

Estudos estruturais da enzima Cpz8: uma sulfotransferase primitiva envolvida na biossíntese de antibióticos sulfatados.

Bruna Domingues Vieira¹; Luciane A. C. Tonon²; Arthur Z. N. Fernandes³; Rafael de Felício⁴; Leonard Kaysser⁵; Bertolt Gust⁵; Daniela Barretto Barbosa Trivella²

1. Estudante de IC no Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM, Campinas/SP; [*bruna.vieira@lnbio.cnpem.br](mailto:bruna.vieira@lnbio.cnpem.br)
2. Pesquisadora do Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM, Campinas/SP
3. Estudante de mestrado no Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM, Campinas/SP
4. Estudante de pós-doutorado no Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM, Campinas/SP
5. Pesquisador do German Centre for Infection Research (DZIF), Universität Tübingen, Tübingen

Palavras Chave: enzima de biossíntese, estrutura cristalográfica, catálise enzimática.

Introdução

A Cpz8 é uma sulfotransferase (SULT) dependente de PAPS que está envolvida na biossíntese de moléculas do antibiótico caprazamicina sulfatadas¹. Ela utiliza a molécula PAPS como doadora de sulfato e um segundo substrato como aceptor, no entanto ela não apresenta um domínio típico de ligação à molécula PAPS, tornando interessante a caracterização estrutural dessa enzima para estudos de mecanismos catalíticos.

SULTs são enzimas encontradas de bactérias até mamíferos e desempenham papel importante na biotransformação de fármacos e na biossíntese de produtos naturais com aplicação farmacêutica. Comparações da sequência da Cpz8 com outros membros da família SULT revelaram que Cpz8 agrupa com seqüências de proteínas hipotéticas, e não apresenta homólogos próximos com estrutura determinada.

O objetivo deste projeto foi determinar a estrutura tridimensional da enzima Cpz8. Com a estrutura atômica da enzima visamos identificar os sítios de ligação à PAPS e ao aceptor de sulfato e propor as bases moleculares para o reconhecimento dos substratos e mecanismo catalítico da Cpz8.

Resultados e Discussão

A enzima recombinante expressa em *E. coli* Rosetta apresentou excelente padrão de qualidade após purificação por cromatografia de afinidade e exclusão molecular, e foi submetida a ensaio de cristalização. Foram obtidos cristais em 2 condições (precipitante PEG 3350 e tamponante fosfato dissódico/potássico) as quais foram refinadas para melhora dos cristais obtidos inicialmente. Conjuntos de dados de boa qualidade (resolução melhor que 2Å) foram coletados na linha de luz MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-CNPEM, Campinas-SP).

Não foi possível recuperar as fases por substituição molecular, provavelmente devido à baixa identidade da Cpz8 com estruturas de sulfotransferases já reportadas. As fases foram recuperadas por faseamento experimental dos cristais da Cpz8 utilizando SAD (single wavelength anomalous dispersion). O mapa de densidade eletrônica calculado permitiu a determinação da estrutura cristalográfica da enzima Cpz8 (Fig. 2).

Nossas análises de seqüência primária e estruturas de SULT já determinadas indicam que Cpz8 é provavelmente a SULT mais primitiva com estrutura determinada. A análise comparativa da Cpz8 com sulfotransferases de eucariotos (*Schistosoma mansoni*² e humanas³), apesar da baixa identidade sequencial, sugere os sítios de interação com seus dois substratos (aceptor e doador de sulfato). Da

mesma forma, o centro catalítico pode ser sugerido, uma vez que as cadeias laterais dos aminoácidos participantes da catálise são bastante conservadas na estrutura 3D da Cpz8 e das sulfotransferases mais próximas analisadas. No entanto, a conformação obtida para a Cpz8 na forma apo prevê movimentações estruturais para acomodação do substrato aceptor de sulfato. Estes dados embasam o mecanismo de catálise da Cpz8 e agregam informação na evolução e flexibilidade de enzimas da família SULT.

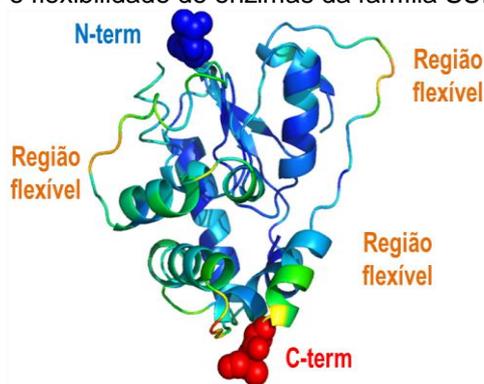


Figura 1. Estrutura geral da Cpz8 colorida por B-fator, N-terminal e C-terminal representados em azul e vermelho, respectivamente.

Conclusões e Perspectivas

A estrutura tridimensional da enzima Cpz8 foi determinada, permitindo a elaboração de hipóteses sobre seu mecanismo catalítico: i- O sítio do aceptor de sulfato é pequeno, ligando apenas substratos pequenos ou ii- Há movimentações estruturais, provavelmente induzidas pela ligação de PAPS.

Foram traçados alguns objetivos a fim de validar as hipóteses sobre as movimentações estruturais da enzima Cpz8. Para isso, visamos a obtenção das estruturas da Cpz8 na forma realmente apo e em complexo com PAPS.

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, financiado pelo CNPq e ao LNBio-CNPEM pela infraestrutura e suporte técnico.

¹Tang, X., et al. A two-step sulfation in antibiotic biosynthesis requires a type III polyketide synthase. *Nat Chem Biol*, 2013. 9(10): p. 610-5.

²Valentim, C. L., et al. Genetic and molecular basis of drug resistance and species-specific drug action in schistosome parasites. *Science*, 2013. 342(6164): p. 1385-9.

³Allali-Hassani, A., et al. Structural and Chemical Profiling of the Human Cytosolic Sulfotransferases. *PLoS Biol*, 2007. 5(5): e97.