

Ourivesaria molecular

Rede paulista supera o alto risco de fracasso e esclarece a estrutura de 52 proteínas

RICARDO ZORZETTO

S

haker Chuck Farah, bioquímico canadense que há 15 anos vive em São Paulo, aponta na tela do compu-

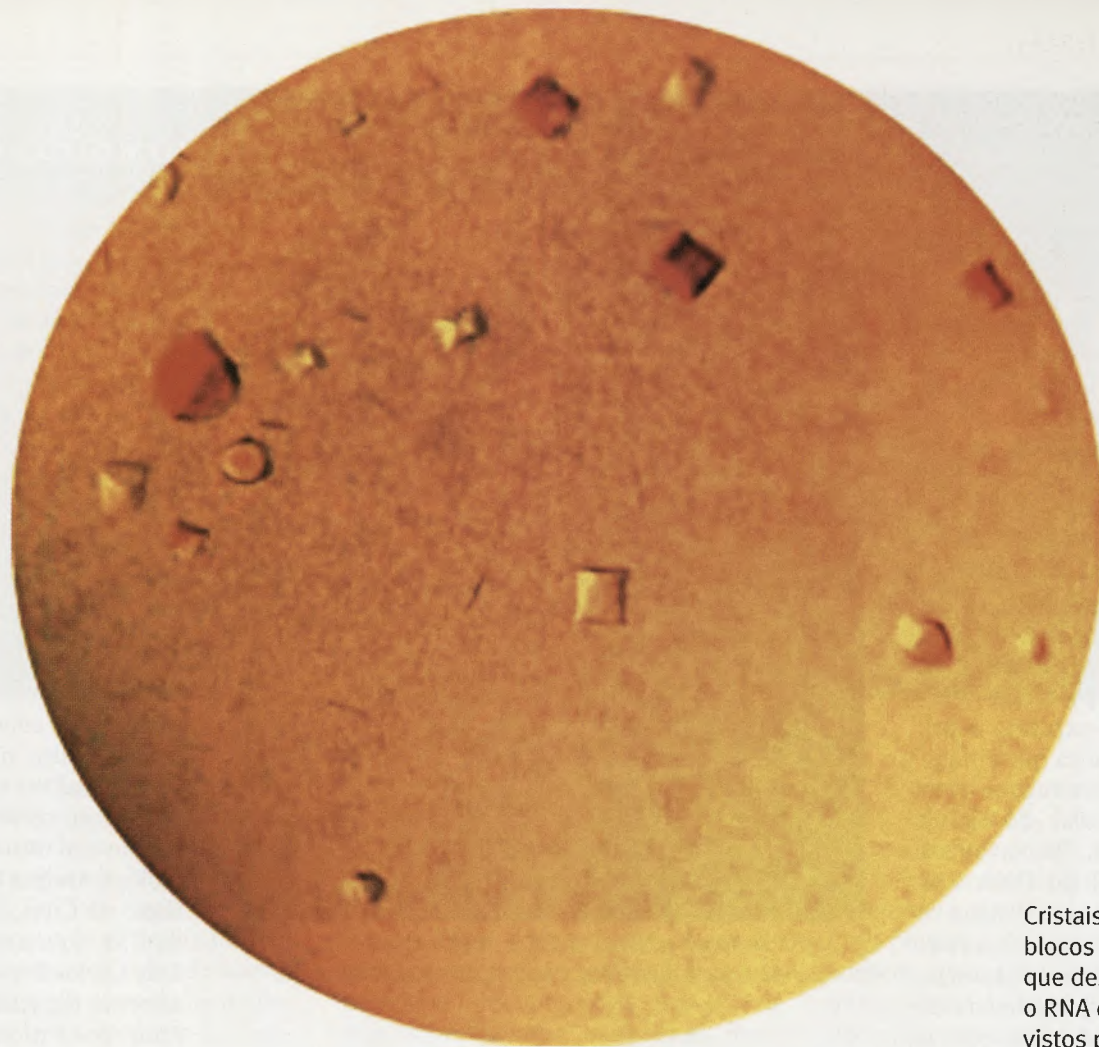
tador um conjunto de círculos concêntricos definidos por uma sutil variação de tons cinza. Pontos negros salpicam o centro do monitor e formam uma imagem que lembra um alvo crivado de balas. É a assinatura de luz de uma proteína produzida pela *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, a bactéria causadora do cancro cítrico, uma das piores pragas da citricultura nacional. Ao atravessar um cristal da proteína, um feixe de raios X sofre desvios e registra no detector pontos que permitem identificar a estrutura tridimensional dessa molécula. Por meio dessa técnica chamada difração de raios X, a equipe desse bioquímico da Universidade de São Paulo (USP) definiu, átomo por átomo, a estrutura em relevo da YaeQ: seus 182 blocos essenciais (aminoácidos)

se agrupam e modelam um barril sem tampas, com uma fenda no alto.

A YaeQ é apenas uma das 52 moléculas cuja estrutura espacial foi descrita nos dois últimos anos pelos pesquisadores da Rede de Biologia Molecular Estrutural, ou Smolbnet, sigla em inglês de Structural Molecular Biology Network. Criada em dezembro de 2000 sob a coordenação do bioquímico Rogerio Meneghini, com apoio da FAPESP e do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), essa rede começa agora a colher os principais resultados da análise de proteínas após quatro anos e meio de trabalho. É que primeiro foi preciso treinar biólogos, bioquímicos, químicos e médicos de 20 laboratórios paulistas nas técnicas adotadas para descobrir a forma tridimensional dessas moléculas, essenciais à composição e ao funcionamento dos organismos vivos.

Duas características dessa rede tornaram a tarefa mais difícil. A primeira é que as equipes exercem atividades dis-

tintas umas das outras. O grupo do médico Ismael Silva, por exemplo, estuda proteínas ligadas ao surgimento de cânceres ginecológicos, enquanto a equipe chefiada pelo biólogo Luis Eduardo Soares Netto investiga um conjunto de proteínas que protegem as células dos radicais livres. Já a bióloga Carla Columbano de Oliveira analisa a estrutura das proteínas componentes de um aglomerado – o exossomo – existente no núcleo das células, responsável pelo controle de qualidade das moléculas de ácido ribonucléico (RNA) que, entre outras tarefas, copiam a informação dos genes e orientam a produção de outras proteínas. O segundo complicador é que quase todos os grupos apresentavam pouco ou nenhum conhecimento sobre as técnicas de determinação da estrutura de proteínas. “Nosso objetivo era ensinar o processo de investigação da forma tridimensional das proteínas às equipes de pesquisadores que freqüentemente se deparam com a necessidade de conhe-



Cristais raros:
blocos de enzimas
que desfazem
o RNA defeituoso
vistos por lupa

cer a estrutura dessas moléculas”, afirma Meneghini, que dirigiu de 1997 a 2004 o Centro de Biologia Molecular Estrutural (Cebime) do LNLS.

Múltiplas técnicas - O esforço valeu. Nos últimos dois anos as diferentes equipes determinaram a estrutura de 24 proteínas pela difração de raios X – a principal técnica usada no estudo dos cristais dessas moléculas, a cristalografia de proteínas. Entre elas, há duas importantes proteínas que inibem em estágios diferentes a coagulação do sangue e, no futuro, poderão ser aplicadas nos tratamentos de infarto e trombose. Os pesquisadores também chegaram à forma tridimensional de outras 14 proteínas com uma segunda técnica que usa raios X, mas é menos precisa que a anterior: o espalhamento a ângulo baixo, ou Small Angle X-Ray Scattering (Saxs). Por meio de uma terceira técnica, a ressonância magnética nuclear, eles desvendaram a conformação de mais 14 moléculas.

Apresentados em 50 artigos publicados em revistas internacionais, esses resultados foram considerados bastante bons na avaliação feita em outubro de 2004 por uma comissão independente, com especialistas do Instituto Pasteur, na França, da Universidade de Oxford, na Inglaterra, e do Laboratório Nacional Brookhaven, nos Estados Unidos. “A taxa de sucesso desde a obtenção dos clones até a determinação das estruturas é comparável à de projetos internacionais”, afirmaram os avaliadores estrangeiros. Eles também reforçaram a necessidade de instalar no LNLS uma outra linha de raios X, que fornece radiação mais intensa em comprimentos de onda específicos. Essencial para identificar a estrutura de proteínas desconhecidas, essa linha, a MAD (Multiwavelength Anomalous Dispersion), deve entrar em operação até o final deste ano.

Era mesmo necessário criar uma rede como essa. Até o final da década de 1990 contavam-se nos dedos de uma só

mão os laboratórios brasileiros dedicados à cristalografia de proteínas, com destaque para o grupo do cristalógrafo Glaucius Oliva, do Instituto de Física de São Carlos, ligado à USP, e do próprio Cebime. Reduzindo uma histórica defasagem, as equipes de outros 20 laboratórios são capazes de percorrer sozinhas ao menos cinco das seis etapas desse processo. “A julgar pelos resultados obtidos, esse programa promoveu um importante estímulo para o desenvolvimento dessa área no país”, comenta Meneghini, que atualmente é pesquisador do Centro Latino-americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde (Bireme).

Ofuscada pela notoriedade conquistada pelo seqüenciamento do genoma de 180 organismos, a cristalografia reassume agora, no mundo todo, o papel primordial que sempre desempenhou no estudo da função das proteínas. Explica-se: a conformação espacial dessas moléculas determina o papel que exercerão. Uma proteína é produzida

no interior das células pelo acréscimo de um aminoácido após outro, em uma longa fita composta essencialmente por átomos de hidrogênio, carbono, nitrogênio e oxigênio. Tão logo é formada, essa fita começa a sofrer torções e a dobrar-se sobre si mesma, assumindo uma forma espacial por causa da atração e da repulsão exercida pelas cargas elétricas de determinados trechos da molécula.

O resultado desse balé solitário são moléculas com forma de barbante, de globo ou até de ampulheta. Como uma chave que abre apenas uma fechadura, as proteínas apresentam uma estrutura espacial tão específica que em geral elas só interagem com outras moléculas de forma complementar. “Foi a forma tridimensional do DNA que indicou a James Watson e Francis Crick como essa molécula se comportava”, comenta Farah. E o que a forma de barril com fenda conta para o bioquímico da USP a respeito da função dessa proteína? Farah ainda não sabe. A comparação com outras proteínas sugere que a YaeQ seja completamente diferente do que se conhecia. “Esse é o nosso próximo desafio”, afirma o bioquímico da USP. “Estamos seguindo o caminho oposto ao percorrido tradicionalmente”, diz Farah. Em geral usa-se a cristalografia para desvendar a estrutura de proteínas com funções conhecidas, mas, com o término de vários genomas, cresceu o número de proteínas cujas funções ainda não foram identificadas.

Sucessos e frustrações - Mais artesanal que o seqüenciamento dos genomas, a determinação da forma tridimensional das proteínas é uma tarefa tortuosa, quase sempre composta por seis etapas e com taxa de sucesso baixa, em média 5%. É que cada fase apresenta empecilhos, com uma dificuldade extra: não há como antever qual etapa dará errado nem por que razão não funcionou, em um retorno aos testes empíricos de tentativa e erro. O primei-



John Kendrew e Max Perutz, à direita: quase 20 anos para descobrir a estrutura da hemoglobina

ro passo é escolher o gene responsável pela produção de uma proteína e descobrir a seqüência de pares de bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina e guanina) que o formam. Em seguida tenta-se copiar o gene da proteína de que se deseja obter um cristal.

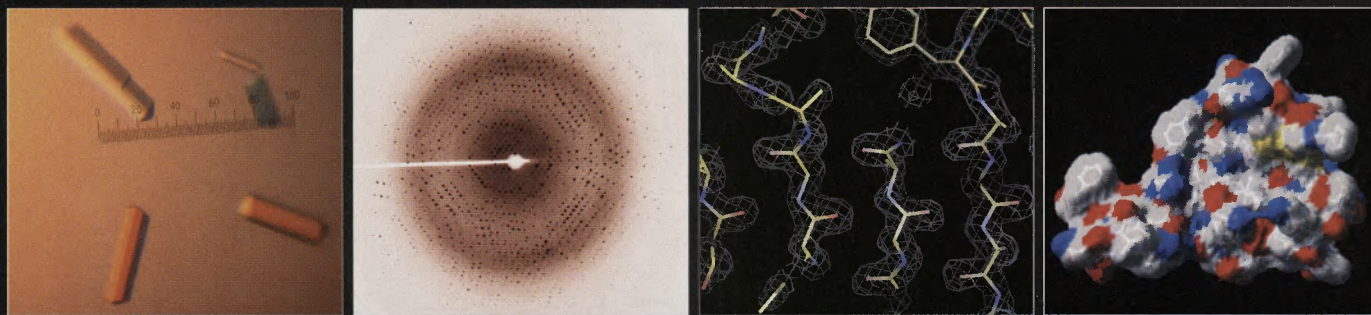
Quando tudo corre bem, os pesquisadores inserem o gene escolhido no material genético de uma bactéria ou uma levedura, que devem produzir a proteína em quantidade suficiente para as etapas seguintes. Com o trabalho por conta desses microorganismos, não há o que fazer além de aguardar. A próxima fase é separar a proteína a ser estudada das demais fabricadas pela bactéria ou pela levedura – a filtragem pode durar semanas. Os poucos miligramas da proteína purificada são diluídos em diferentes concentrações de sais e alcoóis, depositados em dezenas de recipientes lacrados e distribuídos sobre placas retangulares de acrílico, um pouco maior que um maço de cigarros. E novamente é preciso esperar.

Em um processo ainda pouco compreendido pelos pesquisadores, os mi-

lhões de cópias da proteína começam a perder água e a se aproximarem umas das outras, formando um bloco no estado sólido. Com alguma sorte, as moléculas da proteína se acomodam todas a mesma distância umas das outras e com a mesma orientação, tal qual um pelotão de soldados perfilados que aguardam instruções do comandante. É o cristal da proteína. Mas se as distâncias entre uma molécula e outra são irregulares ou a orientação das cópias da proteína não é homogênea, surge um sólido disforme no fundo do recipiente. E não há receita certa. “Cada proteína necessita de condições específicas – pouco mais de determinado sal ou um tanto menos de um certo álcool – para formar um cristal”, comenta a bióloga Andrea Balan, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, que, em parceria com Luis Carlos Ferreira, investiga a forma espacial de um conjunto de 18 proteínas da *Xanthomonas citri* envolvidas no transporte de nutrientes para o interior da bactéria.

Quebra-cabeça - Só então começam os testes de difração no LNLS, em Campinas. Em um imponente prédio de concreto, potentes ímãs aceleram elétrons a velocidades próximas à da luz no interior de um anel circular. Cada vez que são desviados para manterem a trajetória circular, os elétrons liberam uma luz muito intensa, a luz síncrotron, composta por radiações que vão do infravermelho aos raios gama. Em um laboratório conectado a esse anel de luz síncrotron, os pesquisadores controlam por meio de um computador a orientação do cristal exposto aos raios X e fazem centenas de imagens semelhantes às exibidas por Farah, cada uma de um ângulo diferente. Um programa de computador analisa as imagens e gera um esboço da proteína. Conhecendo a seqüência de aminoácidos das proteínas, os pesquisadores iniciam um verdadeiro jogo de quebra-cabeça que pode consumir meses de trabalho:

Quatro cenas de uma longa jornada



Etapas da identificação da estrutura espacial de um anticoagulante, o inibidor do fator XIIa: da esquerda para a direita, cristais vistos por lupa (na escala, 100=1 mm) e por difração de raios X antecedem a reconstituição da molécula átomo a átomo

experimentam um a um os aminoácidos até descobrir sua posição específica na proteína enovelada.

O que é complicado hoje já foi muito mais difícil. Em 1937, quando o bioquímico austríaco Max Ferdinand Perutz começou a usar difração de raios X para investigar a estrutura da hemoglobina, proteína que transporta o oxigênio no sangue, não havia computador. O trabalho era todo manual: as imagens eram feitas com equipamentos de raios X bem menos potentes, impressas em placas de vidro e dispostas em molduras enfileiradas no laboratório antes de se calcular no papel a posição dos átomos. Perutz estava determinado a revelar a forma tridimensional da hemoglobina durante seu doutorado no prestigioso Laboratório Cavendish, da Universidade de Cambridge, mas não conseguiu. Só esclareceu a estrutura espacial da hemoglobina em 1959, quase duas décadas depois de completar o doutoramento, feito que lhe valeu o Nobel de Química de 1962, partilhado com o britânico John Kendrew.

Seguindo essa receita – mas com o apoio de computadores –, a equipe de Farah estudou 35 dos 1.700 genes da *Xanthomonas citri* responsáveis pela fabricação de proteínas ainda desconhecidas e determinou a forma de duas proteínas por meio da difração de raios X. No meio do caminho, porém, o bioquímico da USP teve a sorte de topor com Ana Paula Valente e Fábio Almei-

da, ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), que haviam desenvolvido uma forma de analisar proteínas por ressonância magnética nuclear sem passar pela etapa de purificação. Farah adaptou o uso da ressonância para analisar a estabilidade das proteínas – quanto mais estáveis, ou seja, dobradas sobre si mesmas, mais facilmente elas formam cristais – e poupou meses de trabalho que possivelmente não seria bem-sucedido.

Anticoagulante - Outras equipes tomaram caminho diverso. Em vez de partirem de conjuntos de proteínas de um microorganismo para identificar a estrutura de algumas poucas, deixando o que não deu certo para trás, escolheram investigar a forma espacial de proteínas com as quais já trabalhavam. Foi a decisão do biólogo Sergio Schenkman, da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), que há 20 anos estuda proteínas do ciclo de vida do protozoá-

rio *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, e do seu transmissor na América do Sul, o inseto *Triatoma infestans*, ou barbeiro. A equipe de Schenkman detalhou a estrutura de duas proteínas do sistema digestivo do barbeiro que atuam em fases distintas da seqüência de reações da coagulação do sangue: uma inibe a ação da trombina e a outra impede o funcionamento do fator XIIa. Ambas apresentam potencial aplicação no tratamento de problemas provocados pela coagulação do sangue, como a trombose. “Essas proteínas devem impedir a coagulação do sangue no trato digestivo do inseto, que se alimenta uma vez a cada 15 ou 20 dias”, explica o pesquisador.

Por ressonância magnética nuclear, Schenkman identificou a estrutura espacial de uma terceira molécula, correspondente à porção terminal da trialisina, proteína da saliva do barbeiro que abre poros nas células, matando-as. Possivelmente o inseto injeta essa proteína na pele no momento da picada, abrindo caminho para sugar o sangue. Análises da equipe da Unifesp e do LNLs permitiram mapear regiões do trecho terminal da trialisina importantes para a atividade dessa molécula. Com base nessas informações, os pesquisadores acreditam ser possível desenhar peptídeos com ação antimicrobiana. Diferentemente dos genomas, a cristalografia de proteínas avança um passo por vez.

O PROJETO

Structural Molecular Biology Network
(Smolbnet)

COORDENADOR

ROGERIO MENEHINI – Bireme

INVESTIMENTO

R\$ 13.036.329,12 (FAPESP)