

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

Bruna Domingues Vieira*; Luciane A. C. Tonon; Arthur Z. N. Fernandes; Rafael de Felício; Leonard Kaysser; Bertolt Gust; Daniela Barretto Barbosa Trivella

Resumo

Neste trabalho determinamos a estrutura da sulfotransferase Cpz8 e comparamos esta estrutura com outros membros da superfamília sult. A Cpz8 é possivelmente a mais primitiva sulfotransferase com estrutura conhecida. Através desta estrutura pudemos propor os mecanismos de reconhecimento dos substratos, no qual movimentações estruturais desempenham papel central. A dinâmica desta sult primitiva parece estar conservada na evolução, apesar da sequência primária ser pouco conservada. Os mecanismos propostos ajudam também a compreender a dinâmica de sult de mamíferos, as quais são importantes no metabolismo de fármacos.

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 acceptor, 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 sequências 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 acceptor 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-CNPq, 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.

Nossas análises de sequência 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 (acceptor 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 acceptor de sulfato. Estes dados embasam o mecanismo de catálise da Cpz8 e agregam informação na evolução e flexibilidade de enzimas da família SULT.

Conclusões

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

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, financiado pelo CNPq e ao LNBio-CNPq 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.