



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS SUBSTRATOS DE PTPA, TIROSINA-
FOSFATASE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

MARCELA PURIFICAÇÃO

Florianópolis
Fevereiro de 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS SUBSTRATOS DE PTPA, TIROSINA-
FOSFATASE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

MARCELA PURIFICAÇÃO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Hernán Terenzi
Andrea Villarino

Florianópolis
Fevereiro de 2008

AO MEU IRMÃO:

**PODE ATÉ PARECER QUE NÃO,
MAS SIMPLEMENTE SEI QUE ESTÁS AQUI,
PORQUE SEMPRE TE SINTO AO MEU LADO.**

SAUDADES...

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Hernán Terenzi pela oportunidade, orientação e liberdade na realização deste trabalho;

À Andrea Villarino pela orientação, companheirismo e amizade nestes anos de mestrado;

Aos grupos de Montevideu - Uruguai, em especial aos da Prof.^a Ana Ferreira, Dra. Rosario Dúran, Dr. Otto Pritsch, por sua hospitalidade e pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas de laboratório Javier, Patrícia, Gabriela, Priscila, Camila, Franciele, Luciano, Claus, Viviane, Ana, Paulo, Letícia, Marcelo e Sérgio pelas conversas e companhia durante tanto tempo no 'lab';

Às mais que colegas Cat, Débo e Duda pelo companheirismo em tantas noites e finais de semana no 'lab', nos experimentos não tão bem-sucedidos, nas sextas-feiras à noite em qualquer lugar e em tantos outros bons momentos;

Aos meus amigos mais do que queridos, Amiga Cintia, Kê, Lilih, Rafinha e Tiago, que por diversas vezes ouviram falar do 'lab', dos experimentos e, finalmente, desta dissertação;

À Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC pela oportunidade;

A Capes e CNPq pelo apoio financeiro;

A todos que, de uma forma ou de outra, dentro ou fora da universidade, contribuíram para o meu crescimento não só profissional, mas também pessoal.

E, agradeço principalmente às pessoas mais importantes da minha vida, MEUS PAIS; porque sem o apoio e a torcida de vocês, nada disto teria acontecido e nada valeria à pena. O resultado está aqui e também é fruto de vocês. MÃE E PAI AMO VOCÊS.

RESUMO

Proteínas tirosina-fosfatases (PTPs) de diversos microrganismos possuem importantes papéis na determinação da patogenicidade por modificação do equilíbrio entre fosforilação/defosforilação dentro do hospedeiro. Deste modo, a identificação de substratos das PTPs torna-se um passo essencial para compreensão de seus papéis fisiológicos, e também contribuem para o desenvolvimento de novos fármacos. Neste trabalho, a metodologia de '*mutant substrate-trapping*' foi utilizada como ferramenta para identificação de potenciais substratos fisiológicos de PtpA, uma das duas únicas tirosina-fosfatases presentes em *Mycobacterium tuberculosis*. A mutação do Asp126 no sítio ativo de PtpA converteu uma enzima ativa em um '*mutant substrate-trapping*': PtpA-D126A. Ambas as enzimas, ativa/não mutada ('*wild-type*' - wt) e mutante D126A, foram purificadas e caracterizadas por estudos cinéticos e estruturais. O mutante D126A mostrou ser uma boa ferramenta para '*mutant substrate-trapping*', apresentando valor de Km semelhante à proteína ativa, todavia com Vmax reduzido, mantendo os possíveis substratos mais tempo unidos ao seu sítio ativo. Para identificar prováveis substratos de PtpA, ensaios *in vitro* foram realizados, por incubação de PtpA-D126A com diferentes extratos de macrófagos humanos da linhagem THP-1. Os experimentos foram realizados na escala de Ressonância Plasmônica de Superfície e posteriormente passados a miligramas de proteína. Os complexos PTP-substrato foram isolados por imobilização covalente da PtpA-D126A à resina de agarose e analisados por SDS-PAGE. A identificação por espectrometria de massa dessas proteínas, bem como das proteínas de *E. coli* co-eluídas com PtpA-D126A durante cromatografias de afinidade e exclusão molecular, revelou alguns possíveis substratos de PtpA. Outros ensaios estão programados para confirmação dos resultados e identificação de substratos fisiológicos da proteína tirosina-fosfatase PtpA de *M. tuberculosis*.

ABSTRACT

Protein tyrosine phosphatases (PTPs) of several microorganisms may have an important role in the determination of the pathogenicity by modifying the phosphorylation/dephosphorylation equilibrium in their host. Thus, the identification of PTPs substrates is an essential step to understand their physiological role, and also contribute to the design of new drugs. In this study the substrate-trapping method was used as a tool to identify the putative physiological substrate of PtpA, one of the only two PTPs present in *Mycobacterium tuberculosis*. The mutation of the Asp126 in the active site of PtpA converts the active enzyme into a 'substrate-trapping' enzyme: PtpA D126A. The wild-type and mutated PtpA were purified and characterized by kinetic studies. The mutant was shown to be a good "substrate-trapping" tool as its K_m value is similar to the K_m of the wild-type-PtpA but the V_{max} is reduced, allowing the retention of the putative substrate in the active site for a longer period. To identify substrates of PtpA, *in vitro* assays were performed, by incubating the PtpAD126A with different protein extracts from human macrophages THP-1. The enzyme-substrate complexes were isolated by affinity precipitation and analyzed by SDS-PAGE. The identification by mass spectrometry of a large group of proteins from *E. coli* co-eluted with PtpA-D126A, during the affinity and molecular exclusion chromatography reveals some putative substrates for mycobacterial PtpA. Assays are in progress to reproduce results in human cells and resolve bands by 2D electrophoresis and proceed to another mass spectrometry identification of the putative substrates of mycobacterial PtpA.

SUMÁRIO

Revisão Bibliográfica.....	13
Objetivo Geral	23
Objetivos Específicos	23
Materiais e Métodos	24
1. Construção dos mutantes de PtpA.....	24
2. Obtenção de células competentes e transformação	25
3. Expressão e purificação de PtpA	26
4. Dicroísmo Circular.....	27
5. <i>Fingerprint</i> com tripsina.....	28
6. Avaliação da atividade enzimática de PtpA	28
7. Cultura celular e preparação dos extratos protéicos	29
8. Ensaio de Ressonância Plasmônica de Superfície	30
9. Isolamento de possíveis substratos	31
10. Espectrometria de Massa.....	32
11. Western Blot.....	33
Resultados e Discussão	34
1. Construção dos mutantes de PtpA.....	34
2. Obtenção de células competentes e transformação	34
3. Expressão e purificação de PtpA	35
4. Análise Estrutural de PtpA	38
5. Avaliação da atividade enzimática de PtpA	40
6. Cultura celular e preparação dos extratos protéicos	42
7. Ensaios de Ressonância Plasmônica de Superfície	43
8. Isolamento de possíveis substratos	46

Conclusões.....	56
Considerações finais	57
Perspectivas	58
Apêndice A - Análise bidimensional dos Extratos	60
Apêndice B - Análise em MS de PtpA- <i>wt</i>	61
Apêndice C - Outros ensaios de ' <i>mutant substrate-trapping</i> '	62
Apêndice D - PtpB, outra tirosina-fosfatase de <i>M. tuberculosis</i>	64
Submissão do Artigo	70
Referências Bibliográficas	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo da infecção por <i>M. tuberculosis</i>	14
Figura 2. Eficiência da vacina BCG aplicadas em diversos grupos etários.....	15
Figura 3. Pirâmide com os fármacos utilizados no tratamento da tuberculose; destaque para os antibióticos aos quais há resistência e mapa mostrando os países onde aparecem.....	16
Figura 4. (A) O mecanismo geral da reação catalisada por uma proteína tirosina-fosfatase (PTP), em (B) estrutura de PtpA e PtpB de <i>M. tuberculosis</i>	19
Figura 5. (A) Alinhamento de seqüências de diferentes PTPs. (B) Esquema da metodologia de 'mutant substrate-trapping'.....	21
Figura 6. Determinação da temperatura ótima para produção de PtpA recombinante solúvel.....	35
Figura 7. Perfil SDS-PAGE de purificação por afinidade de PtpA- <i>wt</i>	36
Figura 8. Cromatograma da gel filtração de PtpA- <i>wt</i> e PtpA-D126A, utilizando coluna de exclusão molecular em sistema HPLC.....	38
Figura 9: (A) Espectro CD de PtpA- <i>wt</i> comparado ao mutante D126A. Inserido gel SDS-PAGE com análise das PtpAs tratadas com tripsina. (B) Curvas da desnaturação térmica para PtpA- <i>wt</i> e mutante D126A.....	39
Figura 10. Estrutura química do <i>p</i> -nitrofenil-fosfato (<i>p</i> NPP) utilizado como substrato artificial de fosfatases em ensaios cinéticos.....	40
Figura 11. Dados de atividade obtidos para PtpA- <i>wt</i> e PtpA-D126A. Círculos representam os dados experimentais e, triângulos representam a melhor curva da equação Michaelis-Menten gerada por Excel 7.0.....	42
Figura 12. Perfil em SDS-PAGE dos extratos protéicos de macrófagos humanos THP-1; ativados e, não ativados.....	43
Figura 13. Sensorgrama de ensaio SPR apresentando dados de associação e dissociação dos extratos, ativado e não ativado, com PtpA-D126A.....	44
Figura 14. Sensorgrama proveniente do ensaio de aceleração da dissociação das proteínas do extrato à PtpA-D126A, utilizando tampão glicina pH 6.5, pH 5.5, pH 4.5 e, pH 2.5.....	45

Figura 15. Sensorgrama proveniente do ensaio de competição pelos sítios de ligação de PtpA-D126A, utilizando Na ₃ VO ₄ nas concentrações de 2.5 mM, 5 mM e 10 mM.....	46
Figura 16. Ensaio de ' <i>mutant substrate-trapping</i> ' utilizando o mutante PtpA-D126A	47
Figura 17. Cromatograma da gel filtração de PtpA- <i>wt</i> e PtpA-D126A, realizada após purificação por afinidade com um terço de inibidores de protease, destaque para pico correspondente a um agregado de alto peso molecular na purificação do mutante.	49
Figura 18. Perfil em SDS-PAGE do agregado observado em gel filtração.	50
Figura 19. Proteínas identificadas por MALDI TOF do complexo co-eluído com PtpA-D126A.	50
Figura 20. Alinhamento por Clustal W das seqüências aminoacídicas de EF1A de leucócitos humanos e EF-Tu de <i>E. coli</i> , indicando resíduos idênticos, fortemente similares e, fracamente similares.....	52
Figura 21. Perfil em SDS-PAGE e Western Blot das proteínas de <i>E. coli</i> co-eluídas com PtpA-D126A.....	54
Figura 22. Perfil em 2D-PAGE dos extratos de macrófagos não ativados; controle sem ortovanadato e ativados.....	60
Figura 23. Espectro em MS de PtpA- <i>wt</i> tratada com tripsina	61
Figura 24. Perfil em SDS-PAGE de ensaios de ' <i>mutant substrate-trapping</i> ' utilizando resina ativada com sulfato de cobre, que causa interferência e impede análise das bandas	63
Figura 25. Determinação da temperatura ótima para produção de PtpB- <i>wt</i> recombinante solúvel.	64
Figura 26. Determinação da concentração ótima de imidazol para a eluição de PtpB.....	65
Figura 27. Perfil SDS-PAGE da purificação por afinidade de PtpB-D128A.....	65
Figura 28. Calibração de coluna de exclusão molecular; utilizando para construção da curva padrão Blue Dextrano, Albumina, Anidrase Carbônica, Citocromo-C e Aprotinina	66
Figura 29. Cromatograma da gel filtração de PtpB- <i>wt</i>	67
Figura 30. Seqüência aminoacídica das duas tirosina-fosfatases de <i>M. tuberculosis</i> , PtpB e PtpA; destacando os resíduos de aspartato.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento da purificação de PtpA-wt e PtpA-D126A de <i>M. tuberculosis</i> a partir de 1l de células <i>E. coli</i>	37
Tabela 2. Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para PtpA-wt, PtpA-D126A, utilizando o substrato artificial pNPP; determinados pelo programa Excel 7.0.	42
Tabela 3. Proteínas de <i>E. coli</i> co-purificadas com PtpA-D126A durante purificação. As proteínas foram agrupadas conforme suas implicações já descritas na literatura	51
Tabela 4. Parâmetros cinéticos de PtpB-wt e PtpB-D128A de <i>M. tuberculosis</i> utilizando o substrato artificial pNPP.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

TB: tuberculose

PTPs: Proteínas tirosina-fosfatases

DSPs: Proteínas tirosina-fosfatases com dupla especificidade

LMW: Proteínas tirosina-fosfatases de baixo peso molecular

C: Cisteína, Cys

X: Qualquer aminoácido

R: Arginina, Arg

S: Serina, Ser

T: Treonina, Thr

D: Aspartato, Asp

A: Alanina, Ala

WT: 'wilde-type', tipo selvagem

DA: Mutante cujo Aspartato catalítico foi trocado por uma Alanina

CA: Mutante cuja Cisteína catalítica foi trocada por uma Alanina

CS: Mutante cuja Cisteína catalítica foi trocada por uma Serina

DA/CA: Duplo mutante, cisteína e aspartato catalíticos mutados à Alanina

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

LB: Meio Luria-Bertani (10 g tripton, 5 g extrato de levedura e 5 g NaCl por litro)

NHS: N-Hidroxisuccinimida

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido Etileno Diamino Tetracético

CD: Dicroísmo Circular

SPR: Ressonância Plasmônica de Superfície

MS: Espectrometria de Massa

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A tuberculose (TB) é uma doença contagiosa grave, com relatos médicos na Grécia e na Roma antiga e, atualmente acredita-se que esta doença já era conhecida também no antigo Egito, onde pesquisadores encontraram lesões de tuberculose em múmias (Ducati *et al.*, 2006). No entanto, somente em 1882 a bactéria responsável pela doença, *Mycobacterium tuberculosis*, foi isolada pelo cientista alemão Robert Koch; ficando este bacilo conhecido como bacilo de Koch (Munch, 2003).

No decorrer do século XIX e até meados do século XX, a tuberculose representou grande preocupação como doença endêmica, principalmente entre as classes mais pobres. Por volta de 1880, após descoberto que tratava-se de uma doença infecto-contagiosa, melhorias na saúde pública foram adotadas e reduziram sua incidência mesmo antes do surgimento de tratamento (Munch, 2003). Somente em meados dos anos 40, com o desenvolvimento do antibiótico estreptomicina é que o tratamento, e não apenas a prevenção, se tornou possível. Já no início dos anos 50, com a descoberta de outros fármacos mais específicos como a isoniazida e a pirazinamida, acreditou-se que a TB pudesse ser completamente eliminada (Gomez & McKinney, 2004). Entretanto, o aparecimento de bacilos super-resistentes e a associação com a infecção causada pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV - AIDS), nos anos 80, levou a novos casos agravados da doença (Wells *et al.*, 2007). Este ressurgimento da TB resultou, em 1993, na declaração da Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma emergência médica global (<http://www.who.int>).

A TB é transmitida basicamente pelo ar e pode atingir todos os órgãos do corpo, porém, como o bacilo se reproduz e desenvolve rapidamente em áreas do corpo com muito oxigênio, o pulmão é o principal órgão atingido pela doença (Smith *et al.*, 2004). O espirro ou tosse de uma pessoa infectada joga no ar cerca de dois milhões de bacilos que permanecem em suspensão durante horas (Figura 1-A). Após a inalação, estes bacilos infecciosos são fagocitados por macrófagos no pulmão (Figura 1-B) e induzem uma resposta inflamatória local, que leva ao recrutamento de monócitos para o

local da infecção (Figura 1-C) (Russell, 2001). A micobactéria se reproduz no interior dos macrófagos, mas à medida que a resposta imune progride, outros macrófagos e células-T se acumulam e confinam o patógeno em um granuloma ou tubérculo (Figura 1-D). Este granuloma consiste em um núcleo de macrófagos infectados, cercado por células do sistema imune e é delimitado por uma camada fibrosa composta de colágeno. Dentro do tubérculo, o bacilo fica retido e em estado latente (Gomez & McKinney, 2004), podendo permanecer assim durante anos. E é por esse motivo que 90% das pessoas portadoras da micobactéria acabam não desencadeando a doença (Russell, 2001). Após um enfraquecimento do sistema imune (Figura 1-E), há uma redução ou um mau funcionamento das células imunes e o granuloma se desfaz, fazendo com que os bacilos passem à forma não latente, se reproduzindo extracelularmente e provocando a tosse que favorece a sua disseminação (Figura 1-F). Os sintomas da tuberculose, geralmente, são tosse crônica, febre, suor noturno, dor no tórax, perda de apetite e indisposição. Os exames usados na tentativa do diagnóstico de certeza são a baciloscopia do escarro, a radiologia do tórax e o teste tuberculínico, que evidencia o contato prévio com o bacilo (Ducati *et al.*, 2006).

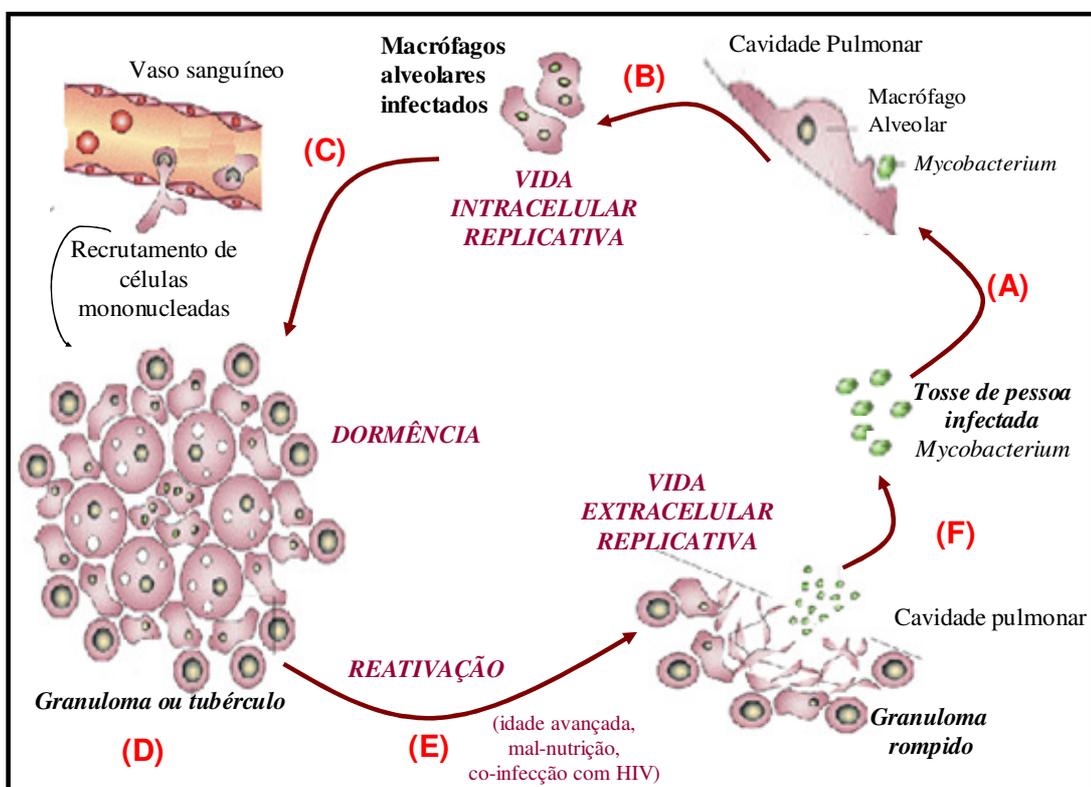


Figura 1: Ciclo da infecção por *M. tuberculosis* (adaptado de Russel, 2001).

A tuberculose continua sendo um grave problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento, voltando a ocupar papel de destaque entre as principais doenças infecto-contagiosas. Apesar da existência de antibióticos e de vacina, *M. tuberculosis* continua sendo a bactéria que causa o maior número de mortes por origem infecciosa no mundo. Considera-se que um terço da população mundial esteja infectada e, sabe-se que anualmente há cerca de 9 milhões de novos infectados, além de dois milhões de óbitos decorrentes (<http://www.who.int>). No Brasil, estima-se a existência de mais de 42 milhões de infectados e o aparecimento de aproximadamente 80.000 novos casos por ano, além de a doença levar à ocorrência de cerca de 6.000 óbitos por ano (<http://www.datasus.gov.br>).

A vacinação existente, BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) empregada pela primeira vez em humanos em 1921, protege apenas contra as formas mais agressivas da tuberculose, e somente em crianças já que a proteção em adultos varia de 0 a 80% (Figura 2). Atualmente, o tratamento comum utilizado para TB dura seis meses, associando quatro antibióticos durante dois meses e dois antibióticos por quatro meses (Dye *et al.*, 1999; Rieder, 2002). O arsenal de fármacos utilizado contra a tuberculose é bastante pequeno (Figura 3) e é praticamente o mesmo desde a década de 60, sendo que alguns possuem ações similares e não agem sob a forma latente do bacilo, presente dentro dos granulomas. Esta terapia extremamente longa, falha e de difícil implementação levou ao conseqüente aparecimento de novos bacilos resistentes aos antibióticos tipicamente utilizados, conhecidos como multi-resistentes - MDR (*Multi Drug Resistance*) e ultra-resistentes - XDR (*Extreme Drug Resistance*) (Dorman & Chaisson, 2007). Dificultando ainda mais o controle mundial desta doença ainda bastante negligenciada (Figura 3).

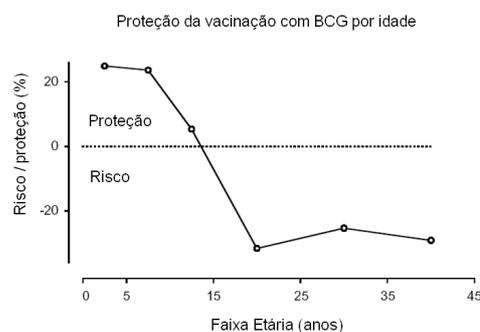


Figura 2: Eficiência da vacina BCG aplicadas em diversos grupos etários (adaptado de Rieder, 2002)

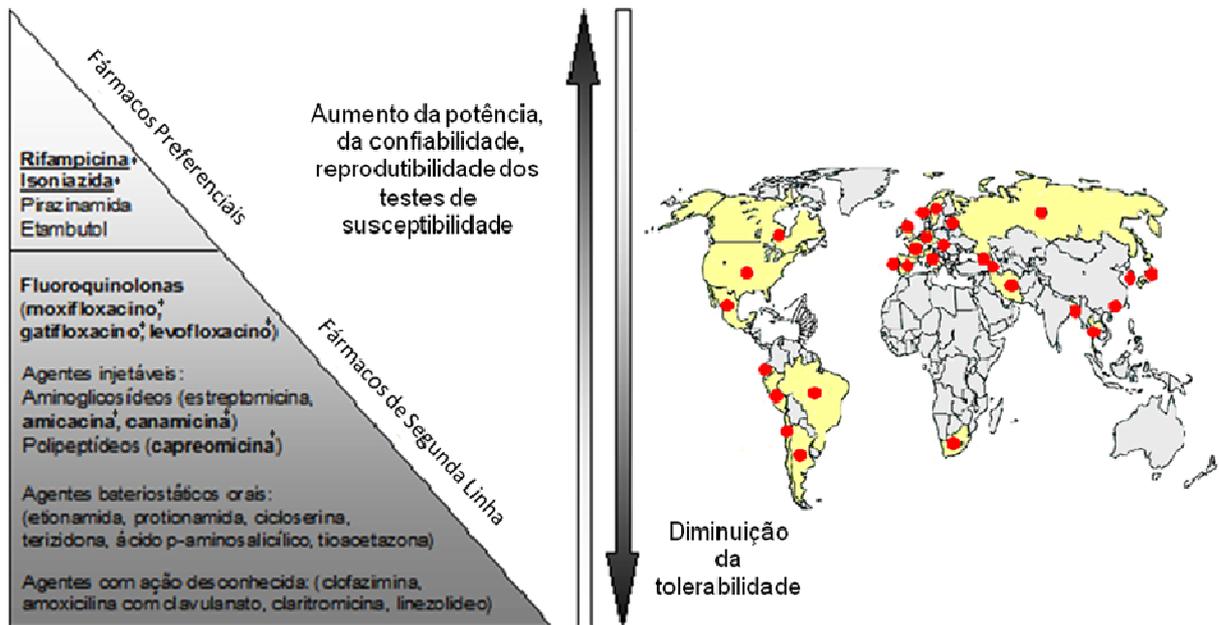


Figura 3: Pirâmide mostrando os diferentes fármacos utilizados durante o tratamento anti-tuberculose. Sublinhado mostrando os dois antibióticos preferenciais aos quais as micobactérias MDR desenvolveram resistência e, com asterisco (*) são mostrados os medicamentos aos quais as micobactérias XDR são resistentes. Os pontos vermelhos no mapa mostram os países onde casos de XDR aparecem (dados de 19 de Março de 2007 pela OMS) (adaptado de Dorman, 2007).

Neste panorama mundial da tuberculose pode-se perceber como ainda é de grande importância focalizar as investigações básicas e aplicadas no controle global da doença, desenvolvendo áreas como prevenção, diagnóstico e tratamento. Para o desenvolvimento de tais áreas é necessário compreender primeiramente como se dá a interação entre o hospedeiro (homem) e o patógeno (*M. tuberculosis*), bem como a contribuição desta interação no desenvolvimento da doença. Já é sabido que *M. tuberculosis* apresenta mecanismos de sobrevivência muito complexos que lhe permitem enfrentar o ambiente hostil que encontra dentro dos macrófagos humanos (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1996), sendo capaz de ativar sinais específicos responsáveis por alterar a função dos mesmos; como inibição da fusão fagossomo-lisossomo, inibição da acidificação dos fagossomos e bloqueio do processamento/apresentação de antígenos (Vergne *et al.*, 2005; Deretic *et al.*, 2006). Dentro destes mecanismos utilizados pelo bacilo durante sua interação com o hospedeiro, os mecanismos envolvidos na sinalização celular se mostram essenciais.

O mecanismo de maior importância envolvido na sinalização celular é a transdução de sinal, encontrado em todas as células eucariontes e procariontes e, responsável pela adaptação das mesmas às mudanças ambientais (Galan & Bliska, 1996). As respostas celulares são mediadas por cascatas de reações que envolvem proteínas quinases, as quais ativam substratos protéicos por fosforilação dependente de ATP em resíduos específicos, tais como histidina e aspartato em procariotos (sistemas dois componentes) e, serina/treonina ou tirosina em eucariotos ou quinases tipo-eucarionte. A regulação reversa das quinases (defosforilação) é mediada por proteínas fosfatases (Bach *et al.*, 2006). As proteínas fosfatases participam modulando uma grande variedade de eventos celulares tais como metabolismo, a transcrição gênica, controle do ciclo celular, resposta imune, e o crescimento da célula (Walton e Dixon, 1993). A importância destas proteínas fosfatases reside no fato de serem consideradas responsáveis pelo controle da taxa e da duração das respostas, revelando assim, seu potencial como uma nova classe de alvos terapêuticos (Zhang, 2005; Chopra *et al.*, 2003; Tonks, 2006)

Resultados obtidos com outras bactérias patogênicas sugerem que a ação de proteínas fosfatases teria um importante papel na determinação da patogenicidade das micobactérias (DeVinney *et al.*, 2000; Andersen *et al.*, 2004), interferindo com a sinalização celular do macrófago mediada por fosforilação/defosforilação (Cozzone *et al.*, 2004). Como exemplo, há *Yersinia pseudotuberculosis*, que secreta uma tirosina-fosfatase (YopH) cuja atividade enzimática é essencial para a sobrevivência da bactéria nas células do hospedeiro (Black & Bliska, 1997). YopH é secretada pela bactéria no meio extracelular e seu alvo é a superfície interna dos macrófagos, onde defosforila proteínas relacionadas ao citoesqueleto e implicadas na ação bactericida (Black *et al.*, 2000; Ivanov *et al.*, 2005). Outro exemplo é a Stp, uma serina/treonina fosfatase de *Listeria monocytogenes* que defosforila o fator de alongação EF-Tu do hospedeiro, impedindo a correta síntese protéica (Archambaud *et al.*, 2005); enquanto SptP, tirosina-fosfatase de *Salmonella typhimurium*, através da defosforilação de proteínas chaves, altera a organização do citoesqueleto do hospedeiro, evitando assim a internalização da bactéria dentro das células não-fagocitárias (Fu & Galan, 1999).

As proteínas fosfatases são hidrolases que utilizam como substratos resíduos de aminoácidos fosforilados. Estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza, tendo sido descritas em animais (Buzalaf *et al.*, 1998), vegetais (Xu *et al.*, 1998) e em microrganismos (Stark, 1996). As proteínas fosfatases estão divididas em duas grandes superfamílias, que além de estruturalmente diferentes utilizam mecanismos de catálise diferentes (Tonks, 2006). A superfamília das serina/treonina fosfatases é composta por enzimas dependentes de íons metálicos divalentes e com um mecanismo de catálise apresentando uma única etapa (Barford *et al.*, 1998). Já proteínas tirosina fosfatases, não necessitam de íons metálicos e defosforilam os resíduos de tirosina em duas etapas, com formação de um intermediário tiofosforilado (Pannifer *et al.*, 1998)

A superfamília das proteínas tirosina fosfatases (*Phospho Tyrosine Phosphatases* - PTPs) é responsável pela hidrólise do fosfato ligado aos resíduos de tirosina em proteínas (Dixon, 1996; Burke & Zhang, 1998). São estruturalmente diversas e podem ser divididas em pelo menos quatro subfamílias: (1) PTPs clássicas específicas, (2) PTPs com dupla especificidade (DSPs), (3) PTPs Cdc25, e (4) PTPs de baixo peso molecular (LMW) (Zhang, 2005). Essas enzimas possuem poucas similaridades na seqüência, entretanto são consideradas da mesma superfamília devido ao seu mecanismo catalítico comum (Figura 4-A) e pela conservação de características estruturais no sítio ativo (Figura 4-B). Todos os membros deste grupo utilizam o mesmo mecanismo de catálise, no qual o resíduo de cisteína do sítio ativo executa um ataque nucleofílico no grupamento fosfato do substrato. Adicionalmente, um resíduo invariável de aspartato tem papel crucial na catálise; num primeiro momento ele age como um ácido, protonando o grupo fenolato do substrato e, num segundo momento, como uma base, ativando uma molécula de água para promover a hidrólise (Pannifer *et al.*, 1998). O domínio catalítico das PTPs consiste de estruturas secundárias α e β , sendo composto de um núcleo de folhas- β flanqueado por α -hélices (Zhang, 2002). Neste domínio é encontrada a cisteína catalítica, característica comum das PTPs, as quais são inibidas pelo pervanadato e outros agentes oxidantes (Tonks, 1996; Huyter *et al.*, 1997; Tracey, 2000)

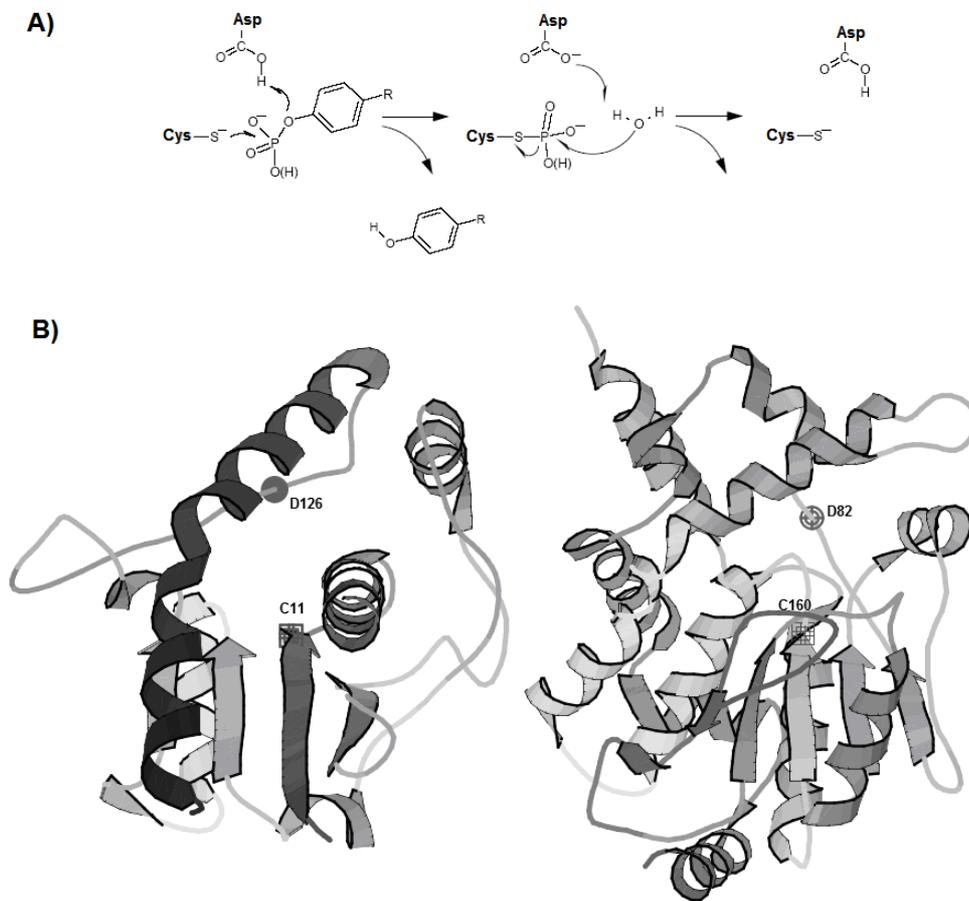


Figura 4: (A) O mecanismo geral da reação catalisada por uma proteína tirosina-fosfatase (PTP), em (B) estrutura de PtpA (PDB ID: 1U2P) e PtpB (PDB ID: 1YWF) de *M. tuberculosis*, domínio catalítico estruturalmente composto por um núcleo de folhas- β flanqueado por α -hélices; em destaque a Cys e o Asp catalíticos.

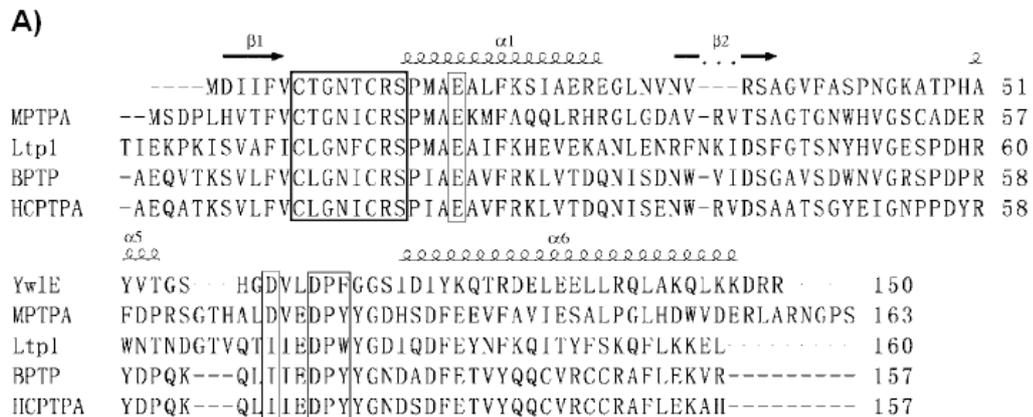
Até pouco tempo, acreditava-se que a sinalização celular em procariotos baseava-se somente no sistema dois-componentes (histidina e aspartato); sendo as tirosina-fosfatases exclusivas de organismos eucariotos. No entanto, recentemente se demonstrou a presença de genes que codificam para as PTPs também em bactérias, sendo estas então denominadas PTPs tipo-eucarióticas (Kennelly & Potts, 1999; Cozzone *et al.*, 2004). *M. tuberculosis* possui duas tirosina-fosfatases (PtpA e PtpB), todavia em seu genoma não se observam genes que codifiquem para as correspondentes tirosina-quinases (Cole *et al.*, 1998; <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). A ausência em *M. tuberculosis* de tirosina-quinases e a presença de PtpA e PtpB nos filtrados de meio de cultivo sugerem que

elas sejam secretadas no meio extracelular e que seus substratos sejam proteínas dos macrófagos do hospedeiro (Koul *et al.*, 2000); isto é reforçado pelo descrito para *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, onde Map1985, que possui 89% de similaridade com PtpA, é secretada no citoplasma de macrófagos durante infecção (Bach *et al.*, 2006). Há pouco tempo, foi demonstrado que a inativação de PtpB impede a sobrevivência da micobactéria mutada dentro de macrófagos ativados (Singh *et al.*, 2003), e que PtpA interfere com o mecanismo de fagocitose, através da polimerização de actina no interior dos macrófagos (Castandet *et al.*, 2005); além de que quando clonada em *M. bovis* BCG, PtpA é expressa em condições encontradas durante a infecção intracelular de macrófagos humanos (Cowley *et al.*, 2002), sugerindo um papel essencial das duas tirosina-fosfatases na virulência de *M. tuberculosis*.

Existe uma grande quantidade de evidências sobre o importante papel das PTPs eucarióticas na regulação de processos fisiológicos (Hunter, 1995). Contudo uma compreensão molecular detalhada das ações de muitas destas enzimas, tanto de origem eucariótica quanto procariótica, ainda resta ser determinada. A falta de uma definição precisa das vias de sinalização envolvidas, em grande parte reside na dificuldade de identificação dos substratos dessas fosfatases. Com PTPs selvagens e ativas (PTP-*wt*) o complexo enzima-substrato forma-se apenas transitoriamente, sendo deste modo, de difícil isolamento (Hengge *et al.*, 1995).

Estudos mecanísticos e estruturais detalhados mostram que as PTPs utilizam um mecanismo comum de hidrólise de fosfomonoésteres (Zhang, 2002). As PTPs possuem um domínio altamente conservado que envolve a seqüência consenso do sítio catalítico (C[X]₅R[S/T]), contendo os resíduos catalíticos cisteína e aspartato (Xu *et al.*, 2006) (Figura 5-A). Com base neste padrão compartilhado entre PTPs, foi proposto o método conhecido por '*mutant substrate-trapping*' como ferramenta para identificar potenciais substratos desta família (Flint *et al.*, 1997). A estratégia consiste em gerar mutantes das PTPs que possuam uma mutação pontual em um ou dois resíduos de aminoácidos conservados do sítio ativo (C, D, Q; Flint *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 2002), trocando-os por outros que a princípio não alterem a estrutura e a estabilidade dessas proteínas (como alanina e serina). Tais mutantes retêm a habilidade de ligar substratos,

mas são incapazes ou severamente afetados na capacidade de defosforilar, tornando assim, possível a captura do complexo enzima-substrato (Figura 5-B).



B)

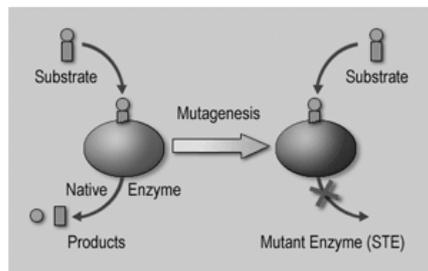


Figura 5. A) Alinhamento de seqüências de PTPs: *Bacillus subtilis* - YwIE, *M. tuberculosis* - MPTPA, *Saccharomyces cerevisiae* - Ltp1, bovina - BPTP, e humana - HCPTPA. Os resíduos conservados aparecem destacados (Modificado de Xu *et al.*, 2006). **(B)** Esquema da metodologia de 'mutant substrate-trapping' (www.diazyme.de)

Diversos tipos de mutantes para a técnica de '*mutant substrate-trapping*' de PTPs tem sido gerados e usados com sucesso nos últimos dez anos (Blanchetot *et al.*, 2005; Tiganis & Bennett, 2007), sendo descritos em mais de 60 trabalhos científicos, buscando principalmente substratos de PTPs de origem eucarionte (Blanchetot *et al.*, 2005). Até o momento, somente um trabalho foi publicado utilizando esta técnica na procura de substrato de uma tirosina-fosfatase de origem bacteriana (YopH, de *Yersinia pseudotuberculosis*) (Black & Bliska, 1997). Nas micobactérias ainda não é completamente entendido o significado dos processos de fosforilação/defosforilação

para sua sobrevivência intracelular e patogenicidade. Neste trabalho pretende-se isolar e identificar substratos da proteína tirosina-fosfatase PtpA de *M. tuberculosis* usando ferramentas de '*mutant substrate-trapping*' como parte de um esforço para elucidar a função biológica desta enzima; pois a identificação de suas especificidades funcionais e mecánísticas serão necessárias para que, no futuro, seja possível o desenho e desenvolvimento de inibidores específicos com papel terapêutico contra a tuberculose.

OBJETIVO GERAL

Identificação de substratos da tirosina-fosfatase PtpA de *Mycobacterium tuberculosis*, utilizando ferramentas de 'mutant substrate-trapping' e precipitação por matriz de agarose.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção dos mutantes de PtpA, PtpA-D126A e PtpA-C11A, de *M. tuberculosis*;
- Expressão e purificação, por cromatografia de afinidade e gel filtração, da tirosina-fosfatase PtpA-*wt* e dos mutantes em *E. coli*;
- Caracterizar cineticamente e estruturalmente os mutantes PtpA-D126A e PtpA-C11A;
- Isolar possíveis substratos de PtpA por precipitação com matriz de agarose dos complexos resultantes da incubação dos mutantes (PtpA-D126A e PtpA-C11A) com extratos protéicos de macrófagos humanos;
- Identificar os potenciais substratos de PtpA através de espectrometria de massa.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Construção dos mutantes de PtpA ('*mutant substrate-trapping*')

Os plasmídeos contendo o gene da PtpA-*wt* e a mutação DA, PtpA-D126A, foram obtidos do laboratório dirigido pelo Dr. Pedro Alzari (Unité de Biochimie Structurale, Institut Pasteur, Paris - França). Para obtenção do mutante CA, PtpA-C11A, o plasmídeo contendo o gene não mutado da PtpA (*Rv2234*) foi utilizado como molde para a metodologia de mutagênese sítio dirigida, através de reações de PCR com vetores de expressão pET 28 e iniciadores contendo o códon para mutação. (Braman *et al.*, 1996).

O vetor pET 28a+ (*Plasmid for Expression by T7 RNA polimerase* - Novagen) confere às bactérias transformadas resistência ao antibiótico kanamicina; e apresenta o promotor do fago T7, portanto a ativação da síntese da T7 polimerase pelo indutor leva a expressão da proteína recombinante. As proteínas recombinantes originadas pelo vetor pET 28 contêm uma seqüência de seis histidinas na porção amino terminal (*his-tag*), esta característica permite a purificação da proteína por cromatografia de afinidade em uma coluna carregada com metal (IMAC, *Immobilized metal ion affinity chromatography*) (Phorat, 1992)

A partir do plasmídeo pET 28 contendo o gene de PtpA-*wt* foi feita a inserção da mutação C11A utilizando os seguintes iniciadores 5' GTGTCTGATCCGCTGCATGTCACATTCGTTGCTACAGGC 3' e 5' GCCTGTAGCAACGAA TGTGACATGCAGCG GATCAGACAC 3' (códon contendo a mutação destacado). Uma gama de 8-60 ng de DNA molde (PtpA-*wt*) foram incubados com 100 ng de cada iniciador e 2.5 UE de Platinum Taq High Fidelity Polimerase (Invitrogen), em um volume final de 50 µl contendo 2 mM MgSO₄, 0.5 mM dNTP (LGC Biotecnologia). As condições para as reações de PCR foram: 30 seg. a 94 °C e 16 ciclos de 30 seg. a 94 °C seguido de 1 min. a 55 °C e 15 min. a 68 °C (Mastercycler Gradiente - Eppendorf). A digestão do DNA molde (DNA parental metilado) foi feita pela incubação durante 1h a 37 °C com

10 UE de *Dpn-I* (Invitrogen), e o DNA restante foi utilizado para transformação de células competentes de *Escherichia coli*. As construções foram posteriormente verificadas por seqüenciamento de DNA e por análise por espectrometria de massa dos produtos de digestão das proteínas obtidas.

2. Obtenção de células competentes e transformação de *E. coli*

As células competentes de *E. coli* foram obtidas para realização de transformação com as construções plasmídicas de PtpA, *wt* e mutantes. Para isto 50 µl de meio LB (Luria-Bertani) foi inoculado com uma colônia da cepa desejada [BL21(DE3) ou DH5α] a 37 °C sob agitação até $DO_{600\text{ nm}} \sim 0.5$; sendo então centrifugado a 5000 x g por 5 min. a 4 °C. O sedimento foi suspenso em 25 ml de $CaCl_2$ 0.1 M e mantido por 1 h a 4 °C, novamente centrifugado e suspenso em 5 ml de $CaCl_2$ 0.1 M com 10% glicerol e incubado 30 min. a 4 °C (Mandel & Higa, 1970). Alíquotas de 100 µl de células competentes foram armazenadas a - 80 °C.

Para transformação foi utilizado um volume de 100 µl de *E. coli* competentes, acrescido de 2 µl de plasmídeo (~ 200 ng), sendo mantido durante 30 min. a 4 °C, colocado 2 min. a 42 °C e imediatamente levado a 4 °C por 2 min. Foram adicionados 500 µl de meio LB e mantido por 1 hora a 37 °C. Diferentes volumes da transformação (100 - 500 µl) foram semeados em LB ágar-kanamicina (50 µg/ml) e mantidos a 37 °C por 16 h. Com as colônias transformadas de *E. coli* DH5α foi feito um cultivo de 5 ml em LB kanamicina para a preparação de um estoque de DNA (utilizando-se para extração do DNA plasmídico o *kit* MiniPrep-Qiagen). A dosagem de DNA foi feita a 254 nm (coeficiente de extinção molar $\epsilon = 6600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). A partir de um sedimento de 50 ml de cultivo de *E. coli* BL21(DE3), suspenso em 50% de glicerol previamente autoclavado, foi preparado um estoque a - 20 °C de bactérias transformadas para sua utilização na expressão de PtpA.

3. Expressão e purificação de PtpA mutada e não mutada

As construções plasmídicas contendo PtpA-*wt* e D126A foram utilizadas para expressão das diferentes proteínas em *E. coli* BL21 (DE3). Um volume de 0.5 ml de pré-cultivo em LB-kanamicina de células transformadas, mantido a 37 °C por 16 h, foi utilizado para inocular 500 ml de LB-kanamicina (Boitel *et al.*, 2003). O cultivo foi mantido a 37 °C até o final da fase exponencial ($DO_{600\text{ nm}} = 0.5-0.8$). Após, uma concentração final de 0.5 mM IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo) foi adicionada para indução da expressão da proteína recombinante. As culturas foram incubadas em diferentes tempos e temperaturas (16 h a 15 °C e, 4 h a 37 °C) para determinação da temperatura onde houve produção do maior nível de proteína recombinante solúvel. Os precipitados bacterianos foram dispersos no tampão de lise [20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl, glicerol 10%, contendo inibidores de proteases (Protease Inhibitor Mix – Amersham Biosciences)] e sonicados a 4 °C (Fisher Scientific Model 60 Sonic Dismembrator). O tempo de sonicação foi otimizado, procurando obter o maior número de células lisadas e uma concentração constante de proteína solúvel. O lisado foi centrifugado a 15.000 x g a 4 °C durante 1h, recuperando-se o sobrenadante.

As proteínas recombinantes foram purificadas do sobrenadante a partir do *his-tag*, através de imobilização por afinidade a metal. Para isto, o sobrenadante solúvel foi incubado durante 40 minutos, sob agitação e à temperatura ambiente, com 3 ml da matriz Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) ativada com $CuSO_4$ 0.1 M, conforme recomendação do fabricante e, previamente equilibrada no tampão de lise. As proteínas não ligadas à resina foram removidas através de três lavagens da resina (W1, W2, e W3) com cinco volumes de coluna (VC) do tampão de lise contendo, respectivamente, 10 mM, 20 mM e 30 mM de imidazol. Em seguida, as proteínas recombinantes foram eluídas da matriz em cinco etapas de dois VC do tampão de lise contendo 300 mM de imidazol (competidor que rompe a interação por afinidade).

Posteriormente, o imidazol foi eliminado das eluições por diálise (Membrana de celulose MW 5.3 kDa SIGMA) sob agitação constante a 4 °C. A diálise se deu em

quatro etapas, com 3 horas contra cada novo tampão (20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl, 5 mM DTT, 10% glicerol) de decrescentes concentrações de imidazol (150 mM, 75 mM e 35 mM); sendo o último tampão-D de estoque, sem Imidazol e com 50 mM NaCl, 20% glicerol, 5 mM DTT e 5 mM EDTA. Após, as proteínas foram centrifugadas para eliminar os possíveis precipitados e concentradas também por centrifugação (Amicon Ultra-15 Millipore, membrana de poro de 10 kDa). A concentração de proteína foi determinada a partir da curva de calibração obtida com diferentes concentrações de BSA utilizando a metodologia de Bradford (Bradford, 1976). Todas as proteínas foram produzidas na forma solúvel e o rendimento de cada proteína recombinante por litro de cultura foi determinado. A pureza das amostras foi verificada por SDS-PAGE 12%.

Procurando melhorar a purificação e a separação da proteína monomérica dos possíveis agregados presentes nas amostras, foi realizada uma etapa adicional de purificação por gel filtração das proteínas PtpA (mutada e não mutada). As colunas utilizadas em um sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* – AKTA Basic Sistem) foram a Superdex 75 10/300 (GE Healthcare), para as análises com quantidades analíticas de proteína (10 μ l, 10 μ g) e, a Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) para as análises com quantidades preparativas de proteína (1 ml, 5 mg). As colunas foram lavadas com 2 volumes de coluna (VC) de água Milli-Q previamente degaseificada 15 min. e equilibradas com 2VC do tampão de diálise D previamente filtrado por 0.22 μ m e degaseificado. O volume do pico correspondente a fosfatase foi concentrado na ordem de 5 mg/ml e acrescido de 50 mM DTT final, sendo então dividido em alíquotas e mantido a - 20 °C.

4. Dicroísmo Circular

Os experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados utilizando-se 25 μ M de PtpA-*wt* e PtpA-D126A no tampão 20 mM NaH₂PO₄ (pH 7.4) contendo 20 mM NaCl, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm. O espectro CD foi obtido através de um espectropolarímetro JASCO J-715 equipado com um controlador de temperatura '*peltier*', que permite o controle da temperatura da amostra. Os dados

foram medidos em intervalo de comprimentos de onda variando de 300 a 200 nm, a 25 °C. Foram realizadas 5 repetições para cada espectro, com velocidade de varredura de 50 nm/min. e resolução de 0.2 nm, respostas de 1 s e largura de faixa de 1.0 nm. Foi realizada a subtração de espectros de fundo e os dados foram convertidos de sinal CD (mdegree) em elipticidade molar (deg cm²/dmol).

A estabilidade térmica de PtpA-*wt* e PtpA-D126A também foi estudada através de dicroísmo circular. O espectro a 222 nm foi medido na faixa de temperatura de 25 °C a 90 °C, com aumento gradual de 5 °C, com um período de equilíbrio de 5 min. em cada temperatura. Experimentos para renaturação (de 90 °C até 25 °C) também foram realizados para assegurar a reversibilidade. As variações no espectro a 222 nm foram plotadas no gráfico versus a temperatura em cada ponto e, os pontos de desnaturação térmica média (T_m) foram calculados.

5. Fingerprint com tripsina

Visando avaliar uma possível perda da estrutura conformacional da proteína mutante PtpA-D126A em relação à PtpA-*wt*, foram realizados ensaios de digestão parcial com tripsina. Para isto PtpA-*wt* e PtpA-D126A foram incubadas na razão 20:1 com tripsina (Promega) no tampão de estoque das PTPs (20 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 20% glicerol e 5 mM EDTA), e mantidas a temperatura ambiente. Foram retiradas amostras após 1h e 3h de digestão para análise em gel SDS-PAGE 15%.

6. Avaliação da atividade enzimática de PtpA mutada e não mutada

Para determinar se as preparações de fosfatases obtidas estavam ativas foram realizados ensaios de atividade utilizando *p*-Nitrofenil fosfato (*p*NPP) como substrato artificial. Para avaliar e caracterizar o mutante D126A de PtpA como bom '*mutant substrate-trapping*', os parâmetros cinéticos das proteínas foram determinados. O

tampão utilizado para a atividade foi o descrito no artigo de caracterização desta fosfatase – imidazol 25 mM pH 7.0 (Koul *et al.*, 2000), testado e otimizado quanto à presença de agente redutor (DTT) e íons divalentes ($MgCl_2$ e $CaCl_2$). Os ensaios de atividade foram realizados a 37 °C utilizando concentrações crescentes de pNPP (0.5 - 40 mM), sendo o coeficiente de extinção molar do pNP a 410 nm = $3.8 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$. Para a determinação do K_m e V_{max} , foram utilizadas as melhores curvas para a equação de Michaelis-Menten de cada uma das proteínas, evitando assim problemas de aumento de erros dos métodos de linearização (Tommasini *et al.*, 1985).

7. Cultura celular e preparação dos extratos protéicos

A linhagem celular monocítica humana THP-1 foi obtida e cultivada durante estágio com a Dr^a. Ana Ferreira no laboratório de Imunologia do Instituto de Higiene (Montevideu, Uruguai). As células foram cultivadas em meio de RPMI 1640 com 2 mM de L-glutamina, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1.5 g/l de bicarbonato de sódio, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sódio, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina; posteriormente filtrado a 0.22 µm. Os frascos de cultivo contendo 0.5×10^6 células foram mantidos em incubadora umidificada a 37 °C e 5% de CO_2 , até ser duplicado o número celular.

Para diferenciação celular dos monócitos em macrófagos, os frascos foram incubados durante 72 horas com 50 ng/ml de PMA (acetato de forbol miristato) em incubadora umidificada a 37 °C e 5% de CO_2 . Foram utilizados macrófagos em dois estados diferentes; ativados e não ativados. Para ativação dos macrófagos foram adicionados aos frascos de cultivo 0.2 µg/ml de LPS (lipopolissacarídeo) e 500 U/ml de INF- γ (interferon-gama), sendo mantidos por 20 min. a 37 °C e 5% de CO_2 .

Os extratos foram preparados conforme literatura (Wu *et al.*, 2006); para inibição das fosfatases dos macrófagos os cultivos foram pré-tratados com 100 µM de ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) ativado durante 30 min. a 37 °C, em seguida

centrifugados e o precipitado celular disperso em tampão de lise (25 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glicerol, 1 mM benzamidina, 1 SBTI µg/mL, 1 mM PMSF e 5 mM de ácido iodoacético - IAA) e incubando por 30 min. a 4 °C, havendo inibição irreversível das tirosina-fosfatases presentes pelo IAA. Logo foram acrescentados 10 mM DTT final para neutralizar o IAA restante. Após, esses extratos foram centrifugados a 30.000 x g e os sobrenadantes estocados a - 80 °C.

8. Ensaio de Ressonância Plasmônica de Superfície (BIAcore)

Para análise da interação entre PtpA-*wt* e PtpA-D126A com extratos protéicos de macrófago foi utilizada a técnica de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR). Os experimentos foram realizados durante estágio com Dr. Otto Pritsch na Unidade de Biofísica de Proteínas do Instituto Pasteur de Montevideú. Tal metodologia foi escolhida para as primeiras análises devido à grande capacidade de verificar associações e dissociações utilizando uma quantidade bastante reduzida de material. Foram utilizados nas análises o aparelho BIAcore 3000 (GE Healthcare) e o *chip* Sensor Chip CM5, contendo cadeias de dextran carboxi-metilado covalentemente ligadas à superfície de ouro (Pattnaik, 2005).

Inicialmente, foi determinado o pH do tampão de imobilização a partir do cálculo do ponto isoelétrico (PI) de PtpA-*wt* e PtpA-D126A. Como ambas possuem PI em torno de 6.5 foi escolhido tampão acetato de sódio 10 mM pH 4.5; pois neste pH, menor que o PI, os grupos amino das proteínas encontram-se carregados positivamente e assim permitem sua ligação à matriz, carregada negativamente, do *chip*. Foram utilizadas 0.44 µg de PtpA (*wt* e D126A) para imobilização, em seguida foram feitas lavagens com o tampão de corrida HBS-EP Buffer BIA Certified (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% polisorbato 20 (v/v)) e os extratos protéicos de macrófagos foram injetados. A complexação entre os extratos e a PtpA imobilizada foi monitorada em

tempo real, sendo descontados os valores da interação controle entre o extrato e a superfície do *chip* bloqueada e sem PtpA.

Foram realizados experimentos para avaliar possíveis diferenças entre os extratos de macrófagos ativados e não ativados, inibição ou diminuição da interação por diferentes concentrações de ortovanadato de sódio ativado (Na_3VO_4) e os fatores que rompem a interação extrato-PTP, como concentração salina e pH.

9. Isolamento de possíveis substratos por “*Mutant Substrate-Trapping*”

Após caracterização inicial da interação entre PtpA, *wt* e D126A, e o extrato de macrófagos usando SPR, e otimização das condições de lavagem e eluição, partiu-se para a utilização da metodologia ‘*mutant substrate-trapping*’ em maior escala. Para isso, o mutante D126A de PtpA imobilizado foi incubado com extratos protéicos de macrófagos, na tentativa de isolar possíveis substratos.

Previamente foi feita a imobilização covalente de PtpA-D126A à resina NHS-activated Sepharose High Performance (GE Healthcare) ativada e bloqueada conforme orientações do fabricante. A quantidade de resina correspondente a 500 μg de PtpA-D126A foi incubada com 5 mg de extrato protéico de macrófagos (Palka et al., 2003) a 4 °C sob suave agitação durante 2 horas. Para remoção de proteínas que estivessem ligadas fracamente à Ptp ou à resina, foram realizadas lavagens com concentrações crescentes de NaCl (0.2 M, 0.5 M e 1M) no tampão 25 mM HEPES pH 7.4. A eluição foi feita por uma diminuição brusca do pH, utilizando tampão pH 2.5.

Foram feitos ensaios incubando os extratos com matriz NHS bloqueada sem a presença de PtpA como controle. As lavagens e eluições foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%, corado por protocolo de nitrato de prata compatível com espectrometria de massa (Parodi-Talice et al., 2004).

10. Espectrometria de Massa

A identificação das proteínas isoladas durante os ensaios de “Mutant Substrate-Trapping” foram analisadas por espectrometria de massa (MS). O aparelho utilizado nas análises foi um espectrômetro de massa MALDI TOF (Applied Biosystems 4800 Analyzer). Os experimentos foram realizados na Unidade de Bioquímica e Proteômica Analíticas (Instituto Pasteur Montevideu - Uruguai), projeto de colaboração CNPq-PROSUL 2005-2007.

Inicialmente, as bandas correspondentes a proteínas de interesse foram retiradas dos géis corados com nitrato de prata, sendo então descoradas em solução de ferricianeto de potássio 30 mM e tiosulfato de sódio 100 mM por 20 min. (Parodi-Talice *et al.*, 2004). As proteínas foram digeridas com tripsina em bicarbonato de amônio a 35 C durante 16 h, e os peptídeos extraídos com 60% acetonitrila em 0.2% de ácido trifluoroacético (Hellman, 2000). Os peptídeos foram re-solubilizados em 10 µl de TFA 0.1% sendo então dessalinizados em colunas C18 Zip Tips (Millipore), de acordo com as instruções do fabricante. Os peptídeos foram eluídos em 5 µl de acetonitrila 50%/TFA 0.1%. Para MS análise, 0.5 µl de cada amostra foi co-precipitada com 0.5 µl da matriz (solução saturada de ácido α -ciano-4-hidrocinâmico em 50% de acetonitrila e TFA 0.1%). As proteínas foram identificadas após buscas nas bases de dados NCBI, com as massas dos peptídeos, utilizando o programa MASCOT (Matrix Science http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), e incluindo os parâmetros: taxonomia, tolerância de massa de 0.05 Da; oxidação parcial em metionina; e permissão para um sítio de clivagem por tripsina perdido. Os critérios para identificação positiva incluíram a pontuação (*scores*) dados pelo MASCOT e porcentagem de cobertura das seqüência. Quando, na identificação das proteínas, os scores apresentados eram baixos ou porcentagem de cobertura pequena, foi feita a confirmação das seqüências dos peptídeos por PSD (*Post Source Decay*), através do seqüenciamento dos aminoácidos destes peptídeos.

11. Western Blot

Para detecção de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina que estivessem interagindo com PtpA-D126A, foi utilizada a metodologia de Western Blot. As proteínas do gel SDS-PAGE foram transferidas à membrana de PVDF, previamente lavada com metanol 100% e equilibrada no tampão de transferência (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina, 20% metanol), a eletro-transferência (equipamento Bio-Rad) foi feita à temperatura de 4 °C por 1 hora a 100 V. A membrana contendo as proteínas foi lavada três vezes em 15 ml de tampão TBS (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) por 5 min. e mantida por 1 hora em 25 ml de TBS suplementado com 3% de soro albumina bovina (TBS-B), para bloqueio dos sítio inespecíficos; posteriormente foram realizadas três lavagens de 5 min. com 15 ml de TBS e TBS contendo 0.05% de Tween-20 (TBS-T), sendo então mantida a 4 °C por 16 horas com 10 ml do anticorpo primário (IgG anti-fosfotirosina de rato - *Cell Signalling*) na diluição 1:2000 em TBS-B. Após, foram realizadas novamente lavagens com TBS e TBS-T, sendo então a membrana mantida por 2 horas com 10 ml do anticorpo secundário conjugado com peroxidase (IgG anti-IgG de rato - *Cell Signalling*), na diluição 1:2000 em TBS-B, sob agitação a temperatura ambiente. Depois de outras lavagens em TBS e TBS-T, a detecção das proteínas fosforiladas em tirosina foi feita utilizando o substrato quimioluminescente da peroxidase (*kit LumiGLO - Cell Signalling*), conforme instruções do fabricante. Um filme de raio-X (Amersham) foi então exposto à membrana tratada durante 1 hora; após aparecimento das bandas o filme foi revelado, fixado e lavado com 300 mM de ácido acético. Foi utilizado um marcador de peso molecular biotilado (*Biotinilated Protein Ladder - Cell Signalling*) para visualização no raio-X; este foi aplicado no gel SDS-PAGE e também transferido, seu anti-corpo foi acrescentado (diluição 1:2000) junto ao anticorpo secundário.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Construção dos mutantes de PtpA (*mutant substrate-trapping*)

Os plasmídeos contendo o gene de PtpA-*wt* e de PtpA-D126A, foram obtidos através de colaboração com o Instituto Pasteur de Paris; deste modo restava a obtenção do mutante de PtpA-C11A. Para obtenção do plasmídeo com a mutação CA, diversos ensaios de mutagenese sítio dirigida através de reações de PCR foram realizados; sendo alteradas condições, como temperatura, concentração do DNA molde e dos iniciadores. Entretanto, após transformação de *E. coli* (DH5 α) com os produtos de PCR pré-tratados com Dpn-I, não foram obtidas colônias transformantes. Alguns problemas, excluindo as condições testadas, podem ter ocorrido, entre eles destaca-se o excesso de trocas de bases (sem troca da fase de leitura e desconsiderando a mutação pontual), realizadas no desenho dos iniciadores, com o intuito de eliminar a presença de pareamento dentro dos mesmos. Novos iniciadores foram desenhados (5'-TTCGTTTCTACGGGCAACATCTG-3' e 5'-CAGATGTTGCCCGTAGAAACGAA-3') e outra metodologia será utilizada (construção por PCR), para que numa próxima etapa ambos sejam utilizados durante a continuação do trabalhos.

2. Obtenção de células competentes e transformação de *E. coli*

Através do tratamento químico com cloreto de cálcio foram obtidas bactérias competentes das duas cepas de *E. coli* utilizadas neste trabalho, BL21(DE3) e DH5 α . Os estoques de bactérias e o protocolo de transformação foram testados realizando-se os controles positivos (plasmídeo comercial) e negativos (sem plasmídeo), e apresentaram boas condições de uso; sendo deste modo, utilizados durante o período de realização dos trabalhos. A transformação das cepas com o plasmídeo pET28a+ contendo o gene de PtpA-*wt* e PtpA-D126A também se deu de forma bastante satisfatória. Permitindo a purificação de novas cópias do plasmídeo (utilizando *E. coli*

DH5 α) através do Kit MiniPrep-Qiagen e a expressão das proteínas recombinantes (utilizando *E. coli* BL21 (DE3)).

3. Expressão e purificação de PtpA mutada e não mutada

As construções em vetores pET 28a+ contendo os genes de PtpA (não mutada – *wt*, e mutação D126A) foram utilizadas para expressão em *E. coli* BL21(DE3) das diferentes proteínas. As células transformadas de *E. coli* foram cultivadas em meio LB contendo kanamicina até o final da fase exponencial. Depois, uma concentração de IPTG 0.5 mM foi adicionada para indução da expressão da proteína recombinante. As culturas foram mantidas sob diferentes tempos e temperaturas para determinação da melhor condição para produção do maior nível de proteína recombinante solúvel (Figura 6); sendo escolhida a indução durante 16h a 15 °C, onde grande parte da proteína recombinante se encontrava na porção solúvel, facilitando deste modo a purificação por cromatografia de afinidade.

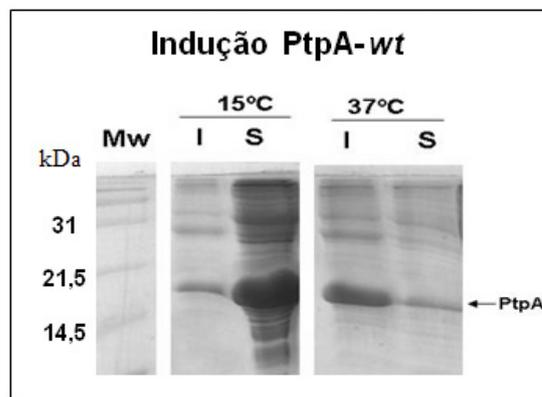


Figura 6. Determinação da temperatura ótima para produção de proteínas recombinantes solúveis. **Mw**= padrão de massa molecular, **I**=fração insolúvel, **S**= fração solúvel. A temperatura selecionada para a indução foi 15 °C. Coloração: Coomassie Blue R-250.

Após esta etapa de cultivo, foram otimizados os processos para lise das células. Os sedimentos bacterianos, resultantes do cultivo, foram resuspenso no tampão de lise contendo inibidores de proteases e sonicados a 4 °C. O tempo de sonicação foi otimizado sendo de 10 ciclos x 1 min. a 0 °C para um volume de 30 ml;

contendo 60 mg de células/ml de tampão de lise. Desta forma, obtivemos o maior número de células lisadas e, ao final, uma concentração constante de proteína solúvel; dados medidos através da metodologia de Bradford.

A Figura 7 mostra o gel SDS-PAGE da purificação otimizada da proteína PtpA-*wt*, sendo o mesmo perfil também obtido para o mutante PtpA-D126A. As proteínas recombinantes foram purificadas do sobrenadante por cromatografia de afinidade e eluídas com imidazol. O protocolo de purificação foi otimizado com relação à eluição, ficando determinada a concentração de 300 mM de imidazol para completa eliminação das proteínas recombinantes da matriz (Figura 26 – Apêndice D). As proteínas foram produzidas na forma solúvel, e o rendimento da purificação em média foi de 8 mg de proteína por litro de cultura bacteriana para PtpA-D126A e 5 mg de proteína por litro de cultura bacteriana para PtpA-*wt*, representando aproximadamente 3% da proteína total aplicada à matriz (Tabela 1). Anteriormente, foi descrito para PtpA-*wt* um rendimento mais baixo de proteína purificada (3.5 mg por litro de cultura) (Madhurantakam *et al.*, 2005) possivelmente porque nesse artigo a indução foi realizada com uma concentração mais baixa de IPTG (0.1 mM) do que utilizada neste trabalho (0.5 mM).

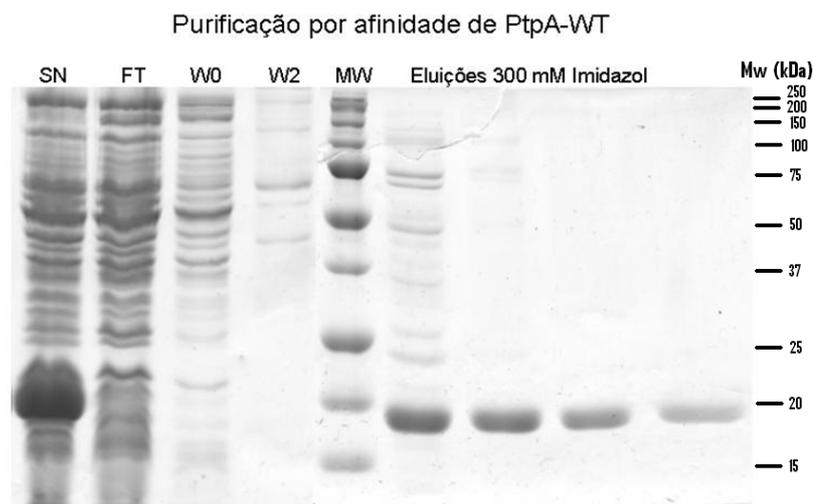


Figura 7. Purificação de PtpA-*wt* com *Cu-Chelating Sepharose*. **Mw**= padrão de massa molecular, **SN**= sobrenadante obtido por sonicação do precipitado de células previamente resuspenso no tampão de lise; **FT**= *flow through*, proteínas não ligadas em *Cu-Chelating Sepharose*. **W0**= proteínas eliminadas da matriz por lavados com tampão de lise; **W2**= proteínas eliminadas da matriz por lavados com tampão de lise com 30 mM de imidazol. **Eluições**= proteínas eluídas da matriz por tampão de lise contendo 300 mM de imidazol. Coloração: Coomassie Blue R-250.

Tabela 1: Rendimento da purificação de PtpA-*wt* e PtpA-D126A de *M. tuberculosis* a partir de 1l de células *E. coli*.

PtpA purificada por Cu-Chelating Sepharose Fast Flow (mg de PtpA por litro de cultura) ^a (%) ^b	
PtpA- <i>wt</i>	4.6 ± 0.24 (3.2 %)
PtpA-D126A	8.8 ± 3.13 (3.5 %)

^a Quantidade de PtpA como mg por litro de cultura expressa como média ± desvio padrão de três experimentos independentes de purificação.

^b Quantidade de PtpA purificada após cromatografia de afinidade como porcentagem da quantidade de proteínas inicialmente aplicada à matriz.

As frações de eluições contendo as proteínas recombinantes purificadas por afinidade foram dialisadas para retirada do imidazol; já que após eliminação foi observado o aumento da atividade específica e da estabilidade PtpAs (dados não mostrados). A diálise foi feita em quatro etapas diminuindo gradualmente o imidazol, pois a eliminação em uma única etapa leva à precipitação da proteína. Em seguida, as proteínas foram concentradas por ultra filtração (Amicon - Millipore), suas concentrações foram determinadas e a pureza das amostras verificadas por SDS-PAGE.

Uma etapa adicional de purificação por cromatografia de exclusão por tamanho (gel filtração) das proteínas PtpA-*wt* e PtpA-D126A foi realizada procurando melhorar a purificação e avaliar a presença de agregados protéicos e outros contaminantes (Figura 8). No cromatograma da purificação não foram detectados agregados das proteínas recombinantes, somente a forma monomérica. Este resultado concorda com os observados para os outros membros da família das PTP (Jiang *et al.*, 1999), onde somente a forma monomérica é ativa. A equação da reta (da curva de calibração da coluna analítica) permitiu calcular a massa molecular nativa das proteína tirosina-fosfatases de *M. tuberculosis*. Para PtpA-*wt* o volume de eluição (V_e) foi 12.43 ml, sendo determinada sua massa molecular em 19.3 kDa (massa molecular teórica de 19.9 kDa); para PtpA-D126A o V_e foi 12.16 ml e massa 21.4 kDa. O outro pico observado no cromatograma da gel filtração, após a saída de PtpA, com V_e de 30.75 ml corresponde ao imidazol que não foi completamente eliminado pela diálise realizada

após a purificação de afinidade. De fato, o mesmo pico foi obtido quando o imidazol foi injetado separadamente na coluna. Assim, uma etapa de gel filtração é recomendada para se obter uma preparação monomérica e livre de imidazol de PtpA-*wt* e PtpA-D126A, adequada para ensaios bioquímicos posteriores.

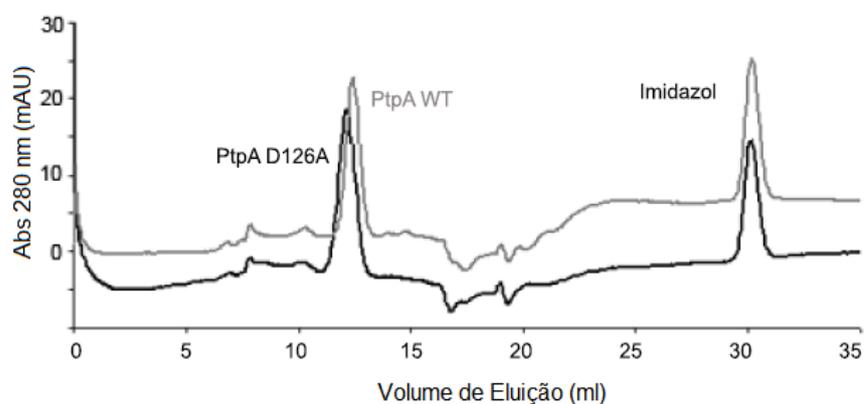


Figura 8. Cromatograma da gel filtração de PtpA-*wt* e PtpA-D126A, utilizando a coluna Superdex 75 10/300 GL no sistema HPLC (AKTA, GE). Volumes de eluição: PtpA-D126A= 12.16 ml, PtpA-*wt*= 12.43 ml e Imidazol= 30.75 ml.

Quando comparadas, PtpA-D126A teve um volume de retenção menor na coluna do que a proteína PtpA-*wt*, correspondendo ao aumento de 2 kDa em seu peso molecular. Esta diferença foi observada tanto utilizando as colunas analíticas como preparativas de gel filtração e, o mesmo foi reproduzido em mais de seis experimentos independentes. Este incremento de 2 kDa sugere que a introdução da mutação pontual D126A não promoveu trocas substanciais na conformação da fosfatase. Contudo, para certeza de que não houve grandes mudanças na estrutura da proteína PtpA-D126A, foram realizadas análises estruturais através de dicroísmo circular.

4. Análise Estrutural de PtpA-*wt* e PtpA-D126A por Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular de PtpA-*wt* e PtpA-D126A, foram feitos com o intuito de determinar se os dados encontrados durante a passagem por coluna exclusão molecular não estariam refletindo extensas alterações estruturais. Como mostrado na figura 9, o perfil dos espectros CD da proteína '*wild-type*' e do mutante D126A são similares. Embora, PtpA-D126A tenha apresentado uma intensidade menor no pico negativo de 208 nm em comparação à proteína *wt*, sugerindo que há leve rearranjo na conformação de estruturas secundárias do mutante (α -hélices, folhas- β e, estruturas randômicas ou voltas).

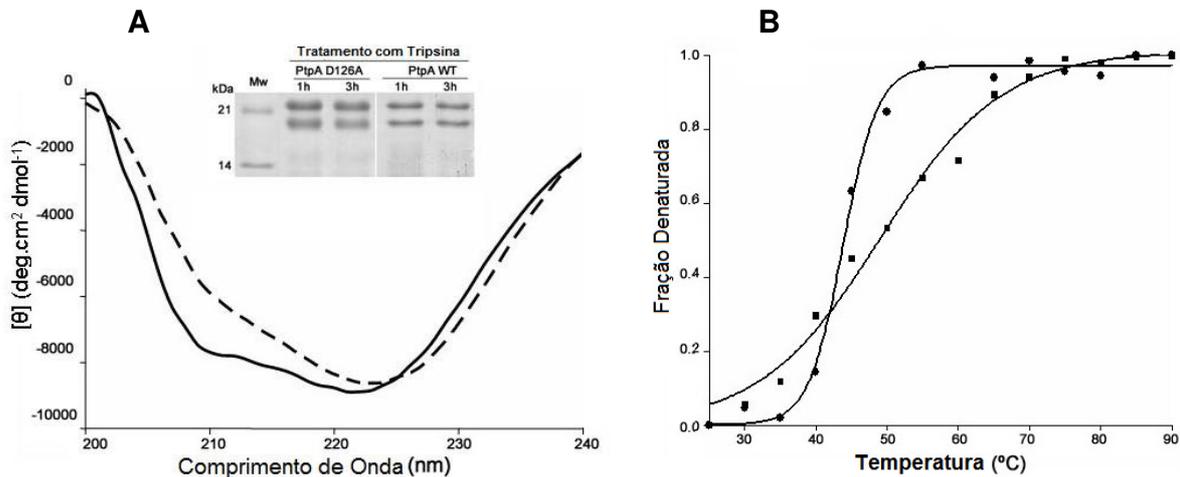


Figura 9: Dados de dicroísmo circular de PtpA-*wt* e mutante D126A. **(A)** Espectro CD da PtpA-*wt* (—) em comparação ao seu mutante D126A (---). **Inserido** gel SDS-PAGE com análise de PtpA (*wt* e D126A) tratadas com tripsina para digestão parcial; **MW** representa padrão de peso molecular. **(B)** Curvas da desnaturação térmica para PtpA-*wt* e mutante D126A. Estabilidade térmica de 25 μM de PtpA-*wt* (■), e PtpA-D126A (●) realizado em dicroísmo circular. A fração de proteína desnaturada está colocada em função da temperatura.

A análise dos espectros utilizando o programa K2d (Andrade *et al.*, 1993) permitiu calcular o percentual de estruturas secundárias em cada uma das proteínas analisadas. Em PtpA-*wt* foram encontrados 37% de α -hélice, 11% de folhas- β e 52% de estruturas randômicas ('*loop*'). O mutante D126A apresentou um percentual bastante semelhante, com 34% de α -hélices, 19% de folhas- β e 47% estruturas randômicas. Esses dados vêm ao encontro dos dados reportados na estrutura de PtpA (PDB ID: 1U2P) e aos obtidos por

CD para outras proteínas (Kim *et al.*, 2007), onde mutantes apresentaram pequenas alterações em CD porém sem implicar numa perda da conformação geral. Além disso, ensaios de digestão com tripsina revelaram que tal mudança conformacional não causou perda da estrutura global da proteína mutante (inserido na Figura 9-A); pois o padrão de clivagem foi o mesmo, somente do *his-tag*.

Posteriormente foram realizados experimentos de desnaturação térmica (Figura 9-B) procurando determinar a temperatura correspondente ao ponto de desnaturação térmica. PtpA-*wt* apresentou a 48 °C o ponto de desnaturação, enquanto para PtpA-D126A este ponto foi à temperatura de 44 °C. A relativa instabilidade do mutante PtpA-D126A indica que contatos moleculares envolvendo o Asp126 da proteína *wt* contribuem para a estabilidade total da mesma.

5. Avaliação da atividade enzimática de PtpA mutada e não mutada

A atividade de PtpA-*wt* e PtpA-D126A foi testada, utilizando o substrato artificial *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP – Figura 10) e o tampão de atividade testado e otimizado, ficando determinado a 20 mM imidazol pH 7, 40 mM DTT. Os resultados obtidos mostraram que as proteínas recombinantes super-expressas e purificadas estão em sua forma ativa. Tanto PtpA *wt* quanto o mutante D126A foram capazes de defosforilar o substrato artificial.



Figura 10. Estrutura química do *p*-nitrofenil-fosfato (*p*NPP) utilizado como substrato artificial de fosfatases em ensaios cinéticos.

Deste modo, foram determinados os parâmetros cinéticos de PtpA-*wt* e PtpA-D126A (Figura 11 e Tabela 2). A PtpA-*wt* apresentou um K_m de 3.4 mM e uma atividade específica de $4.8 \mu\text{mol } p\text{NP min.}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Parâmetros cinéticos similares foram relatados

para um homólogo de PtpA em *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Li & Strohl, 1996) e para outras PTPs (Klinghoffer & Kazlauskas, 1995). A atividade específica de PtpA é aproximadamente 10 vezes mais alta do que o relatado previamente ($0.5 \mu\text{mol pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) (Koul *et al.*, 2000), indicando que nosso protocolo otimizado é o mais apropriado para a produção desta fosfatase. PtpA D126A apresentou um valor de Km (4.8 mM) similar ao da PtpA-*wt*, em contraste o valor do kcat foi 52 vezes mais baixo do que aquele observado para PtpA-*wt* similar ao encontrado na literatura (Madhurantakam *et al.*, 2007). Estes dados permitiram confirmar o Asp126 como o aspartato catalítico, conforme foi predito utilizando o motivo definido pela família de *Low-Molecular-Weight Protein Tyrosine Phosphatases* - LW (V/LCX₅RSX₈₅₋₁₀₅DP) e de acordo com os estudos estruturais. A perda de atividade do mutante está sendo causado pela perda de contatos intra-moleculares importantes envolvidos na catálise, devido à substituição do Asp126 para alanina (troca de um grupo carregado carboxil por um não carregado metil) e não a grandes trocas conformacionais como verificado por dicróismo circular. Estes resultados estão de acordo com os dados descritos para mutantes substrate-trapping DA e de CS de outras PTPs (Flint *et al.*, 1997; Garton *et al.*, 1996; Romsicki *et al.*, 2003; LaMontagne *et al.*, 1998). De fato, a estrutura de PtpA revela que o resíduo Asp 126, cataliticamente ativo, está no loop entre β 4 e α 5 (Figura 4-B) estruturas que formam uma parede na fenda do sítio ativo (Madhurantakam *et al.*, 2005).

Em conclusão, as análises cinéticas mostram que PtpA-D126A é ativa, sem consideráveis mudanças no Km, mas com uma importante redução na atividade catalítica, apresentando desta forma as características em potencial de um bom '*mutant substrate-trapping*' e necessárias para a captura de potenciais substratos: (i) baixa atividade (kcat mais baixo do que a *wt*), (ii) liga eficientemente ao substrato (Km similar ao da *wt*), e (iii) não apresenta nenhuma mudança substancial da estrutura. A baixa atividade do mutante pode também explicar seu rendimento mais elevado do que o da *wt* (Tabela 1). De fato, expressar uma PTP ativa em um organismo que já tem um sistema de tirosinas quinase/fosfatase, como *E. coli* (Vincent *et al.*, 1999), pode causar um desequilíbrio na fosforilação, afetando a produção da proteína recombinante.

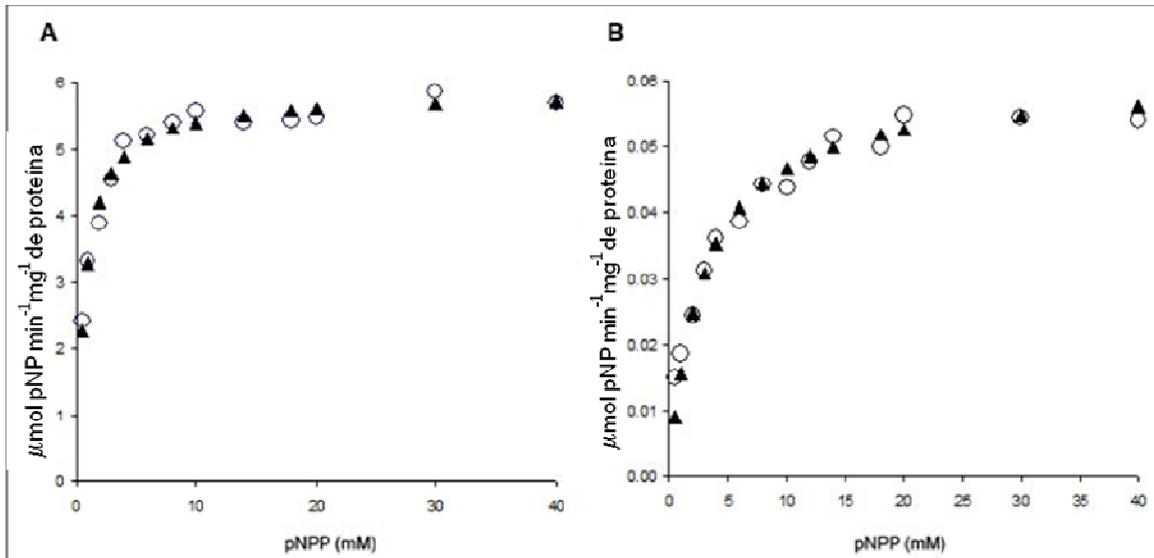


Figura 11. Representação da curva de Michaelis-Menten para os valores de atividade obtidos para (A) PtpA-*wt* e (B) PtpA-D126A. Atividade expressa como atividade específica ($\mu\text{mol pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína). Círculos representam os dados experimentais de um dos três experimentos independentes. Triângulos representam a melhor curva da equação Michaelis-Menten gerada por Excel 7.0.

Tabela 2. Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para PtpA-*wt*, PtpA-D126A, utilizando o substrato artificial pNPP; determinados pelo programa Excel 7.0.

	$V_{\max}^{a, b}$ ($\mu\text{mol pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (seg^{-1})	K_m^b (mM)
PtpA- <i>wt</i>	4.8 ± 1.51	5.74	3.4 ± 0.73
PtpA-D126A	0.1 ± 0.06	0.11	4.8 ± 1.65

^a V_{\max} expresso como atividade específica ($\mu\text{mol pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) e usado para cálculo do valor do k_{cat} .

^b Valores de V_{\max} e K_m expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes, realizados com dois diferentes estoques de proteína purificada.

6. Cultura celular e preparação dos extratos protéicos

Após caracterização de PtpA-D126A, foi iniciada outra etapa, onde o objetivo era isolar, através deste mutante, os potenciais substratos de PtpA. Para isso, cultivos e preparação dos extratos protéicos de macrófagos humanos (THP-1) foram preparados. A figura 12 mostra o gel SDS-PAGE dos diferentes extratos obtidos, sendo possível observar um perfil bastante semelhante. O rendimento obtido de cada extrato de

macrófagos, não ativados e ativados com LPS e INF- γ , foi em média de 2 mg por ml. Com a finalidade de caracterizar melhor estes extratos, eletroforese em duas dimensões foram realizadas (Figura 22 – Apêndice A); atualmente os mesmos estão sendo analisados utilizando o programa Image Master, de forma a determinar diferenças entre eles.

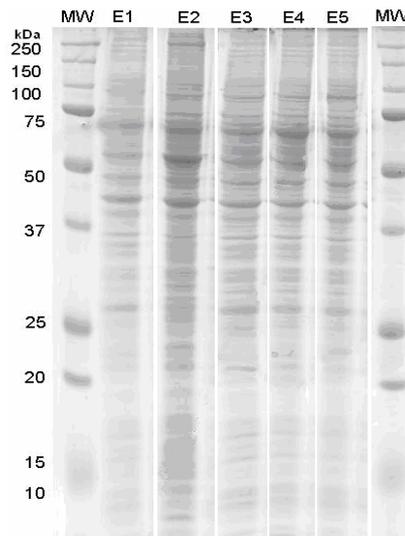


Figura 12. Perfil em SDS-PAGE (12%) dos extratos protéicos de macrófagos humanos THP-1; em **E1**, **E3** e **E5** extratos de macrófagos ativados com 0.2 $\mu\text{g/ml}$ LPS e 500 U/ml INF- γ e, em **E2** e **E4**: extratos de macrófagos não ativados.

7. Ensaio de Ressonância Plasmônica de Superfície

Após obtenção dos extratos protéicos foram realizados experimentos para análise da interação entre eles e as PtpAs. Para isto, utilizamos inicialmente a metodologia de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR). É relativamente recente o uso desta metodologia para análises de interação dos tipos proteína-proteína, proteína-extrato ou proteína-pequenas moléculas. SPR permite o monitoramento direto, em tempo real, de alta qualidade e, de sensível detecção (Takeda *et al.*, 2006). A etapa de imobilização utilizando o tampão acetato pH 4.5 resultou na imobilização covalente de 3.000 unidades relativas de ressonância (RU) de PtpA-D126A.

Diversos ensaios foram realizados, na figura 13 encontram-se as curvas de associação e dissociação de extrato ativado e não ativado, onde não foram observadas diferenças no comportamento de dissociação dos mesmos, sendo a diferença na associação devido a diferentes concentrações injetadas. Este resultado nos leva a crer que ambos, extrato ativado e não ativado, possuem em seu conteúdo proteínas que interagem com PtpA-D126A. Foi possível observar que, no tampão de corrida, uma boa quantidade de proteínas do extrato interage com o mutante imobilizado e se dissocia muito lentamente. Desta forma, foram iniciadas tentativas para acelerar a dissociação dos ligantes retornando a linha de base e, explorar o tipo de interação que estava acontecendo. Inicialmente foram testadas lavagens com tampões contendo 0.2 M, 0.5 M e 1 M de NaCl, para avaliar se a interação era do tipo iônica. Apesar de uma dissociação decrescente em cada tampão ter sido observada, não foi obtido retorno à linha de base. Subseqüentemente, foi passado tampão glicina em diversos pHs decrescentes para avaliar se a interação tinha componentes hidrofóbicos, sendo testados pH 5.5, pH 4.5 e pH 2.5 (Figura 14). Somente no tampão pH 2.5 é que foi possível romper a associação e retornar à linha de base, o que sugere que se trata de uma interação hidrofóbica. Tal resultado vai ao encontro do discutido no artigo da estrutura de PtpA (Madhurantakam *et al.*, 2005), que mostra resíduos hidrofóbicos como o triptofano presentes no sitio ativo e que os mesmos seriam importantes na definição da especificidade pelo substrato.

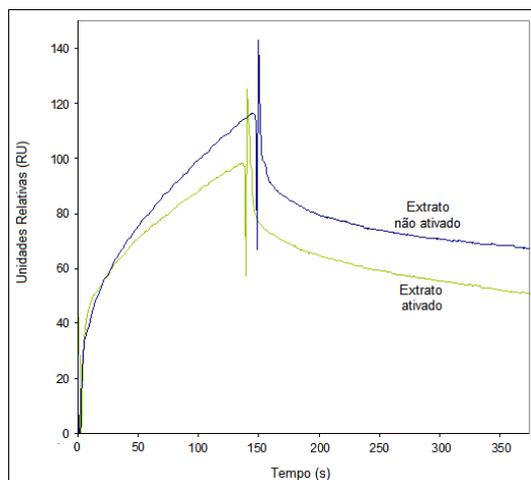


Figura 13 : Sensorgrama proveniente do ensaio com PtpA-D126A e extrato protéico de THP-1. As curvas apresentam os dados de associação e dissociação de extrato ativado (cinza) e não ativado (preto) à PtpA-D126A imobilizada.

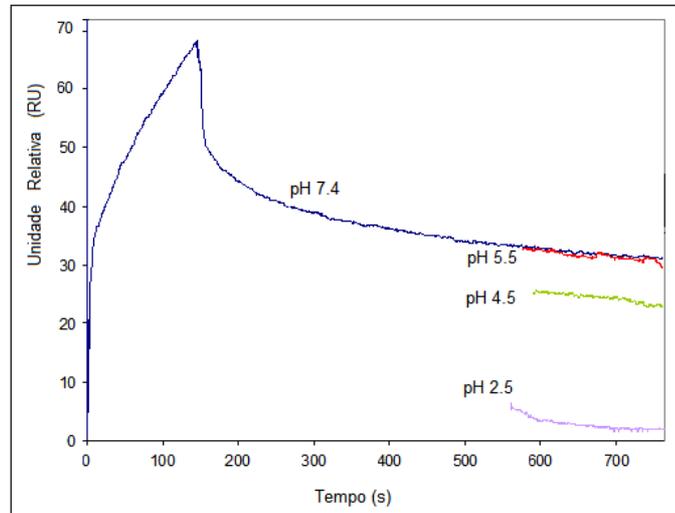


Figura 14 : Sensorgrama proveniente do ensaio de aceleração da dissociação das proteínas do extrato à PtpA-D126A, utilizando tampão glicina pH 6.5, pH 5.5, pH 4.5 e, pH 2.5.

Posteriormente, foram realizados experimentos utilizando ortovanadato de sódio ativado (Na_3VO_4), conhecido inibidor competitivo e reversível de PTPs, para avaliar se o mesmo era capaz de competir com as proteínas ligantes do extrato pelo sítio ativo do mutante imobilizado. Foram realizados experimentos contendo as seguintes concentrações de ortovanadato: 2.5 mM, 5 mM e 10 mM (Figura 15). Depois de injetado o extrato, e ser observada uma interação de 70 RU, foi injetado ortovanadato, entretanto, o inibidor não foi capaz de romper a interação, sugerindo que as proteínas do macrófago que estavam interagindo fortemente com o mutante imobilizado de PtpA. Somente quando o ortovanadato foi injetado junto ao extrato é que foi possível detectar uma competição pelos sítios de união, este resultado foi observado em todas as concentrações, sendo de maneira similar em 5 mM e 10 mM de Na_3VO_4 . Para comprovar a ligação reversível do ortovanadato ao sítio ativo da fosfatase, foram feitos lavados com 5 mM de EDTA (Huyer *et al.*, 1997) e, em seguida foi novamente injetado o extrato. O resultado foi a volta do nível inicial de interação (70 RU), sugerindo que os sítios onde tinha se ligado o inibidor foram liberados e agora estariam interagindo com as proteínas do extrato, proteínas essas que os dados sugerem ser possíveis substratos de PtpA.

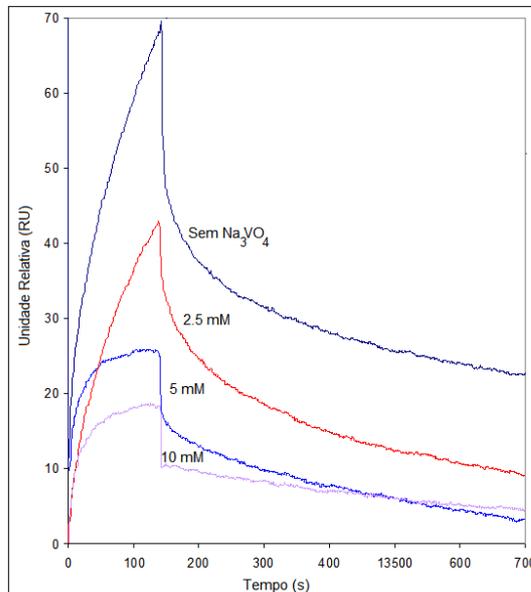


Figura 15 : Sensorgrama proveniente do ensaio de competição pelos sítios de ligação de PtpA-D126A, utilizando Na_3VO_4 nas concentrações de 2.5 mM, 5 mM e 10 mM.

8. Isolamento de possíveis substratos por “*Mutant Substrate-Trapping*”

Com o intuito de isolar possíveis substratos de PtpA foram realizados ensaios de ‘*mutant substrate-trapping*’ utilizando o mutante D126A, os extratos de macrófagos e as informações obtidas por SPR. Nestes ensaios foram incubados 5 mg de extrato protéico de macrófagos com 50 μg do mutante PtpA-D126A. Para precipitação do complexo PtpA-D126A—substrato, foram escolhidas condições semelhantes àsquelas encontradas nos ensaios de SPR. Deste modo, a matriz utilizada foi NHS, onde a PtpA-D126A foi imobilizada como no *chip* CM5, através de ligações covalentes pelos grupos amino das lisinas e o grupos ativos da matriz de agarose. Com a finalidade de retirar interações inespecíficas, lavagens com crescentes concentrações de NaCl foram usadas e, as eluições realizadas com repetidas aplicações de tampão glicina pH 2.5. Estes experimentos em maior escala foram analisados através de gel SDS-PAGE corado com nitrato de prata, permitindo a visualização do perfil de cada etapa e de uma banda na última eluição (1º Experimento - E2) (Figura 16). No primeiro experimento, realizado no Uruguai, detectou-se uma única banda de aproximadamente 37 kDa na eluição E2, a pH 2.5. No segundo experimento, realizado no Brasil e feito com maior

quantidade de matriz e extrato, uma banda de massa molecular similar foi observada na eluição E4, que estaria interagindo com PtpA-D126A como visto em SPR.

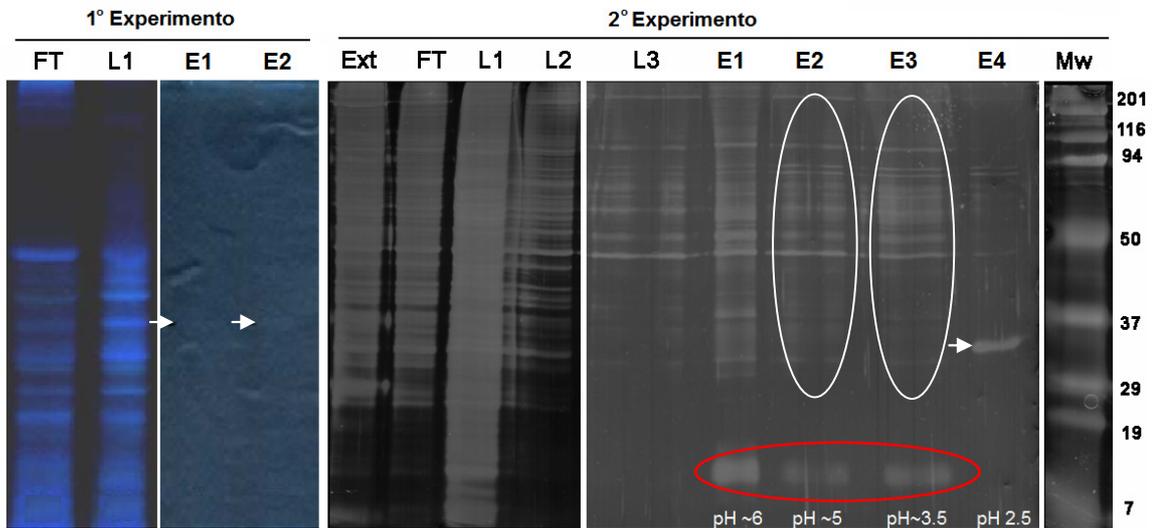


Figura 16. Ensaio de “substrate-trapping” utilizando o mutante PtpA-D126A. **MW** = massa molecular; **Ext.**= extrato E2; **FT**= proteínas do extrato que não se ligaram; **L1**, **L2** e **L3**= lavagens para retirada de proteínas com interação fraca; **E1** a **E4**= eluições, proteínas liberadas por quatro incubações com tampão pH 2.5. **Setas** mostrando o possível substrato de PtpA, um fator de alongação. **Elipses brancas** mostrando proteínas do citoesqueleto e **vermelha** mostrando PtpA clivada.

As bandas consideradas de interesse foram cortadas do gel e analisadas por espectrometria de massa MALDI TOF. A banda de E2 do primeiro experimento foi identificada com dificuldade utilizando o seqüenciamento de alguns peptídeos (PSD), devido à pouca quantidade e também à presença de contaminação com queratina. Ainda assim, o PSD de dois dos peptídeos da digestão com tripsina que não corresponderam com queratina foram identificados como peptídeos do fator de alongação ‘EF1A-1/EF-Tu - receptor do grupo 7 de leucócitos’. Embora a massa teórica de EF1A seja de 57 kDa e a da banda observada em E2 da ordem 37 kDa, já foi descrito na literatura a presença de formas de EF1A em diversas massas moleculares (Lee *et al.*, 2004; Archambaud *et al.*, 2005). Em géis bidimensionais de proteínas de macrófagos humanos, foi reportado que diferentes estados de fosforilação em um, dois ou mais sítios; e clivagens, se reflete em fatores de alongação de diferentes massas moleculares, estando entre 20 kDa e 100 kDa em macrófagos (Sem *et al.*, 2005). Este fato poderia ter ocorrido nos extratos de macrófago utilizado, levando assim às diferenças encontradas nas massas das bandas dos experimentos.

O fator de alongação EF-Tu é uma proteína abundante em procariotos e eucariotos, e possui um papel central na síntese de proteínas. Trata-se de uma proteína multifuncional que interage com RNA, outras proteínas e nucleotídeos. Acredita-se que EF-Tu é fosforilado em todos os organismos, fazendo com que uma importante via de controle da síntese protéica se dê através da defosforilação (Lippmann *et al.*, 1993; Chang & Traugh, 1997). Recentemente, o fator de alongação EF-Tu foi descrito como substrato de uma serina/treonina fosfatase, Spt, de *Listeria monocytogenes* (Archambaud *et al.*, 2005), e quando defosforilado, este fator complexado ao aminoacil-tRNA, é incapaz de se ligar ao ribossomo, impedindo desta forma a síntese protéica; sugerindo um importante papel da fosfatase na regulação e, deste modo, na sobrevivência da bactéria. A regulação das atividades dos fatores de alongação em geral, através de fosforilação por proteínas quinases, ainda é alvo de muitos estudos (Rhoads, 1999; Sans *et al.*, 2004). Em procariotos, a modificação pós-traducional de EF-Tu por fosforilação tem sido reportada e proteínas quinases sido identificadas (Lippmann *et al.*, 1993; Mikulik *et al.*, 1999; Gaidenko *et al.*, 2002). Em contraste, tanto para eucariotos e procariotos, pouco se sabe de proteínas fosfatases defosforilando fatores de alongação, tornando ainda mais interessante o resultado obtido neste experimento de '*mutant substrate-trapping*'.

No segundo experimento, realizado no Brasil com maiores quantidades de extrato e matriz, a banda encontrada foi de peso molecular similar e mais proeminente. Em experimentos subseqüentes, outras bandas de interesse foram identificadas como a própria PtpA clivada em um ponto sensível ao pH após o aspartato (destaque em vermelho na figura 16 – Lundblad, 1994) e contaminantes de proteínas do citoesqueleto, tais como actina, vimentina e dineína (destaque elipse branca da Figura 16). Apesar de ter sido sugerido na literatura um papel de PtpA na polimerização da actina (Castandet *et al.*, 2005), o aparecimento dela também nos controles realizados durante todos os experimentos (sem PtpA) e, em outros estudos similares serem consideradas proteínas rotineiramente encontradas (Wu *et al.* 2006), fizeram excluí-la como possível substrato. Sobretudo, porque as proteínas do citoesqueleto foram observadas em condições de eluição onde o pH final ainda não era pH 2.5.

Posterior a estes dois experimentos, foram realizados diversos novos experimentos com lotes diferentes de extratos de macrófagos; porém sem êxito na identificação de um possível substrato de PtpA. Tratando de identificar o problema que poderia ter acontecido durante tais repetições, constatou-se que nos ensaios onde a banda de 37 kDa foi encontrada, o experimento foi realizado em ausência de inibidores de proteases suplementários, já que estes não estavam disponíveis. Enquanto que todas as outras repetições continham tal coquetel de inibidores; deste modo, realizamos o teste da atividade de PtpA em presença e ausência de inibidor. Durante estes testes, foi observada uma inibição de aproximadamente 50% na atividade da PtpA, utilizando *pNPP* como substrato artificial. Contudo já não havia mais extratos disponíveis para a realização dos novos ensaios de '*mutant substrate-trapping*'; que serão realizados numa futura continuação do trabalho.

Com o intuito de analisar a importância dos inibidores de protease no comportamento das PtpAs, foram realizadas em paralelo novas purificações de PtpA-*wt* e PtpA-D126A em baixa concentração de inibidores de protease (somente um terço do utilizado normalmente). O resultado foi a aparição no cromatograma de um novo pico, simétrico e de grande absorvância, somente na purificação de PtpA-D126A (Figura 17). Tal pico foi concentrado e analisado por SDS-PAGE, onde se observou uma grande quantidade de bandas e entre elas a mais abundante correspondendo a PtpA-D126A (Figura 18). O aparecimento deste agregado pode estar evidenciando a formação em *E. coli* de um complexo entre o mutante PtpA-D126A e, um ou mais, possíveis substratos; os quais estariam neste momento sendo co-eluídos junto à PtpA-D126A. Tratando de elucidar quais proteínas que possivelmente estariam interagindo com PtpA-D126A foi realizada a identificação por MS das principais bandas.

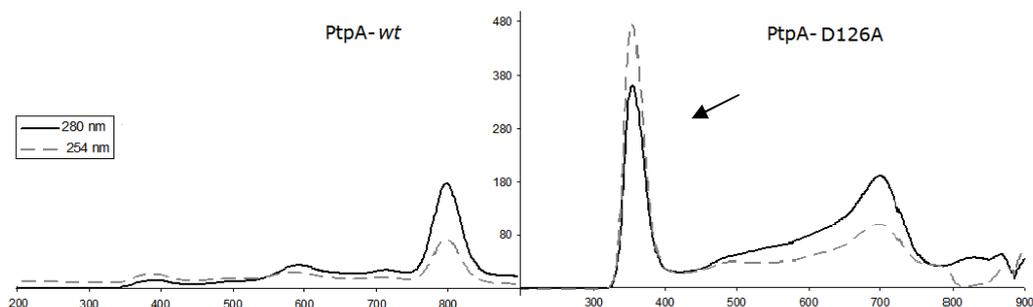


Figura 17: Cromatogramas da gel filtração de PtpA-*wt* e PtpA-D126A, realizadas após purificação por

afinidade na presença de um terço de inibidores de protease, seta indicando o pico correspondente a presença de um agregado de alta massa molecular na purificação do mutante D126A.

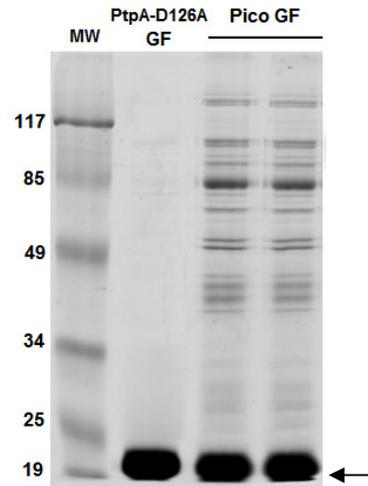


Figura 18: Perfil em SDS-PAGE 12% do pico concentrado observado em gel filtração. **MW:** padrão de massa molecular, **PtpA-D126A GF:** mutante D126A de PtpA purificado por cromatografia de afinidade seguida de gel filtração; **Pico GF:** agregado de alto peso molecular encontrado durante purificação do mutante por gel filtração. Seta indicando a presença de PtpA-D126A no complexo.

A figura 19 mostra as proteínas do complexo protéico co-eluído com PtpA-D126A que foram passíveis de identificação por MS MALDI TOF. Com base em suas implicações descritas na literatura, elas foram agrupadas em cinco diferentes conjuntos mostrados na tabela 3; sendo os quatro primeiros considerados como os de maior interesse e discutidos separadamente.

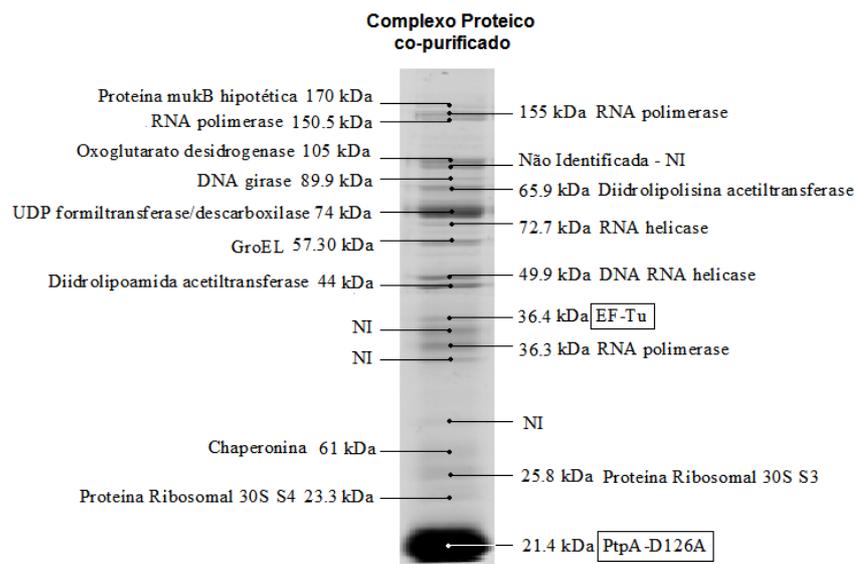


Figura 19: Proteínas identificadas por MALDI-TOF provenientes de SDS-PAGE do complexo protéico co-

eluído com PtpA-D126A

Tabela 3: Proteínas de *E. coli* co-purificadas com PtpA-D126A durante purificação. As proteínas foram agrupadas conforme suas implicações já descritas na literatura.

Implicação	Proteína	Score	Cobertura (%)
Síntese Proteica	EF-Tu	76	33
	Proteína ribossomal 30S S3	77	42
	Proteína ribossomal 30S S4	82	43
	RNA polimerase, subunidade b	152	28
	RNA polimerase, cadeia B	111	21
	RNA polimerase	75	31
	RNA helicase induzível independente de ATP	90	29
	DNA e RNA helicase (superfamília II)	118	35
Defesa antioxidante, ciclo do ácido tricarboxílico e metabolismo intermediário.	2-oxoglutarato desidrogenase, componente descarboxilase	112	29
	Diidrolipolisina acetiltransferase componente do complexo piruvato desidrogenase	78	22
	Diidrolipoamida acetiltransferase	87	35
Hsp – “Heat Shock Proteins”	GroEL	85	31
	Chaperonina	125	35
Resistência à polimixina	fusão UDP-L-Ara4N formiltransferase/UDP-GlcA C-4'-descarboxilase	145	30
Replicação do DNA cromossomal	DNA girase, subunidade B	104	32
	Proteína mukB hipotética	108	14

O primeiro grupo é formado por proteínas ligadas diretamente à síntese de proteínas. Proteínas envolvidas na síntese protéica já foram descritas em outros microrganismos como substratos de fosfatases (Archambaud *et al.*, 2005; Mamoun e Goldberg, 2001). Indiscutivelmente, o que mais chamou atenção foi identificar Ef-Tu, junto a numerosas proteínas envolvidas na síntese protéica, o que sugere o isolamento de um complexo de *E. coli*, graças a sobre-expressão do mutante PtpA-D126A. Em *E. coli*, o fator de alongação EF-Tu atua na ligação do aminoacil-tRNA (RNA transportador unido ao aminoácido correspondente ao seu anti-códon) ao complexo mRNA-ribossomo. O EF-Tu apresenta-se na forma ativa quando complexado com GTP, que fornece a energia necessária para a ligação do aminoacil-tRNA no sitio ribossomal (reconhecimento códon-anticódon) ao ser hidrolisado em GDP. Após a hidrólise, o complexo EF-Tu~GDP é liberado do ribossomo, e a reciclagem do GDP em GTP é feita por outro fator, EF-Ts, o qual forma um complexo intermediário EF-Tu~GDP=EF-Ts (Rodnina *et al.*, 2000).

metabolismo intermediário, dentro do Ciclo de Krebs (ou do ácido tricarboxílico) (Kim, 2003). Curiosamente, este complexo protéico ODH, foi recentemente isolado em *Corynebacterium glutamicum* junto a Odhi, proteína homóloga de GarA de *M. tuberculosis*; e encontrado defosforilado se associando a ODH e inibindo o metabolismo de glutamato pela célula (Niebisch e Goldberg, 2006). Esta proteína de *M. tuberculosis*, GarA, recentemente foi identificada como substrato da quinase PknB de *M. tuberculosis* (Villarino *et al.*, 2005). GarA é uma proteína pequena, 17 kDa, e encontrada também no sobrenadante de filtrados de cultivos de *M. tuberculosis*, o que sugere que assim como PtpA atua dentro dos macrófagos infectados, interferindo no metabolismo do mesmo. Recentemente, GarA-defosforilada foi co-purificada junto a ODH, utilizando extratos de macrófagos (informação do grupo colaborador de P. Alzari, IP). Encontrar PtpA complexada a proteínas deste complexo, sugere uma possível implicação na regulação de GarA ou, possivelmente, defosforilando alguma proteína do complexo ODH, interferindo desta forma numa via essencial do metabolismo geral do macrófago a favor da proliferação intracelular da bactéria. PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* eram sempre encontradas na literatura estritamente como tirosina-fosfatases (Koul *et al.*, 2000; Grundner *et al.*, 2005; Madhurantakam *et al.*, 2005), contudo, recentemente tem sido demonstrado que poderiam possuir outras implicações que não somente a defosforilação de resíduos de tirosina, permitindo assim uma interação em outras vias (Beresford *et al.*, 2007; Romá-Mateo *et al.*, 2007).

A identificação das proteínas do terceiro grupo, GroEL e Chaperonina, conhecidas como proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins* - HSPs), no complexo co-purificado com o mutante de PtpA, provavelmente se deve ao fato de PtpA-D126A ser uma proteína exógena de *E. coli* e estar sendo super expressa nestas células. As HSPs constituem uma família de proteínas celulares citoplasmáticas implicadas na resposta ao estresse celular, que ocorre comumente em rápidas trocas de temperatura, por isso o nome 'choque térmico' (Hartl e Hayer-Hartl, 2002). Este tipo de associação entre proteínas recombinantes e proteínas HSPs é comum quando a célula aumenta de forma considerável a síntese protéica. Isto acontece devido a um maior número de proteínas sendo formadas e muitas precisando do auxílio de chaperonas na formação da correta conformação estrutural (Lee, 2007).

A co-eluição *in vivo* utilizando 'mutant substrate-trapping' é uma estratégia descrita na literatura majoritariamente para PTPs eucariotas (LaMontagne *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2007). Como já foi abordado na literatura nestes casos de co-eluição, se o complexo formado entre enzima-substrato for de 1:1 imagina-se que a proteína mais abundante no complexo, depois do mutante sobre-expresso, tratar-se-ia da proteína que estaria interagindo diretamente com ele. Na figura 19, observa-se que a proteína mais abundante no complexo com PtpA-D126A foi a fusão encontrada no quarto grupo da tabela 3, a UDP-L-Ara4N formiltransferase/UDP-GlcA C-4'-descarboxilase, o que explicaria o pico mais alto a 254 nm no cromatograma da purificação, devido a absorção do UDP neste comprimento de onda. Todavia, deve-se levar em consideração que apesar de possuir uma K_{cat} menor que a da proteína *wt*, o mutante D126A ainda é capaz de defosforilar e, uma vez o substrato defosforilado o complexo se rompe. Portanto, para diferenciar das proteínas isoladas quais seriam potenciais substratos de PtpA (proteínas fosforiladas em tirosina), foi utilizada a metodologia de Western Blot, mostrado na figura 21, para detecção da fosforilação.

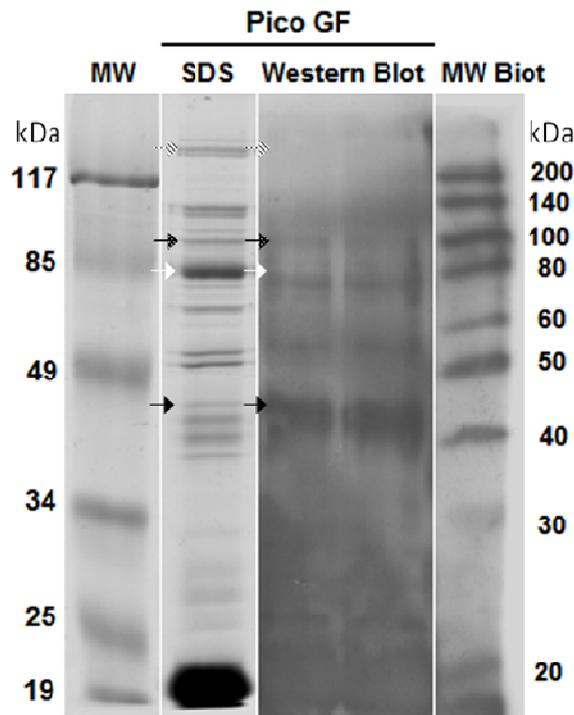


Figura 21: Perfil em SDS-PAGE e Western Blot das proteínas de *E. coli* co-purificadas com PtpA-D126A. **MW:** padrão de peso molecular, **SDS:** perfil em SDS-PAGE do complexo co-purificado com PtpA-D126A; **Western Blot:** perfil do mesmo complexo em raio-X exposto à membrana de Western Blot revelada com

anti-fosfotirosina; **MW Biot:** padrão de peso molecular biotilado. **Setas brancas** indicando proteínas não fosforiladas em tirosina:  RNA polimerase e  fusão UDP-L-Ara4N formiltransferase /UDP-GlcA C-4'-descarboxilase; **Setas pretas** indicando proteínas fosforiladas:  diidrolipolisina acetiltransferase e,  EF-Tu.

Apesar de a qualidade da detecção não estar excelente, é possível a visualização de algumas bandas as quais estavam fosforiladas. De forma bastante interessante, o fator EF-Tu aparece fosforilado, assim como diidrolipolisina acetiltransferase; já a fusão UDP-L-Ara4N formiltransferase/UDP-GlcA C-4'-descarboxilase e a RNA polimerase não mostram fosforilação. Estes resultados reforçam a idéia de PtpA agindo como parte da regulação da síntese protéica através da defosforilação do EF-Tu, como outras fosfatases (Mamoun e Goldberg, 2001; Archambaud *et al.*, 2005); na regulação de GarA e/ou, defosforilando alguma proteína do já discutido complexo ODH. Curiosamente, a própria PtpA-D126A pode ser observada fosforilada, sua seqüência mostra que ela possui três resíduos de tirosinas, estando todas expostas. Dado que *M. tuberculosis* não possui tirosina-quinases anotadas em seu genoma, o significado desta fosforilação de PtpA não pode ser avaliado; podendo se tratar de um artefato devido a presença de tirosina-quinases em *E. coli* (Vincent *et al.*, 1999). A ativação e inativação de quinases e fosfatases através de fosforilação está bem descrita na literatura (Zhang *et al.*, 2002), e deve ser levada em consideração em futuros estudos.

CONCLUSÕES

O mutante PtpA-D126A da proteína tirosina-fosfatase PtpA de *Mycobacterium tuberculosis*, pode ser considerado um bom mutante para a metodologia de ‘*mutant substrate-trapping*’ por apresentar as seguintes características:

- Manter a estrutura da proteína PtpA-*wt* sem mutação;
- Possuir Km da mesma ordem da PtpA-*wt*;
- Ter uma velocidade de reação, kcat, menor em comparação à proteína sem a mutação;
- E, ser capaz de interagir com outras proteínas, formando complexos *in vitro* e *in vivo*.

Até o momento, a utilização de PtpA-D126A aparentemente demonstra uma ação de PtpA, que parece estar envolvida na regulação do fator de alongação EF-Tu.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação de tantas proteínas interessantes, e a já discutida importância das PTPs na regulação de vários eventos celulares, qualifica-as como alvos para a descoberta de novos fármacos (Zhang 2002; Tonks, 2006), ainda mais se for levado em conta que aproximadamente 30% das proteínas celulares são fosfoproteínas, enquanto que desta apenas 1 - 2% são fosfotirosina-proteínas (Cozzone *et al.*, 2004). Ao passo que quinases e fosfatases são parceiras, e suas atividades são coordenadas na regulação das respostas de sinal, cabe o aprofundamento nas possíveis relações existentes entre as vias de ambas, como discutido acima entre PtpA e PknB. Proteínas fosfatases, como PtpA, são consideradas como tendo o importante papel de controlar a taxa e a duração das respostas mediadas via fosforilação/defosforilação, podendo interferir em diversas vias através de diferentes substratos. O papel crucial destas enzimas como reguladores da sinalização vem sendo cada vez mais enfatizado e, os resultados aqui apresentados e discutidos, acrescentam ainda mais força a este importante papel das PTPs, além de demonstrar a necessidade de mais estudo de suas vias. Estes avanços juntos revelam o potencial das PTPs, representando uma nova classe de alvos terapêuticos.

PERSPECTIVAS

Próximos trabalhos relacionados a este aqui apresentado, envolvem a busca de inibidores da tirosina-fosfatase PtpA de *M. tuberculosis*. Os testes iniciais de atividade/inibição já foram realizados e continuarão; esta vertente do projeto é feita em colaboração do grupo do Prof. Rosendo Augusto Yunes do Departamento de Química - UFSC. Inicialmente as moléculas testadas foram as chalconas produzidas pelo próprio laboratório colaborador, outros estudos já estão programados, bem como a publicação de um artigo decorrente destas análises. Os próximos potenciais inibidores pertencerão a uma nova classe de moléculas e verificaremos também, assim como as chalconas, seus efeitos sobre a outra tirosina-fosfatase micobacteriana, PtpB.

Tendo em vista, os testes e otimizações das etapas que constituem a busca pelo substrato das fosfatases de *M. tuberculosis*, via o uso da metodologia de “*mutant substrate-trapping*”, torna-se mais fácil a real procura por tais substratos. Percalços experimentais foram enfrentados durante todo o desenvolvimento desta dissertação e levaram a uma maior compreensão do fenômeno envolvido e dos mecanismos para melhor abordá-lo. Tudo isto leva agora ao ponto de maior aproveitamento, ou seja, de aplicar tal técnica com uma relativa maior facilidade dentro das fosfatases de *M. tuberculosis*, como para outras que eventualmente surgirão. A continuação deste trabalho de mestrado se dará durante o desenvolvimento da tese de doutorado e contará com a confirmação dos resultados aqui obtidos, não só pelo uso do mesmo mutante PtpA-D126A como também pelo mutante inativo C11A e o duplo mutante DA/CA. Levando em consideração a influência dos inibidores de proteases, contaminações por queratina e todos os percalços que já foram detectados e outros que provavelmente aparecerão. Além disso, o trabalho contará também com os estudos da segunda tirosina-fosfatase PtpB, onde estudos prévios já foram realizados (Apêndice D) e serão intensificados, para a identificação e confirmação de seus possíveis substratos.

Sendo possível a identificação, e confirmação dos possíveis substratos de PtpA e PtpB, teremos como objetivo direto a produção deles como proteínas recombinantes, caso sejam seqüências passíveis de expressão procariótica. Isto para: avaliar a atividade de PtpA e PtpB com seus prováveis substratos específicos, detectar as constantes da interação enzima-substrato e, obter quantidades suficientes de proteína para futuros ensaios de cristalização dos substratos ou dos complexos enzima-substrato.

APÊNDICE A

Análise Bidimensional Dos Extratos De Macrófagos

O protocolo para realização dos géis desnaturantes bidimensionais dos extratos de macrófagos já foram otimizados e testados. O resultado foram géis de 12% de excelente qualidade, com boa definição dos spots (Figura 22). A coloração realizada foi Coomassie G-250 a partir de protocolo compatível com espectrometria de massa. As análises dos géis estão sendo feitas utilizando o programa Image Master, com o intuito de avaliar diferenças entre os géis e identificar por MS eventuais spots de interesse.

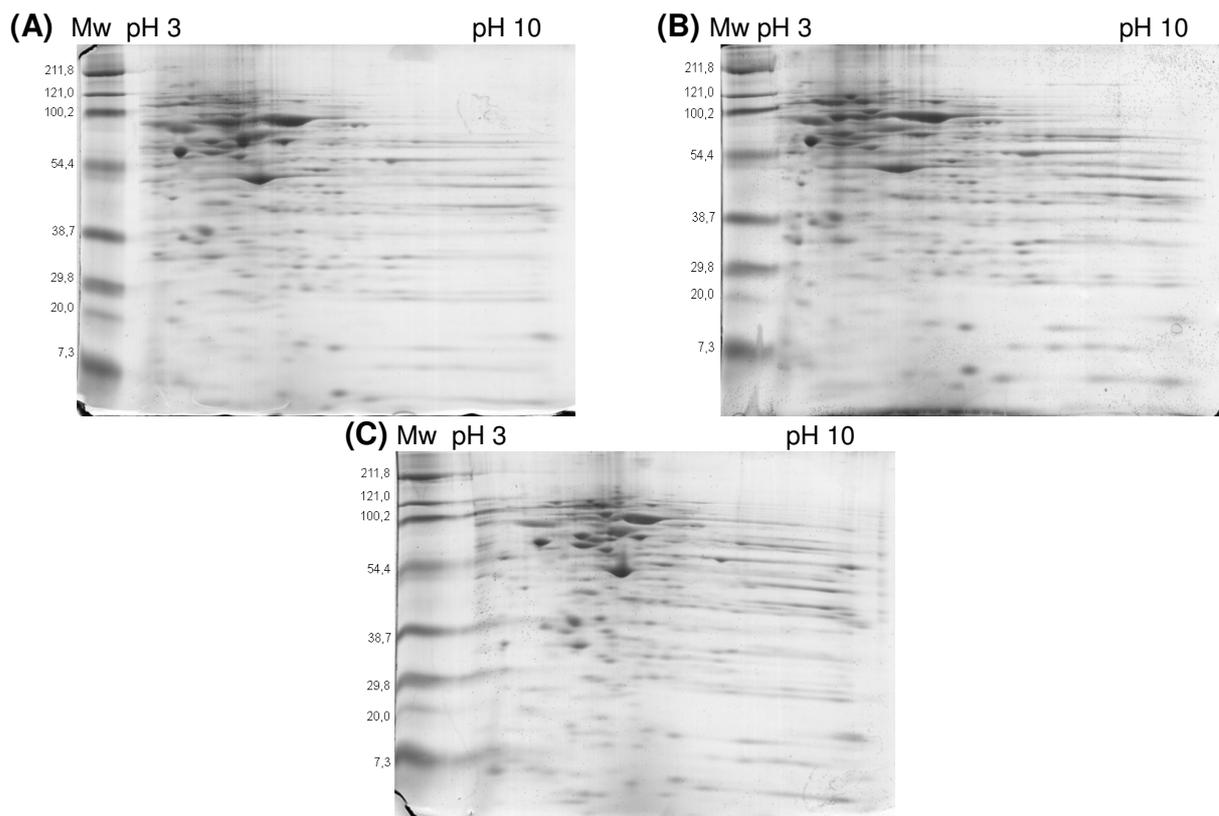


Figura 22. Perfil em 2D-PAGE dos extratos de macrófagos. **Mw**= padrão de massa molecular em kDa; em **(A)** Extrato protéico de THP-1 não ativados; em **(B)** Extrato protéico de THP-1 ativados com 0.2 µg/ml de LPS e 500 U/ml INF-γ (controle sem ortovanadato) e em **(C)** Extrato protéico de THP-1 ativados com LPS e INF-γ (com ortovanadato).

APÊNDICE B

Análise em MS de PtpA-*wt*

Durante os trabalhos de identificação dos possíveis substratos de PtpA por espectrometria de massa, também se realizou a análise de PtpA, sendo obtido o seguinte espectro mostrado na figura 23.

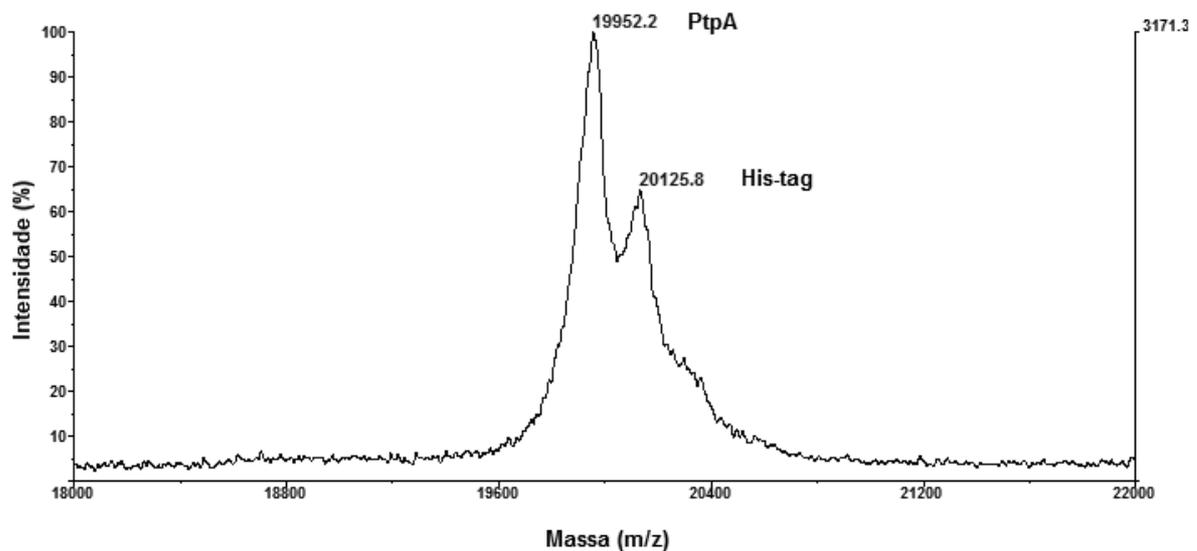


Figura 23. Espectro resultante da digestão com tripsina da tirosina-fosfatase PtpA-*wt* por MS; destaque para o pico correspondente a PtpA e outro correspondente ao His-tag.

A massa molecular do 'peptídeo' correspondente a PtpA foi de acordo com o seu peso molecular teórico, sendo os dois de 19.9 kDa. Já o peptídeo correspondente ao His-tag, uma seqüência de aminoácidos incluindo seis histidinas, acrescentada à proteína recombinante pelo vetor pET28 e que facilita sua purificação através de cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC); sofreu um aumento de 173.6 Da do esperado teórico. Tal pequeno aumento no peso molecular, visto somente por MS, corresponde à presença de uma modificação pós-traducional, feita pelas células de *E. coli* no His-tag; esta massa corresponde a uma N-glicosilação em um dos resíduos de aminoácidos desta cauda adicional.

APÊNDICE C

Outros ensaios de “*mutant substrate-trapping*”

Os primeiros trabalhos para busca dos possíveis substratos de PtpA foram realizados utilizando a metodologia de precipitação por afinidade, e baseava-se na purificação por IMAC aqui já descrita. Entretanto, após inúmeras tentativas e otimizações a matriz Chelating-Sepharose não se mostrou tão eficiente, e foi necessária a troca por outra, tendo sido escolhida a NHS (descrita na metodologia).

Abaixo, na figura 24, encontra-se um dos géis resultantes de ensaio de ‘*mutant substrate-trapping*’ utilizando a resina Chelating-Sepharose ativada com 0.1 M de sulfato de cobre. Os ensaios foram feitos de acordo com o protocolo de purificação, seguindo lavagens com concentrações crescentes de imidazol (10 mM, 20 mM e 30 mM), bem como a eluição feita com 300 mM do mesmo. Devido à grande interferência das concentrações utilizadas de imidazol na visualização dos experimentos, através da coloração com nitrato de prata compatível com MS, tentou-se realizar lavagens com concentrações crescentes de NaCl e eluição em uma única etapa, através da adição de tampão de amostra para SDS-PAGE seguido de 5 min. a 95 °C e centrifugação imediata, para recolhimento do sobrenadante. Esta modificação também não possibilitou a análise do ensaio por SDS corado com prata. Fato este que nos fez pensar em uma possível interferência do íon cobre utilizado na resina.

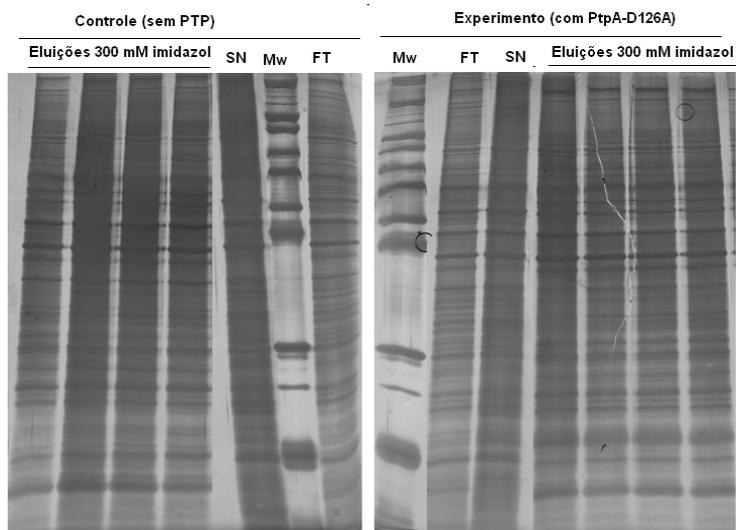


Figura 24. Perfil em SDS-PAGE de ensaios de '*mutant substrate-trapping*' utilizando para precipitação a resina *Chelating-Sepharose* ativada com sulfato de cobre. Destaque para a interferência causada, onde as eluições aparecem como tendo mais proteína que o próprio sobrenadante.

APÊNDICE D

PtpB, outra tirosina-fosfatase de *M. tuberculosis*

Tendo em vista a continuação dos trabalhos não somente com PtpA, já foram iniciadas as otimizações de protocolo para purificação da outra tirosina-fosfatase de *M. tuberculosis*, PtpB, bem como seu mutante DA. Assim como para PtpA, foram testadas as temperaturas de indução para obtenção da maior quantidade de proteína recombinante na forma solúvel; foram realizadas induções a 37 °C por 4h e 15 °C por 16 h. Sendo eleita, assim como para PtpA, a segunda condição, como pode ser visto na figura 25.

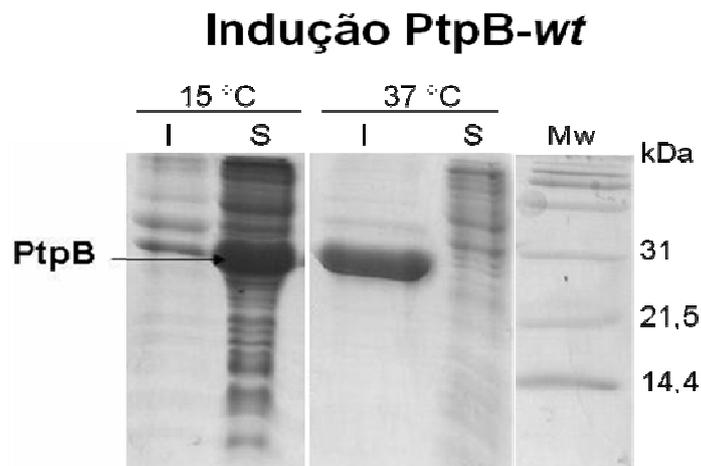


Figura 25. Determinação da temperatura ótima para produção de PtpB-wt recombinante solúvel. **Mw**= padrão de massa molecular; **I**=proteína insolúvel, **S**= proteína solúvel. A temperatura selecionada para a indução foi 15 °C. Coloração: Coomassie Blue R-250.

As condições de purificação de PtpB-wt e PtpB-D128A já foram determinados, sendo a purificação por afinidade (Figuras 26 e 27) utilizando a resina Chelating Sepharose e por gel filtração (Figuras 28 e 29) usando as colunas Superdex 75 10/300 GL e Superdex 200 16/60 no sistema HPLC (AKTA, GE). Já foram otimizados todos os tampões para as purificações bem como avaliada sua efetividade e o rendimento das proteínas.

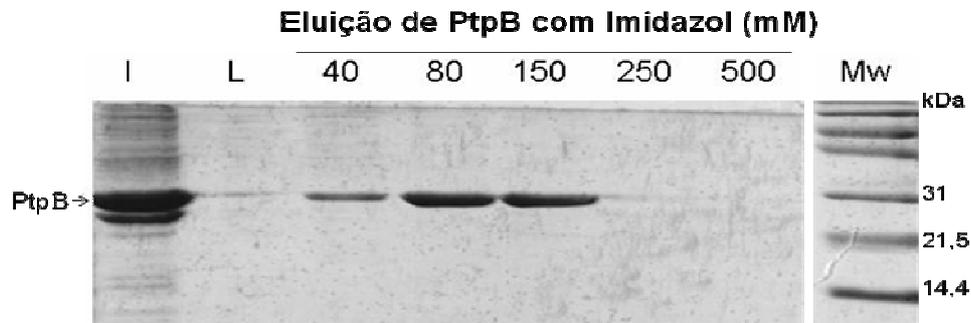


Figura 26. Determinação da concentração ótima de imidazol para a eluição de PtpB. **I**= proteína imobilizada em *Cu-Chelating Sepharose*, **L**= lavado com o tampão de ligação (20 mM Tris HCl pH 8, 0.5M NaCl, 10% glicerol, 10 mM de imidazol). A concentração selecionada para eluição foi 300 mM de imidazol. Coloração: Coomassie Blue R-250.

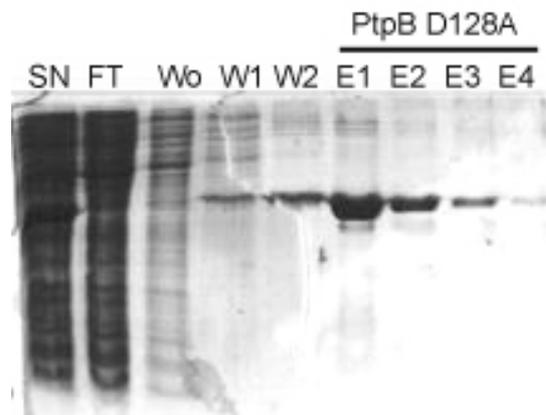


Figura 27. Purificação de PtpB-D128A com Cu-Chelating Sepharose. **SN** = sobrenadante obtido por sonicação do precipitado de células previamente resuspenso no tampão de lise (20 mM Tris HCl pH 8, 0.5M NaCl, 10% glicerol, 10 mM de imidazol, inibidores de proteases). O tempo ótimo de sonicação foi 10 x 1 min., em banho de gelo, para um volume de 30 ml à 60 mg de células/ml de tampão de lise. **FT** = flow through, proteínas não ligadas em Cu-Chelating Sepharose (após 40 min. de incubação à 25°C, com agitação com 3 mL de matriz). **W0** = proteínas eliminadas da matriz por lavado, com 3x5 mL de tampão de lise. **W1** = proteínas eliminadas da matriz por lavado, com 3x5 mL de tampão de lise com 20 mM de imidazol. **W2** = proteínas eliminadas da matriz por lavado, com 3x5 mL de tampão de lise com 30 mM de imidazol. **E1 a E4** = proteínas eluídas da matriz por quatro incubações com 6 mL do tampão de lise com 300 mM de imidazol.

A calibração das colunas de gel filtração foi feita utilizando o kit *Gel Filtration Molecular Weight Markers* (SIGMA), onde as proteínas foram diluídas em tampão (50 mM fosfato de potássio pH 7.0; 150 mM NaCl; 4 mM DTT) nas seguintes concentrações: Albumina à 10 mg/mL, Citocromo-C à 2 mg/ml e, Anidrase Carbônica e Aprotinina à 3 mg/ml. Foram injetados 100 µl de cada solução protéica e o fluxo utilizado foi de 0.7 mL/min.; sendo determinados os seguintes volumes de eluição (V_e)

para cada proteína : Albumina (66 kDa) = 9.53 ml, Citocromo-C (12,4 kDa) = 13.18 ml, Anidrase Carbônica (29 kDa) = 11.74 ml e Aprotinina (6.5 kDa) = 15.03 ml. O volume morto (V_0), determinado pelo *Blue Dextran* (2000 kDa), foi de 7.58 ml (Figura 28).

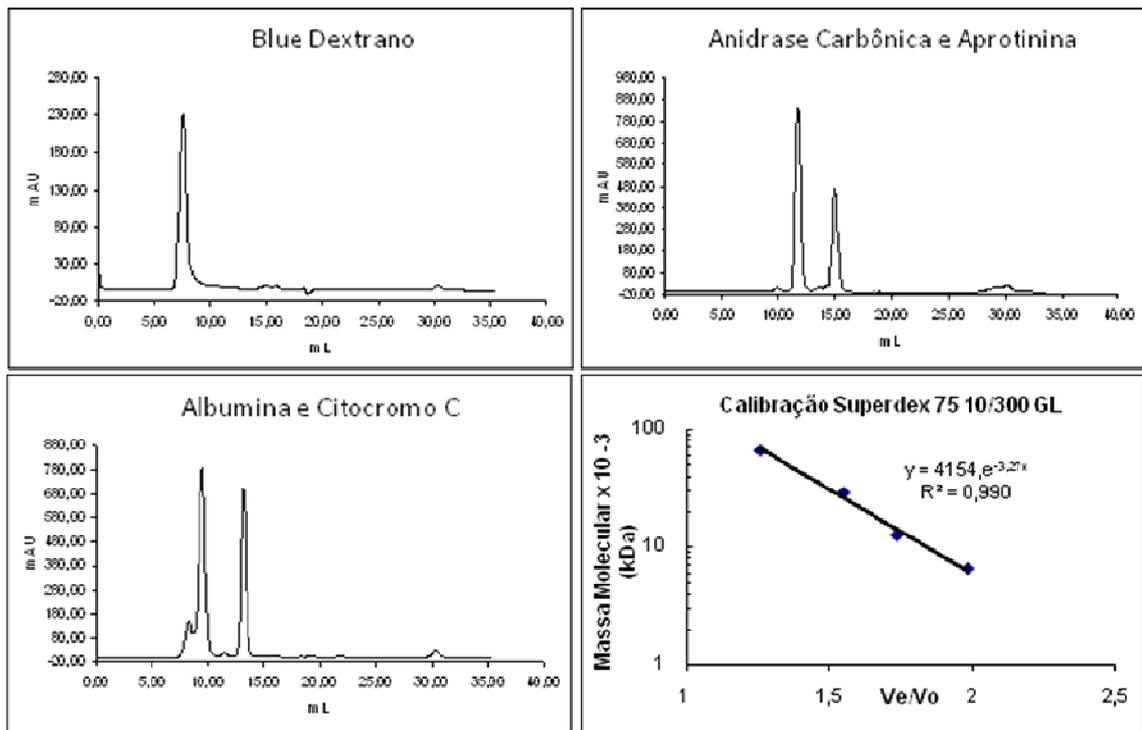


Figura 28. Calibração da coluna Superdex 75 10/300 GL no sistema HPLC (AKTA, GE). Utilizando para construção da curva padrão Blue Dextrano, Albumina, Anidrase Carbônica, Citocromo-C e Aprotinina.

Durante a análise por gel filtração em coluna analítica (Figura 29), foi observado o volume de eluição de PtpB e calculado seu peso molecular na forma nativa. Para PtpB-WT o V_e foi 11.28 ml e a massa molecular calculada de 31.8 kDa, sendo que a teórica, calculada de acordo com a seqüência somado o His-tag (característica conferida pelo vetor de expressão pET28) foi de 32.2 kDa. Este resultado mostra que a proteína encontra-se em sua conformação nativa.

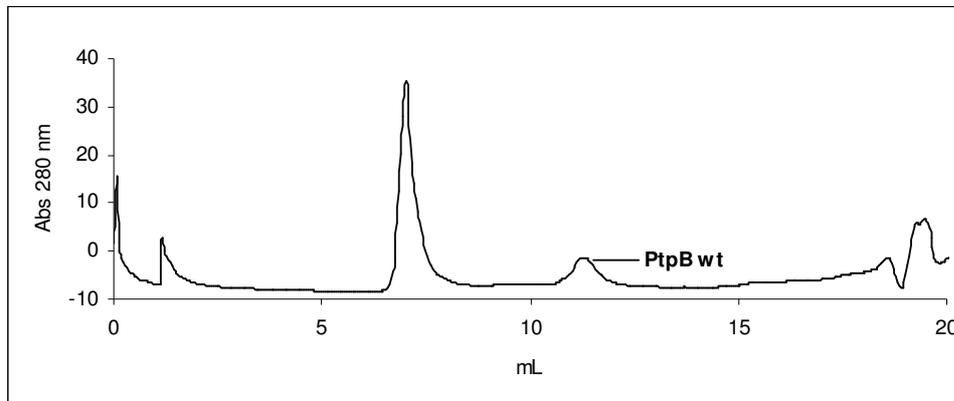


Figura 29. Cromatograma da gel filtração de PtpB-wt, utilizando a coluna Superdex 75 10/300 GL no sistema HPLC (AKTA, GE). Volume de eluição de PtpB-wt= 11.28.

Para avaliar se o mutante produzido de PtpB, PtpB-D128A, poderia ser utilizados em ensaios para captura do substrato foram realizados testes de atividade e, comparados à proteína WT. Para ser um bom “*mutant substrate-trapping*” o valor da K_m deve permanecer similar ao valor da proteína WT (*wild-type*, sem mutação) e o V_{max} deve ser menor que o valor da proteína WT, neste caso o substrato fica mais tempo ligado ao sítio ativo. Entretanto, não foram encontradas mudanças nos valores do V_{max} entre a proteína PtpB-WT e o mutante PtpB-D128A; 3.4 e 3.7 mM pNP/min. x mg respectivamente (Tabela 4); indicando que a mutação não foi no resíduo aspartato implicado na catálise. A escolha de mudar o Asp128 foi baseada na análise do sítio ativo de proteínas da então família de PtpB (*Dual-Specificity Phosphatases Family*, DSP) e na análise da sua seqüência de aminoácidos, utilizando um motivo pré-definido ($DX_{25-45}HCX_5RS/T$) que define a possível posição dos resíduos catalíticos da família DSP. Em novembro 2005 a estrutura de PtpB foi publicada (Grundner *et al.*, 2005), e mostrou a presença de inserções e deleções de grandes elementos estruturais, classificando PtpB como membro de outra família de tirosina-fosfatases (*Tyrosin-Specific Phosphatase* - YSPs). A estrutura também demonstrou que o aspartato catalítico é o Asp82 e não o Asp128 como havia sido predito. No momento, estamos realizando experimentos para obtenção de PtpB-D82A, o mutante “*substrate-trapping*” D/A de PtpB.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos de PtpB-WT e PtpB-D128A de *M. tuberculosis* utilizando o substrato artificial pNPP.

	Vmax ($\mu\text{M pNP/min x mg}$)	Km (mM)
PtpB-WT	3,4	2,3
PtpB-D128A	3,7	3

Os valores apresentados para Vmax e Km constituem a média de três experimentos realizados independentes.

Além da incerteza da família a qual PtpB pertence, outro fator que dificultou a predição correta do Asp catalítico foi a quantidade relativamente alta de resíduos de aspartato na seqüência de PtpB. Na figura 30 podemos ver a diferença entre as tirosina fosfatases de *M. tuberculosis* com relação ao seu conteúdo de resíduos de aspartato.

PtpB

1 - MAVRELP^DGAW NFRD^DVAD^DTAT ALRPGRLFRS SELSRL^{DD}AG RATLRRRLGIT ^DVAD^DLRSSRE
 61 - VARRGPGRV^DP DGID^DVHLLPF P^DDL^{DDDD}AD^D SAPHETA^DFKR LLTND^DGSNGE SGESSQ^DSIND^D
 121 - AATRYM^DDEY RQFPTRNGAQ RALHRVVTLL AAGRPVLTHC FAGK^DRTGFV VALVLEAVGL
 181 - ^DRD^DVIVAD^DYL RSND^DSVPOLR ARISEMIQOR F^DTELAPEV TFTKARLS^DG VLGVRAEYLA
 241 - AARQT^DIDE^DY GSLGGYL^DDA GISQATVNRM RGVLLG

PtpA

1 - VSD^DPLHVT^DFV CTGNICRSPM AEKMFAQQLR HRGLG^DAVRV TSAGTGNWHV GSCAD^DERAAG
 61 - VLRAHGYP^DT^D HRAAQVGTEH LAAD^DLLVAL^D RNHARLLROL GVEAARVRML RSP^DD^DPRSGTH
 121 - ALD^DVE^DDPYYG ^DHS^DD^DFEEVFA VIESALPGLH ^DW^DV^DDERLARN GPS

Figura 30. Seqüências de resíduos de aminoácidos das duas tirosina-fosfatases de *M. tuberculosis*, PtpB e PtpA. Em destaque os resíduos de aspartato apresentados por ambas.

Novos iniciadores para a construção do mutante PtpB-D82A já foram desenhados (5' GCTGCCGTTCCCCGGCCTCGCCGATG 3' e 5' CATCGGCGAG GGCGGGGAACGGCGAGC 3' (códon contendo a mutação em destaque) e serão utilizados na continuação dos trabalhos. Uma característica extremamente importante e recentemente descrita para PtpB é sua tripla especificidade. Até o momento, PtpB havia já havia sido incluída como uma proteína tirosina-fosfatase pertencente ao subgrupo

das YSPs (*Tyrosin-Specific Phosphatase* - YSPs); após já ter sido considerada uma DSP (*Dual-Specificity Protein Phosphatase* - DSPs). Contudo, em um trabalho publicado ainda mais recentemente (Beresford *et al.*, 2007) é proposta uma nova classe de PTPs, das proteínas tirosina-fosfatases com tripla especificidade (*Triple-Specificity Phosphatase* – TSPs) onde agora estaria incluída a fosfatase PtpB de *M. tuberculosis*. Tal família apresenta a dupla especificidade conhecida para PTPs, ou seja, por resíduos de serina/treonina ou de tirosina fosforilados, além de apresentar uma nova e importante atividade, a de fosfoinosítídeo fosfatase. Esses achados recentes serão de extrema valia no desenho de novos mutantes para a metodologia de “*mutant substrate-trapping*”, bem como na análise de futuros potenciais substratos de PtpB.



Draft Manuscript For Review

Kinetic and structural characterization of a potential substrate-trapping mutant of the tyrosine phosphatase PtpA from *Mycobacterium tuberculosis*

Journal:	<i>The Journal of Biochemistry</i>
Manuscript ID:	JB-08-01-0030
Manuscript Type:	Regular Paper
Date Submitted by the Author:	29-Jan-2008
Complete List of Authors:	Purificação, Marcela; Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Bioquímica Razzerá, Guilherme; National Center for Nuclear Magnetic Resonance Jiri Jonas Terenzi, Hernan; Universidade Federal de Santa Catarina, Bioquímica Villarino, Andrea; Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Departamento de Ciências Fisiológicas; Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Departamento de Bioquímica
Keywords:	kinetic, circular dichroism, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , tyrosine phosphatase, substrate-trapping mutant
Topics:	01 Biochemistry General < BIOCHEMISTRY, 08 Enzymology < BIOCHEMISTRY



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, J. N., JANSEN, P. G., ECHWALD, S. M., MORTENSEN, O. H., FUKADA, T., DEL VECCHIO, R., TONKS, N. K., MOLLER, N. P. A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. **FASEB J.**, v. 18, p. 8-30, 2004.

ANDRADE, M. A., CHACÓN, P., MERELO, J. J., MORÁN, F. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network. **Protein Eng.**, v. 6, p. 383-390, 1993.

ARCHAMBAUD, C., GOUIN, E., PIZARRO-CERDA, J., COSSART, P., DUSSURGET, O. Translation elongation factor EF-Tu is a target for Stp, a serine-threonine phosphatase involved in virulence of *Listeria monocytogenes*. **Mol. Microbiol.**, v. 56, p. 387-396, 2005.

BACH, H., SUN, J., HMAMA, Z., AV-GAY, Y. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* PtpA is an endogenous tyrosine phosphatase secreted during infection. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 6540-6546, 2006.

BARFORD, D., DASS, A. K., EGLOFF, M. P. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 27, p. 133-164, 1998.

BERESFORD, N., PATEL, S., ARMSTRONG, J., SZÖOR, B., FORDHAM-SKELTON, AP., TABERNERO, L. MptpB, a virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity. **Biochem. J.**, v. 406, p. 13–18, 2007.

BLACK, D. S., BLISKA, J. B. Identification of p130Cas as a substrate of Yersinia YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. **EMBO J.**, v. 16, p. 2730-2744, 1997.

BLACK, D. S., MARIE-CARDINE, A., SCHRAVEN, B., BLISKA J. B. The Yersinia tyrosine phosphatase YopH targets a novel adhesion regulated signaling complex in macrophages. **Cell. Microbiol.**, v. 2, p. 401–414, 2000.

BLANCHETOT, C., CHAGNON, M., DUBE, N., HALLE, M., TREMBLAY, M. L. Substrate-trapping techniques in the identification of cellular PTP targets. **Methods**, v. 35, p. 44-53, 2005.

BOITEL, B., ORTIZ-LOMBARDIA, M., DURAN, R., POMPEO, F., COLE, S. T., CERVENANSKY, C., ALZARI, P. M. PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol. Microbiol.**, v. 49, p. 1493–1508, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAMAN, J., PAPWORTH, C., GREENER, A. Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. **Methods Mol. Biol.**, v. 57, p: 31-44, 1996.

BURKE JR, T. R., ZHANG, Z. Y. Protein-tyrosine phosphatases: structure, mechanism, and inhibitor discovery. **Biopolymers**, v. 47, p. 225-241, 1998.

BUZALAF, M. A., TAGA, E. M., GRANJEIRO, J. M., FERREIRA, C. V., LOURENÇÃO, V. A., ORTEGA, M. M., POLETTO, D. W., AOYAMA, H. Kinetic characterization of bovine lung low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase. **Exp Lung Res.**, v. 24, p. 269-72, 1998.

CASTANDET, J., PROST, J. F., PEYRON, P., ASTARIE-DEQUEKER, C., ANES, E., COZZONE, A. J., GRIFFITHS, G., MARIDONNEAU-PARINI, I. Tyrosine phosphatase MtpA of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits phagocytosis and increases actin polymerization in macrophages. **Res. Microbiol.**, v. 156, p. 1005-1013, 2005.

CHANG, Y. W., TRAUGH, J. A. Phosphorylation of elongation factor 1 and ribosomal protein S6 by multipotential S6 kinase and insulin stimulation of translational elongation **J Biol Chem.**, v. 272, p. 28252-7, 1997.

CHOPRA, P., MEENA, L. S., SINGH, Y. New drug targets for *Mycobacterium tuberculosis*. **Indian J. Med. Res.**, v. 117, p. 1-9, 2003.

COLE, S. T., BROSCH, R., PARKHILL, J., GARNIER, T., CHURCHER, C., HARRIS, D., GORDON, S. V., EIGLMEIER, K., GAS, S., 3RD BARRY, C. E., TEKAIA, F., BADCOCK, K., BASHAM, D., BROWN, D., CHILLINGWORTH, T., CONNOR, R., DAVIES, R., DEVLIN, K., FELTWELL, T., GENTLES, S., HAMLIN, N., HOLROYD, S., HORNSBY, T., JAGELS, K., KROGH, A., MCLEAN, J., MOULE, S., MURPHY, L., OLIVER, K., OSBORNE, J., QUAIL, M. A., RAJANDREAM, M. A., ROGERS, J., RUTTER, S., SEEGER, K., SKELTON, J., SQUARES, R., SQUARES, S., SULSTON, J. E., TAYLOR, K., WHITEHEAD, S., BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature.**, v. 393, p. 537-544, 1998.

COZZONE, A. J., GRANGEASSE, C., DOUBLET, P., DUCLOS, B. Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. **Arch Microbiol.**, v. 181, p. 171-181, 2004.

COWLEY, S. C., BABAKAIFF, R., AV-GAY, Y. Expression and localization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA. **Res. Microbiol.**, v. 153, p. 233-241, 2002.

DERETIC, V., SINGH, S., MASTER, S., HARRIS, J., ROBERTS, E., KYEI, G., DAVIS, A., DE HARO, S., NAYLOR, J., LEE, H., VERGNE, I. *Mycobacterium tuberculosis* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defense mechanism. **Cell. Microbiol.**, v. 8, p. 719-727, 2006.

DEVINNEY, I., STEELE-MORTIMER, I., FINLAY, B. B. Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 29-33, 2000.

DIXON, J. E. Protein tyrosine phosphatases: their roles in signal transduction. **Recent Prog Horm Res.**, v. 51, p. 405-415, 1996.

DORMAN, S. E., CHAISSON, R. E. Review From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. **Nat Med.**, v. 13, p. 295-8, 2007.

DUCATI, R. G., RUFFINO-NETTO, A., BASSO, L. A., SANTOS, D. S. The resumption of consumption – a review on tuberculosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 697-714, 2006.

DYE, C., SCHEELE, S., DOLIN, P., PATHANIA, V., RAVIGLIONE, M. C. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance Monitoring Project **J Am Med Assoc.**, v. 282, p. 677–686, 1999.

FLINT, A. J., TIGANIS, T., BARFORD, D., TONKS, N. K. Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 94, p. 1680-1685, 1997.

FU, Y., GALAN, J. E. A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. **Nature**, v. 401, p. 293-297, 1999.

GALAN, J. E., BLISKA, J. B. Cross talk between bacterial pathogens and their host cells. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 12, p. 221-255, 1996.

GAIDENKO, T. A., KIM, T. J., PRICE, C. W. The PrpC serine-threonine phosphatase and PrkC kinase have opposing physiological roles in stationary-phase *Bacillus subtilis* cells. **J Bacteriol.**, v. 184, p. 6109-14, 2002.

GARTON, A. J., FLINT, A. J., TONKS, N. K. Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. **Mol Cell Biol.**, v. 16, p. 6408-18, 1996.

GOMEZ, J. E., MCKINNEY, J. D. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. **Tuberculosis**, v. 84, p. 29–44, 2004.

GRUNDNER, C., NG, H. L., ALBER, T. *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpB structure reveals a diverged fold and a buried active site. **Structure**, v. 13, p. 1625-1634, 2005.

HARTL, F. U., HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, v. 295, p. 1852-8, 2002.

HELLMAN, U. Sample preparation by SDS/PAGE and in-gel digestion. **EXS.**, v. 88, p. 43-54, 2000.

- HENGGE, A. C., SOWA, G. A., WU, L., ZHANG, Z. Y. Nature of the transition state of the protein-tyrosine phosphatase-catalyzed reaction. **Biochemistry**, v. 34, p. 1398-1405, 1995.
- HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, v. 80, p. 225–236, 1995.
- HUYTER, G., LIU, S., KELLY, J., MOFFAT, J., PAYETTE, P., KENNEDY, B., TSAPRAILIS, G., GRESSE, M. J., RAMACHANDRAN, C., Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. **J. Biol. Chem.**, v. 10, p. 843-851, 1995.
- IVANOV, M. I., STUCKEY, J. A., SCHUBERT, H. L., SAPER, M. A., BLISKA, J. B. Two substrate-targeting sites in the Yersinia protein tyrosine phosphatase co-operate to promote bacterial virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 55, p. 1346-1356, 2005.
- JIANG, G., DEN HERTOOG, J., SU, J., NOEL, J., SAP, J., HUNTER, T. Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase- α . **Nature**, v. 401, p. 606-10, 1999.
- KENNELLY, P. J., POTTS, M. Life among the primitives: protein O-phosphatases in prokaryotes. **Front Biosci.**, v. 4, p. 372-385, 1999.
- KIM, C-H. Catalytic domain of Salmonella typhimurium 2-oxoglutarate dehydrogenase is localized in N-terminal region. **J Mol Cat B: Enzymatic**, v. 26, p. 193-200, 2003.
- KIM, Y. T., YOSHIDA, H., KOJIMA, M., KURITA, R., NISHII, W., MURAMATSU, T., ITO, H., PARK, S. J., TAKAHASHI, K. The effects of mutations in the carboxyl-terminal region on the catalytic activity of *Escherichia coli* signal peptidase I. **J Biochem.**, (em impressão) 2007
- KLINGHOFFER, R. A., KAZLAUSKAS, A. Identification of a putative Syp substrate, the PDGF beta receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 22208-17, 1995.
- KOUL, A., CHOIDAS, A., TREDER, M., TYAGI, A. K., DRLICA, K., SINGH, Y., ULLRICH, A. Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatases of Mycobacterium tuberculosis. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 5425-5432, 2000.

LAILER, P. M., TAGA, E. M., VAN ETTEN, E. L. Human liver acid phosphatases: cysteine residues of the low-molecular-weight enzyme. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 216, p. 512-21, 1982.

LAMONTAGNE, K. R. JR., FLINT, A. J., FRANZA, B. R. JR., PANDERGAST, A. M., TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatase 1B antagonizes signaling by oncoprotein tyrosine kinase p210 bcr-abl in vivo. **Mol. Cell Biol.**, v. 18, p. 2965-2975, 1998.

LEE, A. Y., GOO PARK, S., KHO, C. W., YOUNG PARK, S., CHO, S., LEE, S. C., LEE, D. H., MYUNG, P. K., PARK, B. C. Identification of the degradome of Isp-1, a major intracellular serine protease of *Bacillus subtilis*, by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. **Proteomics**, v. 4, p. 3437-45, 2004.

LEE, D. H., KIM, S. G., PARK, Y. C., NAM, S. W., LEE, K. H., SEO, J. H. Proteome analysis of recombinant *Escherichia coli* producing human glucagon-like peptide-1. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 849, p. 323-30, 2007.

LIANG, F., KUMAR, S., ZHANG, Z-Y. Proteomic approaches to studying protein tyrosine phosphatases **Mol. BioSyst.**, v. 3, p. 308–316, 2007.

LI, Y., STROHL, W. R. Cloning, purification, and properties of a phosphotyrosine protein phosphatase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 136-142, 1996.

LIPPMANN, C., LINDSCHAU, C., VIJGENBOOM, E., SCHRÖDER, W., BOSCH, L., ERDMANN, V. A. Prokaryotic elongation factor Tu is phosphorylated in vivo. **J Biol Chem.**, v. 268, p. 601-7, 1993.

LUNDBLAD, R. L. Techniques in Protein Modification. **CRC Press**, Boca Raton, USA, 1995.

MADHURANTAKAM, C., RAJAKUMARA, E., MAZUMDAR, P. A., SAHA, B., MITRA, D., WIKER, H. G., SANKARANARAYANAN, R., DAS, A. K. Crystal structure of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9-Å resolution. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 2175-2181, 2005.

MADHURANTAKAM, C., CHAVALI, V. R., DAS, A. K. Analyzing the catalytic mechanism of MPtpA: A low molecular weight protein tyrosine phosphatase from

Mycobacterium tuberculosis through site-directed mutagenesis. **Proteins** (em impressão), 2007.

MAMOUN, C. B., GOLDBERG, D. E. Plasmodium protein phosphatase 2C dephosphorylates translation elongation factor 1beta and inhibits its PKC-mediated nucleotide exchange activity in vitro. **Mol Microbiol.**, v. 39, p. 973-81, 2001.

MANDEL, M., HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. **J. Mol. Biol.**, v. 53, p. 159–162, 1970.

MIKULÍK, K., ZHOULANOVA, E., HOANG, Q. K., JANECEK, J., BEZOUSKOVÁ, S. Protein kinase associated with ribosomes of streptomycetes. *Folia Microbiol (Praha)*., v. 44, p. 123-30, 1999.

MÜNCH, R. Review: on the shoulders of giants Robert Koch. **Microbes and Infection.**, v. 5, p. 69–74, 2003.

NIEBISCH, A., KABUS, A., SCHULTZ, C., WEIL, B., BOTT, M. Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the Odhl protein. **J Biol Chem.**, v. 281, p. 12300-7, 2006.

PALKA, H. L., PARK, M., TONKS, N. K. Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase Met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 5728-5735, 2003.

PANNIFER, A. D., FLINT, A. J., TONKS, N. K., BARFORD, D. Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by x-ray crystallography. **J Biol Chem.**, v., 273, p. 10454-62, 1998.

PARODI-TALICE, A., DURÁN, R., ARRAMBIDE, N., PRIETO, V., PIÑEYRO, M. D., PRITSCH, O., CAYOTA, A., CERVENANSKY, C., ROBELLO, C. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. **Int J Parasitol.**, v. 34, p. 881-6, 2004.

PATTNAIK, P. Surface Plasmon Resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction. **Applied Biochem Biotech.**, v. 126, p. 79-92, 2005.

PORATH, J. Immobilized metal ion affinity chromatography. **Protein Expression Purif.**, v. 3, p. 263-281, 1992.

RHOADS, R. E. Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein synthesis. **J Biol Chem.**, v. 274, p. 30337-40, 1999.

RIEDER, H. L. Interventions for Tuberculosis Control and Elimination. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (**IUATLD**), Paris, France, 2002. Disponível em: <<http://www.un.org>>. Acesso em: 10 de novembro de 2007.

RODNINA, M. V., STARK, H., SAVELSBERGH, A., WIEDEN, H. J., MOHR, D., MATASSOVA, N. B., PESKE, F., DAVITER, T., GUALERZI, C. O., WINTERMEYER, W. GTPases mechanisms and functions of translation factors on the ribosome. **Biol Chem.**, v. 381, p. 377-87, 2000.

ROMÁ-MATEO, C., RÍOS, P., TABERNERO, L., ATTWOOD, T. K., PULIDO, R. A novel phosphatase family, structurally related to dual-specificity phosphatases, that displays unique amino acid sequence and substrate specificity. **J Mol Biol.**, v. 374, p. 899-909, 2007.

ROMSICKI, Y., SCAPIN, G., BEAULIEU-AUDY, V., PATEL, S., BECKER, J. W., KENNEDY, B. P., ASANTE-APPIAH, E. Functional characterization and crystal structure of the C215D mutant of protein-tyrosine phosphatase-1B. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 29009-29015, 2003.

RUSSELL, D. G. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 2, p. 569-77, 2001.

SANS, M. D., XIE, Q., WILLIAMS, J. A. Regulation of translation elongation and phosphorylation of eEF2 in rat pancreatic acini. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 319, p. 144-51, 2004.

SINGH, R., RAO, V., SHAKILA, H., GUPTA, R., KHERA, A., DHAR, N., SINGH, A., KOUL, A., SINGH, Y., NASEEMA, M., NARAYANAN, P. R., PARAMASIVAN, C. N., RAMANATHAN, V. D., TYAGI, A. K. Disruption of mptpB impairs the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to survive in guinea pigs. **Mol. Microbiol.**, v. 50, p. 751-762, 2003.

SHIN, Y-K., KIM, K-Y., PAIK, Y-K. Alterations of protein expression in macrophages in response to *Candida albicans* infection. **Mol and Cells.**, v. 20, p. 271-279, 2005.

SMITH, C. V., SHARMA, V., SACCHETTINI, J. C. TB drug discovery: addressing issues of persistence and resistance. **Tuberculosis.**, v. 84, p. 45-55, 2004.

STARK, M. J. Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. **Yeast.**, v. 12, p. 1647-75, 1996.

STURGILL-KOSZYCKI, S., SCHAIBLE, U. E., RUSSELL, D. G. Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. **EMBO J.**, v. 15, p. 6960–6968, 1996.

TAKEDA, H., FUKUMOTO, A., MIURA, A., GOSHIMA, N., NOMURA, N. High-throughput kinase assay based on surface plasmon resonance suitable for native protein substrates. **Anal Biochem.**, v. 357, p. 262-71, 2006.

TIGANIS, T., BENNETT, A. M. Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. **Biochem. J.**, v. 402, p. 1-15, 2007.

TOMMASINI, R., ENDRENYI, L., TAYLOR, P. A., MAHURAN, D. J., LOWDEN, J. A. A statistical comparison of parameter estimation for the Michaelis-Menten kinetics of human placental hexosaminidase. **Can. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 63, p. 225-230, 1985.

TONKS, N. K., NEEL, B. G., From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. **Cell**, v. 87, p. 365-8, 1996.

TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 7, p. 833-846, 2006.

TRACEY, A. S., Hydroxamido vanadates: aqueous chemistry and function in protein tyrosine phosphatases and cell cultures. **J. Inorg. Biochem.**, v. 80, p. 11-16, 2000.

VERGNE, I., CHUA, J., LEE, H. H., LUCAS, M., BELISLE, J., DERETIC, V. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, p. 4033-4038, 2005.

VILLARINO, A., DURAN, R., WEHENKEL, A., FERNANDEZ, P., ENGLAND, P., BRODIN, P., COLE, S. T., ZIMNY-ARNDT, U., JUNGBLUT, P. R., CERVENANSKY, C., ALZARI, P. M. Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. **J Mol Biol.**, v. 350, p. 953-63, 2005.

VINCENT, C., DOUBLET, P., GRANGEASSE, C., VAGANAY, E., COZZONE, A. J., DUCLOS, B. Cell of *Escherichia coli* contain a protein tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 3472-3477, 1999.

WALTON, K. M., DIXON, J. E. Protein tyrosine phosphatases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 62, p. 101-120, 1993.

WELLS, C. D., CEGIELSKI, J. P., NELSON, L. J., LASERSON, K. F., HOLTZ, T. H., FINLAY, A., CASTRO, K. G., WEYER, K. HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis: the perfect storm. **J. Infect. Dis.**, v. 196, Suppl 1, p. S86-107, 2007.

WU, J., KATREKAR, A., HONIGBERG, L.A., SMITH, A.M., CONN, M. T., TANG, J., JEFFERY, D., MORTARA, K., SAMPANG, J., WILLIAMS, S. R., BUGGY, J., CLARK, J. M. Identification of substrates of human protein-tyrosine phosphatase PTPN22. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 11002-11010, 2006.

XIE, L., ZHANG, Y. L., ZHANG, Z. Y. Design and characterization of an improved protein tyrosine phosphatase substrate-trapping mutant. **Biochemistry**, v. 41, p. 4032-4039, 2002.

XU, Q., FU, H. H. Gupta R, Luan S. Molecular characterization of a tyrosine-specific protein phosphatase encoded by a stress-responsive gene in Arabidopsis. **Plant Cell.**, v. 10, p. 849-57, 1998.

XU, H., XIA, B., JIN, C. Solution structure of a low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase from *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 1509-1517, 2006.

ZHANG, Z. Y. Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 5, p. 416-423, 2001.

ZHANG, Z. Y., ZHOU, B., XIE, L. Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. **Pharmacol Ther.**, v. 93, p. 307-17, 2002

ZHANG, Z. Y., Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 42, p. 209-34, 2002.

ZHANG, Z. Y. Functional studies of protein tyrosine phosphatases with chemical approaches. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1754, p. 100-7, 2005.

Dados de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv. Disponível em: <<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>>. Acesso em 05 de novembro de 2007.

Informações de Saúde, Dados Epidemiológicos e Morbidade, Tuberculose, Brasil. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em 17 de dezembro de 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, Programa: A World Free of TB. Disponível em: <<http://www.who.int/tb>>. Acesso em: 27 de dezembro de 2007.

Substrate-Trapping-Enzyme (STE) Technology. Disponível em: <<http://www.diazyme.de>>. Acesso em 05 de janeiro de 2008.