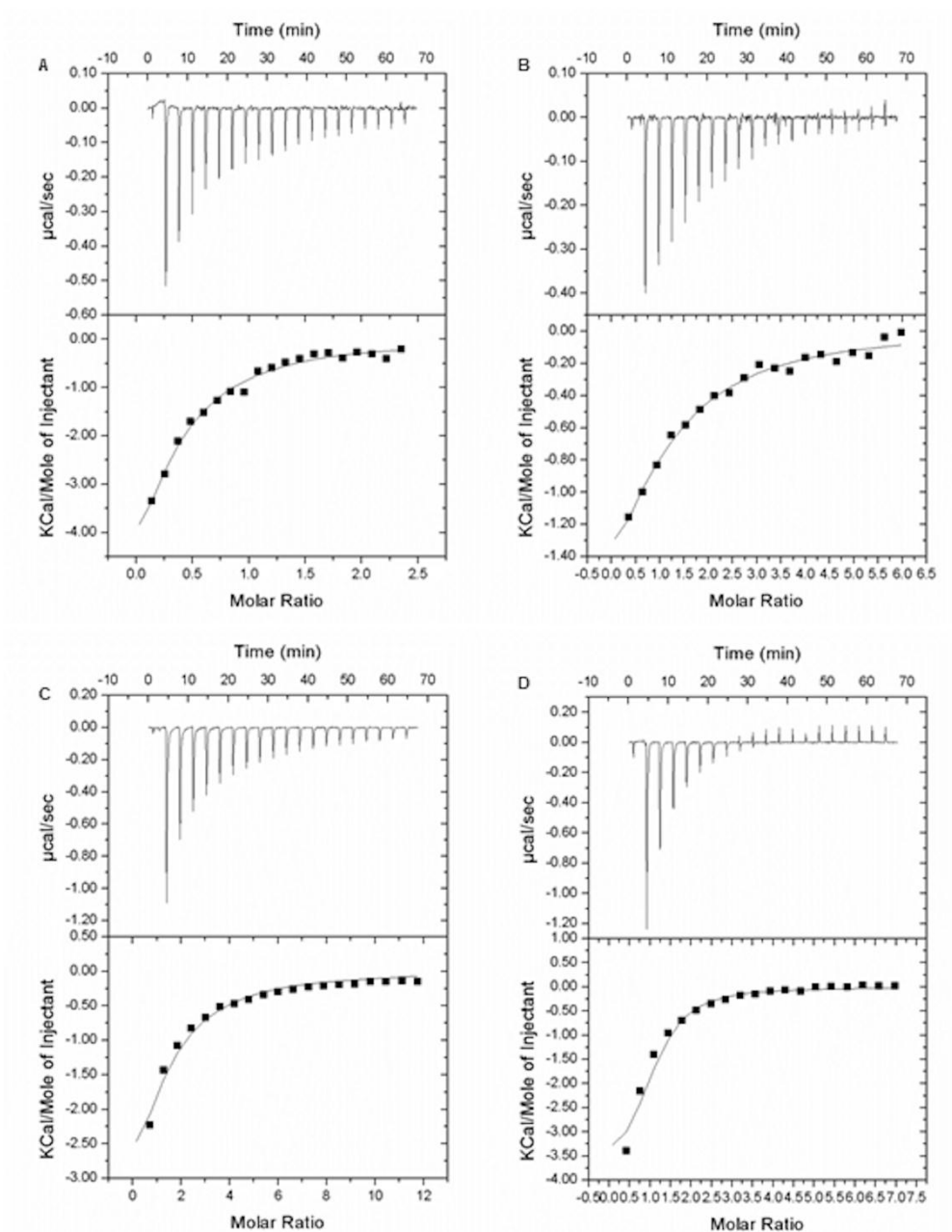
^a n = número de sítio ativo, K_a = constante de associação, ΔH° = entalpia de ligação, ΔS° = entropia de ligação, ΔG° = energia livre de Gibbs, K_d = constante de dissociação.

Os resultados dos ensaios de ligação para ambos os substrato (dThd e P_i) e para ambos os produtos (timina e 2dR1P) mostraram que ocorreu uma liberação de calor na formação dos complexos binários, indicando que ambos os substratos e os produtos ligam-se à enzima livre através de processos exotérmicos (**Figuras 16 e 17**).

O padrão de intersecção das retas (**Figura 15**) sugeriu um mecanismo cinético sequencial para hTP, no entanto se esse mecanismo é ordenado *steady-state* ou aleatório de rápido equilíbrio não pôde ser determinado. Através dos ensaios de ligação pode-se determinar que o mecanismo cinético da hTP não apresenta ordem de ligação dos substratos nem ordem de liberação dos produtos, visto que todos ligam-se à enzima livre. Os resultados sugerem que a reação catalisada pela enzima hTP apresenta um mecanismo cinético bi-bi aleatório de

rápido equilíbrio, no qual ambos os substratos ligam-se aleatoriamente à enzima livre formando um complexo ternário, capaz de realizar a catálise, e ambos os produtos dissociam-se aleatoriamente, regenerando a enzima livre (**Figura 18**).

Figura 16 - Curvas de ligação dos ligantes na hTP madura por ITC. (A) Titulação do substrato dThd. (B) Titulação do substrato P_i. (C) Titulação do produto timina. (D) Titulação do produto 2dR1P.



O mecanismo cinético aqui proposto para hTP é consistente com o mecanismo cinético proposto para TP purificada de fígado de rato (25), sendo esse um mecanismo cinético bi-bi aleatório de rápido equilíbrio. Diferentemente, o mecanismo cinético sequencial ordenado foi proposto para TP de *E. coli* (26) e *S. typhimurium* (41).

Figura 17 - Curvas de ligação dos ligantes no precursor da hTP por ITC. (A) Titulação do substrato dThd . (B) Titulação do substrato P_i. (C) Titulação do produto timina. (D) Titulação do produto 2dR1P.

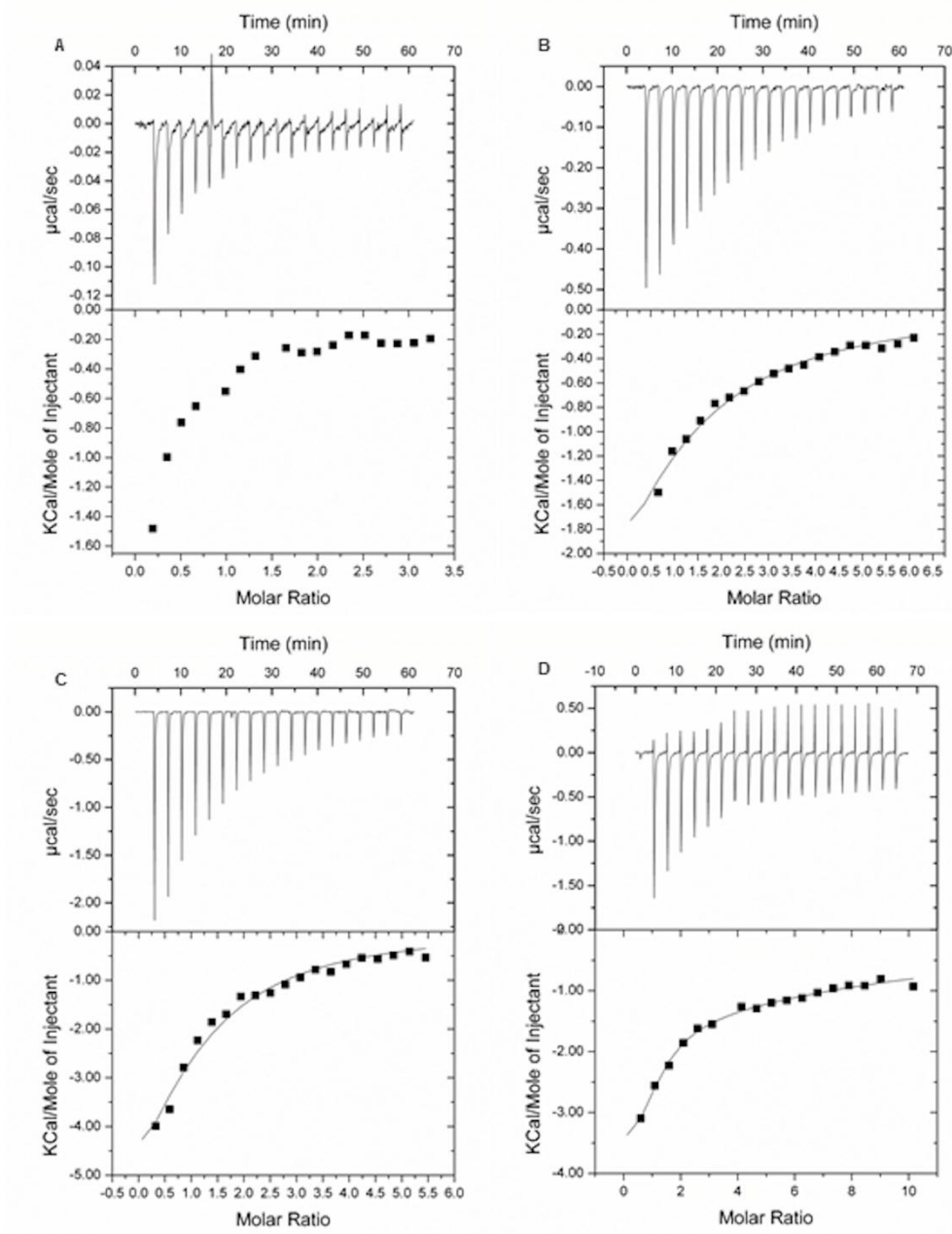
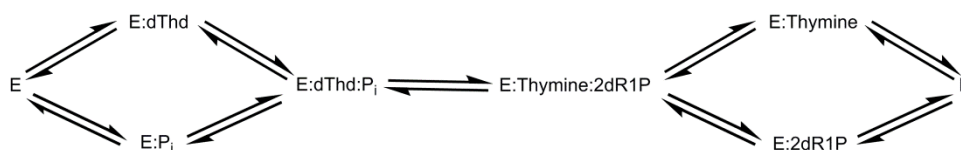


Figura 18 - Mecanismo cinético proposto para hTP.



Nota: A reação catalisada pela enzima hTP apresenta um mecanismo cinético bi-bi aleatório de rápido equilíbrio, no qual ambos os substratos ligam-se aleatoriamente à enzima livre formando um complexo ternário, capaz de realizar a catálise, e ambos os produtos dissociam-se aleatoriamente, regenerando a enzima livre.

Os parâmetros termodinâmicos revelaram os diferentes tipos de interações que ocorrem entre as subunidades da enzima e os ligantes. O valor negativo de ΔH° (entalpia favorável) sugere que ligações de hidrogênio e interações do tipo van der Waals favorecem a formação do complexo binário. O valor negativo de ΔS° (entropia desfavorável) implica em que ocorra uma mudança conformacional, na enzima ou no ligante, na formação do complexo binário, enquanto que um valor de ΔS° positivo (entropia favorável) indica que a formação do complexo binário é dominada por interações hidrofóbicas e expulsão de moléculas de água do sítio ativo (98).

A ligação do substrato dThd na hTP madura (**Figura 16A**) é um processo termodinamicamente favorável, indicado pelo valor negativo de ΔG° . A formação do complexo binário parece ser estabilizado por ligações de hidrogênio e interações van der Waals (ΔH° negativo); no entanto contribuições entrópicas desfavoráveis (ΔS° negativo) foram observadas, indicando que a formação do complexo binário parece estar associado a uma mudança conformacional. As possíveis interações sugeridas são consistentes com as estruturas cristalográficas da hTP em complexo com o análogo de substrato TPI e com o produto timina. Essas estruturas demonstraram que presença desses ligantes no sítio ativo da enzima (na ausência de qualquer outro ligante) foi suficiente para alterar a conformação estrutural da enzima de uma forma aberta para uma forma fechada, similar à conformação cataliticamente ativa da enzima (45, 46).

O modelo *one binding site* aplicado não resultou em um valor de estequiometria adequado para dThd ($n = 0,2$). No entanto, quando se titulou o substrato P_i na enzima livre, o modelo *one binding site* resultou em um valor de 0,93 para n , sugerindo que todos os sítios ativos da hTP foram ocupados pelo P_i . A ligação do substrato dThd no precursor da hTP apresentou uma liberação de calor

na formação do complexo binário (**Figura 17A**), no entanto, nenhum modelo de ligação disponível no software Origin 7 SR4 (Microcal, Inc.) pôde ser aplicado.

A ligação do substrato P_i em ambas as enzimas hTP (**Figuras 16B e 17B**) são processos termodinamicamente favoráveis (ΔG° negativo), estabilizados por ligações de hidrogênios e interações van der Waals (ΔH° negativo). As contribuições entrópicas para o precursor e para a proteína madura foram diferentes na formação dos complexos binários. Na formação do complexo binário hTP madura: P_i foram observadas contribuições entrópicas favoráveis (ΔS° positivo), associadas a ligações hidrofóbicas e expulsão de moléculas de água do sítio ativo. Diferentemente, na formação do complexo binário precursor da hTP: P_i foi observado contribuições entrópicas desfavoráveis (ΔS° negativo), associadas a uma mudança conformacional. As prováveis interações para estabilização do complexo binário são consistentes com estudos cristalográficos da TP de *E. coli*, sugerindo que poucos movimentos ocorrem após a ligação do fosfato no sítio ativo, principalmente uma ligação de hidrogênio entre a His119 e a Gly208, correspondendo a His150 e a Ala239 na hTP (47). A estequiometria da ligação (n) representada pelo valor de 0,93, obtido para a proteína madura e pelo n fixado em 1 para o precursor, sugere que uma molécula de P_i liga-se em cada subunidade da homodimérica hTP. O mesmo pode ser visto em análises estruturais, onde um sítio de ligação para o P_i no domínio α/β foi demonstrado em cada monômero da enzima (44).

A ligação do produto timina em ambas as enzimas hTP (**Figuras 16C e 17C**) apresentou parâmetros termodinâmicos semelhantes. A formação do complexo binário parece ser um processo termodinamicamente favorável indicado pelos valores negativos de ΔG° e ΔH° . Mais uma vez, observou-se que a ligação de uma molécula no sítio ativo das pirimidinas leva a uma mudança conformacional na enzima (ΔS° negativo).

A ligação do produto 2dR1P em ambas as enzimas hTP (**Figuras 16D e 17D**) apresentou parâmetros de ligação diferentes. A formação do complexo binário parece ser um processo termodinamicamente favorável, estabilizado por ligações de hidrogênio e interações van der Waals (ΔG° e ΔH° negativos). A formação do complexo binário hTP madura:2dR1P parece ser favorecido também por interações hidrofóbicas e expulsão de moléculas de água do sítio ativo (ΔS° positivo), enquanto que a formação do complexo binário precursor da hTP:2dR1P parece estar relacionado mais a uma alteração conformacional na enzima ou no ligante (ΔS°

negativo). O mesmo perfil de contribuições entrópicas foi observado para o substrato P_i , sendo contribuições favoráveis (ΔS° positivo) para formação do complexo binário proteína madura: P_i e contribuições desfavoráveis para a formação do complexo binário precursor: P_i (ΔS° negativo). Uma diferença bastante evidente foi observada nos valores dos K_d , sendo que o 2dR1P parece ter uma afinidade maior pela enzima madura, visto que o valor do K_d é aproximadamente 40 vezes menor em relação ao valor do K_d para precursor.

Os resultados obtidos nos ensaios de ligação demonstraram que as interações entre os substratos/produtos e as enzimas hTP são coordenados por eventos moleculares diferentes observados nos parâmetros termodinâmicos. As interações proteína:ligante são processos termodinamicamente favoráveis, no entanto apresentam mecanismos de ligação diferentes na formação dos complexos binários, refletidos nos tipos de interações não covalentes e nas mudanças conformacionais ocorridas. Análises estruturais de ambas as enzimas em complexo com os substratos e produtos naturais poderiam fornecer uma melhor compreensão dos resultados obtidos através de ITC.

6.8 Estudos de perfil de pH

A influência do pH nos parâmetros cinéticos, k_{cat} e k_{cat}/K_M , foi realizada a fim de avaliar a catálise ácido-base das enzimas hTP, assim como a dependência do pH na ligação aos substratos dThd e P_i . O estudo do perfil de pH forneceu as constantes de dissociação aparentes ácido-base para grupamentos ionizáveis (K_a e K_b). Através desses valores obtêve-se os valores dos pKs aparentes de grupamentos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos envolvidos na catálise enzimática e na ligação aos substratos. A faixa de pH onde as enzimas hTP apresentaram atividade foi entre 5,5 – 9,0. Os dados obtidos em pH 5,5 não foram incluídos na análise do k_{cat}/K_M do P_i devido à curva de saturação ter apresentado um perfil sigmoidal e, por conseguinte, não fornecer o K_M para poder ser incluído na análise de dados.

O perfil de pH para o k_{cat} (**Figuras 19A e 19B**) demonstrou que ambas as enzimas possuem atividade catalítica maior em pHs baixos, no entanto a afinidade pelos substratos diminuiu tanto em pHs baixos quanto em pHs elevados (**Figuras 19C – 19F**). A influência do pH no k_{cat} (**Figuras 19A e 19B**) não pode ser analisada

de acordo com a equação *bell-shaped* para perfil de pH, nem de acordo com outras equações usualmente utilizadas em análises de perfil de pH (72). O perfil de pH para o k_{cat} sugere uma porção linear com inclinação -1 entre os valores de pH baixos e elevados, o qual pode ser, respectivamente, a atividade enzimática máxima e a atividade enzimática parcial (dois pK_s aparentes). No entanto, os dados obtidos (**Figuras 19A e 19B**) não permitem estimar valores de pK_s confiáveis. De qualquer forma, os resultados sugerem que a catálise enzimática é favorecida pela protonação de um resíduo de aminoácido e que sua desprotonação prejudica a ocorrência da catálise. Estudos demonstraram que a His116 apresenta uma função importante na catálise, tanto na estabilização do estado de transição durante a catálise quanto doando um próton ao N-1 do anel pirimídico, para que ocorra a fosforólise da dThd (45). A His116 é protonada através de um mecanismo de transferência de prótons, pela tríade formada pelos aminoácidos Asp114, Glu225 e a Lys222 (45). Adicionalmente, estudos de mutagênese sítio-dirigida revelaram que a His116 é essencial para atividade catalítica, onde foi demonstrado que a substituição deste resíduo por uma fenilalanina ou por uma lisina aboliu completamente a atividade enzimática (48). Semelhante aos resultados obtidos para hTP, já foi demonstrado que a TP de micro-organismos *E. coli* e *Lactobacillus casei* também possuem atividade máxima em pH baixo (pH 6,0) (26, 96). Embora os resultados obtidos não forneçam nenhum valor de pK_a para k_{cat} , eles indicam que a atividade máxima da hTP ocorre em pH baixo.

A influência do pH na ligação aos substratos apresentou um padrão de curva *bell-shaped* com inclinação +1 para o lado ácido e -1 para o lado básico, indicando a participação de um grupo ionizável em cada lado (**Figuras 19C – 19F**). Os dados da curva *bell-shaped* para o $k_{cat}/K_{timidina}$ foram aplicados na Eq. 7, gerando valores de pK_a aparente de 5,1 e 5,2 e valores de pK_b aparente de 9,2 e 9,0 para o precursor e proteína madura, respectivamente (**Figuras 19C e 19D**). Os resultados sugerem que a protonação da cadeia lateral de um aminoácido com valor de pK_a aparente de 5,1 e 5,2 e a desprotonação da cadeia lateral de um aminoácido com valor de pK_b aparente de 9,2 e 9,0 prejudicam a ligação do substrato dThd. As estruturas cristalográficas da enzima hTP complexada com o produto da reação timina (PDB 2J0F), com o substrato 5-iodouracil (PDB 2WK6) e com o potente inibidor TPI (PDB 1UOU), demonstraram que a cadeia lateral da His116 está envolvida no sítio de ligação pirimídico, que por sua vez, é o sítio de ligação da

timidina (45, 46, 48). A His116 pertence ao domínio α/β da hTP, no qual está localizado o sítio de ligação do P_i , e ligações de hidrogênios são feitas entre TPI/timina/5-iodouracil e os resíduos. A ligação da timina é similar à do 5-clorouracil do TPI, na qual o grupo metil da timina foi substituído pelo cloro. A His116 interage diretamente com o 5-clorouracil através do grupamento $\epsilon 2$ (N-3). Neste contexto, sugere-se que a cadeia lateral da His116 parece ser o provável grupo ionizável candidato ao valor de pK_a de 5,1 e 5,2 e este deve estar desprotonado para que ocorra a ligação ao substrato dThd.

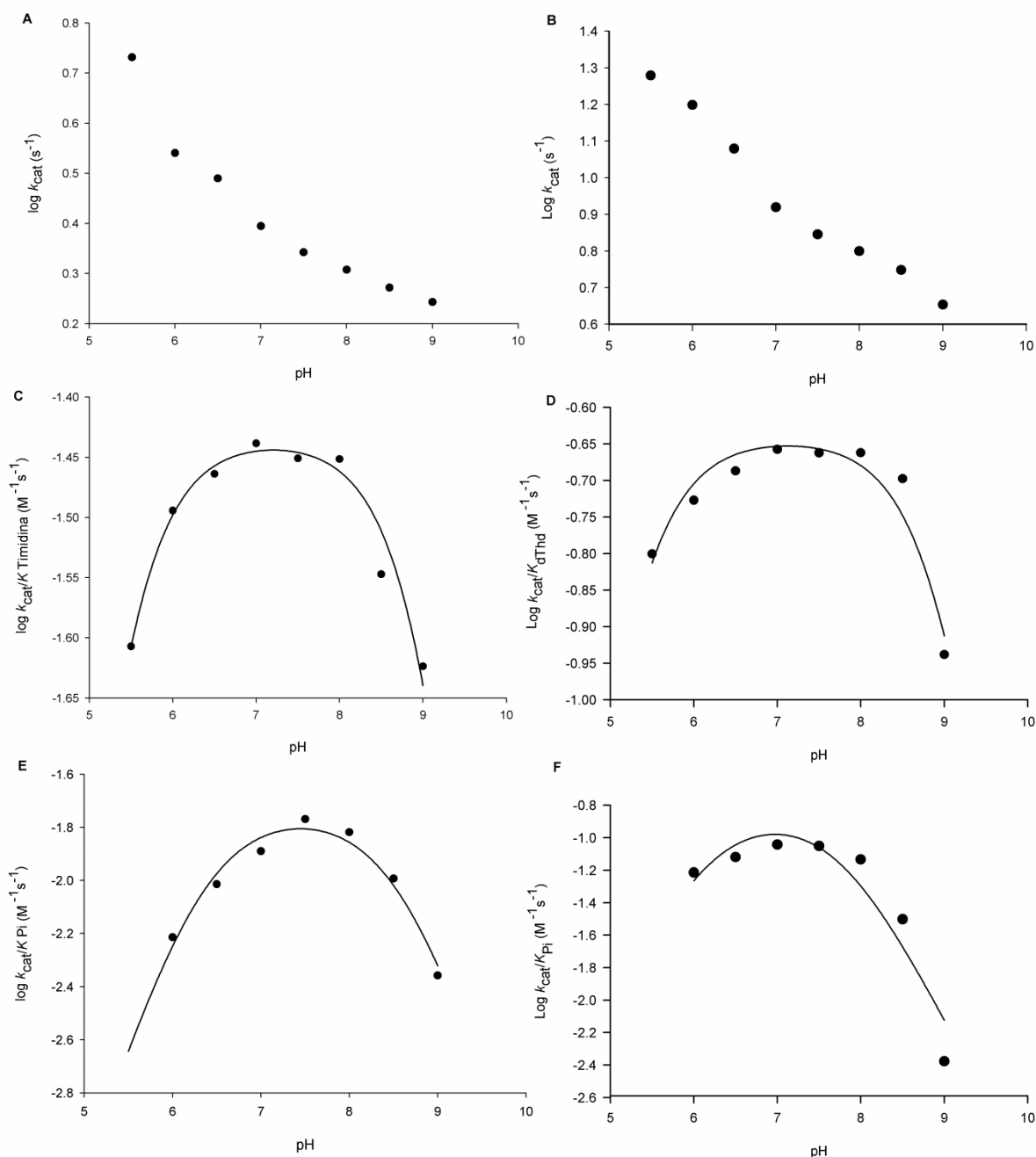
As estruturas cristalográficas da hTP também demonstraram que a cadeia lateral da Lys221 interage diretamente com TPI/timina/5-iodouracil através de ligações de hidrogênio (45, 46, 48). Diferentemente da His116, a Lys221 pertence ao domínio α , no qual o sítio de ligação pirimídico está localizado, assim como os outros resíduos que estão envolvidos na ligação de TPI/timina/5-iodouracil. A cadeia lateral da Lys221 parece ser o provável grupo ionizável candidato ao valor de pK_b de 9,2 e 9,0 e este deve estar protonado para que ocorra interação com a dThd.

Os dados da curva *bell-shaped* para o $k_{cat}/K_{fosfato}$ foram aplicados na **Eq. 7** resultando os valores de pK_a aparente de 6,2 e 6,1 e valores de pK_b aparente de 8,6 e 7,8 para o precursor e proteína madura, respectivamente (**Figuras 19E e 19F**). Os resultados indicam que a protonação de um grupo ionizável com um valor de pK_a de 6,2 e 6,1 e a desprotonação de um grupo ionizável com um valor de pK_b de 8,6 e 7,8 prejudicam a ligação do substrato P_i . De acordo com a estrutura cristalográfica da enzima PyNP de *Bacillus stearothermophilus* (PDB 1BRW), os aminoácidos Lys81, Ser83, Lys108, Ser110 e Thr120 são resíduos importantes na ligação ao P_i (47). As enzimas PyNP de *B. stearothermophilus* e a hTP apresentam 40 % de identidade (47) e através da análise das estruturas primárias verificou-se que todos os resíduos são conservados com exceção da Lys108, a qual corresponde à Met142 na hTP. A Lys81 correspondente à Lys115 na hTP é o provável resíduo de aminoácido candidato ao valor de pK_b de 7,8 – 8,6 e este deve estar protonado para que ocorra a ligação ao P_i . A importância da Lys115 na ligação desse substrato já foi demonstrada através de experimentos de mutagênese sítio-dirigida, onde a substituição da Lys115 pelo glutamato completamente aboliu a atividade enzimática (50).

A curva *bell-shaped* para o $k_{cat}/K_{fosfato}$ indicou também a participação de um grupo ionizável com valor de pK_a de 6,2 e 6,1. De acordo com as análises

estruturais, os demais resíduos de aminoácidos que interagem com esse substrato não apresentam cadeias laterais ionizáveis e, desta forma, o valor de pK_a de 6,2 e 6,1 parece ser atribuído ao grupo ionizável do substrato P_i .

Figura 19 - Parâmetros cinéticos dependentes do pH para o precursor da hTP e proteína madura em função do $\log k_{cat}$ (A – B); do $\log k_{cat}/K_{timidina}$ (C – D); do $\log k_{cat}/K_{fosfato}$ (E – F).



6.9 Modelagem molecular

A técnica I-Tasser foi utilizada para predição das estruturas do precursor e da hTP madura uma vez que todas as estruturas cristalográficas determinadas (PDB: 2WK5, 2WK6, 1UOU e 2J0) apresentam a ausência do domínio *N*-terminal, mais precisamente dos primeiros 40 resíduos de aminoácidos. Alguns autores propõem que a ausência de uma densidade eletrônica na região inicial *N*-terminal da hTP inviabilizou a resolução estrutural através da técnica de raios X (45). O k_{cat} da hTP madura, como pôde ser observado através dos estudos de cinética enzimática, é aproximadamente duas vezes maior em relação ao precursor. Do mesmo modo, os outros parâmetros cinéticos analisados (K_M ; k_{cat}/K_M), também demonstraram diferenças relevantes entre as enzimas hTP (ver **Tabela 5**). No intuito de entender melhor quais os aspectos estruturais que poderiam estar relacionados às diferenças catalíticas, optou-se por ferramentas de modelagem molecular conforme foi previamente descrito na metodologia.

A sequência primária do precursor da hTP (**Figura 20**) foi submetida ao I-Tasser web Server retornando os cinco modelos com a melhor qualidade estereoquímica e baseado nas funções de energia do programa I-Tasser. O melhor modelo obtido é mostrado na **Figura 21**, sendo que o domínio *N*-terminal está representado em amarelo e vermelho. A região em vermelho representa os dez aminoácidos iniciais existentes somente no precursor.

Através da modelagem molecular do domínio *N*-terminal do precursor da hTP ficou evidenciado uma hipótese para as diferenças observadas nos ensaios cinéticos. O modelo sugere que os dez primeiros resíduos de aminoácidos existentes somente no precursor formam uma pequena alfa hélice na entrada do sítio ativo da enzima e que, por sua vez, podem atuar dificultando a ligação ao substrato e/ou a fosforólise da dThd. Os resultados sugerem que a clivagem proteolítica desses resíduos pode estar relacionada ao aumento da atividade catalítica da enzima.

Figura 20 - Alinhamento da sequência primária das enzimas hTP, precursor e madura, realizada com o programa ClustalW.

```

          10      20      30      40      50      60
hTP_precursora MAALMTPGTGAPPAPGDFSGEGSQGLEDPSPPEPKQLPELIRMKRDGGRLEADIRGFVAA
hTP_madura     -----APPAPGDFSGEGSQGLEDPSPPEPKQLPELIRMKRDGGRLEADIRGFVAA
                *****

          70      80      90      100     110     120
hTP_precursora VVNGSAQGAQIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLTQALAQSGQOLEWPEAWRQQLVDKHSSTGG
hTP_madura     VVNGSAQGAQIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLTQALAQSGQOLEWPEAWRQQLVDKHSSTGG
                *****

          130     140     150     160     170     180
hTP_precursora VGDKVSIVLAPALAAACGCKVPMISGRGLGHTGGTLDKLESIPGFNVIQSP EQMQVLLDQA
hTP_madura     VGDKVSIVLAPALAAACGCKVPMISGRGLGHTGGTLDKLESIPGFNVIQSP EQMQVLLDQA
                *****

          190     200     210     220     230     240
hTP_precursora GCCIVGQSEQLVPADGILYAARDVTATVDSLPLITASILSKKLVEGLSALVVDVKFGGAA
hTP_madura     GCCIVGQSEQLVPADGILYAARDVTATVDSLPLITASILSKKLVEGLSALVVDVKFGGAA
                *****

          250     260     270     280     290     300
hTP_precursora VFPNQEQARELAKTLVGVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRVCVGHAEVEEALLCMDGAGPP
hTP_madura     VFPNQEQARELAKTLVGVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRVCVGHAEVEEALLCMDGAGPP
                *****

          310     320     330     340     350     360
hTP_precursora DLRDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALGRFERMLAAQGVDPGLARAL
hTP_madura     DLRDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALGRFERMLAAQGVDPGLARAL
                *****

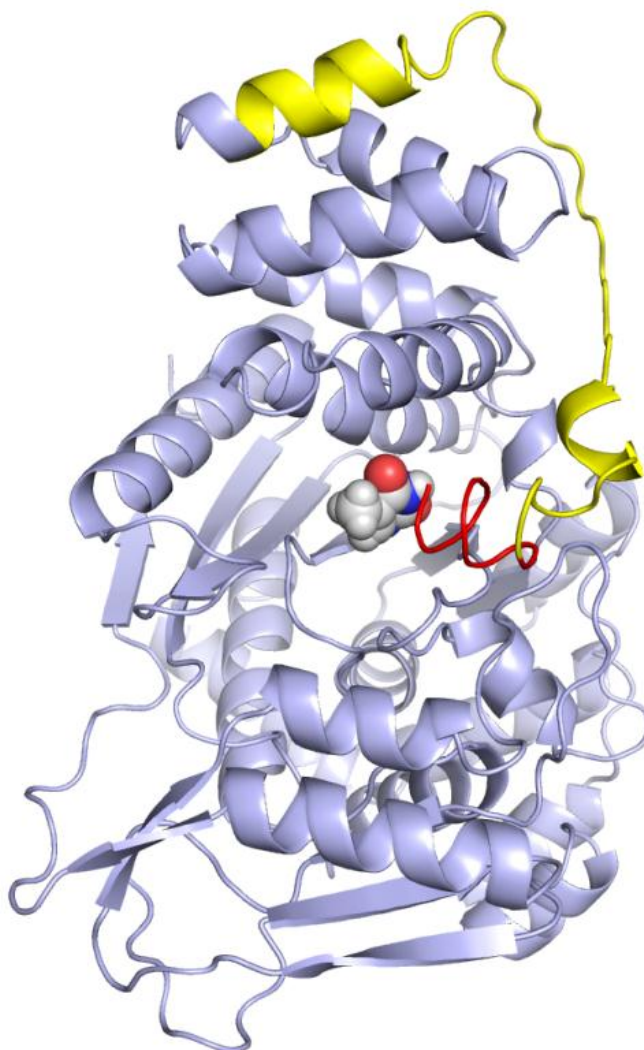
          370     380     390     400     410     420
hTP_precursora CSGSPAERRQLLPRAREQEELLAPADGTVELVRLPLALVVLHELGAGRSRAGEPLRLGVG
hTP_madura     CSGSPAERRQLLPRAREQEELLAPADGTVELVRLPLALVVLHELGAGRSRAGEPLRLGVG
                *****

          430     440     450     460     470     480
hTP_precursora AELLVDVGQRLRRGTPWLRVHRDGPALSGPQSRAEQEALVLSDRAPFAAPSPFAEVLVLP
hTP_madura     AELLVDVGQRLRRGTPWLRVHRDGPALSGPQSRAEQEALVLSDRAPFAAPSPFAEVLVLP
                *****

hTP_precursora ..
hTP_madura     QQ
                **

```

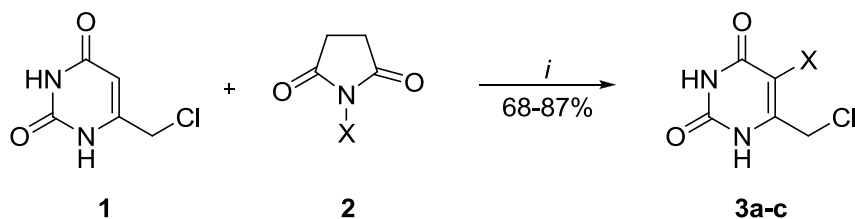
Figura 21 - Modelo do precursor da enzima hTP em associação com a timina. A enzima esta representada no modelo de cartoon e a timina no modelo de esferas. Em amarelo e vermelho esta identificado o domínio *N*-terminal da enzima.



6.10 Síntese dos compostos planejados

Os compostos químicos foram sintetizados em duas etapas a partir do 6-(clorometil)pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona (**1**). A primeira etapa foi realizada a partir da reação do composto **1** com as respectivas *N*-halosuccinimidas **2** na presença de água como solvente (**Esquema 1**). Os produtos halogenados **3a-c** foram obtidos com 68-87 % de rendimento.

Esquema 1

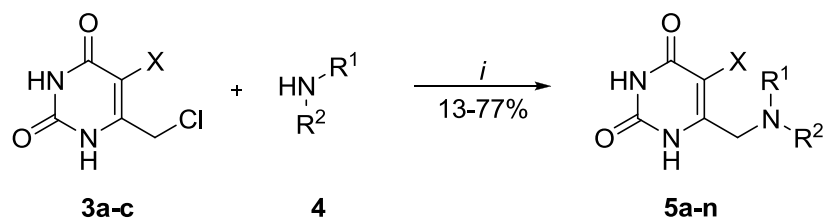


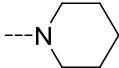
Entrada	X	Rendimento (%)
3a	Cl	71
3b	Br	68
3c	I	87

Reagentes e condições: *i* = H₂O, 25-100 °C, 1 h.

A segunda etapa foi realizada a partir da substituição nucleofílica dos compostos **3a-c** utilizando amino álcoois ou aminas secundárias (**4**). Os produtos **5a-n** foram obtidos em tempos de reação que variaram entre 6-20 h com rendimentos dos produtos purificados variando entre 13-77 %. As reações foram conduzidas por aquecimento térmico convencional e utilizaram água como solvente (**Esquema 2**). Todos os compostos apresentaram espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H (RMN ¹H), espectroscopia no infravermelho (FTIR) e espectrometria de massas de alta resolução (ESI-FTMS) condizentes com as estruturas propostas (**Anexo H**). No **Anexo H**, encontram-se exemplificados os dados espectroscópicos e espectrométricos para os compostos **3c** e **5g**.

Esquema 2



Entrada	X	R ¹	R ²	Rendimento (%)
5a	Cl	H	CH ₂ CH ₂ OH	13
5b	Cl	H	CH(CH ₂ OH)CH ₂ OH	33
5c	Br	H	CH ₂ CH ₂ OH	32
5d	Br	H	CH(CH ₂ OH)CH ₂ OH	23
5e	Br	H	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	20
5f	I	H	CH ₂ CH ₂ OH	21
5g	I	H	CH(CH ₂ OH)CH ₂ OH	75
5h	I	H	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	26
5i	I	Me	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	42
5j	I	Me	Me	75
5k	I	Pr	Pr	27
5l	I		CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₂	21
5m	I		CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂	71
5n	I	H		77

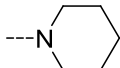
Reagentes e condições: *i* = H₂O, 25-50 °C, 6-20 h.

6.11 Determinação da IC₅₀ dos compostos sintetizados

Após verificar que nenhum dos compostos químicos sintetizados como possíveis inibidores das enzimas hTP recombinantes apresentou um efeito inibitório dependente do tempo, a determinação da IC₅₀ foi realizada afim de avaliar o

potencial inibitório dos compostos sobre as enzimas em estudo. A atividade inibitória dos compostos foi avaliada em ambas as proteínas recombinantes, uma vez que ambas as formas proteicas podem ser alvos terapêuticos importantes. Os resultados de IC_{50} foram calculados com base na **Eq. 8** e os valores obtidos estão apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Valor de IC_{50} dos compostos para o precursor da hTP e proteína madura.

Composto	X	R ¹	R ²	IC ₅₀ (μM)	
				Precursor	Madura
5a	Cl	H	CH ₂ CH ₂ OH	33 ± 6	39 ± 5
5b	Cl	H	CH(CH ₂ OH)CH ₂ OH	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,2
5c	Br	H	CH ₂ CH ₂ OH	26 ± 4	24 ± 2
5d	Br	H	CH(CH ₂ OH)CH ₂ OH	0,32 ± 0,04	NT
5e	Br	H	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	>100	>100
5f	I	H	CH ₂ CH ₂ OH	2,1 ± 0,3	1,2 ± 0,1
5g	I	H	CH(CH ₂ OH)CH ₂ OH	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,01
5h	I	H	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	89 ± 2	40 ± 7
5i	I	Me	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	56 ± 12	36 ± 7
5j	I	Me	Me	8,3 ± 0,4	8,4 ± 0,5
5k	I	Pr	Pr	>100	>100
5l	I		CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₂	30 ± 4	28 ± 5
5m	I		CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂	129 ± 20	87 ± 12
5n	I	H		33 ± 5	34 ± 4

NT: Composto químico não testado.

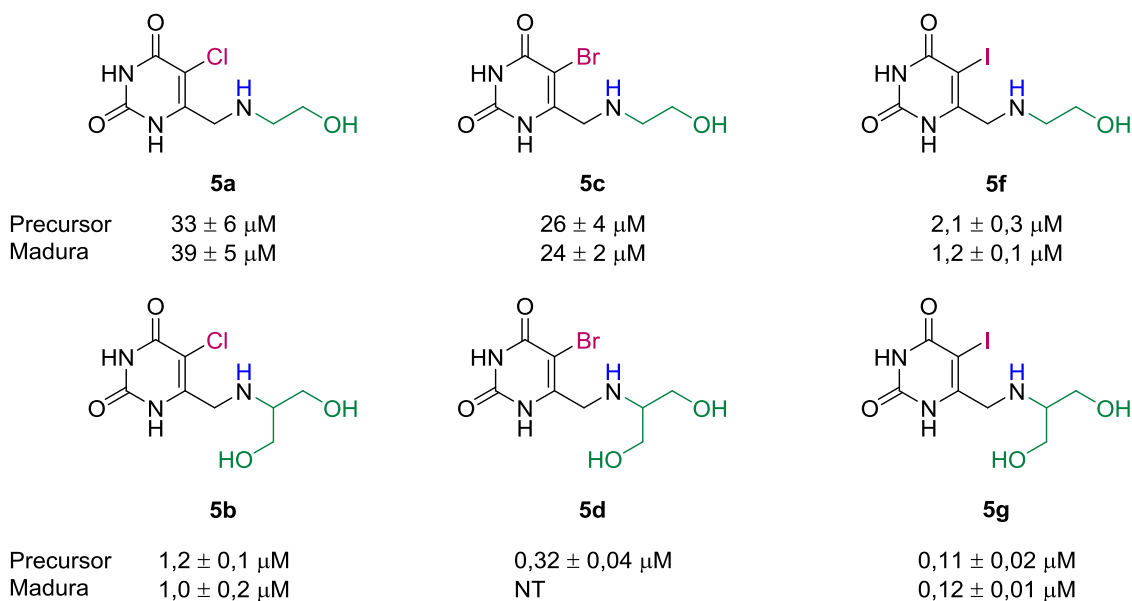
Os possíveis compostos inibidores apresentaram valores de IC_{50} que variaram entre uma faixa de 0,11 μM a 129 μM para o precursor e entre uma faixa de 0,12 μM a 87 μM para a proteína madura. Os valores de IC_{50} dos compostos **5a**, **5b**, **5d**, **5g**, **5j** e **5l** foram semelhantes para as duas enzimas enquanto que os compostos **5f**, **5h** e **5i** apresentaram valores de IC_{50} distintos. Esses compostos parecem apresentar uma maior afinidade pela enzima madura, o que pode estar relacionado às suas diferenças estruturais, visto que essas proteínas diferem na região *N*-terminal. Os compostos **5e** e **5k** não apresentaram nenhuma atividade

inibitória sobre as enzimas quando testados em concentrações finais de 100 μM . Os resultados mostraram que dentre os 14 compostos químicos sintetizados, o composto **5g** apresentou o melhor potencial inibitório com um valor de IC_{50} que variou entre 0,11 – 0,12 μM . Notavelmente, os compostos **5b**, **5d** e **5f** também apresentaram uma ação inibitória importante sobre as enzimas, com um valor de IC_{50} de 1,2 – 1,0 μM , 0,320 μM e 2,1 – 1,2 μM , respectivamente.

A atividade inibitória dos compostos químicos variou amplamente de acordo com os diferentes substituintes na posição 5 do anel heterocíclico uracil e dos substituintes R^1 e R^2 . Dentre os dois compostos que possuem o Cl como substituinte halogenado na posição 5 do anel uracil (substituinte X), o composto **5b** apresentou um efeito inibitório 32 vezes maior em relação ao composto **5a**. Esse maior efeito inibitório também pode ser observado nos compostos que possuem Br como substituinte halogenado. O composto **5d** apresentou uma ação inibitória 81 vezes maior em relação ao composto **5c**. Isso denota a importância da inserção de uma segunda hidroxila na cadeia lateral dos compostos **5** uma vez que os derivados da etanolamina (**5a**, **5c** e **5f**) foram menos efetivos como inibidores da hTP que os compostos derivados do 2-aminopropano-1,3-diol (**5b**, **5d** e **5g**) (**Figura 22**). Essa segunda hidroxila pode formar um novo par doador-aceptor de ligações de hidrogênio, estabilizando mais eficientemente o complexo enzima:inibidor.

O maior efeito inibitório foi observado nos compostos que apresentam um átomo de I na posição 5 do anel heterocíclico (**Figura 22**). É interessante ressaltar que há um aumento do volume molecular a partir do átomo de Cl, passando pelo Br até o I. Esse maior volume molecular pode estar relacionado com a melhor efetividade da ação inibitória. Além disso, o átomo de I apresenta o maior sigma-hole, dentre os halogênios testados (79). Assim, os compostos contendo esse átomo podem realizar as interações por ligações de halogênios de forma mais efetiva. Novamente, a substituição usando um derivado do 2-aminopropano-1,3-diol (**5g**) conduziu ao composto de maior efeito inibitório sobre a hTP.

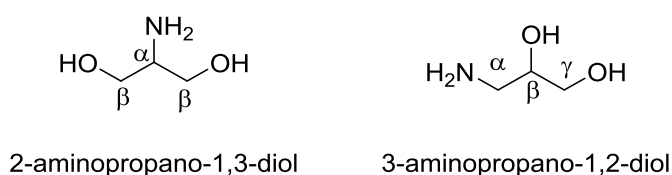
Figura 22 - Estruturas dos compostos **5a-5d**, **5f-5g** e seus valores de IC₅₀ para a forma precursora e madura da hTP.



O composto **5g** apresentou um efeito inibitório de 10-19 vezes maior em relação ao composto **5f** (derivado da etanolamina). Em contrapartida, a presença do substituinte 3-aminopropano-1,2-diol em R² diminuiu consideravelmente a atividade inibitória conduzindo ao composto **5h** que apresentou IC₅₀ de 89 ± 2 e 40 ± 7 μM para as formas precursora e madura da hTP, respectivamente (**Tabela 7**). Um resultado interessante foi apresentado pelo composto **5e** que não apresentou atividade inibitória sobre a hTP em uma concentração de 100 μM.

Comparado aos compostos **5d** e **5g** essa modificação estrutural, posicionando a hidroxila da posição β para posição γ em relação ao nitrogênio, (**Figura 23**) reduziu a capacidade de inibição em mais de 300-800 vezes para a forma precursora e em mais de 300 vezes para a forma madura da proteína. A presença do substituinte 2-aminopropano-1,3-diol nos compostos **5b**, **5d** e **5g** conduziu aos compostos de maior atividade inibitória sobre a hTP (**Figura 22**).

Figura 23 - Estruturas das aminas 2-aminopropano-1,3-diol e 3-aminopropano-1,2-diol e suas diferenças estruturais.



Com o objetivo de aumentar o espaço estrutural da série de compostos estudada, sintetizou-se os derivados **5i-5n** contendo grupamentos alquílicos cíclicos e acíclicos em R². Nesses compostos, o átomo de I foi mantido na posição 5 do anel heterocíclico já que este desempenhou a melhor ação quando presente nos inibidores testados. Nenhum dos compostos testados obteve uma melhor efetividade como inibidor da reação catalisada pela enzima hTP que o composto **5g** (Tabela 7). Cabe destacar, o aparente efeito estérico exercido pelo composto **5k** quando comparado a seu congêneres **5j**. A mudança de um substituinte dimetilico para um dipropílico praticamente aboliu a efetividade inibitória uma vez que o composto **5k** não exerceu ação quando testado em uma concentração de 100 µM enquanto que o **5j** inibiu a atividade enzimática com IC₅₀ de 8,3 ± 0,4 e 8,4 ± 0,5 µM para a forma precursora e madura, respectivamente.

Os resultados aqui apresentados, preliminarmente, sugerem o composto **5g** como um possível candidato ao desenvolvimento de um novo fármaco tendo a enzima hTP como alvo molecular. É importante salientar que tanto o precursor quanto a proteína madura podem ser alvos terapêuticos para o tratamento do câncer e que o composto **5g** apresentou ação inibitória sobre ambas as formas.

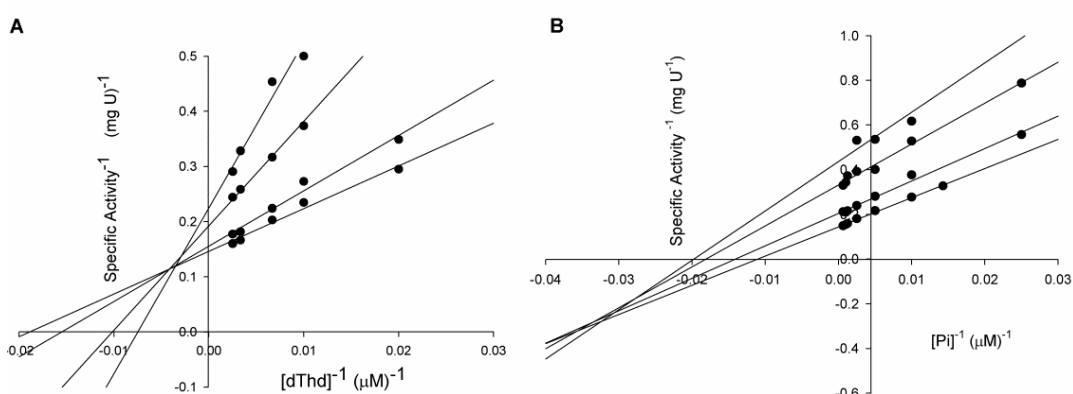
6.12 Determinação do K_i

As comparações das afinidades de diferentes inibidores para uma mesma enzima podem ser determinadas através do K_i ou do ΔG da ligação enzima:inibidor (82). A determinação do K_i foi realizada para avaliar as constantes inibitórias e o mecanismo cinético de inibição sobre a hTP. O valor de K_i foi determinado para o composto **5g** (IC₅₀ = 0,12 ± 0,10 µM) utilizando a enzima hTP madura recombinante.

O padrão de intersecção das retas resultante à esquerda do eixo y e acima do eixo x, quando se variou o substrato dThd (Figura 24A), indicou um tipo de inibição não competitiva, onde α > 1. O padrão de intersecção das retas exclui os mecanismos de inibição competitiva e incompetitiva, uma vez que esses mecanismos apresentam um padrão de retas que se cruzam no eixo y e retas paralelas, respectivamente. Um inibidor não competitivo liga-se tanto à enzima livre quanto ao complexo enzima:substrato (ES) e, dessa forma, a afinidade da ligação é definida através de duas constantes de dissociação; a constante de dissociação do

complexo binário enzima:inibidor EI (K_i) e a constante de dissociação do complexo ternário ESI (K_{is}). A constante α , por sua vez, define o grau em que a ligação do inibidor afeta a afinidade da enzima pelo substrato. Quando $\alpha > 1$, o inibidor liga-se preferencialmente à enzima livre, quando $\alpha = 1$, o inibidor liga-se com afinidades semelhantes à enzima livre e ao complexo ES e quando $\alpha < 1$, o inibidor liga-se preferencialmente ao complexo ES (82).

Figura 24 - (A) Padrão de intersecção das retas na ausência e presença do inibidor quando se variou o substrato dThd **(B)** Padrão de intersecção das retas na ausência e presença do inibidor quando se variou o substrato P_i .



Os valores de K_i e K_{is} foram calculados de acordo com a **Eq. 10**, obtendo-se o valor de K_i de $91(\pm 34)$ nM e o valor de K_{is} de $291(\pm 88)$ nM, para o substrato dThd. Os resultados obtidos mostraram que o valor de K_{is} é aproximadamente três vezes do que o valor de K_i corroborando com o padrão de intersecção de retas obtido ($\alpha > 1$), indicando que o composto **5g** liga-se preferencialmente a enzima livre. Os efeitos inibitórios sobre os valores das constantes cinéticas aparentes (K_M , V_{max} , V_{max}/K_M) também foram analisados quando se fixou o substrato dThd, onde o aumento da concentração do inibidor resultou no aumento do valor de K_M do substrato e na diminuição do V_{max} e do V_{max}/K_M . Essas alterações são observadas em inibidores não competitivos quando $\alpha > 1$ (82), como mostra a **Tabela 8**.

Tabela 8 - Efeitos inibitórios dos parâmetros cinéticos aparentes quando se variou o substrato dThd na ausência e na presença do inibidor.

[I] nM	K_M μ M	V_{max} S^{-1}	V_{max}/K_M
0	62	7,1	0,11
50	75	6,7	0,09
100	91	5,0	0,05
200	143	4,6	0,03

O padrão de intersecção das retas resultante à esquerda do eixo y e abaixo do eixo x , quando se variou o substrato P_i (**Figura 24B**), indicou um tipo de inibição não competitiva, onde $\alpha < 1$. Neste caso, o composto **5g** liga-se preferencialmente ao complexo ES . Esses dados corroboram os valores de K_i e K_{is} obtidos através da equação (10), onde o valor de K_i é 200 (± 114) nM e o de K_{is} é 90 (± 9) nM. Os efeitos inibitórios sobre os valores das constantes cinéticas aparentes também foram analisados para o substrato P_i , onde o aumento da concentração do inibidor levou a diminuição do K_M e do V_{max} . Tais alterações são observadas em inibidores não competitivos quando $\alpha < 1$ (82), como mostra a **Tabela 9**.

Tabela 9 - Efeitos inibitórios dos parâmetros cinéticos aparentes quando se variou o substrato P_i na ausência e na presença do inibidor.

[I] nM	K_M μ M	V_{max} S^{-1}	V_{max}/K_M
0	97	7,0	0,07
50	82	5,2	0,06
100	48	3,0	0,06
150	32	2,0	0,06

Essa série de compostos químicos foi planejada baseando-se no possível estado de transição da enzima e, dessa forma, esperava-se um mecanismo de inibição competitiva para os substratos. No entanto, os resultados obtidos indicam que o composto **5g** não é um análogo ao estado de transição da hTP e apresenta um mecanismo de inibição não competitiva para ambos os substratos, evidenciando que este inibidor liga-se em outro sítio de interação (sítio alostérico) na hTP, não sendo este, o sítio de ligação dos substratos.

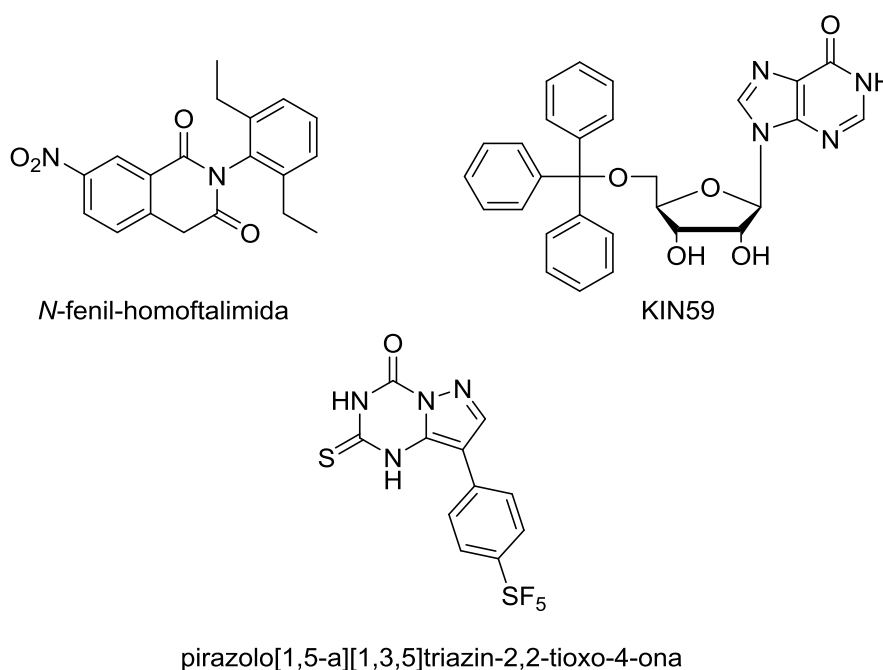
Os inibidores não competitivos podem agir bloqueando a formação de ligações químicas que, por sua vez, resulta no bloqueio do estado de transição da enzima requerido para catálise ou podem interferir na velocidade da reação enzimática (82). Um inibidor não competitivo clássico ($\alpha = 1$) não interfere na ligação

ao substrato e vice-versa. O inibidor e o substrato ligam-se reversivelmente, aleatoriamente e independentemente em sítios de ligação diferentes em um sistema que ocorre o mecanismo de inibição não competitiva (89).

A maioria dos inibidores da hTP identificados até o presente momento são análogos da base nitrogenada uracil e interagem com as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da proteína, particularmente, no sítio de ligação do substrato dThd (inibidores competitivos). Uma menor parte dos inibidores liga-se em outro sítio (alostérico) na hTP, tais como os compostos *N*-fenil-homoftalimida e KIN59 (Figura 25) (55).

Estudos demonstram que o composto *N*-fenil-homoftalimida apresenta um mecanismo de inibição competitiva *mixed-type* com IC_{50} de 246 μ M, sugerindo a existência de pelo menos dois sítios de ligação para esse composto, sendo um deles o sítio de ligação do substrato e o outro um possível sítio alostérico (99). O composto KIN59 demonstrou um mecanismo de inibição não competitiva para ambos os substratos dThd e P_i , com valor de IC_{50} de 67 μ M (97). Recentemente, um estudo demonstrou que o composto 1,3-Diidro-8-(4-pentafluorosulfurfenil)-pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-2,2-tioxo-4-ona (Figura 25) apresentou um mecanismo de inibição não competitiva para a TP de *E. coli*, com valor de IC_{50} de 0,04 μ M (100).

Figura 25 - Estrutura química dos compostos *N*-fenil-homoftalimida, KIN59 e pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-2,2-tioxo-4-ona, respectivamente.



Fonte: Adaptado de Pérez-Pérez et al. (2005) (55) e Sun et al. (2013) (100).

Esses resultados combinados aos do composto **5g** indicam novamente a existência de um sítio alostérico na hTP e, possivelmente, na TP de *E. coli*, no entanto ainda desconhecido e diferente dos sítios de ligação dos substratos. A identificação desse sítio de ligação pode representar uma nova perspectiva para o desenvolvimento de novas classes de inibidores enzimáticos da hTP. Essa nova classe de inibidores pode permitir um melhor entendimento da função molecular do possível sítio alostérico nos processos biológicos mediados pela enzima, como na progressão do câncer e na angiogênese.

Os inibidores não competitivos apresentam algumas vantagens em relação aos inibidores competitivos, tais como: não competem pelo substrato natural e apresentam maior seletividade pelo alvo. Inibidores não competitivos apresentam uma vantagem significativa *in vivo*, como por exemplo, quando o ambiente fisiológico expõe a enzima a concentrações altas do substrato. Do mesmo modo, um inibidor não competitivo liga-se a um sítio alostérico na enzima, podendo alcançar uma alta seletividade frente a outras enzimas que utilizam o mesmo substrato ou realizam a mesma reação enzimática que a enzima alvo (82).

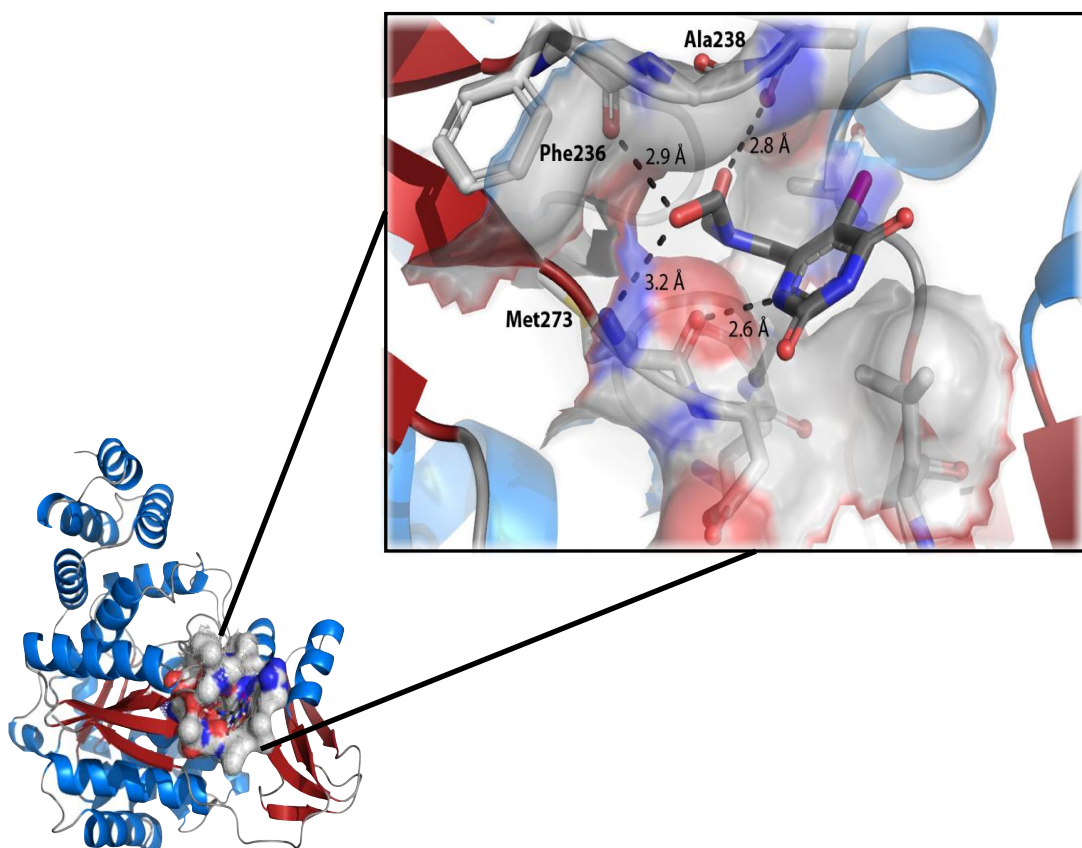
É importante ressaltar que o inibidor **5g** apresentou valor de IC₅₀ maior que 100 µM quando testado na UP humana, demonstrando uma maior afinidade pela hTP dentre as enzimas PyNP (dado não apresentado). Além disso, é importante destacar também que o composto **5g** possui uma atividade inibitória maior sobre a hTP em relação aos inibidores que possuem o mesmo mecanismo de inibição (não competitiva) descritos até o presente momento.

6.13 Docagem molecular

Os experimentos de docagem molecular foram realizados a fim de avaliar o possível sítio e os modos de interação do composto **5g** à hTP. A proposição de outro sítio de interação (sítio alostérico) foi baseada no mecanismo de inibição não competitiva para o composto **5g**. O programa AutoDock4.2 identificou duas possíveis cavidades de ligação para o composto **5g**, além do próprio sítio ativo da enzima. Para a confirmação dos resultados obtidos por meio da docagem molecular, as cavidades da hTP foram analisadas com os programas CASTp e metaPocket 2.0 para verificar se o volume destas eram condizentes com o volume do composto testado (195.1 Å³). A **Figura 26** apresenta a segunda maior cavidade da hTP

associada com o composto **5g**. Nessa figura, pode-se observar que o composto é ancorado por quatro pares de interações através de ligações de hidrogênio. As hidroxilas presentes no substituinte 2-aminopropano-1,3-diol parecem exercer um papel importante na interação proteína:ligante. Esses grupamentos atuam como doadores de ligações de hidrogênio com distâncias de 2,8 Å, 2,9 Å e 3,2 Å em relação aos resíduos Ala238, Phe236 e Met273, respectivamente. Outra interação polar observada no complexo formado entre o composto **5g** e a hTP foi entre o N-3 do anel heterocíclico e o resíduo Met273. A distância dessa interação foi de 2,6 Å e, da mesma forma que as anteriores, está dentro da soma dos raios de van der Waals dos átomos envolvidos (101).

Figura 26 - Representação tridimensional da enzima hTP associada com o composto **5g**. Os resíduos que estão fazendo ligações de hidrogênio (linha tracejada) com o composto **5g** estão na representação de palitos e coloridos por tipo de átomos. A estrutura da hTP está representada em “cartoon” e colorida por estrutura secundária (hélices α : azul claro; folha β : vermelho) e o sub-sítio encontrado está destacado com a superfície molecular e colorida por tipo de átomos. A figura foi gerada com o programa PyMOL.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hTP é uma enzima chave na via de salvamento de pirimidinas, apresentando um papel biológico importante na reciclagem de bases pirimídicas o que permite a manutenção e a proliferação celular (24). O interesse em desenvolver inibidores que interfiram na atividade enzimática da hTP advém de suas propriedade angiogênicas (28), que contribuem para progressão tumoral e para metástase. Do mesmo modo, a hTP encontra-se superexpressa em alguns tipos de tumores sólidos e visto que as células cancerosas utilizam preferencialmente a via de salvamento para obtenção dos nucleotídeos (22), o desenvolvimento de inibidores que tem como alvo a atividade hTP, poderiam levar a redução do crescimento tumoral e da metástase. É importante ressaltar também que a hTP inativa análogos de nucleosídeos com propriedades antitumoral e antiviral (49) e, dessa forma, o uso de inibidores da hTP em associação a esses fármacos poderia aumentar a eficácia terapêutica dessa classe de quimioterápicos.

Considerando todas essas observações, a hTP é um alvo molecular atrativo para o desenvolvimento de inibidores de sua atividade, principalmente, para o uso na terapia do câncer. Apesar da identificação de diversos compostos químicos com potenciais efeitos inibitórios sobre a hTP, nenhum deles foi aprovado para o uso clínico até o presente momento. O desenho racional de inibidores baseia-se nas informações sobre o mecanismo (cinético, químico e catalítico) e a estrutura das enzimas-alvo. Neste contexto, a análise do mecanismo de ação do alvo molecular deve ser uma prioridade para o desenvolvimento de novos fármacos que buscam o desenho racional de potentes inibidores enzimáticos (59). O entendimento do modo de ação da hTP, como a identificação das etapas químicas (76, 78) e não químicas presentes no mecanismo cinético da reação catalisada pela enzima, pode representar uma ferramenta útil para o desenvolvimento de novas classes de inibidores, demonstrando sua função molecular na angiogênese e em outros processos biológicos tais como apoptose e metástase. Esta tese caracterizou bioquimicamente o precursor e a proteína madura, uma vez que não se sabe qual forma da hTP apresenta um papel biológico importante na progressão do câncer e, assim, tanto o precursor quanto a forma madura podem ser considerados alvos terapêuticos para o desenvolvimento de inibidores.

O gene TYMP que codifica a hTP foi amplificado a partir do cDNA de uma amostra de tecido tumoral colorretal, clonado em vetor de clonagem pCR-Blunt e subclonado em vetor expressão pET23a(+), e o sequenciamento de DNA confirmou a integridade do gene e ausência de mutações. As proteínas recombinantes foram expressas em sua fração solúvel em cepas de *E. coli* Roseta(DE3). A obtenção das proteínas nas suas formas homogêneas se deu através da determinação de um protocolo de purificação através de HPLC, utilizando duas etapas cromatográficas. O protocolo desenvolvido resultou em proteínas ativas e estáveis quando armazenadas em ultrafreezer (-80 °C). A caracterização do precursor e da hTP madura demonstraram que ambas as enzimas recombinantes possuem atividade de TP, pois a fosforólise de dThd, na presença de P_i , formando timina e dR1P pode ser detectada.

Os ensaios de espectrometria de massa permitiram a identificação das proteínas recombinantes bem como a determinação da massa molecular intacta. A determinação da estrutura quaternária através de cromatografia líquida de exclusão por tamanho permitiu a identificação da forma ativa das enzimas em solução como um dímero, não diferindo da forma ativa de alguns micro-organismos.

Os ensaios espectrofotométricos de atividade juntamente com os resultados obtidos por ITC permitiram inferir o mecanismo cinético das enzimas hTP, assim como as constantes cinéticas aparentes e verdadeiras dos substrato e os parâmetros termodinâmicos da formação dos complexos binários. O precursor, assim com a hTP madura, seguem um mecanismo cinético bi-bi aleatório de rápido equilíbrio, consistente com o mecanismo já proposto para TP purificada de fígado de rato (25). O mecanismo sequencial também foi proposto para TP dos micro-organismos *E. coli* (26) e *S. typhimurium* (41). No entanto, diferentemente do mecanismo proposto para hTP, esses mecanismos seguem uma ordem de adição de substratos e uma ordem de liberação dos produtos.

Os ensaios espectrofotométricos de atividade demonstraram que as enzimas hTP apresentam parâmetros cinéticos diferentes, sugerindo que a enzima madura é cataliticamente mais eficiente em relação ao precursor. No intuito de entender tais especificidades optou-se pela análise estrutural do precursor e da proteína madura pela técnica de modelagem molecular, onde ficou evidenciado que a presença dos dez aminoácidos na região *N*-terminal forma uma pequena alfa hélice próximo ao sítio de ligação do substrato, a qual poderia dificultar a ligação do substrato no sítio

ativo e a catálise enzimática. Além disso, os ensaios espectrofotométricos demonstraram que as enzimas apresentam inibição pelo substrato dThd, indicando a existência de um sítio de ligação alostérico na hTP, diferente dos sítios de ligação aos substratos. A existência de um sítio alostérico na TP purificada de fígado de rato (25) e na hTP (97) já foi previamente proposta, onde a ligação de uma molécula neste sítio alostérico parece resultar em uma forma enzimática inativa.

Os ensaios de ITC também identificaram os possíveis mecanismos de interação molecular envolvidos na formação dos complexos binários, como a formação de ligações de hidrogênio, as interações do tipo van der Waals e as interações hidrofóbicas e/ou expulsão de moléculas de água do sítio ativo que favorecem a formação do complexo binário enzima:ligante (ΔH° e ΔS° favorável). Por outro lado, a ocorrência de uma possível mudança conformacional na estrutura tridimensional da enzima ou do ligante pode ser observada a partir dos parâmetros termodinâmicos obtidos (ΔS° desfavorável).

A influência do pH nos parâmetros cinéticos foi avaliada afim de analisar a catálise ácido-base no modo de ação da hTP. O perfil de pH indicou que a enzima apresenta uma atividade catalítica maior em pH baixo sugerindo que a protonação da cadeia lateral de um resíduo de aminoácido favorece a catálise enzimática. Estruturas cristalográficas e estudo de mutagênese sítio-dirigida demonstram que a His116 apresenta um papel importante na catálise, agindo como um grupamento doador de próton durante a fosforólise da dThd. O estudo do perfil de pH forneceu também os valores dos pK_s das cadeiras laterais dos resíduos de aminoácidos que interagem com os substratos. Assim, através dos valores dos pK_s obtidos juntamente com análises estruturais da hTP, sugere-se que a desprotonação da His116 e a protonação da Lys221 parece ser essencial para que ocorra ligação ao substrato dThd. Do mesmo modo, a desprotonação da Lys115 e a mudança de ionização do P_i parecem ser fundamentais para que ocorra a ligação desse substrato no sítio ativo da hTP.

Esses resultados possibilitaram a caracterização bioquímica da hTP, da sua forma precursora e proteína madura. Os resultados salientam a importância do processamento pós-tradução do precursor, onde se sugere que a remoção dos dez aminoácidos iniciais parece ter uma função importante na catálise enzimática. Além disso, os dados apresentados podem ser úteis para o desenvolvimento racional de potentes inibidores tendo como alvo a atividade da hTP, uma vez que a

caracterização de alvos moleculares específicos é considerada a primeira etapa no processo de desenvolvimento de um fármaco de ação seletiva (59).

Tendo em vista a importância do desenvolvimento de novos inibidores da hTP, compostos químicos com ação inibitória da atividade enzimática podem ser obtidos a partir de análogos estruturais aos substratos, aos produtos ou ao estado de transição da reação enzimática (59). Os derivados de pirimidinas são compostos conhecidos com capacidade de inibir a atividade da hTP, dentre eles o mais potente já caracterizado, o TPI (56). O desenho de inibidores análogos ao estado de transição resulta em uma interação mais forte ao sítio de ligação da enzima em relação aos análogos de substrato (60), e desta forma o planejamento e síntese dos possíveis inibidores apresentados neste trabalho, foram baseados no caráter carbocatiônico apresentado pelos estados de transição da enzima.

Os 14 compostos químicos sintetizados e testados como possíveis inibidores da hTP apresentaram um potencial inibitório que variou entre uma faixa de 0,11 μM a 129 μM para o precursor e 0,12 μM a 87 μM para a proteína madura. A maioria dos compostos apresentou um valor de IC_{50} semelhante para as ambas às formas da hTP enquanto que os compostos **5f**, **5h** e **5i** foram mais efetivos na forma madura. O composto **5g** apresentou um maior potencial inibitório com um valor de IC_{50} de 0,11 – 0,12 μM sobre a hTP, onde a presença de um átomo de I na posição 5 do anel heterocíclico e a substituição usando um derivado do 2-aminopropano-1,3-diol parece estar relacionado com a melhor efetividade da ação inibitória. Os dados apresentados sugerem o composto **5g** como um possível candidato ao desenvolvimento de um novo fármaco tendo como alvo molecular a hTP e com ação inibitória em ambas as proteínas recombinantes.

O padrão de intersecção das retas obtidas na determinação do K_i do composto **5g** indicou um mecanismo de inibição não competitiva para ambos os substratos, indicando que este inibidor não é um análogo ao estado de transição da enzima. Os dados obtidos revelaram que o composto **5g** apresenta afinidade tanto pela enzima livre quanto pelo complexo *ES*. Essas afinidades são diferentes para cada um dos substratos, onde na presença de dThd o inibidor liga-se preferencialmente a enzima livre enquanto que na presença do substrato P_i , o inibidor liga-se preferencialmente ao complexo *ES*. O mecanismo de inibição do composto **5g** sobre a hTP mais uma vez aponta para a existência de um sítio de

ligação alostérico. A identificação desse sítio alostérico pode representar um alvo molecular interessante na hTP para o desenho de inibidores potentes e seletivos.

A docagem molecular identificou o possível sítio de ligação do composto **5g** assim como os modos de interação à hTP. A cavidade associada ao composto **5g** encontra-se próximo ao sítio de ligação aos substratos e as hidroxilas presentes no substituinte 2-aminopropano-1,3-diol parecem exercer um papel importante na interação proteína:ligante através dos resíduos Ala238, Phe236 e Met273. A análise da estrutura tridimensional da hTP em complexo com o composto **5g** poderia permitir a identificação do possível sítio alostérico assim como os resíduos de aminoácidos importantes na interação enzima:inibidor e, posteriormente, serem comparados aos ensaios de docagem molecular.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646-674.
2. Floor SL, Dumont JE, Maenhaut C, Raspe E. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? *Cell*. 2012; 18(9):509-515.
3. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010; 29(8):1093-10102.
4. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6):883-899.
5. Instituto Nacional de Câncer, INCA. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=1..
6. World Health Organization, WHO. Disponível em: <http://www.who.int/en/>
7. Hoof PM, Machado KK. Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012; 38(7):825-33.
8. Backer MV, Backer JM. Imaging key biomarker of tumor angiogenesis. *Theranostics*. 2012; 2(5):502-515.
9. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(6):401-410.
10. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971; 285(21):1182-1186.
11. Cook KM, Figg WD. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J Clin*. 2010; 60(4):222-243.
12. Nelson D, Cox M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4ª ed. EUA: Freeman; 2005.
13. Voet D, Voet J. *Bioquímica*. Porto Alegre: Artes médicas; 2006.
14. Campbell M. *Bioquímica*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2000.
15. Xu Y, Johansson M, Karlsson A. Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria. *J Biol Chem*. 2008; 283(3):1563-1571.
16. Moffatt BA, Ashihara H. Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *The Arabidopsis book*. 2002, doi: 10.1199/tab.0018.

17. Shambaugh GE 3rd. Pyrimidine biosynthesis. *Am J Clin Nutr.* 1979; 32(6):1290-1297.
18. Islam MR, Kim H, Kang SW, Kim JS, Jeong YM, Hwang HJ, et al. Functional characterization of a gene encoding a dual domain for uridine kinase and uracil phosphoribosyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 2007; 63(4):465-477.
19. Pugmire MJ, Ealick SE. Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochem J.* 2002; 361(1):1-25.
20. Krenitsky TA, Mellors JW, Barclay RK. Pyrimidine nucleosidases. Their classification and relationship to uric acid ribonucleoside phosphorylase. *J Biol Chem.* 1965; 240(3):1281-1286.
21. Villela AD, Sánchez-Quitian ZA, Ducati RG, Santos DS, Basso LA. Pyrimidine salvage pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Med Chem.* 2011; 18(9):1286-98. Review.
22. Schwartz EL, Baptiste N, Megati S, Wadler S, Otter BA. -Ethoxy-2'-deoxyuridine, a novel substrate for thymidine phosphorylase, potentiates the antitumor activity of 5-fluorouracil when used in combination with interferon, an inducer of thymidine phosphorylase expression. *Cancer Res.* 1995; 55(16):3543-50.
23. Longley DB, Harkin DP, Johnston. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(5):330-338.
24. Friedkin M, Roberts D. The enzymatic synthesis of nucleosides. I. Thymidine phosphorylase in mammalian tissue. *J Biol Chem.* 1954; 207(1):245-256.
25. Iltzsch MH, el Kouni MH, Cha S. Kinetic studies of thymidine phosphorylase from mouse liver. *Biochemistry.* 1985; 24(24):6799-807.
26. Schwartz M. Thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* properties and kinetics. *Eur J Biochem.* 1971; 21(2):191-198.
27. Miyazono K, Okabe T, Urabe A, Takaku F, Heldin CH. Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets. *J Biol Chem.* 1987; 262(9):4098-4103.
28. Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, Wernstedt C, et al. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature.* 1989; 338(6216):557-562.
29. Moghaddam A, Bicknell R. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in *Escherichia coli* and confirmation of its thymidine phosphorylase activity. *Biochemistry.* 1992; 31(48):12141-12146.
30. Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T, Haraguchi M, Akiyama S, et al. Angiogenic factor. *Nature.* 1992; 356(6371):668.

31. Asai K, Hirano T, Kaneko S, Moriyama A, Nakanishi K, et al. A novel glial growth inhibitory factor, gliostatin, derived from neurofibroma. *J Neurochem.* 1992; 59(1):307-317.
32. Bronckaers A, Gago F, Balzarini J, Lienkens S. The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy. *Med Res Rev.* 2009; 29(6):903-953.
33. Gene ID: 1890. Disponível em:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=1890
34. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore?LinkName=gene_nucore_refseqrna&from_uid=1980
35. Uniprot. Disponível em:
http://www.uniprot.org/uniprot/P19971#section_comments
36. Hagiwara K, Stenman G, Honda H, Sahlin P, Anderson A, et al. Organization and chromosomal localization of the human platelet-derived endothelial cell growth factor gene. *Mol Cell Biol.* 1991; 11(4):2125-2132.
37. Zhu GH, Lenzi M, Schwartz EL. The Sp1 transcription factor contributes to the tumor necrosis factor-induced expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase in human colon carcinoma cells. *Oncogene.* 2002; 21(55):8477-85.
38. Wierstra I. Sp1: emerging roles – beyond constitutive activation of TATA – less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 372(1):1-13.
39. PeptideAtlas home. Disponível em: <http://www.peptideatlas.org>
40. Usuki K, Norner L, Larsson E, Miyazono K, Kellman U, et al. Localization of platelet-derived endothelial cell growth factor in human placenta and purification of an alternatively processed form. *Cell Regul.* 1990; 1(8):577-584.
41. Blank JG, Hoffee PA. Purification and properties of thymidine phosphorylase from *Salmonella typhimurium*. *Arch Biochem Biophys.* 1975; 168(1):259-265.
42. Voytek P. Purification of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* and its photoinactivation in the presence of thymine, thymidine, and some halogenated analogs. *J Biol Chem.* 1975; 250(10):3660-3665.
43. Kubilus J, Lee LD, Baden HP. Purification of thymidine phosphorylase from human amniochorion. *Biochim Biophys Acta.* 1978; 527(1):221-228.
44. Walter MR, Cook WJ, Cole LB, Short SA, Koszalka GW, et al. Three-dimensional structure of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* at 2.8 Å resolution. *J Biol Chem.* 1990; 265(23):14016-14022.

45. Norman RA, Barry ST, Bate M, Breed J, Colls JG, et al. Crystal structure of human thymidine phosphorylase in complex with a small molecule inhibitor. *Structure*. 2004; 12(1):75-84.
46. El Omari K, Bronckaers A, Lienkens S, Pérez-Pérez MJ, Balzarini J, et al. Structure basis for non-competitive product inhibition in human thymidine phosphorylase: implications for drug design. *Biochem J*. 2006; 399(2):199-204.
47. Pugmire MJ, Ealick SE. The crystal structure of pyrimidine nucleoside phosphorylase in a closed conformation. *Structure*. 1998; 6(11):1467-1479.
48. Mitsiki E, Papageorgiou AC, Iyer S, Thiyagarajan N, Prior SH, et al. Structures of native human thymidine phosphorylase and in complex with 5-iodouracil. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 386(4):666-670.
49. Liekens S, Bronckaers A, Pérez-Pérez MJ, Balzarini J. Targeting platelet-derived endothelial cell growth factor/ thymidine phosphorylase for cancer therapy. *Biochem Pharmacol*. 2007; 74(11):1555-67.
50. Miyadera K, Sumizawa T, Haraguchi M, Yoshida H, Konstanty W, et al. Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer Res*. 1995; 55(8):1687-1690.
51. Moghaddam A, Zhang HT, Fan TP, Hu DE, Lees VC, et al. Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92(4):998-1002.
52. Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, Sumizawa T, Furukawa T, et al. Angiogenic activity of enzymes. *Nature*. 1994; 368(6468):198.
53. Bijnsdorp IV, Azijli K, Jansen EE, Wamelink MM, Jakobs C, et al. Accumulation of thymidine-derived sugars in thymidine phosphorylase overexpressing cells. *Biochem Pharmacol*. 2010; 80(6):786-792.
54. Khan KM, Ambreen N, Hussain S, Perveen S, Choudhary MI. Schiff bases of 3-formylchromone as thymidine phosphorylase inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2009; 17(8):2983-2988.
55. Pérez-Pérez MJ, Priego EV, Hernández AI, Camarasa MJ, Balzarini J, et al. Thymidine phosphorylase inhibitors: recente developments and potential therapeutic applications. *Mini Rev Med Chem*. 2005; 5(12):1113-23.
56. Fukushima M, Suzuki N, Emura T, Yano S, Kasuno H, et al. Structure and activity of specific inhibitors of thymidine phosphorylase to potentiate the function of antitumor 2'-deoxyribonucleosides. *Biochem Pharmacol*. 2000; 59(10):1227-1236.
57. Yoshino T, Mizunuma N, Yamazaki K, Nishina T, Komatsu Y, et al. TAS-102 monotherapy for pretreated metastatic colorectal cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2012; 13(10):993-1001.

58. Temmink OH, Emura T, de Bruin M, Fukushima M, Peters CJ. Therapeutic potential of the dual-targeted TAS-102 formulation in the treatment of gastrointestinal malignancies. *Cancer Sci.* 2007; 98(6):779-789.
59. Robertson JG. Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry.* 2005; 44(15):5561-5571.
60. Schramm VL. Transition States, analogues, and drug development. *ACS Chem Biol.* 2013; 8(1):71-81.
61. Jain HV, Rasheed R, Kalman TI. The role of phosphate in the action of thymidine phosphorylase inhibitors: Implications for the catalytic mechanism. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010; 20(5):1648-1651.
62. Mařák D, Otmar M, Votruba I, Dračínský M, Krečmerová M. 8-Aza-7,9-dideazaxanthine acyclic nucleoside phosphonate inhibitors of thymidine phosphorylase. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011; 21(2):652-654.
63. Deves C, Renck D, Garicochea B, da Silva VD, Lopes TG, et al. Analysis of select members of the E26 (ETS) transcription factors family in colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2011; 458(4):421-430.
64. pET system manual. Disponível em:
<http://lifeserv.bgu.ac.il/wb/zarivach/media/protocols/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf>
65. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-254.
66. Zhang Z, Marshall, AG. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1998; 9(3):225-233.
67. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996; 68(5):850-858.
68. Proteoma humano. Disponível em: <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes>
69. Rizzi C, Frazzon J, Ely F, Weber PG, Fonseca IO, Gallas M, et al. DAHP synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning, expression, and purification of functional enzyme. *Protein Expr Purif.* 2005; 40:23-30.
70. Fonseca IO, Magalhães MLB, Oliveira JS, Silva RG, Mendes MA, Palma MS, et al. Functional shikimate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: purification and characterization. *Protein Expr Purif.* 2006; 46:429-437.
71. Sigma Aldrich, Enzymatic Assay of thymidine phosphorylase. Disponível em:
http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme_Assay/thymidinephosphorylase.Par.0001.File.tmp/thymidinephosphorylase.pdf

72. Cook PF, Cleland W. *Enzyme Kinetics and Mechanism*. Garland Science; 2007.
73. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-tasser: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat protoc*. 2010; 5(4):725-738.
74. LOMET ONLINE: Meta server based protein fold recognitions. Disponível em: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/LOMETS/>.
75. Schramm VL. Enzymatic transition states: thermodynamics, dynamics and analogue design. *Arch Biochem Biophys*. 2005; 433(1):13-26.
76. Schwartz PA, Veticatt MJ, Schramm VL. Transition state analysis of thymidine hydrolysis by human thymidine phosphorylase. *J Am Chem Soc*. 2010; 132(38):13425-33.
77. Birck MR, Schramm VL. Nucleophilic participation in the transition state for human thymidine phosphorylase. *J. Am. Chem. Soc*. 2004; 126(8):2447-2453.
78. Schwartz PA, Veticatt MJ, Schramm VL. Transition state analysis of the arsenolytic depyrimidination of thymidine by human thymidine phosphorylase. *Biochemistry*. 2011; 50(8):1412-1420.
79. Clark T, Hennemann M, Murray JS, Politzer P. Halogen bonding: the sigma-hole. *J Mol Model*. 2007; 13(2):291-296.
80. Semeraro T, Lossani A, Botta M, Ghiron C, Alvarez R et al. Simplified analogues of immucillin-G retain potent human purine nucleoside phosphorylase inhibitory activity. *J Med Chem*. 2006; 49(20):6037-6045.
81. Clinch K, Evans GB, Fröhlich RF, Furneaux RH, Kelly PM et al. Third-generation immucillins: syntheses and bioactivities of acyclic immucillin inhibitors of human purine nucleoside phosphorylase. *J Med Chem*. 2009; 52(4):1126-1143.
82. Copeland RA. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug Discovery*. Wiley-Interscience; 2005.
83. Goodsell DS, Olson AJ. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. *Proteins*. 1990; 8(3):195-202.
84. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009; 30(16):2785-2791.
85. Dundas J, Ouyang Z, Tseng J, Binkowski A, Turpaz Y, Liang J. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Res*. 2006; 1(34):W116-W118.
86. Huang B. MetaPocket: a meta approach to improve protein ligand binding site prediction. *OMICS*. 2009; 13(4):325-330.

87. Zhang Z, Li Y, Lin B, Schroeder M, Huang B. Identification of cavities on protein surface using multiple computational approaches for drug binding site prediction. *Bioinformatics*. 2011; 27(15):2083-2088.
88. MacRae IJ, Segel IH. Adenosine 5'-phosphosulfate (APS) kinase: diagnosing the mechanism of substrate inhibition. *Arch Biochem Biophys*. 1999; 361(2):277-282.
89. Segel IH. *Enzyme Kinetics – Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. Wiley-Interscience, 1975.
90. Winship PR. An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Res*. 1989; 17(3):1266.
91. Renck D, Ducati RG, Palma MS, Santos DS, Basso LA. The kinetic mechanism of human uridine phosphorylase 1: Towards the development of enzyme inhibitors for cancer chemotherapy. *Arch Biochem Biophys*. 2010; 497(1-2):35-42.
92. Martinelli LK, Ducati RG, Rosado LA, Breda A, Selbach BP, et al. Recombinant *Escherichia coli* GMP reductase: kinetic, catalytic and chemical mechanisms, and thermodynamics of enzyme-ligand binary complex formation. *Mol Biosyst*. 2011; 7(4):1289-305.
93. Kelley KC, Huestis KJ, Austen DA, Sanderson CT, Donoghue MA, et al. Regulation of sCD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in *Escherichia coli*. *Gene*. 1995; 156(1):33-36.
94. Grossman TH, Kawasaki ES, Punreddy SR, Osburne MS. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*. 1998; 209(1-2):95-103.
95. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*. 2005; 41(1):207-234.
96. Avraham Y, Grossowicz N, Yashphe J. Purification and characterization of uridine and thymidine phosphorylase from *Lactobacillus casei*. *Biochim Biophys Acta*. 1990; 1040(2):287-293.
97. Liekens S, Hernández AI, Ribatti D, De Clercq E, Camarasa MJ, et al. The nucleoside derivative 5'-O-trityl-inosine (KIN59) suppresses thymidine phosphorylase-triggered angiogenesis via a noncompetitive mechanism of action. *J Biol Chem*. 2004; 279(28):29598-29605.
98. Ladbury JE, Doyle ML. In *Biocalorimetry II*. 1st ed. London: Wiley; 2004.
99. Kita T, Takahashi H, Hashimoto Y. Thymidine phosphorylase inhibitors with a homophthalimide skeleton. *Biol Pharm Bull*. 2001; 24(7):860-862.
100. Sun L, Bera H, Chui WK. Synthesis of pyrazolo[1,5a][1,3,5]triazine derivatives as inhibitors of thymidine phosphorylase. *Eur J Med Chem*. 2013, 65C:1-1.

101. Rowland RS, Taylor R. Intermolecular Nonbonded Contact Distances in Organic Crystal Structures: Comparison with Distances Expected from van der Waals Radii. *J. Phys. Chem.* 1996; 100(18):7384 – 7391.

ANEXO A

Carta de Aprovação pelo Comitê
de Ética

CEP, PUCRS, 2011



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF. CEP-706/11

Porto Alegre, 29 de abril de 2011.

Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 11/05429 intitulado **"Clonagem do gene que codifica a enzima Timidina Fosforilase humana: superexpressão, purificação e estudos físico-químicos para o desenvolvimento racional de novas drogas anticâncer"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

ANEXO B

Kinetic mechanism of human thymidine phosphorylase – a molecular target for cancer drug development

C. Deves, D.C. Rostirolla, L.K. Martinelli, C.V. Bizarro, L.A. Basso, D.S. Santos.

Manuscrito submetido ao periódico *Molecular Biosystems*, 2013.

#CURRENT_DATE#CURRENT_DATE##

Dear Dr Deves:

The manuscript entitled Kinetic mechanism of human thymidine phosphorylase – a molecular target for cancer drug development (MB-ART-10-2013-070453) has been submitted by Dr Luiz Basso to Molecular BioSystems.

You are listed as a co-author for this manuscript. Our online submission system has automatically created a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account are as follows:

Site URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/mb>

USER ID: candidadeves@yahoo.com.br

PASSWORD: For security reasons your password is not contained in this email. To set your password click the link below.

http://mc.manuscriptcentral.com/mb?URL_MASK=0e0af9b23db847c4b72e619ac61d02d9

You can use the above USER ID and PASSWORD (once set) to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. Please log in to <http://mc.manuscriptcentral.com/mb> to update your account information via the edit account tab at the top right.

Thank you for your participation.

Yours sincerely,
Molecular BioSystems Editorial Office
molbiosyst@rsc.org

Kinetic mechanism of human thymidine phosphorylase – a molecular target for cancer drug development.

Candida Deves^{1,2}, Diana Carolina Rostirolla^{1,2}, Leonardo Kras Borges Martinelli¹, Cristiano Valim Bizarro¹, Diogenes Santiago Santos^{1,2*}, Luiz Augusto Basso^{1,2*}.

¹Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 6681/92-A Av. Ipiranga, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding authors: Luiz A. Basso or Diógenes S. Santos

Av. Ipiranga 6681 – Tecnopuc – Prédio 92A, ZIP CODE 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone/Fax: +55-51-33203629; E-mail addresses: luiz.basso@pucrs.br or diogenes@pucrs.br

Running title: Kinetic mechanism of human thymidine phosphorylase.

Summary

Human thymidine phosphorylase (HTP), also known as platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) or gliostatin, catalyzes the reversible phosphorolysis of thymidine (dThd) to thymine and 2-deoxy- α -D-ribose-1-phosphate (2dR1P). HTP is a key enzyme in the pyrimidine salvage pathway involved in dThd homeostasis in cells. HTP is a target for anticancer drug development as its enzymatic activity promotes angiogenesis. Here, we describe cloning, expression, and purification to homogeneity of recombinant *TYMP*-encoded HTP. Peptide fingerprinting and molecular mass value of the homogenous protein confirmed its identity as HTP assessed by mass spectrometry. Size exclusion chromatography showed that HTP is a dimer in solution. Kinetic studies revealed that HTP displayed substrate inhibition for dThd. Initial velocity and isothermal titration calorimetry (ITC) studies suggest that HTP catalysis follows a rapid-equilibrium random bi-bi kinetic mechanism. ITC measurements also showed that dThd and P_i binding are thermodynamically favorable processes. The pH-rate profiles indicated that maximal enzyme activity was achieved at low pH values. Functional groups with apparent pK values of 5.2 and 9.0 are involved in dThd binding and groups with pK values of 6.1 and 7.8 are involved in phosphate binding.

Keywords: Human thymidine phosphorylase; initial velocity; isothermal titration calorimetry; kinetic mechanism; pH-rate profile.

Introduction

Human Thymidine Phosphorylase (HTP; EC 2.4.2.4) belongs to the pyrimidine nucleoside phosphorylase (PYNP) family, and plays an important role in nucleotide metabolism. In mammalian cells, there are two enzymes from this family: Thymidine Phosphorylase (TP) and Uridine Phosphorylase (UP), whereas in lower organisms there exists only one enzyme, Pyrimidine Nucleoside Phosphorylase (PyNP). PyNP accepts both thymidine and uridine as natural substrates. TP is highly specific for 2'-deoxynucleosides of thymine and related pyrimidine bases, whereas UP does not distinguish between ribose and deoxyribose in pyrimidine nucleosides.¹ HTP is also known as platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)² or gliostatin.³ HTP, which is functionally active as a homodimer, is involved in the salvage pathway of pyrimidine nucleotides, ensuring that a sufficient pool of pyrimidine nucleotides is available for DNA repair and replication.^{4,5} In the presence of inorganic phosphate, this enzyme catalyzes the reversible phosphorolysis of 2'-deoxythymidine (dThd) to thymine and 2-deoxy- α -D-ribose-1-phosphate (2dR1P) (Fig. 1), and its main metabolic function appears to be catabolic.⁶ HTP has also a deoxyribosyl transferase activity by which the deoxyribosyl moiety is transferred from a pyrimidine nucleoside to another pyrimidine base, resulting in the formation of a new pyrimidine nucleoside.⁷

HTP plays an important role in the pathogenesis of cancer. The angiogenic activity of HTP plays a significant function in tumor biology, promoting new capillary blood vessel formation.⁸ High levels of HTP expression in tumor cells have been correlated with poor prognoses.⁹ HTP lacks a signal sequence indicating that HTP is not secreted from carcinoma cells and should thus act indirectly on the endothelial cells. HTP enzymatic activity is reported to be required for new capillary formation, as mutagenesis of the enzyme's active-site residues abolish the angiogenic activity.¹⁰⁻¹² HTP is linked to angiogenesis by the

production of 2-deoxyribose (2dR) from dThd, and this sugar is considered a chemoattractant that stimulates endothelial cell migration.^{13,14} During catalysis, HTP releases the monosaccharide 2dR1P and its dephosphorylation within the cytoplasm permits extracellular release of the 2dR product.¹⁵ 2dR is considered the main factor causing the angiogenic switch and the association between TP activity and angiogenesis is based on the potential accumulation of dThd-derived sugars from the HTP-catalyzed chemical reaction.^{14,16}

Besides the natural 2'-deoxynucleoside thymidine and 2'-deoxyuridine, HTP recognizes and plays a role in the catabolic inactivation of several pyrimidines or pyrimidine nucleosides with antiviral and antitumoral activity, such as 5-(E)-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU), 5-trifluorothymidine (TFT), 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU), or 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FDU). Therefore, administration of such therapeutic agents with an HTP inhibitor could improve the biological efficacy of these nucleoside analogues.¹⁷ On the other hand, HTP has been involved in the activation of several prodrugs of the antitumour agent 5-Fluorouracil, such as tegafur (1-(tetrahydro-2-furanyl)-5-fluorouracil) and capecitabine (4-N-pentyloxycarbonyl-5'-deoxy-5-fluorocytidine). Under therapeutic regimens that include these prodrugs, HTP inhibitors would thus be incompatible.^{18,19}

As HTP contributes significantly to angiogenesis, tumor progression and metastasis, studies are required to reveal the mode of action of HTP. Understanding the mode of action of HTP will inform us on how to better design inhibitors targeting this enzyme. These inhibitors may block HTP activity *in vivo* and, hopefully, suppress tumor growth and reduce metastasis.^{5,10,11,16,20} To date, a number of inhibitors have been designed and tested for their efficacy in inhibiting HTP. Current inhibitors are mainly substrate analogues, while some synthetic inhibitors and purine-based inhibitors have also been reported.⁸ One of the most potent inhibitors, 5-chloro-6-[1-(2-iminopyrrolidinyl)methyl]uracil hydrochloride (TPI),

caused a reduction in the rate of tumor growth when administrated to mice carrying tumors that overexpressed HTP.²¹

Efforts to develop new and potent HTP inhibitors have followed different strategies.²²⁻²⁴ The structure of HTP co-crystalized with one of the most potent inhibitor TPI,²⁵ the molecular model of HTP in complex with "hits" derived from computational screening of the National Cancer Institute database,²⁶ the structure of the transition state of HTP determined from multiple kinetic isotope effect analysis and computer modeling,^{27,28} provide different avenues for the rational design of selective inhibitors.

Here, we describe amplification, cloning and cDNA sequencing of the *TYMP* gene (NM_001953.4) from colorectal tumour tissue. We also present heterologous protein expression in *E. coli*, purification to homogeneity, mass spectrometry, oligomeric state determination, substrate inhibition and pH-rate profiles. Additionally, the determination of true steady-state kinetics and isothermal titration calorimetry (ITC) measurements of substrate/product binding were performed to provide further evidence on HTP enzyme kinetic mechanism. The results described here should augment our knowledge on HTP mode of action and be useful to efforts to HTP-targeted development of inhibitors with potential anti-cancer activity.

Results and discussion

Amplification, cloning and DNA sequencing of the *TYMP* gene

The human *TYMP* gene region coding the mature HTP, P19971[11 – 482] was PCR amplified in the presence of 5% DMSO in the reaction mixture (data not shown). The addition of DMSO co-solvent in the mixture helps the denaturation of CG-rich DNAs,²⁹ which is consistent with a high G+C content of the *TYMP* gene³⁰. The PCR product consistent with the expected size (1415 bp) was detected by agarose gel electrophoresis, purified, and cloned into the pCR-Blunt vector. Subsequently, the insert was subcloned into the pET-23a(+) expression vector and insertion of the DNA fragment confirmed by *NdeI* and *HindIII* enzyme restriction analysis. Nucleotide sequence of the cloned fragment corresponding to the human *TYMP* coding sequence was confirmed by automated DNA sequencing, revealing the integrity of the gene and absence of mutations that could have been introduced by the DNA amplification step.

Expression and purification of recombinant HTP

The pET-23a(+):*TYMP* recombinant plasmid was transformed into Rosetta (DE3) *E. coli* cells by electroporation and culture was grown in TB medium for 48h. The cells were disrupted by sonication and the supernatant, following clarification by centrifugation, was analyzed for protein expression at different periods of cell growth after reaching an $OD_{600nm} = 0.4 - 0.6$. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis confirmed the expression of a protein in the soluble fraction with apparent subunit molecular mass of ~50 kDa, in agreement with the predicted molecular mass for HTP (49,024.3 Da). SDS-PAGE analysis also showed that the highest expression of soluble recombinant HTP was obtained at 24h in TB medium at 37°C, without isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)

induction (data not shown). In agreement with our result, high levels of protein expression in the absence of inducer have been shown to occur in the pET system.^{31,32} In the pET vector system, target genes are positioned downstream of the strong bacteriophage T7 late promoter.³³ It has been proposed that leaky protein expression is due to a property of the *lac*-controlled system when cells approach stationary phase in complex medium and that cyclic adenosine monophosphate, acetate, and low pH are required to achieve high-level expression in the absence of IPTG induction, which may be part of the general cellular response to nutrition limitation.³⁴ However, it has later been shown that unintended induction in the pET system is due to the presence of as little as 0.0001% of lactose in the medium.³⁵

The expressed recombinant HTP protein was purified to homogeneity (Fig. 2) by a two-step protocol consisting of an anion-exchange column (Q-Sepharose Fast Flow) and a hydrophobic interaction column (HiLoad Phenyl Sepharose High performance). The recombinant HTP eluted at approximately 150 mM of NaCl from the anion exchange column, and samples containing the target protein were dialyzed against buffer A to remove remaining salt. Homogeneous recombinant HTP was obtained from the hydrophobic interaction column elution at approximately 255 mM of ammonium sulfate, and again dialyzed against buffer A to desalt. This 18-fold purification protocol yielded 12 mg of homogeneous recombinant HTP from 7.6 g of wet cells indicating a protein yield of 52% (Table 1). Homogeneous enzyme was stored at -80°C with no loss of activity.

Table 1. Purification of recombinant HTP expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) cells. Typical purification protocol from 7.6 g wet cell paste.

Purification Step	Total protein (mg)	Total enzyme activity ^a (U)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	410	98	0.24	1.0	100
Q-Sepharose FF	25	47	1.91	8	48
Phenyl Sepharose	12	52	4.3	17.9	52

^a One unit (U) of enzyme is the amount of HTP that converts 1 μ mol of dThd and P₁ to thymine and 2dR1P per minute at pH 7.5 at 37°C.

Identification and determination of HTP molecular mass by Mass Spectrometry

In order to determine the HTP molecular mass, we performed intact protein analysis using an Orbitrap analyzer (see Experimental Procedures). The average spectra from 1000 scans spanning charge states 26+ to 63+ was deconvoluted and we found a value of 48,853 Da for the average molecular mass of HTP (Fig. 3). However, the theoretical molecular mass for the mature HTP [11-482] with the N-terminal methionine removed is 49,024.3 Da, implying a difference of 171 Da between expected and experimentally found values. We hypothesized that recombinant mature HTP could have lost the first two residues (Ala11 and Pro12), which would result in a truncated protein of 48,856 Da, in good agreement with the experimentally observed molecular mass.

In order to test this hypothesis, we performed LC-MS/MS peptide mapping experiments. We compared the MS/MS spectra of HTP with the human proteome including the amino acid sequences from the mature [11-482] and the truncated version of HTP [13-482]. From 582 spectra, we identified 36 different peptides covering 80.98% of the truncated HTP primary sequence, including the N-terminal peptide PAPGDFSGEGSQGLPDPSPEPK found in 32 different spectra. This peptide starts at Pro13 and is supposed to be found only in the truncated [13-482] HTP form. Moreover, when compared to the mature HTP sequence

[11-482], we did not detect the corresponding N-terminal peptide

APPAPGDFSGEGSQGLPDPSPEPK. These results are in agreement with our data from intact protein analysis experiments, indicating that the recombinant HTP starts at Pro13.

Determination of oligomeric state of HTP in solution

The molecular mass of recombinant HTP was determined by size exclusion chromatography. The partition coefficient (K_{AV}) of protein standards and recombinant HTP were calculated by data fitting to Eq. (1). The linear dependence of K_{AV} on the logarithm of molecular mass of protein standards yielded the linear and slope parameters of Eq. (2). The recombinant HTP eluted as a single peak at 12.47 mL, which corresponds to an apparent molecular mass value of 120,100 Da. Molecular mass value was divided by HTP subunit molecular mass (49,024.3 Da), and the value of 2.4 obtained indicates that HTP is likely a dimer in solution. This result is in agreement with the HTP structural analysis, in which the HTP is homodimeric.^{25,36,37} In addition, crystal structure analysis revealed that *E. coli* TP³⁸ and Pyrimidine nucleoside phosphorylase (PYNP) from *Bacillus stearothermophilus*³⁹ are dimeric proteins which, structurally, do not differ from higher eukaryotes.

Determination of apparent steady-state kinetic constants and initial velocity patterns

The determination of apparent steady-state kinetic constants was performed using either P_i or dThd as the variable substrate. The dependence of initial velocity on increasing P_i concentrations, at fixed-saturating dThd concentration (400 μ M), followed hyperbolic Michaelis-Menten kinetics (Fig. 4A), and the apparent constant values were thus calculated fitting the data to Eq. (3).⁴⁰ The apparent Michaelis-Menten constant (K_M) and the catalytic constant (k_{cat}) for P_i were, respectively, 218 (\pm 15) μ M and 8.7 (\pm 0.2) s^{-1} . The dependence of velocity on increasing concentrations of dThd (Fig. 4B), at fixed-saturating P_i concentration

(2 mM), revealed substrate inhibition at high dThd levels, as there was a decrease in enzyme velocity at dThd concentration values larger than 500 μM . Accordingly, the apparent steady-state parameters were derived from data fitting to Eq. (4), yielding the following values: $k_{\text{cat}} = 9.9 (\pm 0.2) \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{dThd}} = 130 (\pm 6) \mu\text{M}$, and $K_{\text{idThd}} = 895 (\pm 48) \mu\text{M}$, which is approximately 7-fold larger than the K_{M} value. The k_{cat} value here determined is similar to the apparent steady kinetic constants previously reported by Schwartz *et al*²⁸ for HTP, while the K_{dThd} is larger than the value calculated from data fitting to Michaelis-Menten equation in the absence of substrate inhibition ($30 \pm 4 \mu\text{M}$).²⁸ Additionally, the apparent K_{M} value for P_i is 20-fold larger than the one reported for HTP-catalyzed phosphorolytic depyrimidation of dThd ($11 \pm 2 \mu\text{M}$).²⁸

Initial velocity patterns were employed to determine the true Michaelis-Menten constants from primary double-reciprocal plots of the steady-state, and the kinetic mechanism for the forward reaction (phosphorolysis) catalyzed by HTP. The family of lines intersecting to the left of the y -axis (Fig. 5A and B) for both substrates are consistent with ternary complex formation and a sequential mechanism.⁴⁰ The data were fitted to Eq. (6), yielding the following true steady-state kinetic parameters: $k_{\text{cat}} = 7.2 (\pm 0.2) \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{dThd}} = 66 (\pm 5) \mu\text{M}$ and $K_{\text{P}_i} = 107 (\pm 7) \mu\text{M}$. The calculated values for the specificity constants ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) for dThd and P_i are, respectively, $1.09 (\pm 0.06) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $6.7 (\pm 0.3) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. As observed in Fig. 5A, substrate inhibition by dThd is apparently more pronounced at fixed and low concentration of P_i (70 μM) and at high concentration of dThd. Nevertheless, in physiological environments this condition is not likely to occur, since the intracellular concentration of P_i is larger than 4 mM,⁴¹ exceeding its K_{M} value for HTP. A similar initial velocity pattern was observed for TP from mouse liver,⁴² *Escherichia coli*⁴³, *Salmonella typhimurium*⁴⁴, *Lactobacillus casei*⁴⁵, and for human UP.³¹ The ping-pong and rapid equilibrium ordered enzyme mechanisms could be ruled out, since these mechanisms give double-reciprocal plots

of, respectively, parallel lines and intersecting lines at the y -axis. The sequential mechanism indicates that enzymatic catalysis only occurs when both substrates are bound to the enzyme active site. It has been pointed out that the occurrence of substrate inhibition can be observed for ping-pong and steady-state ordered mechanisms.⁴⁶ In addition, substrate inhibition can also be observed in random sequential mechanisms when one substrate has affinity for the binding site of the other.⁴⁶ The ping-pong mechanism could be ruled out (Fig. 5). The pattern of lines in the double-reciprocal plot (Fig. 5A) may suggest that recombinant HTP follows a steady-state ordered mechanism, which displays uncompetitive substrate inhibition.⁴⁶

However, if HTP followed this mechanism, the pattern of lines for dThd (Fig. 5A) should have been observed for variable P_i concentrations at fixed-varied dThd concentrations (Fig. 5B). In addition, the double-reciprocal plots should be bent upwards for variable dThd concentrations at fixed-varied P_i concentrations. This pattern, however, is not observed for dThd (Fig. 5A). Noncompetitive substrate inhibition could be observed for mechanisms in which the inhibitory substrate binds to a second site, an effector site, yielding an inactive enzyme.⁴⁷ As shown in TP from mouse liver, noncompetitive substrate inhibition by thymine at high concentrations was based on the binding of thymine to an effector site inhibiting product formation, and a rapid equilibrium random bi-bi mechanism was proposed.⁴²

Furthermore, the purine riboside derivative KIN59 (5'-*O*-tritylinosine) showed a noncompetitive inhibition against human and *E. coli* TP. Kinetic studies revealed that KIN59 does not compete for the nucleoside or phosphate-binding site of the enzyme.⁴⁸ These findings may suggest the existence of an allosteric binding site different from the thymidine and phosphate-binding sites in HTP.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC) of substrates and products to recombinant HTP

ITC experiments were thus carried out to ascertain the order of substrate addition and product release. Additionally, ITC was employed to determine the relative affinities of the ligands to free HTP, measuring the amount of heat generated or consumed upon binary complex formation, at constant temperature and pressure. Measurements of heat released upon binding of the ligands (Fig. 6) allowed the determination of the binding enthalpy (ΔH°) of the process, the stoichiometry of the interaction (n) and the equilibrium association constant (K_a). The equilibrium dissociation constant (K_d) was calculated as the inverse of K_a . Furthermore, the entropy of the binding reaction (ΔS°) and the Gibbs free energy (ΔG°) were calculated from Eq. (7). Data were best fitted to one binding site model, assuming that ligands bind to dimeric HTP with the same affinity for all active sites. The ITC data for binding of ligands to HTP are summarized in Table 2. The overall binding assays showed that either substrates (dThd and P_i) (Fig. 6A and B) or products (thymine and 2dR1P) (Fig. 6C and D) can bind to free HTP enzyme. Although the initial velocity pattern of intersecting lines to the left of the y-axis (Fig. 5) suggested a sequential mechanism, whether the mechanism followed by HTP is steady-state ordered bi-bi or rapid equilibrium random bi-bi could not be determined. The ITC data demonstrate that the binding of substrates and products to HTP are random (Fig. 6).

Accordingly, the reaction catalyzed by HTP follows a rapid-equilibrium random bi-bi kinetic mechanism, in which both substrates can bind to free enzyme to form the catalytically competent ternary complex; and both products can randomly dissociate to yield free enzyme (Fig. 7). This mechanism is in agreement with TP from mouse liver⁴², for which a rapid-equilibrium random bi-bi mechanism has been reported. In contrast, a bi-bi ordered sequential mechanism has been reported for TP from *Escherichia coli*⁴³ and *Salmonella typhimurium*⁴⁴.

The dThd binding isotherm was not well defined to obtain an adequate stoichiometry value ($n = 0.2$). Nevertheless, for the P_i binding isotherm, the one binding site model yielded a value of 0.93 for n (Table 2), suggesting that almost all HTP active sites were occupied by

this ligand and that there is one molecule of P_i bound to each monomer of the homodimeric HTP. This result is consistent with the crystal structure analysis, in which a putative phosphate binding site has been shown in each monomer of HTP, located in the large α/β domain.³⁸ The ITC data for binding of dThd and P_i to HTP indicate thermodynamically favorable processes, since the ΔG° values for ligand-macromolecule binary complex formation are negative. The ITC data provide thermodynamic signatures of non-covalent interactions to each binding process.⁴⁹ Observed enthalpy changes arise primarily from hydrogen bonding and van der Waals interactions leading to each binary complex formation. The negative sign for ΔH° (exothermic process) suggests favorable redistribution of the network of interactions between the substrates (dThd and P_i) and HTP, including solvent (Table 2) also indicate a net favorable (negative enthalpy for both substrates. The favorable entropy (positive ΔS°) observed for P_i binding to HTP (Table 2) suggests that formation of this binary complex is accompanied by release of "bound" water molecules to the bulk solvent.⁴⁹ As a reduction in conformational states in either ligand or protein upon binary complex formation is entropically unfavourable (negative ΔS°), the positive ΔS° value for P_i binding to HTP may also suggest an increase in conformational states.⁴⁹ Structural and theoretical studies on *E. coli* TP have suggested that few movements occur after phosphate binding, especially a key hydrogen bond between His119 and Gly208 (His150 and Ala239 in HTP, respectively).³⁹ In contrast, unfavorable entropy (negative ΔS°) was observed for dThd binding, indicating that binary complex formation may be associated with conformational changes in either the ligand or protein, leading to a reduction in conformational states.⁴⁹ This finding is consistent with the crystal structures of HTP, as either the binding of substrate analogue TPI or thymine by themselves are sufficient to cause the full domain closure similar to the active form.^{25,36}

For both products binding isotherms, the n value was fixed as one according to the crystal structure analysis, in which a pyrimidine binding site has been observed to each subunit of the homodimeric HTP.³⁶ The dissociation constant (K_d) for 2dR1P is approximately six-fold lower than that of thymine (Table 2). On the other hand, the K_d value for dThd is three-fold lower than that of the P_i (Table 2). Interestingly, there appears to be no energy coupling between the binding of substrates as the K_d values for P_i and dThd (Table 2) are in the same range as their K_M values (Figure 5; $K_{dThd} = 66 \mu\text{M}$ and $K_{Pi} = 107 \mu\text{M}$). The negative ΔG° values for thymine or 2dR1P binding to free HTP show that these processes are favourable as for the dThd and P_i substrates (Table 2). Interestingly, the binding thermodynamic signatures of 2dR1P binding to HTP (negative ΔH° and positive ΔS°) are similar to P_i (Table 2). On the other hand, similar thermodynamic signatures were observed for dThd substrate and thymine product (Table 2), in which the favorable redistribution of network of interactions upon binary complex formation appears to be accompanied by a reduction in conformational states in either ligand or protein (negative ΔS°). It is tempting to suggest that the latter is likely related to tridimensional conformational changes occurring upon binary complex formation to form the closed active site.²⁵

Table 2. Thermodynamic parameters of ligands binding to HTP.^a

Ligands	n	K_a (M^{-1})	ΔH° (kcal mol ⁻¹)	ΔS° (cal mol ⁻¹ deg ⁻¹)	ΔG° (kcal mol ⁻¹)	K_d (μM)
dThd	0.2	$2.1 (\pm 0.4) \times 10^4$	-1.2 ± 0.5	-20.4 ± 8.8	-6.1 ± 2.6	47 ± 9
P_i	0.93	$7.0 (\pm 1.6) \times 10^3$	-3.3 ± 1.1	7.0 ± 2.3	-5.5 ± 1.8	142 ± 32
Thymine	1	$6.4 (\pm 0.6) \times 10^3$	-7.1 ± 0.3	-5.4 ± 0.5	-5.4 ± 0.5	155 ± 9
2dR1P	1	$4.4 (\pm 1.0) \times 10^4$	-4.0 ± 0.2	8.2 ± 1.9	-6.6 ± 1.6	23 ± 5

^a n = number of sites, K_a = association constant; ΔH° = binding enthalpy, ΔS° = binding

entropy, ΔG° = Gibbs free energy, K_d = dissociation constant.

pH-rate profiles

The pH dependence of k_{cat} and k_{cat}/K_M for dThd and P_i were determined to probe acid/base chemistry in HTP mode of action. The pH-rate profiles (Fig. 8) were bell-shaped for $k_{\text{cat}}/K_{\text{dThd}}$ (Fig. 8B) and k_{cat}/K_{P_i} (Fig. 8C) analysis, and the data were thus fitted to Eq. (8). The bell-shaped pH-rate profiles showed slope values of + 1 for the acidic limb and – 1 for the basic limb, indicating participation of a single ionizable group in each limb (Fig. 8B and Fig. 8C). The data from pH 5.5 for k_{cat}/K_{P_i} were not included in the analysis as the saturation curve was sigmoidal rather than hyperbolic.

The pH-rate profile for k_{cat} shows an increase in catalytic rate at low pH values (Fig. 8A). Although the enzyme has shown the maximal activity at low pH, the substrate affinities were reduced at both low and high pHs (Fig. 8B and Fig. 8B). Notwithstanding, the pH dependence of k_{cat} (Fig. 8A) could not be fitted to the bell-shaped pH-rate equation or to other usually observed pH-rate profiles.⁴⁶ It could be argued that the pH-rate profile for k_{cat} (Fig. 8A) suggests a linear portion with slope of – 1 between low and large pH values, in which there would be, respectively, optimum enzyme activity and partial HTP activity (two apparent pKs). However, the data (Fig. 8A) are poorly defined and no reliable estimates could be obtained. In any case, the rather unusual dependence of k_{cat} on pH values suggests that HTP catalysis is more favorable with protonation of an amino acid residue and its unprotonation is detrimental to enzyme catalysis. Targeted molecular dynamics results suggest that in doubly protonated His85 of *E. coli* TP (His116 for HTP), the $\delta 1$ (N-1) proton is hydrogen bonded to the phosphate and the $\epsilon 2$ (N-3) proton could be involved in protonation of O-2 of thymidine.⁵⁰ On the other hand, it has been proposed that His116 plays a role in either stabilizing the transition state during catalysis or in donating a proton to the N-1 of the pyrimidine ring following glycosidic cleavage.²⁵ Crystal structure of HTP in complex with the small inhibitor TPI showed its participation in a proton shuttling mechanism, where Asp114, Glu225 and Lys222 form a triad delivering proton to His116.²⁵ Mutational studies of His116 to a

phenylalanine or a lysine revealed a severe effect on HTP as both mutations completely abolish the enzymatic activity.³⁷ In addition, it has been pointed that the optimum pH for dThd cleavage was close to 5.5,⁵¹ and the maximal activity of the enzyme was at pHs 6.0 and 6.3 for, respectively, *Lactobacillus casei* TP⁴⁵ and *E. coli* TP.⁴³ However, the results here presented cannot provide any pK_a value for k_{cat} , at most they indicate that the maximal rate activity was achieved at low pH.

The pH-rate profile for k_{cat}/K_{dThd} indicates that protonation of a group with pK_a of 5.2 (± 0.5) and deprotonation of a group with pK_a of 9.0 (± 0.8) abolish the ability of dThd to bind and react (Fig. 8B). Crystal structures of HTP in complex with the small molecule inhibitor TPI,²⁵ the natural product thymine,³⁶ and the substrate 5-iodouracil (5IUR)³⁷ demonstrate that the side chain of His116 has been shown to be involved in HTP pyrimidine binding site, which is, in turn, the thymidine binding site. His116 belongs to the α/β domain of the HTP active site where is located the phosphate binding site, and hydrogen bonds are made between TPI/thymine/5IUR and residues. The thymine binding is similar to the 5-chlorouracil of TPI, in which the methyl group of thymine was replaced with chlorine. Moreover, His116 directly interacts with 5IUR via its $\epsilon 2$ (N-3) group. The structural analysis of *Bacillus stearothermophilus* PyNP in complex with the substrate analogue pseudouridine in its active site showed that His82 (His116 in HTP) makes a hydrogen-bonding network with the uracil moiety of the substrate analogue.³⁹ Given these observations, the side chain of His116 seems to be a likely candidate for the group with pK_a value of 5.1 that must be unprotonated to interact with dThd in HTP active site. Accordingly, His116 appears to be important not only enzyme catalysis but also for substrate binding. The crystal structures have also demonstrated that the side chain of Lys221 interacts directly with TPI/thymine/5IUR through hydrogen bonds. Differently to His116, Lys221 belongs to the α domain, in which the pyrimidine binding site is located, as the other residues that are involved in TPI/thymine/5IUR binding. It

suggests that the side chain of Lys221 is a likely candidate for a group with pK_a value of 9.0 that must be protonated for pyrimidine binding to occur. Although none of the HTP crystal structures solved to date is in complex with the natural substrate thymidine and there are no data showing the amino acid residues involved in the interaction between HTP and thymidine, the results here presented suggest that Lys221 is likely to interact with dThD in a similar manner as shown for TPI/thymine/5IUR.^{25,36,37}

The pH-rate profile for k_{cat}/K_{P_i} indicates that a group with pK_a of 6.1 (± 0.6) must be unprotonated and a group with pK_a of 7.8 (± 0.8) must be protonated for P_i binding to occur. The side chain of Lys81 has been shown to be involved in *Bacillus stearotherophilus* PyNP phosphate binding site,³⁹ corresponding to Lys115 in HTP. Besides, the side chain of Lys84 has been pointed as putative phosphate binding site in *E. coli* TP,³⁸ corresponding to Lys115 in HTP. It is thus tempting to suggest that ϵ -amino group of Lys115 is a likely candidate for the residue with a pK_a value of 7.8 (± 0.8) whose protonation abolishes phosphate binding. The pH-rate data are in agreement with site-directed mutagenesis and kinetic analysis, showing that lysates of Lys115Glu HTP mutant expressed in COS cells have no detectable HTP activity.¹¹ The bell-shaped pH profile for k_{cat}/K_{P_i} also showed participation of a single ionizable group with pK_a of 6.1 (± 0.6) that has to be unprotonated for P_i binding. Although the other amino acid residues reported to be involved in P_i binding do not have ionizable side chains, it is possible that the this group with a pK_a value of 6.1 is an ionizable group of phosphate.

Conclusions

As HTP is a key enzyme involved in pyrimidine metabolism and its activity appears to be essential for angiogenesis in certain tumors, the biochemical studies on HTP mode of action

are worth pursuing. Interest in HTP inhibitors has been considerably renewed in the last years and different strategies have been followed to design new and potent inhibitors. Inhibition of the enzyme activity has been investigated as a chemotherapeutic strategy to decrease angiogenesis, slow tumor growth, and reduce metastases.⁹ In addition, inhibitors of HTP could be useful since tumors depend on the nucleotide salvage pathway for their proliferation.⁵² The most potent and effective inhibitors take advantage of enzyme chemistry to achieve inhibition. The catalytic chemistry of enzymes is the key to designing potent inhibitors and makes them a special class of drug targets.⁵³ Mechanistic analysis should thus be a top priority for enzyme-targeted drug design programs.

Here, we present an efficient method to obtain homogeneous recombinant HTP. Initial velocity and isothermal calorimetry studies demonstrated that HTP follows a rapid-equilibrium random bi-bi kinetic mechanism. Amino acid residues involved in either catalysis or substrate binding were proposed based on pH-rate profiles, suggesting that the His116 appears to be essential for both enzyme catalysis and dThd binding. An improved understanding of the mode of action of HTP may be useful to medicinal chemists and chemical biologists. The former would benefit from an improved understanding of HTP mode of action to design potent enzyme inhibitors to be tested as chemotherapeutic agents, and the latter would be interested in these compounds to carry out loss-of-function experiments to reveal the biological role of HTP in angiogenesis and other biological processes such as apoptosis and metastasis.

Experimental procedures

Tissue sample

A single specimen of colorectal tumor tissue was obtained from a patient who underwent surgical treatment at the Hospital São Lucas, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS) in agreement with the purpose of the study. The research project was approved by Human Studies and Ethics (CEP) under protocol number 11/05429.

Gene amplification and cloning

The *TYMP* gene (NM_001953.4) was PCR amplified from the cDNA synthesized by RT-PCR amplification of total RNA isolated from colorectal tumor specimen as previously described.⁵⁴ The synthetic oligonucleotides used for amplification of the coding sequence (residues 11 – 482) (forward primer, 5'-GAC ATA TGG CCC CAC CCG CGC CTG GTG ACT T-3'; and reverse primer, 3'-AAA AGC TTT CAT TGC TGC GGC GGC AGA ACG AGC-5') were designed to contain, respectively, *Nde*I and *Hind*III (New England Biolabs) restriction sites (underlined). The DNA fragment was amplified using *Pfu* DNA polymerase in the presence of 5% dimethyl sulfoxide (DMSO; final concentration). The PCR product was detected on 1% agarose gel, and a 1415-bp band was purified utilizing the Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). The purified fragment was cloned into pCR-Blunt® vector (Invitrogen) and, subsequently, subcloned into pET-23a(+) expression vector (Novagen), previously digested with *Nde*I and *Hind*III restriction enzymes. The coding *TYMP* gene sequence was determined by automated DNA sequencing to confirm sequence identity and the absence of mutations in the cloned fragment.

Expression, purification and absorption coefficient determination of recombinant HTP

The pET-23a(+):*TYMP* recombinant plasmid was transformed into *E. coli* Rosetta (DE3) competent cells (Novagem) and selected on Luria-Bertani (LB) agar plates containing 50 µg mL⁻¹ ampicillin and 34 µg mL⁻¹ chloramphenicol. A single colony was grown in 50 mL of LB medium containing the same antibiotics at 37°C. Aliquots of this culture (12 mL) was used to inoculate Terrific Broth (TB) medium (4 x 500 mL, containing the same antibiotics) and grown for 24 h at 37°C and 180 rpm after reaching an OD_{600nm} 0.4 – 0.6. Recombinant HTP protein expression was achieved without IPTG induction. The cells (29 g) were collected by centrifugation at 11,800 g for 30 min at 4°C and stored at – 20°C. The same procedure was employed for *E. coli* Rosetta (DE3) cells transformed with pET-23a(+) without the *TYMP* gene as negative control. The expression of soluble and insoluble protein was confirmed by 12% SDS – PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue.⁵⁵

All purification steps were performed using an ÄKTA system (GE Healthcare) in a cold room at 4°C, and protein elution was monitored by UV detection. Approximately 7.6 g of frozen cells were resuspended in 76 mL of 50 mM Tris pH 7.5 (buffer A) and incubated with 0.2 mg mL⁻¹ of lysozyme (Sigma – Aldrich) for 30 min with stirring. The cells were disrupted by sonication with 10 pulses of 10 s each at 60% amplitude with 13 mm probe, and centrifuged at 48,000 g for 30 min to remove cell debris. The supernatant was treated with 1% (wt/vol) streptomycin sulfate (Sigma – Aldrich), stirred for 30 min to precipitate nucleic acids, and centrifuged at 48,000 g for 30 min. The resulting supernatant containing the soluble HTP was dialyzed against buffer A 3 x 2 L (2.5 h each), and clarified by centrifugation at 48,000 g for 30 min. The sample was loaded on an anion exchange chromatographic column (Q-Sepharose Fast Flow, GE Healthcare), pre-equilibrated with buffer A, washed with 5 column volumes (CV) of buffer A, and proteins were eluted with 20 CV linear gradient (0 – 100%) of 50 mM Tris 500 mM NaCl pH 7.5 (buffer B) at a 1 mL min⁻¹ flow rate. All fractions were analyzed by 12% SDS – PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue, and the

fractions containing the recombinant enzyme were pooled and dialyzed against 3 x 2 L (2.5 h each) of buffer A. Ammonium sulfate was added to the dialyzed fractions to a final concentration of 700 mM, and centrifuged at 48,000 *g* for 30 min. The supernatant was loaded on a hydrophobic interaction chromatographic column (HiLoad Phenyl Sepharose High performance, GE Healthcare), pre-equilibrated with 50 mM Tris 700 mM (NH₄)₂SO₄ pH 7.5 (buffer C). The column was washed with 5 CV of buffer C, and proteins were eluted with 20 CV linear gradient (0 – 100%) of buffer A at a 1 mL min⁻¹ flow rate, yielding homogeneous HTP recombinant protein, as inferred by 12% SDS – PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue. The eluted fractions were dialyzed against buffer A 3 x 2 L (2.5 h each) and stored at – 80°C. Pooled fractions of all purification steps were analyzed by 12% SDS – PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue. Protein concentration was determined either by the method of Bradford⁵⁶ or by direct absorbance measurement. A value of 29,512 M⁻¹ cm⁻¹ for the molar absorption coefficient at 280 nm ($\epsilon_{280\text{nm}}$) of HTP in buffer A at 37°C was determined using the method of Edelhoch.^{57,58}

Determination of HTP molecular mass by MS

Intact protein analysis was performed by direct injection of HTP samples (reconstituted in acetonitrile 50%: water 48%: formic acid 2%) into an IonMax electrospray ion source. We applied 4.5 kV in positive ion mode, 200 °C of capillary temperature and 50 V of tube lens voltage. High-resolution spectra (800-200 *m/z* range) were collected in FTMS mode using an Orbitrap analyzer (Thermo Discovery XL) at a nominal resolution of 30,000. Charge state deconvolution of averaged data from 1000 spectra were performed using the software MagTran.⁵⁹

Primary structure analysis of HTP by mass spectrometry (MS)

Samples of purified HTP (1 nmol) were trypsin digested using a protocol adapted from Klammer & MacCoss (2006).⁶⁰ The resulting peptide mixtures were subjected to nanochromatography (nanoLC Ultra 1D plus - Eksigent, USA) using a home-made capillary column (15 cm in length, 150 μm i.d., Kinetex C18 core-shell particles – Phenomenex, Inc.). The eluted peptides were detected using an LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer (Thermo Electron Corporation). MS/MS fragmentation was performed using collision-induced dissociation (CID) with an activation Q of 0.250, an activation time of 30.0 ms, and an isolation width of 1.0 Da. The searches were performed against the human proteome. We allowed a precursor tolerance of 10 ppm, a fragment tolerance of 0.8 Da, static carbamidomethylation on cysteines, and dynamic oxidation on methionine residues.

Determination of oligomeric state of HTP in solution

The molecular mass of recombinant HTP was determined by gel filtration chromatography using a Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) size exclusion column, pre-equilibrated with 50 mM Tris pH 7.5 buffer, containing 200 mM NaCl, and a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. The LMW and HMW Gel filtration Calibrations Kits (GE Healthcare) were used as the protein mass molecular standards in the calibration curve construction. The elution volumes (V_e) of protein standards (ferritin, catalase, aldolase, coalbumin, ovoalbumin, ribonuclease A) were used to calculate their corresponding partition coefficient (K_{AV}) according to Eq. (1). Blue dextran 2000 (GE Healthcare) was used to determine the void volume (V_0) and V_t is the total bead volume of the column. The K_{AV} value for each standard protein was plotted against the logarithm of their molecular mass, yielding a linear function with values for the y-intercept and the slope given in Eq. (2). Protein elution was monitored at 215, 254, and 280 nm.

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$K_{AV} = 0.9669 - 0.3087 \log(kDa) \quad \text{Eq. (2)}$$

HTP enzymatic assay

All chemicals in enzyme activity measurements were purchased from Sigma Aldrich. HTP activity was measured for all purification steps in the forward direction, using a continuous spectrophotometric rate assay in a 1.0 cm path length quartz cuvette on a UV-2550 UV/Vis spectrophotometer (Shimadzu). All activity assays were performed using 67 nM of homogenous HTP in 50 mM Tris pH 7.5, varying concentrations of thymidine (dThd) and phosphate (P_i) at 37°C for 60 s in a final volume of 0.5 mL. The reaction progress was monitored by the decrease in absorbance upon conversion of dThd to thymine at 290 nm. The molar absorption extinction coefficient at 290 nm ($\epsilon_{290\text{nm}}$) was determined under the standard assay conditions by direct absorbance measurements. A value of 2,000 M⁻¹ cm⁻¹ for the molar absorption coefficient at 290 nm ($\epsilon_{290\text{nm}}$) was determined by the difference in the molar extinction coefficient between dThd and thymine and it was employed to calculate the rate of HTP-catalyzed chemical reaction. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that converts 1 μmol each of dThd and P_i to thymine and 2dR1P per minute at pH 7.5 at 37°C.

Determination of apparent steady-state kinetic constants and initial velocity patterns

To determine the apparent steady-state kinetic constants, HTP activity was monitored at varying concentrations of dThd (50 – 900 μM) and fixed-saturating concentration of P_i (2

mM), and at varying concentration of P_i (100 – 1000 μM) and a fixed-saturating concentration of dThd (400 μM) under the standard condition assay. The data were either fitted by non-linear regression analysis to the Michaelis-Menten equation⁴⁰ (Eq. (3)) for a hyperbolic saturation curve, or to the substrate inhibition equation⁴⁶ (Eq. (4)) in which v is the steady-state velocity, V_{\max} is the maximal rate, S is the substrate concentration, K_M is the Michaelis constant, and K_i is the dissociation constant for substrate inhibition. The k_{cat} values were calculated from Eq. (5).⁴⁰

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S] \left(1 + \frac{[S]}{K_i} \right)} \quad \text{Eq. (4)}$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{[E]_t} \quad \text{Eq. (5)}$$

To determine the true steady-state kinetic parameters and the enzyme kinetic mechanism (patterns in double-reciprocal plots) for dThd and P_i , initial velocity measurements were carried out in duplicates for varying one substrate concentrations in the presence of fixed-varied concentrations of the other substrate. Accordingly, saturating curves were performed in the presence of varying concentrations of dThd (50, 100, 200, 300, and 500 μM) at several fixed-varied concentrations of P_i (70, 100, 150, 200, 400, and 1000 μM). Data from initial

velocity double reciprocal plots of lines intersecting to the left of the y -axis were fitted to Eq. (6), which describes a mechanism involving ternary complex formation and sequential substrate binding,⁴⁰ using SigmaPlot 10 Software.

$$v = \frac{VAB}{K_{ia}K_b + K_aB + K_bA + AB} \quad \text{Eq. (6)}$$

For Eq. (6), v is the measured steady-state velocity, V is the maximal velocity, A and B are the concentrations of the substrates (dThd and P_i), K_a and K_b are their respective Michaelis constant, and K_{ia} is the dissociation constant for enzyme-substrate A binary complex formation.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

Ligand binding assays were carried out using the iTC200 Microcalorimeter (Microcal, Inc., Northampton, MA). Reference cell (200 μ L) was loaded with Milli Q water during all experiments and the sample cell (200 μ L) was filled with recombinant HTP at a concentration of 88 μ M or 104 μ M, in buffer A. The same buffer was used to prepare all solutions of ligands. The injection syringe (39,7 μ L) was filled with substrates or products at different concentrations (dThd 1 mM, P_i 3 mM, Thymine 5 mM, and 2dR1P 3.5 mM) and the ligand bindings were measured by direct titration of ligand into macromolecule. The stirring speed was 500 rpm and the temperature was set to 37°C for all binding experiments. The first injection (0.5 μ L) was discarded in the data analysis and was followed by 19 injections of 2.0 μ L each, at 180 s intervals. Control titrations (ligand into buffer A) were performed to subtract the heats of dilution and mixing for each experiment prior to data analysis. ITC data were evaluated using the Origin 7 SR4 software (Microcal, Inc). All data were fitted to Eq. (7), in which ΔH° is the enthalpy of binding, ΔG° is the Gibbs free energy change, ΔS° is the

entropy change, T is the absolute temperature in Kelvin, R is the gas constant (1.987 cal K⁻¹ mol⁻¹), and K_a is the equilibrium association constant. The initial estimates for n , K_a and ΔH° parameters were provided in the software by standard Marquardt non-linear regression method. The equilibrium dissociation constant, K_d , was calculated as the inverse of K_a .

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_a = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad \text{Eq. (7)}$$

pH-rate profiles

The dependence of kinetic parameters on pH was determined by measuring initial velocities in the presence of varying concentrations of one substrate at saturating level of the other, in a buffer mixture of 500 mM 2-(*N*-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES)/*N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES)/2-(*N*-cyclohexylamino)-ethanesulfonic acid (CHES) over the following pH values: pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, and 9.0.⁴⁶ As the K_M values changed as a function of pH, different concentration ranges of the variable substrate and the fixed substrate were employed. For all pH tested, 40 nM of recombinant HTP was used in a final volume of 0.5 mL, except at pH 9.0, in which the final enzyme concentration was 80 nM when dThd was the fixed substrate due to low activity. The experimental conditions were as follows: at pH 5.5 (50 – 600 μ M varying dThd concentration and fixed concentration of P_i at 10 mM, and 2 – 10 mM varying P_i concentration and fixed concentration of dThd at 500 μ M), pH 6.0 (30 – 500 μ M varying dThd concentration and fixed concentration of P_i at 5 mM, and 100 – 5000 μ M varying P_i concentration and fixed concentration of dThd at 400 μ M), pH 6.5 (30 – 500 μ M varying dThd concentration and fixed concentration of P_i at 2 mM, and 50 – 1800 μ M varying P_i concentration and fixed concentration of dThd at 400 μ M), pH 7.0 (30 – 300 μ M varying dThd concentration and fixed concentration of P_i at 2 mM, and 50 – 1600 μ M varying P_i concentration and fixed

concentration of dThd at 300 μM), pH 7.5 (30 – 400 μM varying dThd concentration and fixed concentration of P_i at 2 mM, and 50 – 1600 μM varying P_i concentration and fixed concentration of dThd at 300 μM), pH 8.0 (30 – 300 μM varying dThd concentration and fixed concentration of P_i at 2 mM, and 50 – 1800 μM varying P_i concentration and fixed concentration of dThd at 300 μM), pH 8.5 (30 – 300 μM varying dThd concentration and fixed concentration of P_i at 3 mM, and 100 – 1600 μM varying P_i concentration and fixed concentration of dThd at 300 μM), and pH 9.0 (30 – 400 μM varying dThd concentration and fixed concentration of P_i at 10 mM, and 1 – 8 mM varying P_i concentration and fixed concentration of dThd at 300 μM).

The data for pH-rate profiles data for $\log k_{\text{cat}}/K_M$ were fitted to Eq. (8) using SigmaPlot 10 Software. This equation describes a bell-shaped pH profile for a single ionizable group (slope of 1 for the acidic limb) that must be unprotonated for binding/catalysis and another single ionizable group (slope of - 1 for the basic limb) that must be protonated for binding/catalysis to occur. For Eq. (8), y is the kinetic parameter, C is the pH-independent value of y , H is the hydrogen ion concentration, and K_a and K_b are, respectively, the apparent acid and base dissociation constants for ionizing groups.⁴⁶

$$\log y = \log \left(\frac{C}{1 + \frac{H}{K_a} + \frac{K_b}{H}} \right) \quad \text{Eq. (8)}$$

Acknowledgements

This work was supported by funds awarded by Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPES to National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (INCT-TB) to D.S.S. and L.A.B. L.A.B. and D.S.S. also acknowledge financial support awarded by FAPERGS-CNPq-PRONEX-2009. L.A.B. (CNPq, 520182/99-5) and D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06) are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). L.K.B.M is a post-doctoral fellow of CNPq/FAPERGS. C.D acknowledges a PhD scholarship awarded by CAPES and D.C.R. acknowledges a PhD scholarship awarded CNPq.

References

- 1 M. H. el Kouni, M. M. el Kouni and F. N. M. Naguib, *Cancer Res.*, 1993, **53**, 3687-3693.
- 2 K. Usuki, J. Saras, J. Waltenberger, K. Miyazono, G. Pierce, A. Thomason and C. H. Heldin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, **184**, 1311-1316.
- 3 L. Griffiths and I. J. Stratford, *Br. J. Cancer*, 1997, **76**, 689-693.
- 4 C. H. Heldin, K. Usuki and K. Miyazono, *J. Cell. Biochem.*, 1991, **47**, 208-210.
- 5 A. Bronckaers, F. Gago, J. Balzarini and S. Lienkens, *Med. Res. Rev.*, 2009, **29**, 903-953.
- 6 T. A. Krenitsky, *J. Biol. Chem.*, 1968, **243**, 2871-2875.
- 7 M. Schwartz, *Eur. J. Biochem.*, 1971, **21**, 191-198.
- 8 I. V. Bijnsdorp, M. de Bruin, A. C. Laan, M. Fukushima and G. J. Peters, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 2008, **27**, 681-691.
- 9 F. Fochoer and S. Spadari, *Curr. Cancer Drug. Targets*, 2001, **1**, 141-153
- 10 A. Moghaddam, H. T. Zhang, T. P. Fan, D. E. Hu, V. C. Lees, H. Turley, S. B. Fox, K. C. Gatter, A. L. Harris and R. Bicknell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 998-1002.
- 11 K. Miyadera, T. Sumizawa, M. Haraguchi, H. Yoshida, W. Konstanty, Y. Yamada and S. Akiyama, *Cancer Res.*, 1995, **55**, 1687-1690.
- 12 T. Sumizawa, T. Furukawa, M. Haraguchi, A. Yoshimura, A. Takeyasu, M. Ishizawa, Y. Yamada and S. Akiyama S, *J. Biochem.*, 1993, **114**, 9-14.
- 13 K. A. Hotchkiss, A. W. Ashton and E. L. Schwartz, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 19272-19279.
- 14 M. de Bruin, K. Smid, A. C. Laan, P. Noordhuis, M. Fukushima, K. Hoekman, H. M. Pinedo and G. J. Peters, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, **301**, 675-679.
- 15 C. Desgranges, G. Razaka, M. Rabaud and H. Bricaud, *Biochem. Biophys. Acta*, 1981, **654**, 211-218.

- 16 I. V. Bijnsdorp, K. Azijli, E. E. Jansen, M. M. Wamelink, C. Jakobs C, E. A. Struys, M. Fukushima, F. A. Kruyt and G. J. Peters, *Biochem. Pharmacol.*, 2010, **80**, 786-792.
- 17 M. J. Pérez-Pérez, E. M. Priego, A. I. Hernández, M. J. Camarasa, J. Balzarini and S. Liekens, *Mini Rev. Med. Chem.*, 2005, **5**, 1113-1123.
- 18 C. Cole, A. J. Foster, S. Freeman, M. Jaffar, P. E. Murray and I. J. Stratford, *Anticancer Drug. Des.*, 1999, **14**, 383-392.
- 19 S. Akiyama, T. Furukawa, T. Sumizawa, Y. Takebayashi, Y. Nakajima, S. Shimaoka and M. Haraguchi, *Cancer Sci.*, 2004, **95**, 851-857.
- 20 M. Toi, R. M. Atiqur, H. Bando and L. W. Chow, *Lancet Oncol.*, 2005, **6**, 158-166.
- 21 S. Matsushita, T. Nitanda, T. Furukawa, T. Sumizawa, A. Tani, K. Nishimoto, S. Akiba, K. Miyadera, M. Fukushima, Y. Yamada, H. Yoshida, T. Kansaki and S. Akiyama, *Cancer Res.*, 1999, **59**, 1911-1916.
- 22 M. L. Price, W. C. Guida, T. E. Jackson, J. A. Nydick, P. L. Gladstone, J. C. Juarez, F. Doñate and R. J. Ternansky, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 107-110.
- 23 P. Reigan, A. Gbaj, E. Chinje, I. J. Stratford, K. T. Douglas and S. Freeman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 5247-5250.
- 24 M. Rajabi, D. Mansell, S. Freeman and R. A. Bryce, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 1165-1171.
- 25 R. A. Normam, S. T. Barry, M. Bate, J. Breed, J. G. Colls, R. J. Ernill, R. W. Luke, C. A. Minshull, M. S. McAlister, E. J. McCall, H. H. McMiken, D. S. Paterson, D. Timms, J. A. Turcker and R. A. Pauptit, *Structure*, 2004, **12**, 75-84.
- 26 V.A. McNally, A. Gbaj, K T. Douglas, I. J. Stratford, M. Jaffar, S. Freeman and R. A. Bryce, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 3705-3709.
- 27 M. R. Birck and V. L. Schramm, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 2447-2453.

- 28 P. A. Schwartz, M. J. Vetticatt and V. L. Schramm, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 13425-13433.
- 29 P.R. Winship, *Nucleic. Acids Res.*, 1989, **17**, 1266.
- 30 K. Hagiwara, G. Stenman Honda, P. Sahlin, A. Andersson, K. Miyazono, C. H. Heldin, F. Ishikawa and F. Takaku, *Mol. Cell. Biol.*, 1991, **11**, 2125-2132.
- 31 D. Renck, R. G. Ducati, M. S. Palma, D. S. Santos and L. A. Basso, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2010, **497**, 35-42.
- 32 L. K. B. Martinelli, R. G. Ducati, L. A. Rosado, A. Breda, B. P. Selbach, D. S. Santos and L. A. Basso, *Mol. Biosyst.*, 2011, **7**, 1289-1305.
- 33 K. C. Kelley, K. J. Huestis, D.A. Austen, C. T. Sanderson, M. A. Donohue, S. K. Stickel, E. S. Kawasaki and M. S. Osburne, *Gene*, 1995, **156**, 33-36.
- 34 T. H. Grossman, E. S. Kawasaki, S. R. Punreddy and M. S. Osburne, *Gene*, 1998, **209**, 95-103.
- 35 F. W. Studier, *Protein. Expr. Purif.*, 2005, **41**, 207-234.
- 36 K. el Omari, A. Bronckaers, S. Lienkens, M. J. Pérez-Pérez, J. Balzarini and D. K. Stammers, *Biochem. J.*, 2006, **399**, 199-204.
- 37 E. Mitsiki, A. C. Papageorgiou, S. Iyer, N. Thiyagarajan, S. H. Prior, D. Sleep, C. Finnis and K. R. Acharya, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, **386**, 666-670.
- 38 M. R. Walter, W. J. Cook, L. B. Cole, S. A. Short, G. W. Kozalka, T. A. Krenitsky and S. E. Ealick, *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 14016-14022.
- 39 M. J. Pugmire and S. E. Ealick, *Structure*, 1998, **6**, 1467-1479.
- 40 I. H. Segel, *Enzyme Kinetics – Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1975, 957p.
- 41 T. W. Traut, *Mol. Cell. Biochem*, 1994, **140**, 1-22.
- 42 M. H. Iltzsch, M. H. el Kouni and S. Cha S, *Biochemistry*, 1985, **24**, 6799-6807.

- 43 M. Schwartz, *Eur. J. Biochem.*, 1971, **21**, 191-198.
- 44 J. G. Blank and P. A. Hoffee, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1975, **168**, 259-265.
- 45 Y. Avraham, N. Grossowicz and J. Yashphe, *Biochem. Biophys. Acta*, 1990, **1040**, 287-293.
- 46 P. F. Cook and W. W. Cleland, *Enzyme Kinetics and Mechanism*, Garland Science Publishing, New York, 2007, 404p.
- 47 I. J. MacRae and I. H. Segel, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, **361**, 277-282.
- 48 S. Liekens, A. I. Hernández, D. Ribatti, E. De Clercq, M. J. Camarasa, M. J. Pérez-Pérez and J. Balzarini, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 29598-29605.
- 49 J. E. Ladbury and M. L. Doyle, in *Biocalorimetry II*, ed. Wiley, London, 1st ed., 2004, 259.
- 50 J. Mendieta, S. Martín-Santamaría, E. M. Priego, J. Balzarini, M. J. Camarasa, M. J. Pérez-Pérez and F. Gago, *Biochemistry*, 2004, **43**, 405-414.
- 51 T. A. Krenitsky, J. W. Mellors and R. K. Barclay. *J. Biol. Chem.*, 1965, **240**, 1281-286.
- 52 P. M. Schwartz and L. M. Milstone, *Biochem. Pharmacol.*, 1988, **37**, 353-355.
- 53 J. G. Robertson, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2007, **17**, 674-679.
- 54 C. Deves , D. Renck, B. Garicochea, V. D. da Silva, T. G. Lopes, H. Fillman, L. Fillman, S. Lunardini, L. A. Basso, D. S. Santos and E. L. Batista Jr., *Virchows Arch.*, 2011, **4**, 421-430.
- 55 U.K. Laemmli, *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
- 56 M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.
- 57 H. Edelhoch, *Biochemistry*, 1967, **6**, 1948-1954.
- 58 C. N. Pace, F. Vjados, L. Fee, G. Grimsley and T. Gray, *Protein Sci.*, 1995, **4**, 2411-2423.
- 59 Z. Zhang and A. G. Marshall, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 1998, **9**, 225-233.
- 60 A. A. Klammer and M. J. MacCoss, *J. Proteom. Res.*, 2006, **5**, 695-700.

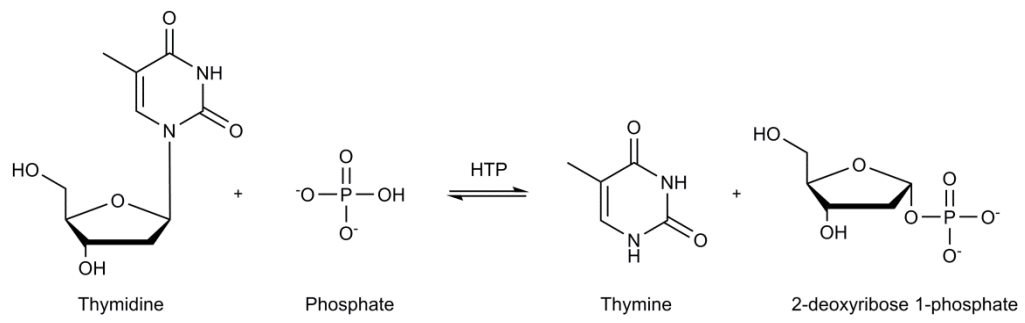
Figure 1. Chemical reaction catalyzed by HTP.

Figure 2. SDS-PAGE (12%) analyses for the two chromatographic steps of purification of recombinant HTP. Lane 1, Molecular Weight Page Ruler Marker (Fermentas); lane 2, crude extract; lane 3, Q-Sepharose Fast Flow anion exchange elution; lane 4, HiLoad Phenyl Sepharose High Performance hydrophobic interaction elution.

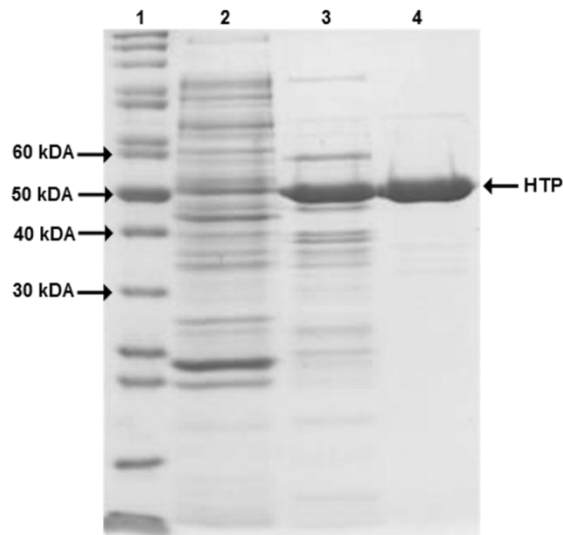


Figure 3. Determination of HTP molecular mass by mass spectrometry analysis. (A) ESI-FTMS spectra with HTP charge state distribution from 26+ to 63+. (B) Deconvoluted spectra of HTP resulted in a peak corresponding to a molecular mass value of 48,853 Da.

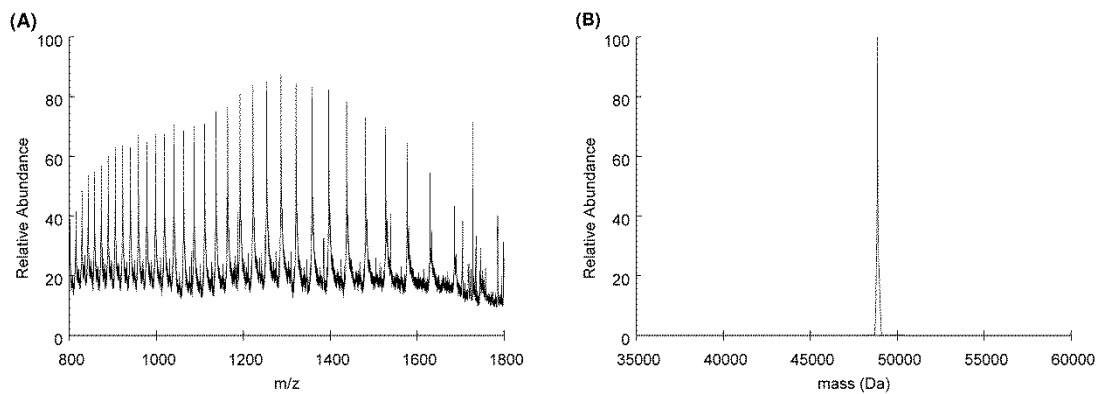


Figure 4. Determination of apparent steady-state kinetic constants. (A) Hyperbolic dependence of specific activity of recombinant HTP on increasing P_i concentrations at fixed concentration of dThd (400 μM). (B) Dependence of HTP specific activity on increasing dThd concentrations at fixed concentration of P_i (2 mM), showing dThd substrate inhibition.

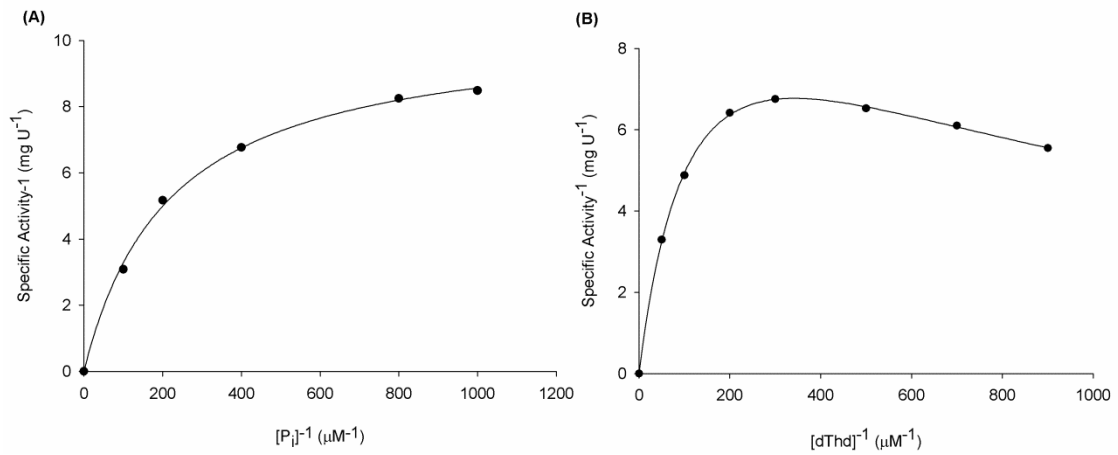


Fig. 5. Intersecting initial velocity patterns for HTP with either dThd (A) or P_i (B) as the variable substrate. Each curve represents fixed-varying levels of the co-substrate.

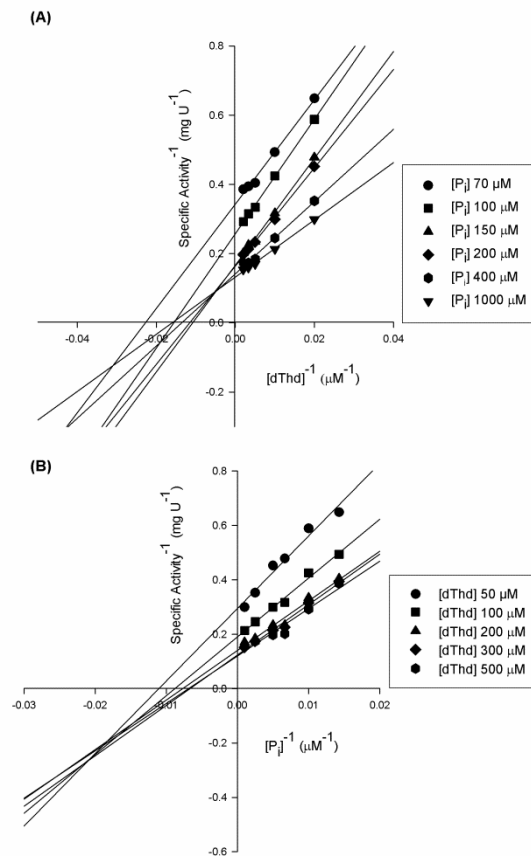


Fig. 6. Isothermal titration calorimetric (ITC) curves for binding of ligands to HTP. (A) Titration of dThd at a final concentration of 165 μM . (B) Titration of P_i at a final concentration of 497 μM . (C) Titration of thymine at a final concentration of 828 μM . (D) Titration of 2dR1P at a final concentration of 580 μM .

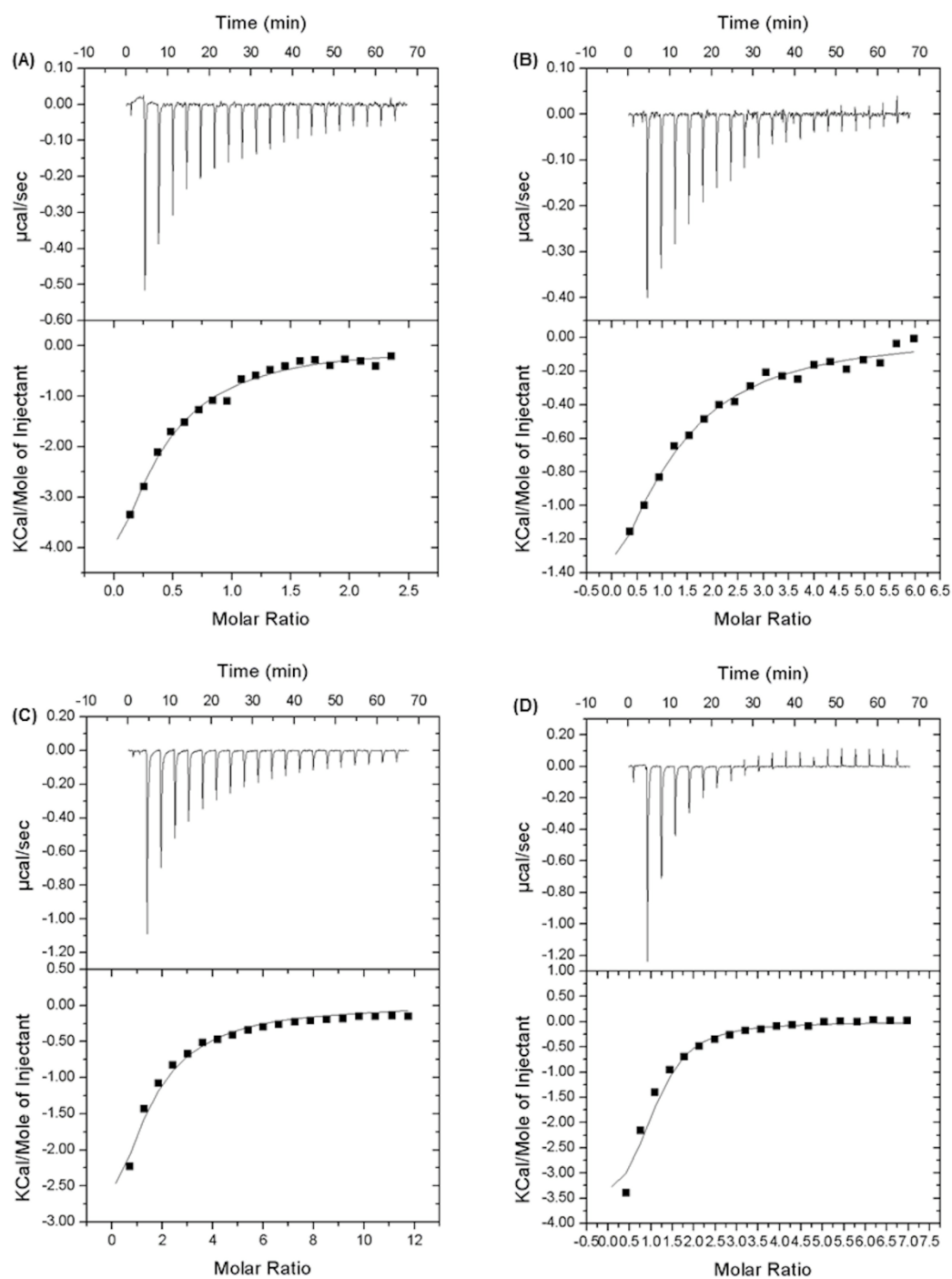


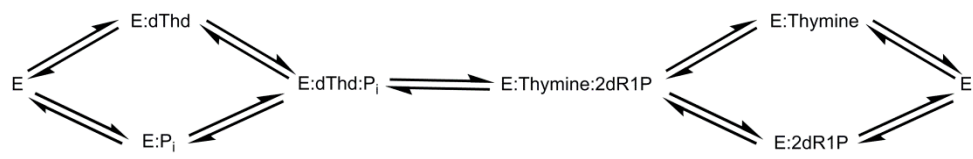
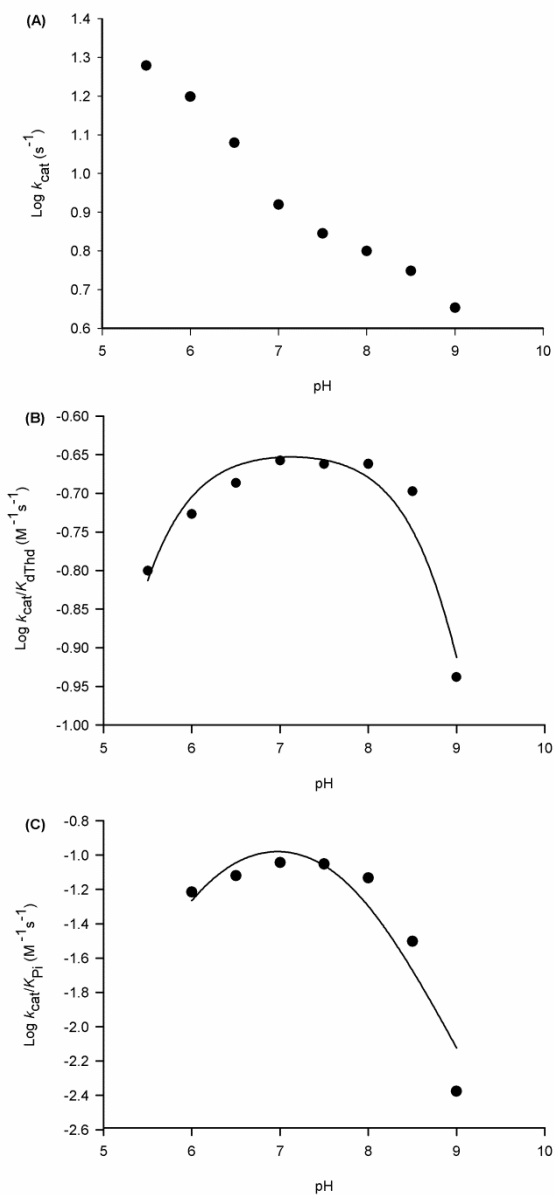
Fig. 7. Proposed kinetic mechanism for HTP.

Fig. 8. Dependence of kinetic parameters on pH. (A) $\log k_{\text{cat}}$; (B) $\log k_{\text{cat}}/K_{\text{dThd}}$; (C) $\log k_{\text{cat}}/K_{\text{Pi}}$.



ANEXO C

Purine nucleoside phosphorylase activity and expression are upregulated in sites affected by periodontal disease

E.L. Batista Jr, C. Deves, L; Ayub, R.G. da Silva, L.C. Filho, L.A. Basso, D.S. Santos.

Manuscrito publicado no periódico *Journal of periodontal Research*, 2010.

Purine nucleoside phosphorylase activity and expression are upregulated in sites affected by periodontal disease

**E. L. Batista Jr^{1,2,3}, C. Deves^{2,3},
L. Ayub¹, R. G. da Silva²,
L. C. C. Filho¹, L. A. Basso^{2,3},
D. S. Santos^{2,3}**

¹Division of Periodontology, School of Dental Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil, ²Center for Research/Molecular and Functional Biology (CP-BMF), TecnoPUC, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil and ³Graduate Program in Cell and Molecular Biology, Department of Biosciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil

Batista EL Jr, Deves C, Ayub L, da Silva RG, Filho LCC, Basso LA, Santos DS.

Purine nucleoside phosphorylase activity and expression are upregulated in sites affected by periodontal disease. *J Periodont Res* 2010; 45: 664-671.

© 2010 John Wiley & Sons A/S

ANEXO D

Analysis of select members of the E26 (ETS) transcription factors family in colorectal cancer

C. Deves, D. Renck, B. Garicochea, V.D. da Silva, T. Giulianni Lopes, H. Fillman, L. Fillman, S. Lunardini, L.A. Basso, D.S. Santos, E.L. Batista Jr.

Manuscrito publicado no periódico *Virchow Archives*, 2011.

Analysis of select members of the E26 (ETS) transcription factors family in colorectal cancer

Candida Deves · Daiana Renck · Bernardo Garicochea · Vinicius Duval da Silva ·
Tiago Julianni Lopes · Henrique Fillman · Lucio Fillman · Silvana Lunardini ·
Luis Augusto Basso · Diogenes Santiago Santos · Eraldo L. Batista Jr.

Received: 29 June 2010 / Revised: 25 January 2011 / Accepted: 28 January 2011 / Published online: 12 February 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract The E-twenty-six (ETS) family of transcription factors is known to act as positive or negative regulators of the expression of genes that are involved in diverse biological processes, including those that control cellular proliferation, differentiation, hematopoiesis, apoptosis, metastasis, tissue remodeling, and angiogenesis. Identification of target gene promoters of normal and oncogenic transcription factors provides new insights into the regulation of genes that are involved in the control of normal cell growth and differentiation. The aim of the present investigation was to analyze the differential expression of 11 ETS (ELF-3, ESE3, ETS1, ETV3, ETV4, ETV6, NERF, PDEF, PU1, Spi-B, and Spi-C) as potential markers for prognostic of colorectal cancer. A series of paired tissue biopsies consisting of a tumor and a non-affected control sample were harvested from 28

individuals suffering from diagnosed colorectal lesions. Total RNA was isolated from the samples, and after reverse transcription, differential expression of the select ETS was carried out through real-time polymerase chain reaction. Tumor staging as determined by histopathology was carried out to correlate the degree of tumor invasiveness with the expression of the ETS genes. The results demonstrated a different quantitative profile of expression in tumors and normal tissues. ETV4 was significantly upregulated with further increase in the event of lymph node involvement. PDEF and Spi-B presented down-regulation, which was more significant when lymph node involvement was present. These findings were supported by immunohistochemistry of tumoral tissues. The results suggest that select ETS may serve as potential markers of colorectal cancer invasiveness and metastasis.

ANEXO E

The transition state analog inhibitor of Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) Immucillin-H arrests bone loss in rat periodontal disease models

C. Deves, T.M. de Assunção, R.G. Ducati, M.M. Campos, L.A. Basso, D.S. Santos, E.L. Batista Jr.

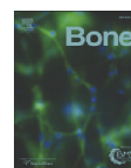
Manuscrito publicado no periódico *Bone*, 2013.



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bone

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

Original Full Length Article

The transition state analog inhibitor of Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) Immucillin-H arrests bone loss in rat periodontal disease models

Candida Deves^a, Thiago Milech de Assunção^a, Rodrigo Gay Ducati^a, Maria Martha Campos^b, Luiz Augusto Basso^a, Diogenes Santiago Santos^a, Eraldo L. Batista Jr.^{b,*}

^a Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Centro de Pesquisas/ Biologia Molecular e Funcional (CP-BMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul-PUCRS, RS, Brazil

^b School of Dental Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 December 2011

Revised 14 August 2012

Accepted 21 September 2012

Available online 28 September 2012

Edited by: R. Baron

Keywords:

Purine nucleoside phosphorylase

Bone loss

Periodontal disease

T-lymphocyte

Osteoclasts

Animal models

ABSTRACT

Purine nucleoside phosphorylase (PNP) is a purine-metabolizing enzyme that catalyzes the reversible phosphorylation of 6-oxypurine (deoxy)nucleosides to their respective bases and (deoxy)ribose-1-phosphate. It is a key enzyme in the purine salvage pathway of mammalian cells. The present investigation sought to determine whether the PNP transition state analog inhibitor (Immucillin-H) arrests bone loss in two models of induced periodontal disease in rats. Periodontal disease was induced in rats using ligature or LPS injection followed by administration of Immucillin-H for direct analysis of bone loss, histology and TRAP staining. *In vitro* osteoclast differentiation and activation of T CD4+ cells in the presence of Immucillin-H were carried out for assessment of RANKL expression, PNP and Cathepsin K activity. Immucillin-H inhibited bone loss induced by ligatures and LPS, leading to a reduced number of infiltrating osteoclasts and inflammatory cells. *In vitro* assays revealed that Immucillin-H could not directly abrogate differentiation of osteoclast precursor cells, but affected lymphocyte-mediated osteoclastogenesis. On the other hand, incubation of pre-activated T CD4+ with Immucillin-H decreased RANKL secretion with no compromise of cell viability. The PNP transition state analog Immucillin-H arrests bone loss mediated by T CD4+ cells with no direct effect on osteoclasts. PNP inhibitor may have an impact in the treatment of diseases characterized by the presence of pathogens and imbalances of bone metabolism.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO F

Biochemical characterization of
recombinant purB-encoded
adenylosuccinate lyase (EC 4.3.2.2)
from *Mycobacterium tuberculosis*
H37Rv

P.R. Vitola, C. Deves, D.C. Rostirolla,
C.V. Bizarro, L.A. Basso, D.S. Santos.

Participação na dissertação de
mestrado

Biochemical characterization of recombinant *purB*-encoded adenylosuccinate lyase (EC 4.3.2.2) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Priscila R. Vitola ^{a, b}, Candida Deves ^{a, b}, Diana C. Rostirolla ^{a, b}, Cristiano V. Bizarro ^{a, c}, Luiz A. Basso ^{a, b} and Diógenes S. Santos ^{a, b}

^a Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681 – Tecnopuc – Prédio 92-A, Porto Alegre 90619-900, RS, Brazil; ^b Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Prédio 60, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil; ^c Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre 90619-900, RS, Brazil

ANEXO G

Citotoxicidade do composto **5g**

Citotoxicidade do composto 5g

Para avaliar a citotoxicidade do composto **5g** foram realizados experimentos utilizando cultura de células de duas linhagens tumorais de cólon (HT-29 e SW-620) e uma linhagem normal de queratinócitos (HaCat), na presença do composto **5g**. As células HaCat foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) enquanto as células HT-29 e SW-620 foram cultivadas em meio RPMI 1640, ambas com 2 mM de L-glutamina, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 150 U ml⁻¹ de penicilina, 150 µg ml⁻¹ de estreptomicina e mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5 % de CO₂.

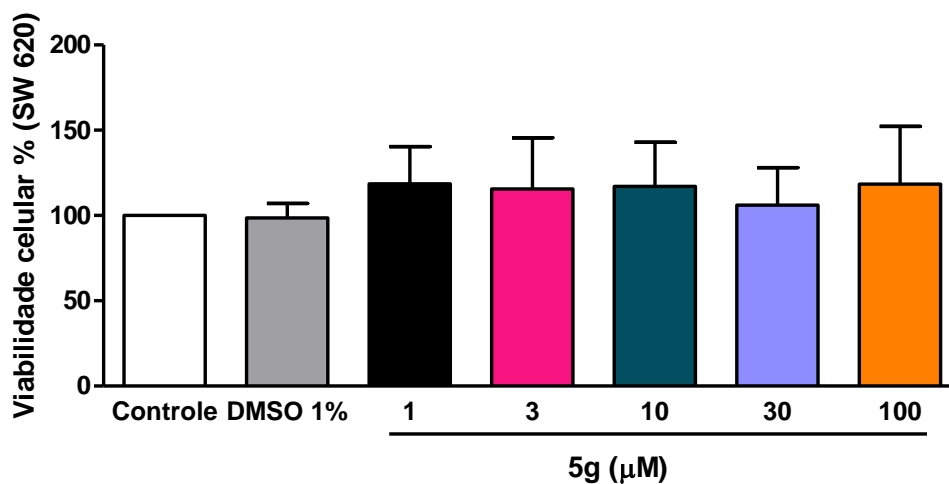
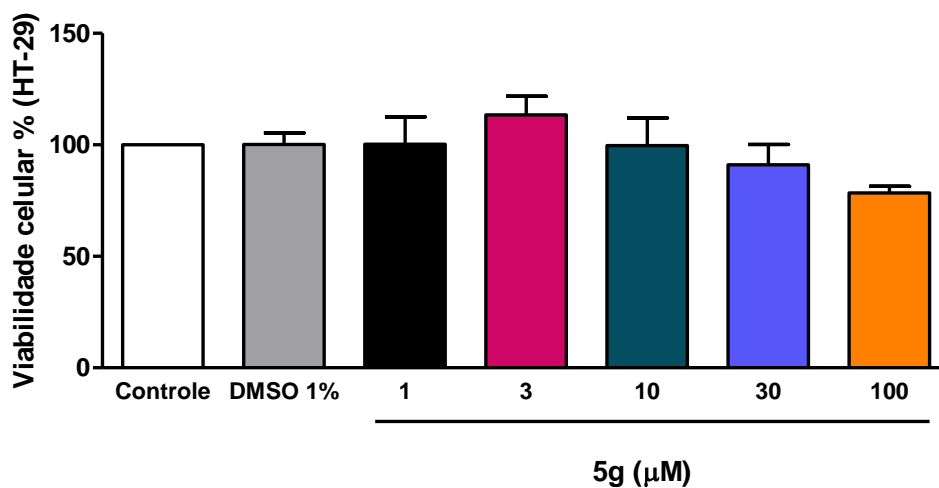
Para a análise da citotoxicidade dos compostos nas linhagens citadas acima, os compostos foram adicionados às células, aderidas em placas de 96 poços (7x10³ células/poço), nas concentrações de 1, 3, 10, 30 e 100 µM, durante 72 h de incubação. Os resultados foram obtidos através do método colorimétrico com brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dimetiltetrazólio (MTT), onde a oxidação do MTT em seu produto MTT-formazan é proporcional à atividade mitocondrial e, por conseguinte, à viabilidade celular. A figura abaixo mostra que os compostos não foram citotóxicos quando testados nas linhagens tumorais HT-29 e SW-620 nem na linhagem normal HaCat. Ao contrário do que se esperava, o composto **5g** induziu proliferação celular nas células HaCat apenas em uma concentração de 30 µM. O mecanismo pelo qual a indução da proliferação ocorreu é desconhecido.

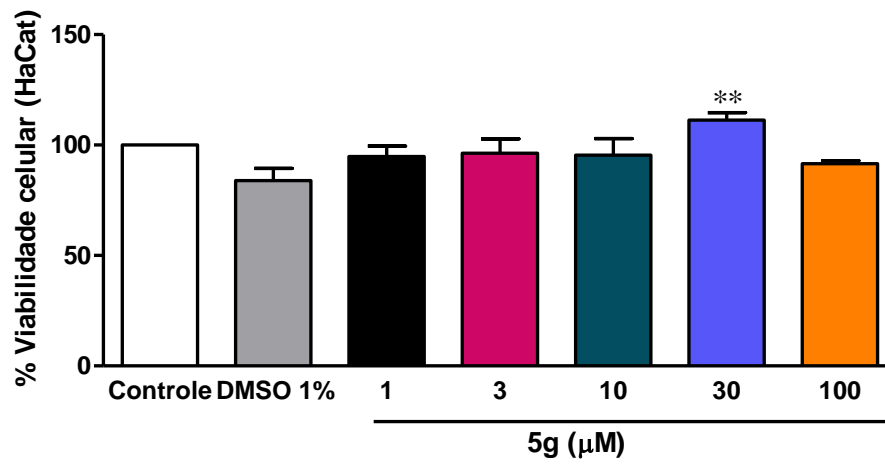
A hTP apresenta um potencial angiogênico no câncer. O bloqueio farmacológico dessa enzima através de inibidores enzimático tem por objetivo impedir a formação de novos vasos sanguíneos através do bloqueio da reação catalisada pela hTP. O potencial angiogênico dessa enzima é atribuído ao produto da reação enzimática, o 2-desoxirribose. Neste caso como esperado, o composto **5g** não apresentou atividade citotóxica sobre as células tumorais nem sobre as células normais. Portanto, um modelo de angiogênese é necessário para melhor avaliar o provável potencial anti-angiogênico do composto **5g**.

Inibidores da hTP podem ser utilizados em associação a análogos de nucleosídeos que possuem um potencial citotóxico e são degradados pela enzima. A combinação do potente inibidor da hTP, o TPI, com um análogo de nucleosídeo degradado pela enzima, o TFT, (TAS-102) encontra-se em estudo clínico Fase II

(57). A associação do composto **5g** com o TFT pode ser também avaliada, futuramente, quanto ao seu potencial anti-angiogênico e citotóxico.

Estes estudos foram realizados no Hospital de Clínicas sob a coordenação do Dr. Rafael Roesler e no laboratório de cultura de células da Faculdade de Farmácia da PUCRS, sob a coordenação da Prof^a. Dra. Maria Martha Campos.





$p < 0,05$

ANEXO H

Dados espectroscópicos e
espectrométricos dos compostos **3c**
e **5g**

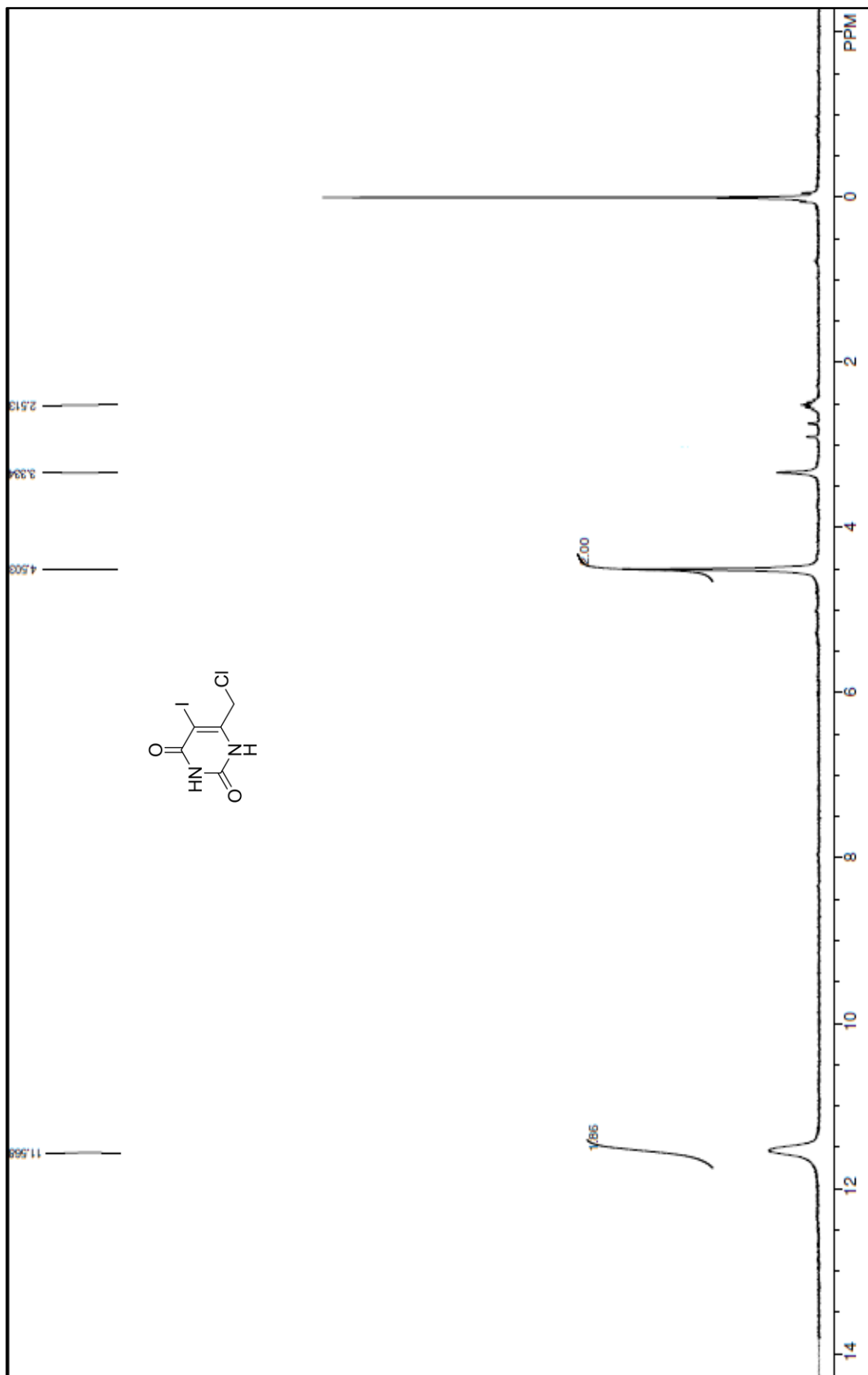


Figura 1. Espectro de RMN de ¹H do 6-clorometil-5-iodopirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**3c**) em DMSO_d₆.

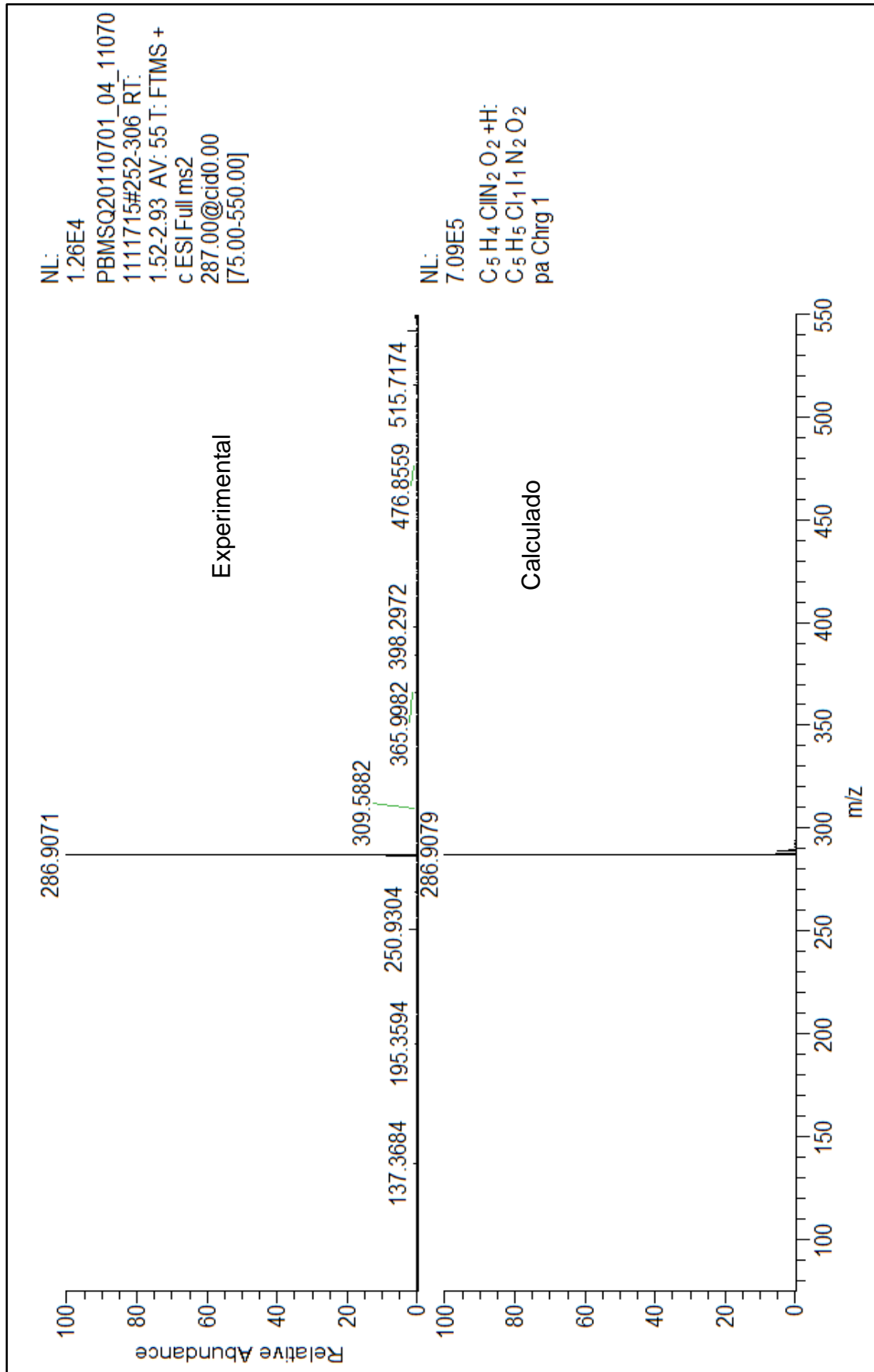


Figura 2. Espectro de Massa em alta resolução (FTMS) do 6-clorometil-5-iodopirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona (**3c**).

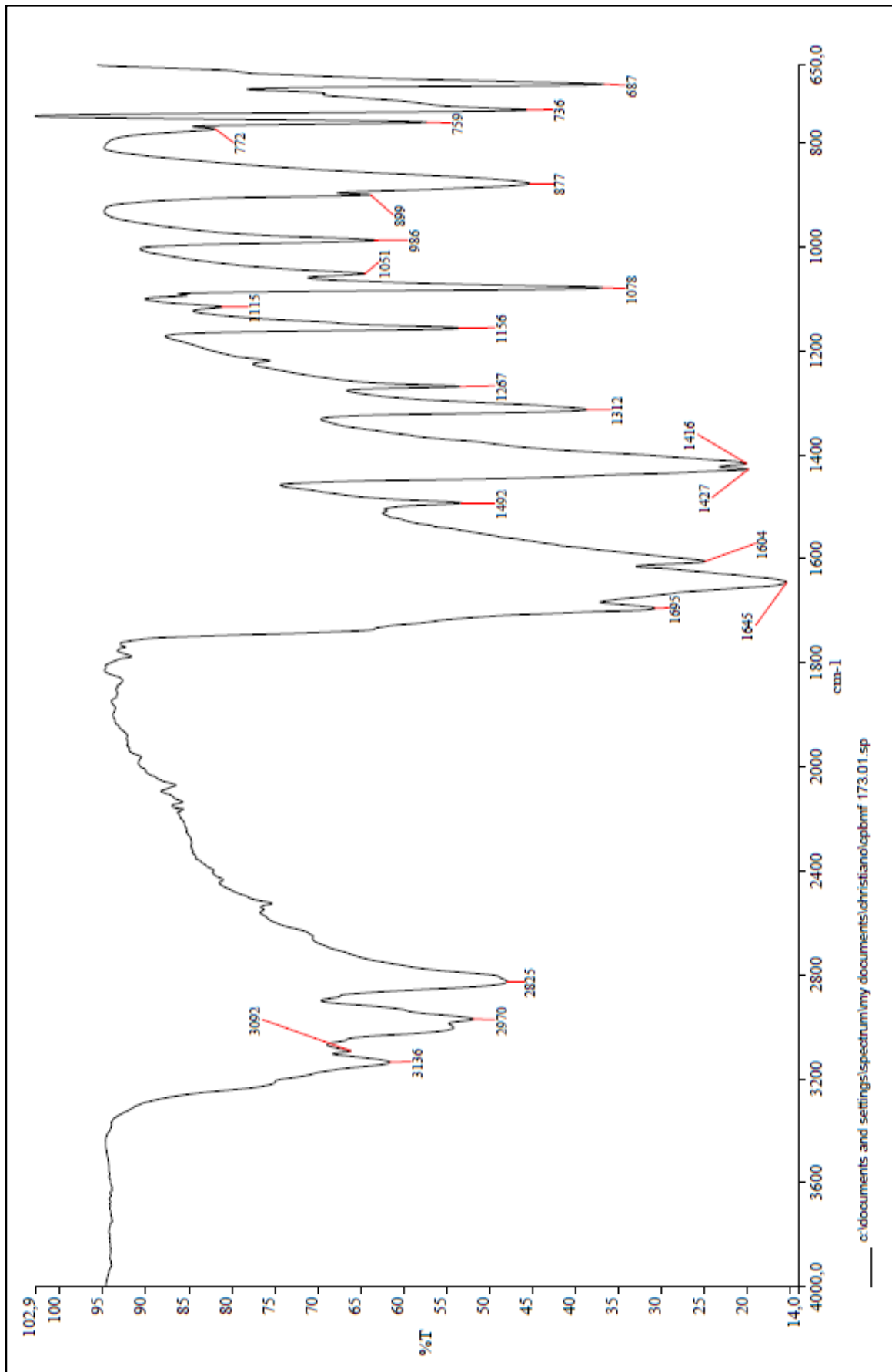


Figura 3. Espectro de absorção no infravermelho (FTIR) do 6-clorometil-5-iodopirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**3c**).

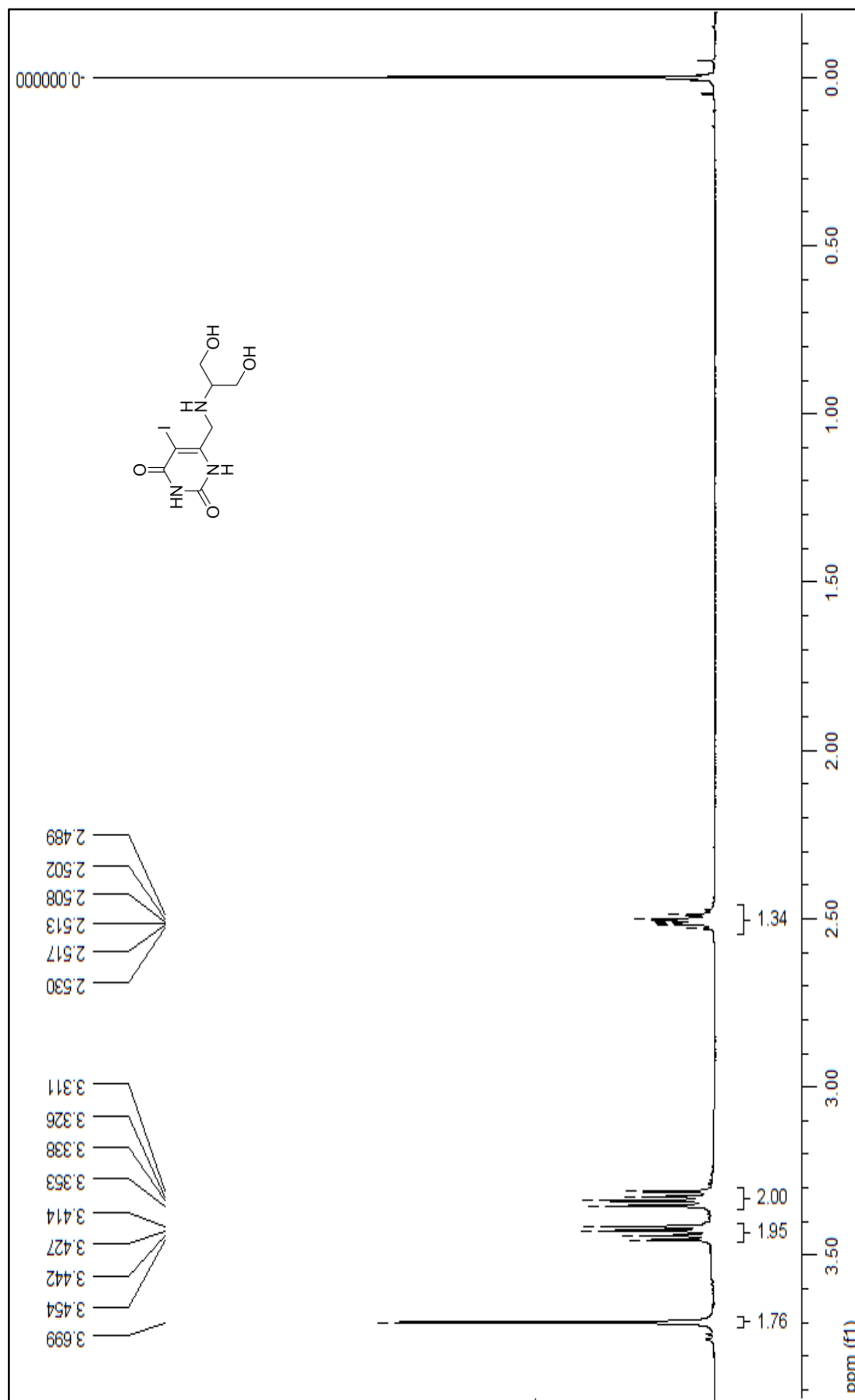


Figura 4. Espectro de RMN de ¹H do 6-((1,3-dihidropropan-2-ilamino)metil)-5-iodopirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**5g**) em CDCl₃.

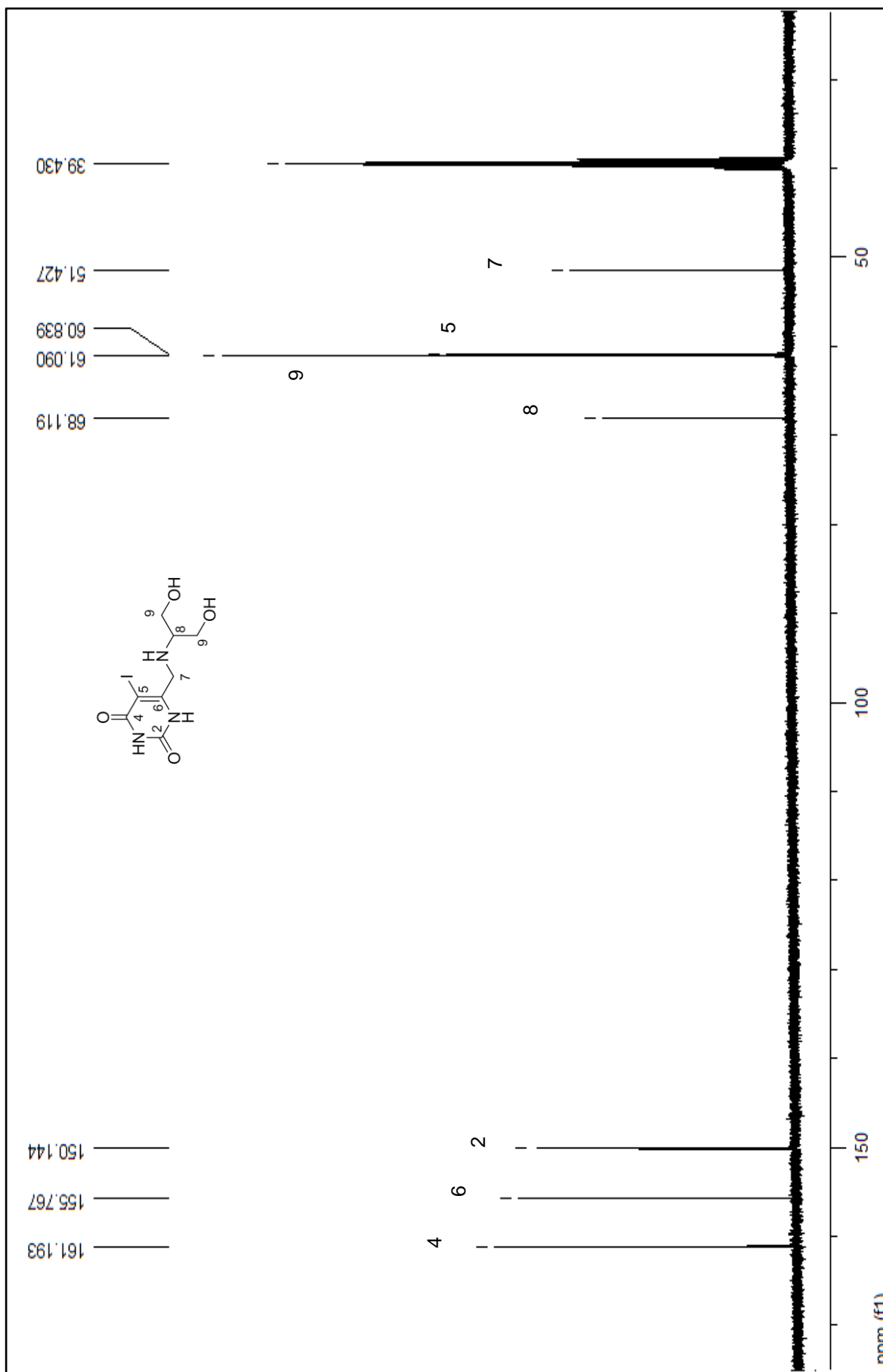


Figura 5. Espectro de RMN de ^{13}C do 6-((1,3-dihidropropan-2-ilamino)metil)-5-iodopirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona (**5g**) em DMSO-d_6 .

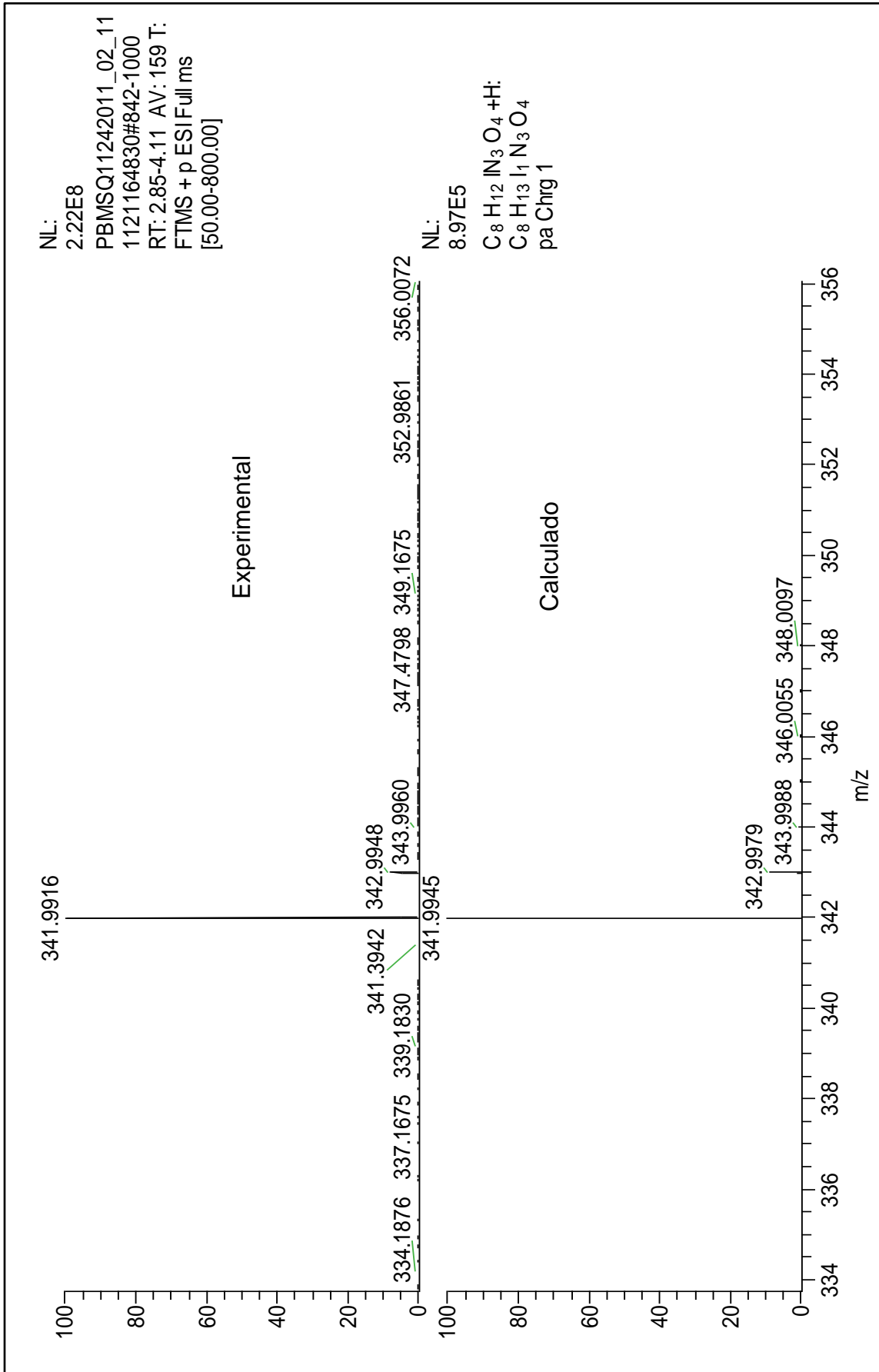


Figura 6. Espectro de Massa em alta resolução (FTMS) do 6-((1,3-diidroxiopropan-2-ilamino)metil)-5-iodopirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona (**5g**).

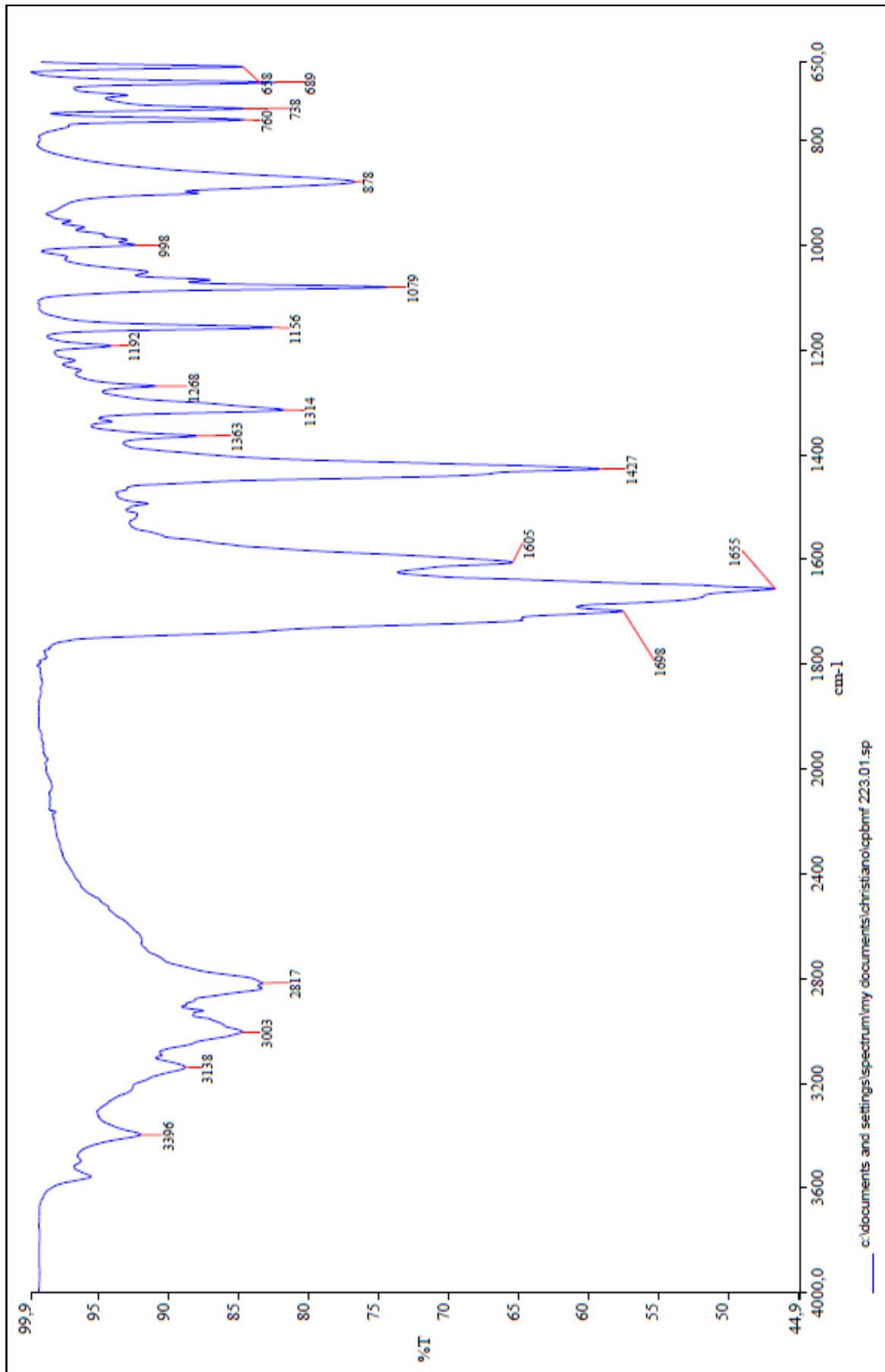


Figura 7. Espectro de absorção no infravermelho (FTIR) do 6-((1,3-dihidropropan-2-ilamino)metil)-5-iodopirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**59**).

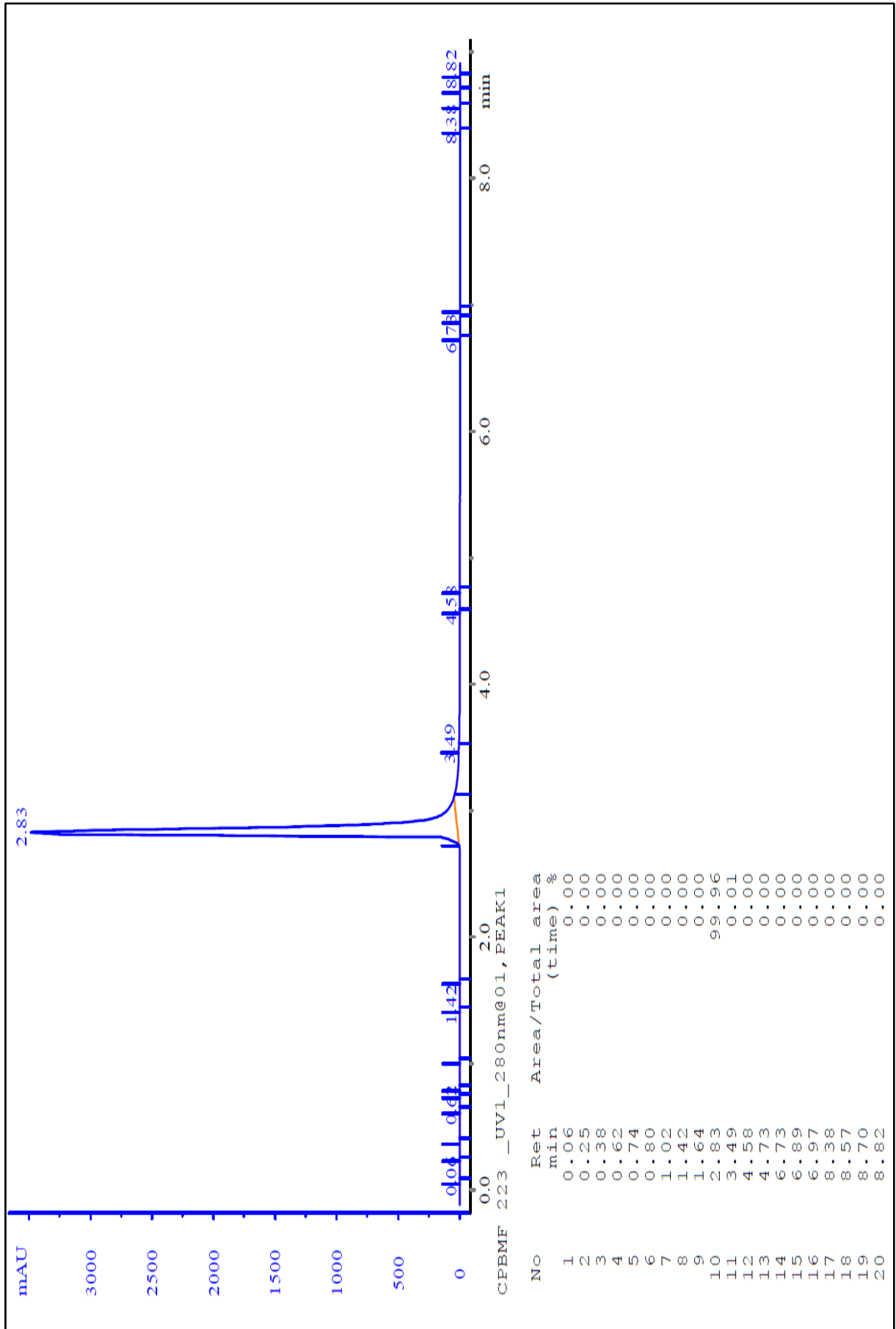


Figura 8. Cromatograma obtido em HPLC do 6-((1,3-diidropropan-2-ilamino)metil)-5-iodopirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona (**5g**).