

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Forma selvagem e formas mutantes da
Fenilalanina Hidroxilase Humana
(hPAH) recombinante: avaliação de
interacções com diferentes Chaperones
Moleculares**

INÊS RODRIGUES SILVA CRISTO

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2008

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Forma selvagem e formas mutantes da
Fenilalanina Hidroxilase Humana
(hPAH) recombinante: avaliação de
interacções com diferentes Chaperones
Moleculares**

INÊS RODRIGUES SILVA CRISTO

Dissertação orientada

pela Prof.^a Doutora Ana Paula Leandro

GRUPO DE METABOLISMO E GENÉTICA

iMED.UL, FACULDADE DE FARMÁCIA DA UL

e pelo Prof. Doutor Mário Santos

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UL

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2008

Resumo

Os chaperones moleculares desempenham um papel crucial nos vários processos celulares relacionados com a aquisição e manutenção da conformação proteica, sendo por isso peças importantes na patogénese das doenças conformacionais, nomeadamente da fenilcetonúria (PKU), uma doença genética causada por uma deficiente actividade da fenilalanina hidroxilase (hPAH). Embora seja presentemente reconhecido que a maior parte das proteínas hPAH mutantes apresentam alterações na sua conformação, são ainda escassos os conhecimentos acerca das interacções entre estas proteínas e os chaperones moleculares.

Utilizando um sistema procariota, a forma selvagem e as formas de hPAH mutantes I65T, R261, R270K e V388M foram co-expressas com os sistemas de chaperones moleculares GroESL, DnaKJ e DnaKJ/GrpE. Após purificação, as proteínas hPAH recombinantes foram caracterizadas relativamente à quantidade obtida, actividade enzimática e perfil de oligomerização. A mesma estratégia experimental foi utilizada para estudar o efeito da adição do chaperone químico glicerol sobre as proteínas hPAH mutantes.

Os resultados obtidos indicam que a co-expressão dos chaperones moleculares, embora induza um aumento das proteínas totais da célula, não resulta num aumento do rendimento das proteínas hPAH mutantes. No entanto, a presença de GroESL conduziu a um aumento da actividade enzimática das formas mutantes que variou entre 1,3 (I65T) e 2,8 vezes (R261Q). Na presença do sistema DnaKJ, apenas as formas mutantes I65T e R270K apresentaram um aumento de actividade de 1,3 e 2,6 vezes, respectivamente. Este aumento da actividade não foi, no entanto, acompanhado por incremento na percentagem dos tetrâmeros. Curiosamente, não foi possível observar um efeito aditivo após adição de glicerol ao sistema de co-expressão.

Os dados obtidos indicam que, embora o sistema GroESL não apresente especificidade relativamente às proteínas mutantes, o efeito do sistema DnaKJ será dependente da forma mutante. Adicionalmente, os chaperones moleculares não parecem estar envolvidos no processo de montagem pós-tradução da estrutura tetramérica da proteína. Finalmente, as interacções que ocorram entre as proteínas mutantes e os chaperones moleculares não serão estabilizadas pela presença de chaperones químicos.

Palavras-chave: Fenilcetonúria; Fenilalanina hidroxilase humana; Chaperones moleculares; Estabilização de proteínas mutantes.

Abstract

Molecular chaperones play a crucial role in the several cellular processes related to the acquisition and maintenance of protein folding, being important pieces in the pathogenesis of conformational diseases, namely phenylketonuria (PKU), a genetic disorder caused by a deficient activity of phenylalanine hydroxylase (hPAH). Although it is now recognized that most of the hPAH mutant proteins present conformational changes, there is a lack of knowledge concerning the interactions between these proteins and molecular chaperones.

Using a prokaryotic system, the wild type hPAH and the mutant forms I65T, R261Q, R270K and V388M were co-expressed with the molecular chaperone systems GroESL, DnaKJ and DnaKJ/GrpE. After purification, the yield, activity and oligomerization profile of hPAH recombinant proteins were characterized. The same experimental strategy was used for the study of the effect of the chemical chaperone glycerol on the hPAH mutant proteins.

The results indicate that co-expression of molecular chaperones, although induced in the yield of the purified mutant hPAH enzymes. However, in the presence of GroESL, the enzyme activity of I65T and R261Q presented an increment of 1.3 and 2.8 fold, respectively. A similar result was obtained in the presence of DnaKJ system, where a 1.3 and 2.6 fold increase was observed for the mutant forms I65T and R270K, respectively. Contrarily to the expected, a higher level of tetrameric forms were not obtained. Furthermore, after the addition of glycerol to the co-expression system, an additive effect was not observed.

The obtained data indicate that, although the GroESL system interactions are not mutant-specific, contrarily to the effect of the DnaKJ system (mutant dependent). Additionally, the molecular chaperones do not seem to be involved in the process of post-translation assembly of the tetrameric structure of the protein. Finally, the interactions that occur between the mutant protein and molecular chaperone are not stabilized by the presence of a chemical chaperone.

Keywords: Phenylketonuria, human Phenylalanine Hydroxylase, Molecular Chaperones, Stabilization of mutant proteins.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Prof. Doutora Paula Leandro, por todo o seu apoio e por me ter supervisionado no meu início no mundo da investigação. Todo o seu esforço, optimismo e noites mal dormidas foram muito importantes para o bom decorrer de todo este ano.

Gostaria também de agradecer à Prof. Doutora Isabel Tavares de Almeida, por me ter recebido no seu grupo de investigação, e ao Prof. Doutor Mário Santos por aceitar conduzir a orientação da minha tese de mestrado.

À Isabel e à Ana, um muito obrigado por fazerem com que o trabalho nunca parasse e pelas conversas sempre “apetitosas”.

Um grande obrigado à “mamã” Sara e à “tia” Andreia pelo apoio e, mais importante, o bom ambiente e brincadeiras que sempre proporcionaram no laboratório, sem esquecer os bolinhos do Algarve e as bolachas holandesas.

Por tudo o que fez para me ajudar, entre discussões científicas e outras menos científicas (conversas filosóficas e grandes intervenções), pelas piadas originais e boa disposição, um grande obrigado ao meu colega de “stress” Rafael (e ao seu bolo de chocolate).

Um grande beijinho para a Ana Rute, Bruno, Cátia, Leonor, Ricardo, Rita e Telma (grupo do costume) pelo apoio e bons jantares.

Por último, mas sem dúvida o mais importante, queria agradecer aos meus pais e irmão, por me terem aturado durante este ano, tanto rabugenta, cansada, como eléctrica. Estiveram sempre lá para me ouvir e apoiar. Por tudo isso, um grande beijo e obrigado.

Lista de abreviaturas

A	Adenina
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BH4	6(R)-L-eritro-5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina
Bisacrilamida	N,N'-metileno-bis-acrilamida
bp	par de bases
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar ao mRNA
Da	Dalton
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleosidos trifosfato
G	Guanina
h	hora
His	Histidina
HPA	Hiperfenilalaninémia
hPAH	Fenilalanina Hidroxilase humana
IPTG	isopropil-1-tio- β -D-galactosídeo
kb	quilobases
kDa	quiloDalton
min	minutos
mA	mili amperes
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
nm	nanómetro
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PAH	Fenilalanina Hidroxilase
PAH wt	Fenilalanina Hidroxilase forma selvagem
PCR	reacção de polimerização em cadeia
PKU	Fenilcetonúria
PVDF	difluoreto de polivinilideno
RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecil sulfato de sódio
T	timina
Tris	tris(hidroximetil)metilamina
U	uracilo
V	Volt

Índice

1. Introdução	1
1.1. Processos intracelulares de aquisição da conformação proteica	1
1.1.1. Sistema Hsp70 / DnaK	2
1.1.2. Sistema Hsp60 / GroEL.....	3
1.1.3. Cooperação entre DnaK e GroEL	4
1.2. Doenças Conformacionais	5
1.2.1. A Fenilcetonúria	6
1.2.2. A Fenilalanina Hidroxilase	7
1.2.3. Modulação da estabilidade de hPAH mutantes	8
1.3. Objectivo do trabalho	9
2. Materiais e Métodos	10
2.1. Estudos sobre a interacção entre chaperones moleculares/químicos e hPAH recombinante	10
2.1.1. Vectores e Estirpes bacterianas	10
2.1.2. Indução e Expressão Proteica	11
2.1.3. Purificação de proteína PAH humana recombinante.....	12
2.1.4. Quantificação proteica	12
2.1.5. Ensaio enzimáticos.....	13
2.1.6. Ensaio de cross-linking.....	13
2.1.7. Análise proteica em géis de poliacrilamida.....	14
2.1.8. Análise de Western blotting.....	15
2.2. Avaliação num sistema de expressão eucariótica <i>in vitro</i> do mecanismo de degradação da hPAH recombinante.....	16
2.2.1. Vectores e Estirpes bacterianas	16
2.2.2. Mutagénese dirigida	16
3. Resultados e Discussão.....	19
3.1. Efeito da presença de chaperones moleculares e químicos sobre formas mutantes de hPAH recombinante estruturalmente afectadas.....	19
3.1.1. Integridade dos vectores de expressão dos chaperones moleculares ..	19
3.1.2. Co-expressão de chaperones moleculares e proteínas hPAH mutantes na ausência e presença de glicerol.....	20

3.1.3. Purificação e quantificação das proteínas hPAH co-expressas com chaperones moleculares na ausência e presença de glicerol.....	21
3.1.4. Actividade enzimática das proteínas hPAH co-expressas com chaperones moleculares na ausência e presença de glicerol.....	25
3.1.5. Ensaio de <i>cross-linking</i>	26
3.2. Clonagem e preparação de sistema de expressão eucariótica <i>in vitro</i> para avaliação do mecanismo de degradação da hPAH recombinante ...	27
4. Conclusões	29
5. Referências	31

Índice de figuras

Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de acção do sistema DnaKJ/GrpE	3
Figura 2 – A) Imagem de cristalografia dos chaperones GroES e GroEL. B) Representação esquemática do mecanismo de acção do sistema GroESL	4
Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de cooperação proposto para os sistemas GroESL e DnaKJ/GrpE	5
Figura 4 – Hidroxilação do aminoácido aromático L-fenilalanina (L-Phe) em L-tirosina (L-Tyr) pela enzima fenilalanina hidroxilase (PAH).	7
Figura 5 – A) Diferentes perspectivas do modelo da forma tetramérica da fenilalanina hidroxilase. B) Dímero da fenilalanina hidroxilase humana.....	8
Figura 6 – Separação electroforética, em gel de agarose (1%), dos produtos de hidrólise dos vectores de expressão pOFX contendo os diferentes chaperones moleculares	19
Figura 7 – Análise por SDS-PAGE dos lisados celulares obtidos após indução dos vectores de expressão pOFX contendo os chaperones moleculares GroESL, DnaKJ e DnaKJ/GrpE	20
Figura 8 – Análise por Western blotting (anticorpo Anti-His) das fracções solúveis dos lisados celulares, após co-expressão das diferentes formas hPAH e os sistemas de chaperones moleculares GroESL e DnaKJ/GrpE, na ausência e na presença de glicerol	21
Figura 9 – Análise por SDS-PAGE e Western Blotting da purificação, por IMAC (gradiente de imidazol) da proteína hPAHwt na ausência e presença de sobre-expressão de diferentes chaperones moleculares	22
Figura 10 – Rendimento de proteína hPAH recombinante obtida (μg hPAH/g proteína total solúvel) após expressão na ausência e presença de co-expressão de chaperones moleculares, com e sem glicerol no meio de cultura.....	24
Figura 11 – Actividade enzimática específica ($\text{nmol Tyr}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) da forma selvagem da hPAH (hPAHwt) produzida na ausência e presença de co-expressão dos diferentes sistemas de chaperones moleculares, com e sem glicerol no meio de cultura.....	25
Figura 12 – Actividade enzimática específica ($\text{nmol Tyr}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) da formas hPAH mutantes I65T, R261Q, R270K e V388M produzidas na ausência de co-expressão dos diferentes sistemas de chaperones moleculares, na presença dos chaperones moleculares e na presença de chaperones moleculares e glicerol a 1%	26

Figura 13 – Análise por separação electroforética em géis nativos de poliacrilamida das proteínas recombinantes hPAH produzidas na presença e ausência de glicerol e diferentes chaperones moleculares	27
Figura 14 – Análise em gel de agarose (1%) do perfil electroforético dos fragmentos obtidos após hidrólise com a enzima <i>Xma</i> I. (A) Amostras provenientes da reacção de mutagénesis dirigida (pSG5 <i>Xma</i> I); (B) Amostras provenientes da reacção de ligação entre o cDNA-PAHwt e pSG5 <i>Xma</i> I	28
Figura 15 – Electroforetograma do DNA proveniente da reacção de ligação entre o cDNA-PAHwt e pSG5 <i>Xma</i> I	28

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Características gerais dos vectores de expressão utilizados para produção das proteínas recombinantes em estudo.	11
Tabela 2 – Anticorpos e respectivas diluições utilizados nos ensaios de Western Blotting	16
Tabela 3 – Características dos programas utilizados na reacção de mutagénese dirigida	17
Tabela 4 – Enzimas de restrição utilizadas para confirmação da integridade dos vectores de expressão dos sistemas de chaperones moleculares.	19
Tabela 5 – Quantidade de proteína obtida ao longo do processo de produção da forma selvagem e de formas mutantes da hPAH sem e com sobre-expressão de chaperones moleculares na ausência e presença de glicerol no meio de cultura.	23

1. Introdução

1.1. Processos intracelulares de aquisição da conformação proteica

Para que uma proteína exerça a sua função biológica é fundamental que apresente uma conformação tridimensional específica (*folding*), a qual se encontra codificada na sua estrutura primária. Esta estrutura funcionalmente activa (estrutura nativa), terciária e/ou quaternária, resulta do estabelecimento de inúmeras interações (covalentes e não-covalentes) entre resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica e a sua aquisição é um processo complexo, que se encontra sujeito a inúmeras interferências. No ambiente intracelular, onde estão presentes um elevado número de macromoléculas e metabolitos, não é favorecida a formação de estruturas de dimensões elevadas, como é o caso da estrutura nativa da maior parte das proteínas celulares. Paralelamente, à medida que a cadeia polipeptídica é sintetizada nos ribossomas, são expostas ao meio intracelular pequenas porções hidrofóbicas da sua sequência, as quais, caso não ocorra o *folding*, terão tendência para agregar. Finalmente, sendo as proteínas moléculas estruturalmente frágeis, situações de *stress* celular levam facilmente à perda da sua conformação com consequente perda da funcionalidade.

Assim, para assegurar a formação e manutenção de proteínas estruturalmente funcionais, a célula recorre a uma classe de proteínas designadas por chaperones moleculares, que se encontram presentes na maior parte dos sistemas celulares (procariotas e eucariotas). Estas moléculas são responsáveis: (i) pelo acompanhamento e protecção das proteínas nascentes, até estas estarem completamente sintetizadas e apresentarem a sua conformação final [5, 6], prevenindo a formação irreversível de agregados [7]; (ii) pelo acompanhamento de proteínas não-nativas destinadas à translocação através de membranas e (iii) pelo *folding de novo* de proteínas conformacionalmente alteradas. Os chaperones moleculares são ainda elementos activos do sistema de controlo de qualidade proteica (*Protein Quality Control*; PQC), reconhecendo proteínas *misfolded* e encaminhando-as para posterior degradação.

Os chaperones moleculares englobam um conjunto de proteínas estruturalmente muito diversas, cujo modo de actuação assenta basicamente no reconhecimento de resíduos hidrófobos expostos ou de segmentos não-estruturados da cadeia polipeptídica [8-10]. Estas macromoléculas não fazem parte da estrutura proteica final nem fornecem qualquer informação para o *folding* proteico. Embora, até à data, não tenham sido ainda estabelecidas normas para a nomenclatura e classificação destas proteínas, elas são frequentemente designadas por Hsp (*Heat Shock Proteins*),

encontrando-se agrupadas em famílias de acordo com a sua função e modo de acção. Podemos realçar entre elas, a família das Hsp70, chaperoninas, Hsp90 e *Small Chaperone Like Proteins*, sendo representantes desta última família o *Trigger Factor* (TF) nas células procariotas e o complexo GimC/prefoldina nos sistemas eucariotas. De entre estas macromoléculas, a família das Hsp70 e das chaperoninas são as que se encontram melhor caracterizadas, quer a nível estrutural quer a nível funcional.

1.1.1. Sistema Hsp70 / DnaK

As proteínas pertencentes à família Hsp70, representada pelo DnaK nos organismos procariotas, apresentam uma massa molecular na ordem dos 70 kDa, sendo responsáveis pelo acompanhamento e protecção de proteínas recém-sintetizadas que ainda não atingiram o *fold* final [5, 11-13]. Estes chaperones apresentam uma especificidade baixa, uma vez que reconhecem não proteínas mas pequenas fracções hidrofóbicas da cadeia peptídica recém-sintetizada, que normalmente se encontram inacessíveis nas proteínas nativas, evitando a sua agregação [7, 9]. As Hsp70 são proteínas monoméricas, constituídas por um domínio N-terminal de ligação ao ATP (*nucleotide binding domain*; NBD) e um domínio C-terminal de reconhecimento do péptido alvo (*peptide binding domain*; PBD) e que se podem encontrar num estado-ATP, de baixa afinidade para o substrato e elevada taxa de permuta, ou num estado-ADP, de elevada afinidade para o substrato e baixa taxa de permuta. Deste modo, a associação e dissociação destes chaperones moleculares do péptido alvo é regulada por ciclos de ligação e hidrólise do ATP, o qual por sua vez é regulado por co-factores específicos, nomeadamente o Hsp40 (homólogo eucariota do DnaJ) [14]. Estes co-chaperones são constituídos por um domínio N-terminal que estimula a hidrólise do ATP ligado às Hsp70, designado por domínio J e um domínio C-terminal de ligação a sequências peptídicas hidrofóbicas ou não estruturadas.

Assim, nas células procariotas, a acção do DnaK é iniciada pela ligação do DnaJ à proteína nascente (Figura 1). Este conjunto associa-se então ao DnaK, que se encontra no estado-ATP. Esta associação estimula a hidrólise do ATP ligado ao DnaK, que passa ao estado-ADP com elevada afinidade para a proteína alvo. Para que haja libertação do DnaJ, é necessária a actuação de um co-chaperone adicional, o GrpE. Este péptido, de 23 kDa, ao ligar-se ao domínio NBD do DnaK, induz uma alteração na sua conformação, que conduz à libertação do ADP e dissociação do DnaJ. A ligação de uma nova molécula de ATP ao domínio NBD do DnaK irá então induzir a libertação do péptido alvo [7]. Este processo permite que a proteína alvo seja encaminhada para o local correcto, onde será libertada após consumo de uma molécula de ATP [15-17].

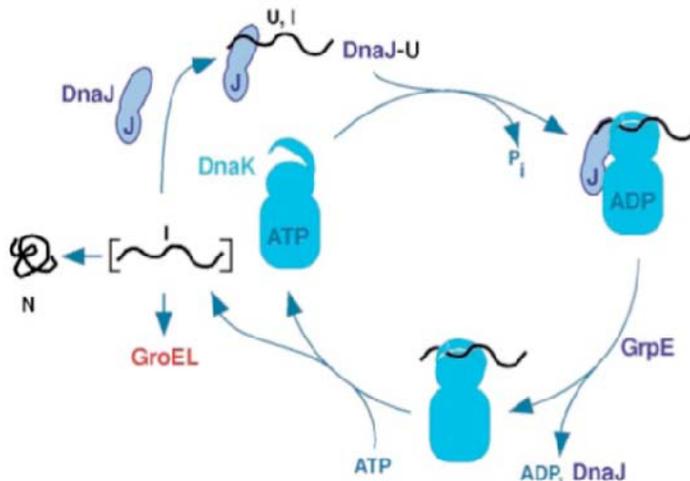


Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de ação do sistema DnaKJ/GrpE. Adaptado de Frydman, J. [7]. (I) estado intermédio; (N) estado nativo; (U) proteína *unfolded*. Ver texto para detalhes.

1.1.2. Sistema Hsp60 / GroEL

À família das chaperoninas pertence um conjunto de complexos proteicos de elevada massa molecular (≈ 900 kDa), que se apresentam como um duplo anel cilíndrico [16, 18-20]. Embora estruturalmente semelhantes, as chaperoninas apresentam sequências bastante distintas, sendo geralmente divididas em dois grupos. As proteínas pertencentes ao grupo I estão presentes nas eubactérias e em organitos celulares de origem procariota, como as mitocôndrias e cloroplastos, sendo representantes deste grupo o GroEL (*Escherichia coli*) e o Hsp60 (mitocôndria). As chaperoninas do Grupo II encontram-se nas arqueobactérias e no citoplasma das células eucariotas, sendo exemplo deste grupo o TRiC (*Tailless complex polypeptide-1* [TCP1] *Ring Complex*).

Nas células procariotas, o duplo anel cilíndrico do complexo GroEL encontra-se associado ao co-chaperone GroES (que tem como homólogo eucariota Hsp10), que “tapa” uma das entradas da cavidade central formada pelo sistema GroEL [21], designado lado cis (Figura 2A). Cada anel deste sistema é constituído por 7 sub-unidades proteicas iguais. Por seu lado, cada monómero (≈ 60 kDa) apresenta os domínios equatorial, intermédio e apical. Os dois anéis contactam entre si através do domínio equatorial, onde se situa também o sítio de ligação ao ATP. O domínio apical contém o sítio de ligação aos péptidos alvo e o sítio de ligação ao GroES, heptâmero em anel em que cada sub-unidade apresenta uma massa molecular de 10 kDa.

O GroEL pode existir em dois estados conformacionais: um estado T (*tense*) com baixa afinidade para o ATP mas elevada afinidade para péptidos não-nativos; e um estado R (*relaxed*) que, pelo contrário, apresenta uma elevada afinidade para o ATP e uma baixa afinidade para os péptidos não-nativos. Após ligação do péptido não-nativo ao domínio apical do GroEL [22-24], dá-se a ligação do ATP e do GroES a esse mesmo anel GroEL (ligação em cis), o que induz alterações conformacionais [25] que levam a que a proteína não-nativa seja guiada para o interior da cavidade formada (Figura 2B), onde encontra o ambiente adequado para que possa iniciar o processo de *fold*ing, de acordo com o seu potencial termodinâmico [26] sem estar sujeita a agregação [27]. A hidrólise do ATP, associado ao anel GroEL cis, induz alterações conformacionais no anel GroEL trans tornando-o apto para se ligar ao ATP e a novas proteínas não-nativas, o que por sua vez induz a libertação do GroES, do ADP e da proteína alvo do anel cis, prosseguindo o ciclo.

O sistema GroESL é extremamente importante no controlo da formação de agregados proteicos, uma vez que em células onde este sistema se encontra inactivado foi observado um aumento de cerca de 30% de agregados [28]. Adicionalmente, este sistema deverá constituir também uma peça fundamental na correcção da conformação de grandes proteínas constituídas por vários domínios [29].

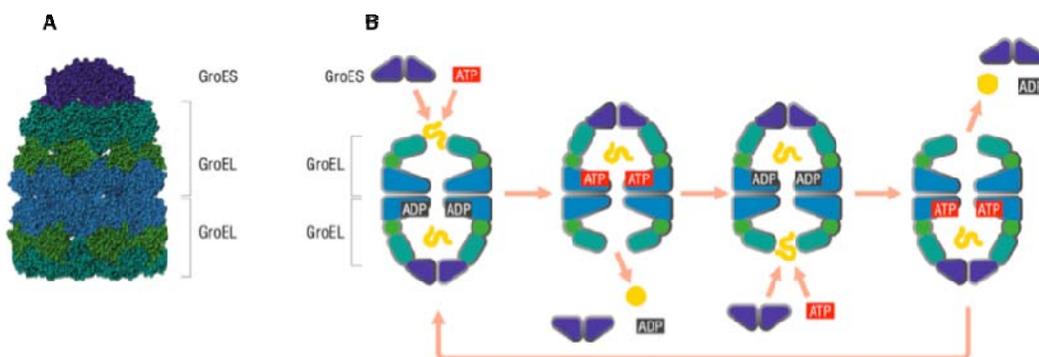


Figura 2 – A) Imagem de cristalografia dos chaperones GroES e GroEL (azul escuro); a azul claro encontra-se representada a estrutura do domínio equatorial, a verde o domínio intermédio e a azul esverdeado o domínio apical. B) Representação esquemática do mecanismo de acção do sistema GroESL. Adaptado de Petsko, G. [30]. () Proteína não-nativa; () Proteína nativa.

1.1.3. Cooperação entre DnaK e GroEL

Na célula, à medida que vão sendo sintetizadas, as proteínas podem adquirir o seu *fold*ing sem necessitar do apoio dos chaperones moleculares ou, pelo contrário, poderão necessitar do acompanhamento de um ou mais sistemas de chaperones

moleculares, que neste caso irão actuar de uma forma concertada (Figura 3). Na realidade, vários estudos indicam que, embora o DnaK tenha uma acção preferencial sobre proteínas nascentes e o GroEL actue numa fase pós-tradução [6, 31], estes sistemas poderão actuar sequencialmente [6]. Experiências onde foi induzida a sobre-expressão da GroEL demonstraram um aumento das associações das proteínas-substrato com o DnaK, as quais antecedem as associações com a GroEL no percurso que leva à aquisição da conformação final dos péptidos produzidos [7]. Por outro lado, ensaios onde foram efectuadas diferentes combinações de sobre-expressão dos sistemas DnaK e GroEL, foi observado a diminuição da quantidade de proteínas agregadas, sugerindo a existência de funções complementares entre estes chaperones [32-36].

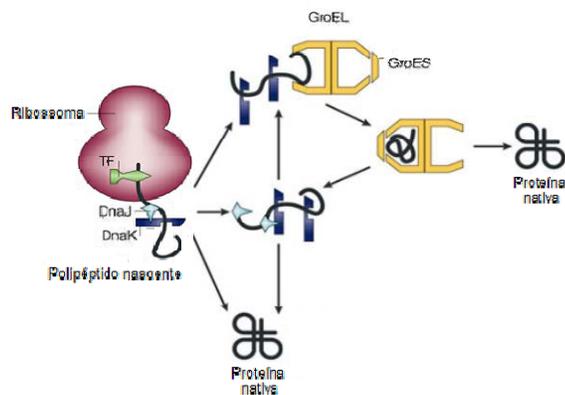


Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de cooperação proposto para os sistemas GroESL e DnaKJ/GrpE. A proteína nascente interage com o TF (*Trigger factor*), um chaperone molecular ATP-independente associado aos ribossomas, que mantém a proteína recém-sintetizada numa conformação “aberta” reconhecida pelo DnaJ. O sistema DnaKJ pode ainda conduzir a proteína ao sistema GroESL. Em qualquer um dos passos pode ser adquirida a conformação nativa da proteína alvo. Adaptado de Young J.C. *et al* [37].

Finalmente, é de realçar que os chaperones moleculares não interagem exclusivamente com proteínas nascentes, mas têm também um papel activo no *folding de novo* de proteínas que se encontram estruturalmente alteradas, como resultado de mutações ao nível do gene que as codifica ou de situações de *stress* celular [8].

1.2. Doenças Conformacionais

Presentemente, é reconhecido que um grande número de doenças que afectam o ser humano, são resultado de alterações na conformação nativa de proteínas, que deste modo perdem a sua função biológica [38, 39]. Estas patologias, designadas por doenças conformacionais, têm assim como origem alterações no gene que codifica para a proteína em causa (hereditárias ou adquiridas) ou modificações proteicas provocadas

por situações de *stress* celular. Quando a proteína alterada tende a formar agregados intracelulares, uma vez que estes estados conformacionais têm frequentemente um efeito tóxico para a célula (nova função), estamos na presença de um estado de *gain of function*. Pelo contrário, quando as proteínas conformacionalmente alteradas são reconhecidas pelo sistema PQC, sendo posteriormente encaminhadas para as vias de degradação da célula, estamos na presença de um estado de *loss of function* [40].

1.2.1. A Fenilcetonúria

As Hiperfenilalaninémias (HPA) são Doenças Hereditárias do Metabolismo que resultam de alterações no sistema de hidroxilação do aminoácido L-fenilalanina (L-Phe), o qual é convertido em L-tirosina (L-Tyr). Este sistema é complexo, envolvendo a actuação de várias enzimas e cofactores. No entanto, cerca de 99% das HPAs são devidas a uma deficiente actividade da fenilalanina hidroxilase (PAH; EC 1.14.16.1) sendo então designadas por fenilcetonúria (PKU; OMIM 261600). As manifestações clínicas desta doença, que incluem disfunção cerebral (microcefalia, atraso mental severo e irreversível e epilepsia) e alterações das capacidades motoras, são resultado quer da acumulação de L-Phe no organismo (efeito tóxico), quer da diminuição de L-Tyr (precursor dos neurotransmissores). O grave atraso psicomotor pode ser prevenido se for instaurada a terapia adequada o mais precocemente possível, após o nascimento. Presentemente, o tratamento desta patologia consiste apenas numa restrição na ingestão de alimentos ricos em L-Phe (tratamento dietético), a qual deve ser observada ao longo da vida.

Tendo em conta os valores de L-Phe plasmática apresentados pelos doentes à nascença, a PKU pode ser agrupada em três classes: (i) PKU clássica, (ii) PKU moderada e (iii) HPA não-PKU [41, 42]. A PKU clássica representa a forma mais grave e necessita de uma terapia mais restritiva, enquanto a HPA não-PKU corresponde à forma mais suave. Sabe-se presentemente que a heterogeneidade clínica observada é resultado directo da elevada heterogeneidade genética. Na realidade, até Setembro de 2008 tinham sido já identificadas 531 mutações patogénicas no gene *PAH* (www.pahdb.mcgill.ca).

Dos 226 doentes PKU detectados em Portugal até 2005, através do Programa Nacional do Diagnóstico Precoce, foi possível obter o genótipo completo de 103 doentes [43, 44]. Foram assim identificadas 29 mutações diferentes, sendo as mutações mais frequentes a IVS10nt-11G>A (17,3%), R261Q (16,3%), R270K (9,7%), V388M (9,7%) e I65T (8,2%). Enquanto que as mutações I65T, R261Q e V388M estão geralmente associadas a um fenótipo de PKU moderada, a IVS10nt-11G>A e a R270K

encontram-se associada ao fenótipo de PKU clássica. Devido à elevada heterogeneidade genética, a maioria dos doentes PKU são heterozigotos compostos, ou seja, apresentam dois alelos mutantes diferentes, pelo que tem sido postulado a existência de fenómenos de complementação interalélica negativa entre as duas diferentes sub-unidades mutantes [45].

1.2.2. A Fenilalanina Hidroxilase

A fenilalanina hidroxilase humana (hPAH) é uma enzima fundamental na regulação dos níveis de L-Phe circulante, que, no Homem, são de aproximadamente $58 \pm 15 \mu\text{M}$ [46]. Esta enzima é codificada pelo gene *PAH*, localizado no cromossoma 12 [47] e que cobre uma sequência genómica de 90 kb. Embora tenha sido já detectada expressão residual nos rins [48] melanócitos [49], linfócitos [50] e vilosidades coriônicas [51, 52], a PAH é uma enzima citosólica expressa maioritariamente nos hepatócitos. Esta proteína catalisa a reacção de hidroxilação do anel aromático da L-Phe na presença de oxigénio molecular (O_2) e do cofactor 6(R)-L-*eritro*-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH_4) originando como produto da reacção L-tirosina (L-Tyr) (Figura 4).

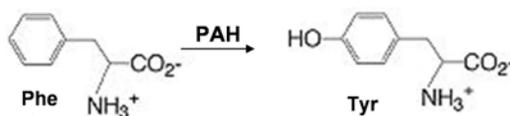


Figura 4 – Hidroxilação do aminoácido aromático L-fenilalanina (L-Phe) em L-tirosina (L-Tyr) pela enzima fenilalanina hidroxilase (PAH).

A clonagem do cDNA da PAH [53] permitiu a obtenção em larga escala da proteína humana recombinante por expressão heteróloga o que por seu lado contribuiu para a elucidação das características enzimáticas e estruturais desta proteína [54]. Assim, é presentemente reconhecido que na sua conformação nativa a PAH é uma proteína homotetramérica (Figura 5A) que resulta da dimerização de dímeros (Figura 5B) [55, 56]. Cada sub-unidade, constituída por 452 aminoácidos (≈ 50 kDa), apresenta no seu centro activo um ião ferro, não hémico, na forma reduzida (Fe^{2+}) e é constituída por 3 domínios, um domínio N-terminal regulador, um domínio catalítico e um domínio C-terminal responsável pela tetramerização.

Em solução a hPAH encontra-se num equilíbrio dinâmico entre dímeros e tetrâmeros, o qual se desloca para a forma tetramérica na presença do substrato L-Phe [56-58]. Enzimaticamente, estas duas formas oligoméricas apresentam propriedades

diferentes. Enquanto que a forma dimérica segue uma cinética Michaeliana em resposta ao aumento da concentração de substrato, os tetrâmeros apresentam uma resposta sigmoïdal, cooperatividade positiva, inibição por concentrações elevadas de substrato e um V_{max} superior ao da forma dimérica.

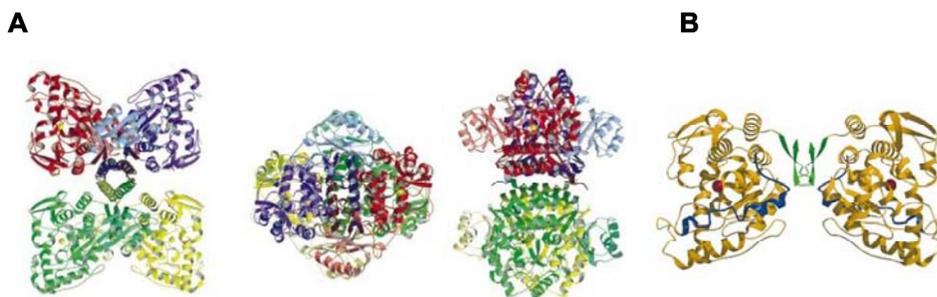


Figura 5 – A) Diferentes perspectivas do modelo da forma tetramérica da fenilalanina hidroxilase. B) Dímero da fenilalanina hidroxilase humana. Adaptado de Flatmark T. e Stevens R.C. [54].

Estruturalmente, a PAH é uma proteína extremamente sensível a alterações de resíduos de aminoácidos em qualquer parte da sua sequência. Deste modo, é reconhecido, presentemente, que na sua maioria as mutações no gene *PAH* codificam proteínas PAH conformacionalmente alteradas, mais susceptíveis a fenómenos de agregação e/ou degradação proteolítica [2], pelo que a PKU é considerada uma doença conformacional onde o efeito patológico resulta de uma *loss of function*.

1.2.3. Modulação da estabilidade de hPAH mutantes

Estudos recentes demonstraram que é possível obter um aumento da actividade enzimática de formas mutantes da hPAH, quando estas proteínas são sintetizadas, num sistema procaríota [2, 59], na presença dos osmólitos naturais glicerol (1 %) e N-óxido de trimetilamina (TMAO; 5 mM). Estes compostos de pequena massa molecular, designados por chaperones químicos, foram responsáveis pela diminuição do conteúdo de formas agregadas e pelo aumento das formas tetraméricas com maior actividade [59]. Ensaïos preliminares, onde a estrutura secundária destas formas tetraméricas foram monitorizadas por dicroísmo circular, indicam que os chaperones químicos induzem um aumento da estruturação, conduzindo deste modo à estabilização das formas de hPAH mutantes.

1.3. Objectivo do trabalho

Presentemente, é reconhecido que os chaperones moleculares exercem um papel fundamental na modulação da patogenicidade das doenças conformacionais, uma vez que têm a capacidade de intervir activamente não só no *folding* de proteínas recém-sintetizadas, mas também no *folding de novo* de proteínas conformacionalmente alteradas [7, 16, 60]. Embora para algumas doenças este mecanismo comece a ser desvendado, são ainda raros os trabalhos envolvendo a PKU. Uma vez que foi já demonstrado que proteínas hPAH mutantes conformacionalmente alteradas são passíveis de ser estabilizadas pela acção de chaperones químicos, podemos postular que também os chaperones moleculares apresentarão a capacidade de estabilizar proteínas hPAH mutantes e assim conduzir a uma melhoria do fenótipo PKU.

Deste modo, este trabalho teve como objectivo principal o estudo das interacções entre os chaperones moleculares ATP-dependentes DnaK e GroEL, homólogos procariotas de Hsp70 e Hsp60, e as proteínas hPAH mutantes mais frequentes na população PKU portuguesa, nomeadamente as formas I65T, R261Q, R270K e V388M [43]. Como modelo de trabalho foram utilizadas células procariotas, onde os sistemas DnaKJ/GrpE e GroESL foram co-expressos com as diferentes formas hPAH mutantes em estudo. Adicionalmente, foi também investigado o efeito da presença de chaperones químicos (glicerol) sobre as interacções chaperones moleculares/proteínas hPAH mutantes recém-sintetizadas.

Numa segunda parte do trabalho, foram dados os primeiros passos experimentais que irão permitir realizar o estudo destas interacções num sistema de expressão eucariota *cell free system*, ensaios essenciais para extrapolar para a célula eucariota os resultados observados no sistema de expressão procariota.

2. Materiais e Métodos

2.1. Estudos sobre a interacção entre chaperones moleculares/químicos e hPAH recombinante

2.1.1. Vectores e Estirpes bacterianas

As proteínas recombinantes em estudo (diferentes formas de hPAH e chaperones moleculares) foram produzidos em células de *Escherichia coli* DH5 α Pro (*deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*($r_k^- m_k^+$), *recA1*, *supE44*, *thi-1*, Δ (*lacZYA-argFV169*), ϕ 80 δ *lacZ* Δ M15, F⁻, λ^- , $P_{N25}/tetR$, $P_{lacI^q}/lacI$, Sp^r), provenientes da Clontech. O cDNA PAH (Anexo 1) encontrava-se já clonado [45] no sítio *Bam*HI do sítio de clonagem múltipla (MCS) do vector de expressão procariota pTrcHisB (Invitrogen). Este vector apresenta a montante do MCS (Anexo 1): (i) o promotor *trc* (P_{trc}), constituído por uma parte das sequências dos promotores *trp* e *lac* (*trp-lac*); (ii) a sequência do gene *LacI^f*, que codifica a proteína repressora *Lac*; (iii) um potenciador de tradução, proveniente do gene *10* do bacteriófago T7; (iv) a sequência de reconhecimento de ligação ao ribossoma (RBS); (v) o codão de iniciação da tradução ATG; (vi) uma sequência de seis codões CAT, que codificam o péptido hexa-histidil (6xHis) com afinidade para metais e que permite a posterior purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade com iões metálicos (IMAC); (vii) a sequência codificante do epítipo Xpress (Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Lys) e (viii) a sequência codificante do péptido reconhecido pela enterocinase, (EK; Asp-Asp-Asp-Asp-Lys ↓) que permite a posterior clivagem e remoção do péptido de fusão. Este vector apresenta ainda a marca de resistência à ampicilina (Amp) e a origem de replicação ColE1 (Tabela 1).

Os chaperones moleculares utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos por Olivier Fayet e o seu cDNA encontrava-se clonado no vector de expressão procariota pOFXtac1 [4], derivado do vector pAPT110. O vector pOFXtac1 apresenta a origem de replicação p15A, os genes de resistência à canamicina (Kan) e à espectinomicina (Spc), o promotor *tac* (igualmente induzido na presença de IPTG) e o gene *LacI^f*, que assegura uma repressão eficiente da transcrição a partir do promotor *tac* (Tabela 1).

Tabela 1 – Características gerais dos vectores de expressão utilizados para produção das proteínas recombinantes em estudo.

Vector	Tamanho (kb)	Origem de replicação	Promotor	Indutor ¹	Resistência ²	Proteína codificada
pOFXtac1	7	p15A	P _{tac}	IPTG	Kan/Spc	-
pOFXtac1-SL	9,2	p15A	P _{tac}	IPTG	Kan/Spc	GroESL
pOFXtac1-KJ	10,5	p15A	P _{tac}	IPTG	Kan/Spc	DnaKJ
pOFXtac1-KJE	11,3	p15A	P _{tac}	IPTG	Kan/Spc	DnaKJ/GrpE
pTrcHisB	4,4	ColE1	P _{trc}	IPTG	Amp	-
pTrcHisB-PAH	6,6	ColE1	P _{trc}	IPTG	Amp	hPAH
pSG5	4,1	f1	P _{T7}	-	Amp	-
pSG5/Xma	4,1	f1	P _{T7}	-	Amp	-
pSG5/Xma-PAH	6,3	f1	P _{T7}	-	Amp	hPAH

¹IPTG - isopropil-β-D-tiogalactosidase. ²Kan – canamicina; Spc – espectinomicina; Amp – ampicilina.

2.1.2. Indução e Expressão Proteica

Para produção das proteínas recombinantes, procedeu-se em primeiro lugar à transformação, por choque térmico [61], de alíquotas de 100 µL de células de *E.coli* DH5αPro competentes, com 10 ng do cDNA respectivo, isoladamente ou em simultâneo consoante se pretendia obter apenas uma (hPAH ou chaperone molecular) ou duas proteínas (hPAH e chaperone molecular), respectivamente. Estas células foram incubadas durante a noite (D.N.), a 37°C, após espalhamento em meio LB sólido (triptona 1%, extracto de levedura 0,5%, NaCl 0,17 M, pH 7, agar 1,5%) contendo Amp (LB/Amp), Kan e Spc (LB/Kan/Spc) ou Amp, Kan e Spc (LB/Amp/Kan/Spc), sempre numa concentração de 50 µg/mL em cada, consoante pretendessemos produzir a proteína hPAH, os chaperones moleculares ou simultaneamente a hPAH e os chaperones moleculares, respectivamente.

Dos transformantes obtidos, foi seleccionada uma colónia bem isolada, para inocular 5 mL de meio LB líquido (triptona 1%, extracto de levedura 0,5%, NaCl 0,17 M, pH 7) contendo Amp, Kan/Spc ou Amp/Kan/Spc. Após incubação a 37°C, D.N., com agitação, a cultura celular obtida foi utilizada para inocular 1 L de meio LB contendo o(s) antibiótico(s) necessários, e novamente incubada a 37°C, com agitação, até ser atingida a fase exponencial de crescimento, monitorizada pela leitura da absorvência a 600 nm (Abs₆₀₀ ~0,5) num espectrofotómetro Hitachi (modelo U-2000).

A expressão das proteínas em estudo foi induzida através da adição de 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactosidase (IPTG; Eurobio). No caso da produção das diferentes formas de hPAH, no momento da indução o meio de cultura foi ainda suplementado

com 0,1 mM de sulfato de amônio ferroso. Nos ensaios onde se pretendia estudar o efeito da adição do chaperone químico, após adição do indutor a cultura foi dividida em duas alíquotas iguais, tendo a uma delas sido adicionada glicerol numa concentração final de 1%. Após 3 h de incubação a 37°C, com agitação, foi obtido o sedimento bacteriano, por centrifugação a 15294xg, a 4°C, durante 15 min, o qual foi armazenado a -20 °C, nunca por períodos superiores a 1 mês.

2.1.3. Purificação de proteína PAH humana recombinante

O sedimento celular foi ressuspensão em tampão de lise (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,8; glicerol 10%) suplementado com 1 mM de fenilmetanosulfonyl fluoreto (PMSF; Sigma) e 1 mg/mL de lisozima (Eurobio), num volume correspondente a 1/100 do seu volume inicial. Após incubação, durante 30 min, a 4°C, as células foram lisadas por sonicação, a 4°C, num sonicador Vibra Cell (Sonics Materials), utilizando 6 ciclos de 60 segundos cada (*duty free cycle* de 50%), com um intervalo de 30 segundos entre cada ciclo. O lisado celular foi centrifugado a 10621xg, durante 20 min, a 4°C, de forma a separar a fracção proteica solúvel da fracção insolúvel.

A purificação das proteínas hPAH recombinantes foi efectuada por IMAC, utilizando a resina Ni-NTA (Qiagen) numa proporção de lisado celular:resina de 1:0,05 (volume:volume), de acordo com o método descrito anteriormente [45]. Deste modo, após adição à fracção proteica solúvel de imidazol e β-mercaptoetanol, ambos numa concentração final de 10 mM, a proteína foi purificada utilizando um gradiente de imidazol (5x4 volumes de tampão de lise 20 mM de imidazol; 2x1 volume de tampão de lise 150 mM em imidazol e; 5x1 volume de tampão de lise 250 mM em imidazol).

As fracções proteicas referentes às eluições com 150 mM e 250 mM de imidazol foram introduzidas numa membrana de diálise com um *Molecular Weight Cut-Off* (MWCO) de 12-14.000 Da (Spectra/Por[®]4) e colocadas em tampão de diálise (Tris-HCl 20 mM pH 7,5 e NaCl 100 mM), D.N., a 4 °C, com agitação. As proteínas dialisadas foram alíquotadas e armazenadas em azoto líquido. Após descongelamento, as amostras proteicas não voltaram a ser congeladas.

2.1.4. Quantificação proteica

As proteínas foram quantificadas pelo método colorimétrico de Bradford [62], utilizando o reagente Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad) e uma curva de calibração (Anexo 3) constituída por albumina sérica bovina (BSA). As absorvências foram lidas a 595 nm no espectrofotómetro Hitachi. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.1.5. Ensaio enzimáticos

A actividade enzimática específica das diferentes formas de hPAH recombinante em estudo foi calculada por determinação da quantidade de tirosina formada por unidade de tempo e em função da quantidade de hPAH presente no meio reaccional ($\text{ng Tyr} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), de acordo com o método descrito por Martínez A. *et al* [56], com algumas modificações. A reacção enzimática decorreu na presença de oxigénio atmosférico, à temperatura de 25°C, num volume reaccional de 800 μL contendo tampão Na-Hepes 100 mM pH 7, 1080 U/mL de catalase (Sigma), 1 mM de L-Phe (Sigma) e 5 μg de hPAH recombinante de acordo com Leandro, P. [45].

Para quantificação da L-Tyr formada, foi utilizado o método do nitrosoaftol [63]. Este composto reage com a L-Tyr formando derivados fluorescentes que emitem a 570 nm (λ_{em}) quando excitados ao comprimento de onda de 460 nm (λ_{exc}). Deste modo, a 700 μL do sobrenadante da reacção enzimática, foram adicionados 350 μL de uma solução de nitrosoaftol (1-nitroso-2-naftol 0,1% em etanol a 95%) e 350 μL de uma solução extemporânea de NaNO_2 (NaNO_2 0,5 mg/mL; HNO_3 20%). Após incubação a 55°C, durante 30 min, esta solução foi colocada em gelo durante 5 min. O derivado fluorescente foi extraído da mistura reaccional pela adição de 3,5 mL de 1-2-dicloroetano. A intensidade de fluorescência da fase aquosa, obtida após centrifugação a 453xg (rotor basculante) durante 5 min, à temperatura ambiente, foi determinada utilizando um espectrofluorímetro Hitachi, (modelo F-2000) e ao λ_{exc} de 460 nm e um λ_{em} de 570 nm. A concentração de L-Tyr presente na solução foi determinada utilizando duas curvas padrão (Anexo 4), cobrindo diferentes gamas de concentração de L-Tyr nomeadamente de 0,5-5 μM (gama baixa) e de 5-25 μM (gama alta). Os ensaios enzimáticos foram sempre realizados em triplicado.

2.1.6. Ensaio de cross-linking

Nos ensaios de *cross-linking*, foi utilizado o suberato de bis-[sulfosuccinimidil] (BS^3 ; Pierce) como *cross-linker*. Este composto é um *cross-linker* homobifuncional, análogo dos ésteres NSH que, em soluções tamponizadas entre pH 7 e 9, reage eficientemente com aminas primárias ($-\text{NH}_2$) presentes, por exemplo, nos resíduos de lisina [64]. Uma vez que o BS^3 reage com aminas primárias, não foi possível utilizar o tampão Tris (grupos amina), pelo que, em primeiro lugar, foi necessário proceder a uma ultra-filtração (filtros Amicon Microcon P30, Millipore) das amostras de hPAH recombinantes

para substituir o tampão Tris-HCl pelo tampão Na-Hepes. A reacção de *cross-linking* foi então efectuada utilizando uma proporção molar de proteína:BS³ de 1:500. Nestes ensaios, foi sempre utilizada uma solução extemporânea de BS³ (preparada em tampão Na-Hepes 20mM, pH 7, NaCl 200 mM). Após incubação durante 30 min, à temperatura ambiente, procedeu-se ao *quenching* da reacção, através da adição de Tris-HCl 1 M, pH 7,5, durante 15 min.

2.1.7. Análise proteica em géis de poliacrilamida

As proteínas em estudo foram analisadas por separação electroforética em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando o sistema Mini-vertical Hoefer-SE245 (GE Healthcare) e o método descontínuo de Laemmli [65]. Deste modo, foram utilizados três tampões diferentes nomeadamente o tampão de concentração (Tris-HCl 0,125 mM, pH 6,8; SDS 0,1%), o tampão de separação (Tris-HCl 0,375 mM, pH 8,8; SDS 0,1 %) e o tampão de electroforese (Tris base 3 g/L; glicina 14,4 g/L; SDS 1 g/L; pH 8,3). A separação decorreu em géis com as dimensões de 80x60x1mm, nas concentrações de acrilamida/bisacrilamida (30% T e 2,67% C) no gel de separação e de concentração de 10 e 4%, respectivamente.

As amostras foram aplicadas, após aquecimento a 100 °C, durante 5 min, num volume final de 18 µl contendo 3 µl de tampão de deposição (Tris-HCl 0,24 M, pH 6,8; glicerol 40%; SDS 8%; azul de bromofenol 0,02%), ao qual foi adicionado β-mercaptoetanol (25%) imediatamente antes da sua utilização. Para proceder à separação electroforética, foi aplicada uma corrente contínua de 20 e 40 mM no gel de concentração e de separação, respectivamente. O sistema foi ainda arrefecido por passagem de um caudal de água fria.

Após a separação e para visualização das proteínas, os géis foram colocados numa solução de azul brilhante de Comassie R250 0,1% (metanol 27% e ácido acético 18%), durante 30 min, à temperatura ambiente e posteriormente mergulhados numa solução de diferenciação (metanol 30% e ácido acético 10%).

As proteínas recombinantes foram também submetidas a uma separação electroforética em géis nativos. O procedimento experimental foi efectuada de acordo com o descrito para o sistema SDS-PAGE, exceptuando a ausência de SDS nos tampões de concentração, de separação, de electroforese e de deposição, este último não contendo também β-mercaptoetanol. As amostras foram aplicadas sem serem previamente aquecidas a 100 °C.

A massa molecular das proteínas recombinantes foi determinada por comparação com o perfil electroforético de diferentes marcadores de massa molecular. Assim, de

acordo com a técnica utilizada recorreu-se aos marcadores: (i) *SDS-PAGE Pre-Stained Low Range* (BioRad), constituído por fosforilase B (103 kDa) BSA (77 kDa), ovalbumina (50 kDa), anidrase carbónica (34,3 kDa), inibidor de tripsina de soja (28,8 kDa) e lisozima (20,7 kDa); (ii) *SDS-PAGE Molecular Weight Standard Low Range* (BioRad) composto por fosforilase B (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbónica (31 kDa), inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa) e; (iii) *Amersham High Molecular Weight for native electrophoresis* (GE Healthcare), contendo tiroglobina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalase (232 kDa), lactato desidrogenase (140 kDa) e BSA (67 kDa).

2.1.8. Análise de Western blotting

As proteínas em estudo foram também analisadas pela técnica de Western Blotting. Assim, após separação electroforética procedeu-se à transferência das proteínas para uma membrana de *PVDF* (Amersham Hybond-P; GE Healthcare), previamente equilibrada em tampão Towbin (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, metanol 20%) [66]. Foi utilizado um sistema de transferência semi-seco (Trans-Blot SD; Bio-Rad), o qual foi submetido a uma corrente contínua de 100 mA (voltagem nunca superior a 25 V).

As proteínas transferidas foram visualizadas por imunodeteção, tendo-se recorrido a anticorpos específicos (Tabela 2) conjugados com a enzima *horseradish peroxidase* (HRP). O processo de conjugação com os anticorpos decorreu de acordo com as instruções fornecidas pelos fabricantes utilizando tampão PBS/T (NaCl 137 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM e Tween-20 0,05%). O bloqueamento decorreu durante 3 h, à temperatura ambiente, com agitação constante, em tampão PBS/T contendo e 5% de leite magro. O anticorpo primário (diluído em tampão PBS/T) foi incubado com a membrana durante 1 h, à temperatura ambiente e quando necessário utilizar um anticorpo secundário (diluído em tampão PBS/T) este foi colocado em contacto com a membrana durante 1 h, à temperatura ambiente, com agitação constante.

A reacção de visualização foi efectuada com o sistema SuperSignal[®] West Femto Trial (Pierce), tendo a membrana sido mergulhada durante 5 min numa solução contendo 75 µL de solução de peróxido, 75 µL de solução de luminol e 2,5 mL de água. Findo este tempo, a membrana foi colocada em contacto com o filme o *Amersham Hyperfilm ECL–High performance chemiluminescence film* (GE Healthcare), durante 15 min, ao fim dos quais se procedeu à revelação através da passagem por uma solução

de revelação (Polymax RT Developer; KODAK) e uma solução de fixação (Polymax RT Fixer; KODAK).

Tabela 2 – Anticorpos e respectivas diluições utilizados nos ensaios de Western Blotting.

Proteína recombinante	Anticorpo primário	Anticorpo secundário	Diluição do anticorpo (primário/secundário)
hPAH	Anti-His-HRP (Invitrogen)	-	1:5000
GroEL	Rabbit Anti-GroEL (Stressgen)	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP (BioRad)	1:7500 / 1:20000
GroES	Rabbit Anti-GroES (Stressgen)	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP (BioRad)	1:7500 / 1:20000
DnaK	Mouse Anti-DnaK (Stressgen)	Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP (BioRad)	1:7500 / 1:20000
DnaJ	Rabbit Anti-DnaJ (Stressgen)	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP (BioRad)	1:7500 / 1:20000

2.2. Avaliação num sistema de expressão eucariótica *in vitro* do mecanismo de degradação da hPAH recombinante

2.2.1. Vectores e Estirpes bacterianas

Nos ensaios de clonagem do cDNA da PAH, foi utilizada a estirpe de *Escherichia coli* DH5 α Pro (alínea 2.1.1.) e nas reacções de mutagénese dirigida recorreu-se à estirpe de *Escherichia coli* XL1-Blue supercompetentes (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1 lac* [F' *proAB lacIqZAM15Tn10 (tet)*]).

O cDNA PAH foi inserido no vector de expressão eucariota pSG5, adquirido à Stratagene [67]. Este vector apresenta: (i) as origens de replicação procariotas *f1* (DNA cadeia simples) e pUC e a origem de replicação eucariota SV40; (ii) os promotores SV40 e T7; (iii) um sinal de poli-adenilação (SV pA); (iv) o intrão II da β -globina, que possibilita o *splicing* dos transcriptos expressos. Apresenta ainda, a jusante do promotor, um MCS com locais de restrição para a *EcoRI*, *BamHI* e *BglII*.

2.2.2. Mutagénese dirigida

A criação de um local de reconhecimento para a *XmaI* no MCS do pSG5 foi efectuada por mutagénese dirigida, utilizando o sistema *Quickchange II Site-Direct Mutagenesis* (Stratagene) [68]. O protocolo fornecido pelo fabricante foi modificado de modo a permitir a inserção de 4 bp [69]. Assim, foram efectuados em primeiro lugar

duas reacções designadas de pré-PCRs, em que cada reacção de PCR apenas contém um dos primers.

Os oligonucleótidos mutagénicos (Primer A: 5'- CTC ACT ATA GGG CCC GGG AAT TCG GAT CC-3' e Primer B: 5'-GG ATC CGA ATT CCC GGG CCC TAT AGT GAG-3'), sintetizados pela Metabion, foram desenhados de acordo com os parâmetros óptimos de tamanho, estabilidade de ligação nos terminais 5' e 3' (conteúdo em citosinas (C) e guaninas (G); GC) e temperatura de fusão (T_m). As reacções de pré-PCR decorreram num volume final de 50 μ L contendo 40 ng de DNA molde, 1,25 pg de cada um dos primers, dNTPs (40 μ M em cada), 1U de DNA polimerase PfuUltra HF e o tampão fornecido pelo fabricante. O DNA foi amplificado num termociclador PCR-Express (Hybaid), utilizando o programa 1 (Tabela 3). Após terminada a reacção de pré-PCR, foram retirados 25 μ L de cada reacção para um novo tubo, tendo esta solução sido suplementada com 1 U de DNA polimerase PfuUltra HF e sujeita a nova amplificação (programa 2; Tabela 3).

Tabela 3 – Características dos programas utilizados na reacção de mutagénese dirigida.

Programa	Nº Ciclos	Tempo (segundos)	Temperatura (°C)
1	1	30	95
	4	30/ 60/ 504	95/ 53/ 68
2	1	30	95
	16	30/ 60/ 720	95/ 58/ 68

Finalmente, o produto de PCR final foi hidrolisado com 15 U de *DpnI*, durante uma hora, a 37°C. Findo este tempo, procedeu-se à transformação de células XL1-Blue por choque térmico. Das colónias resultantes foi preparado DNA (mini-prep), utilizando a técnica descrita por Konecki, D.S. [70].

A correcta introdução da sequência pretendida foi rastreada por digestão do DNA proveniente das mini-preps com a enzima *XmaI* (New England Biolabs). O vector obtido foi designado por pSG5/Xma.

2.2.3. Clonagem em pSG5

O cDNA da hPAHwt (phPAH247; referência de acesso - GenBank U49897) encontrava-se clonado no sítio *EcoRI* do plasmídeo pBR322. Deste modo, para efectuar a sua clonagem no vector pSG5/Xma, em primeiro lugar foi necessário retirar o *insert* phPAH247 daquele plasmídeo, por hidrólise com a enzima *EcoRI*. Paralelamente, o pSG5/Xma foi também submetido à acção da *EcoRI*. Após separação em gel de agarose *SeaPlaque* a 1% (Lonza), os fragmentos linearizados foram extraídos utilizando

o sistema *Qiaquick Gel Extraction* (Qiagen) [71]. Procedeu-se então à hidrólise de ambos os DNAs com a enzima *XmaI*. Os fragmentos obtidos foram novamente purificados e utilizados para proceder à reacção de ligação. Deste modo, a reacção foi executada num volume final de 30 μL , a 16°C, D.N., na presença de 15 μL de cDNA hPAHwt, 10 μL pSG5/*XmaI*, 3 μL de tampão do fabricante e 2 μL de ligase (Biolabs). Paralelamente, foi também efectuado um ensaio controlo, onde se omitiu a presença do cDNA PAH. A reacção de ligação decorreu D.N., a 16°C. O produto resultante desta reacção foi, então, utilizado na transformação de células de *Escherichia coli* DH5 α Pro competentes.

A correcta introdução da sequência pretendida foi, numa primeira fase, rastreada por digestão do DNA proveniente das mini-preps com a enzima *XmaI* e, posteriormente, confirmada por sequenciação (Stabvida) de uma das amostras.

3. Resultados e Discussão

3.1. Efeito da presença de chaperones moleculares e químicos sobre formas mutantes de hPAH recombinante estruturalmente afectadas

3.1.1. Integridade dos vectores de expressão dos chaperones moleculares

Os chaperones moleculares utilizados no decorrer do trabalho, nomeadamente os sistemas GroESL e DnaKJ/GrpE, encontravam-se clonados no vector de expressão pOFX e foram cedidos por Olivier Fayet. Uma vez que este autor refere que estes vectores apresentam alguma instabilidade, antes de dar início aos nossos estudos foi verificada não só a sua integridade destes vectores, mas também a sua capacidade para produzir as proteínas acima mencionadas. Assim, após a análise das sequências nucleotídicas dos vectores fornecidos e do seu perfil de restrição, foram seleccionadas as endonucleases de restrição *SmaI* e *EcoRI* para confirmação da presença dos cDNAs correctos (Tabela 4).

Tabela 4 – Enzimas de restrição utilizadas para confirmação da integridade dos vectores de expressão dos sistemas de chaperones moleculares.

Vector de expressão	Enzima de restrição	Fragmentos obtidos (bp)
pOFX	<i>SmaI</i>	5177 e 1764
pOFX-SL	<i>EcoRI</i>	6849 e 2173
pOFX-KJ	<i>EcoRI</i>	8303, 1204 e 845
pOFX-KJE	<i>EcoRI</i>	9090, 1204 e 845

Como pode ser observado pela análise da Figura 6, os tamanhos dos fragmentos obtidos, após digestão com as enzimas de restrição referidas na Tabela 4, apresentam o tamanho esperado pelo que a integridade dos vectores de expressão dos sistemas de chaperones moleculares foi confirmada.

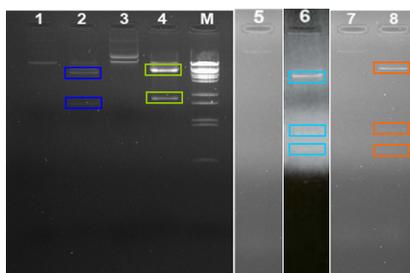


Figura 6 – Separação electroforética, em gel de agarose (1%), dos produtos de hidrólise dos vectores de expressão pOFX contendo os diferentes chaperones moleculares. (M) Marcador de massas moleculares λ DNA-BstEII (Biolabs); (1) pOFX; (2) pOFX hidrolisado com *SmaI*; (3) pOFX-SL; (4) pOFX-SL hidrolisado com *EcoRI*; (5) pOFX-KJ; (6) pOFX-KJ hidrolisado com *EcoRI*; (7) pOFX-KJE; (8) pOFX-KJE hidrolisado com *EcoRI*.

Posteriormente, procedeu-se à expressão destas proteínas, tendo a produção dos chaperones sido verificada pela análise por SDS-PAGE dos lisados celulares (Figura 7). Foi assim confirmada a sobre-expressão das proteínas GroEL (60 kDa), DnaK (70 kDa), DnaJ (40 kDa) e GrpE (23 kDa). Neste sistema electroforético não foi possível detectar a proteína GroES, por apresentar uma massa molecular de 10 kDa. No entanto a sua presença foi posteriormente verificada por análise de Western blotting, utilizando o anticorpo anti-GroES.

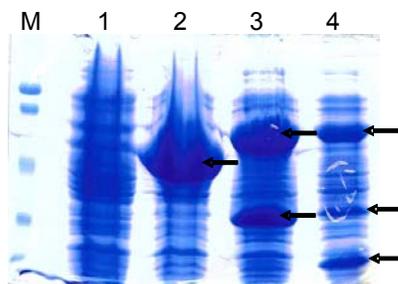


Figura 7 – Análise por SDS-PAGE dos lisados celulares obtidos após indução dos vectores de expressão pOFX contendo os chaperones moleculares GroESL (2), DnaKJ (3) e DnaKJ/GrpE (4). (M) marcador de massas moleculares SDS-PAGE Pre-Stained Low Range; (1) Expressão do vector pOFX; GroEL (60 kDa), DnaK (70 kDa), DnaJ (40 kDa) e GrpE (23 kDa) encontram-se assinalados.

Uma vez que as amostras aplicadas foram normalizadas em relação ao volume, e não à quantidade de proteína total, é de realçar que o sistema DnaKJ/GrpE parece induzir uma diminuição do teor proteico da célula, resultado que está de acordo com o crescimento mais lento observado para as culturas de *Escherichia coli* transformadas com o vector pOFX-KJE. Deste modo, e de acordo com Castanié [4], a sobre-expressão destes chaperones parece exercer um efeito tóxico sobre estas células.

3.1.2. Co-expressão de chaperones moleculares e proteínas hPAH mutantes na ausência e presença de glicerol

Para se proceder ao estudo das interacções entre os chaperones moleculares e as proteínas hPAH mutantes, estas foram produzidas num sistema de expressão onde simultaneamente foram também sobre-expressos diferentes chaperones moleculares, na ausência e na presença de glicerol a 1% (chaperone químico). A análise, por Western blotting, da fracção solúvel dos lisados celulares (Figura 8) demonstra que, na presença dos chaperones moleculares (e ausência de chaperones químicos), todas as proteínas hPAH estudadas (wt e mutantes) apresentam um aumento muito significativo de formas com uma menor massa molecular, que deverão representar formas truncadas a C-terminal. Muito provavelmente também serão estabilizadas formas truncadas a N-

terminal, no entanto devido à perda do epítipo 6xHis estas formas não serão detectadas.

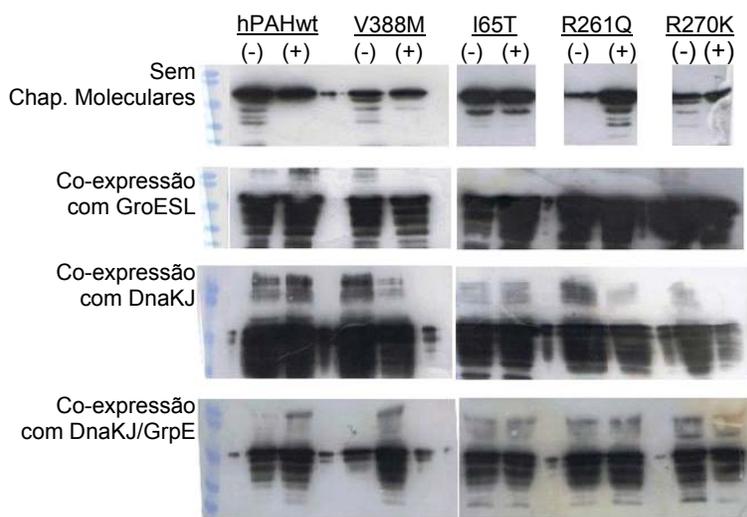


Figura 8 – Análise por Western blotting (anticorpo Anti-His) das fracções solúveis dos lisados celulares, após co-expressão das diferentes formas hPAH e os sistemas de chaperones moleculares GroESL e DnaKJ/GrpE, na ausência (-) e na presença de glicerol (+). A proteína hPAH recombinante encontra-se assinalada (≈ 55 kDa).

3.1.3. Purificação e quantificação das proteínas hPAH co-expressas com chaperones moleculares na ausência e presença de glicerol

Após purificação das fracções solúveis dos lisados celulares por IMAC, as diferentes amostras foram analisadas por SDS-PAGE, após coloração com o azul brilhante de Coomassie R250 (Figura 9). Deste modo, foi possível constatar a presença de uma banda adicional, com uma massa molecular semelhante à do chaperone molecular co-expresso em cada caso. A posterior análise destas amostras por Western blotting, utilizando anticorpos específicos para os diferentes chaperones moleculares, demonstrou a identidade das proteínas co-eluídas (Figura 9). Embora os resultados mostrados na Figura 9 sejam apenas referentes à purificação da proteína hPAHwt, a referida co-eluição dos chaperones moleculares foi observada em todas as proteínas hPAH estudadas.

Estes resultados (ensaios de *pull down*) apontam para a existência de uma forte interacção entre as diferentes formas de hPAH (wt e mutantes) e os chaperones moleculares.

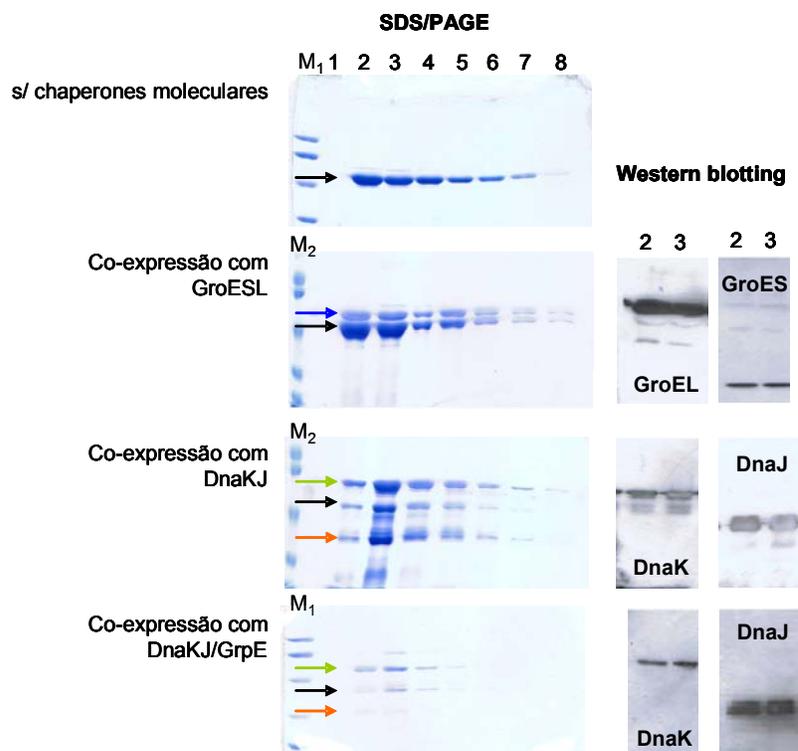


Figura 9 – Análise por SDS-PAGE e Western Blotting da purificação, por IMAC (gradiente de imidazol) da proteína hPAHwt na ausência e presença de sobre-expressão de diferentes chaperones moleculares. (M₁) Marcador de massas moleculares SDS Standards Low Range; (M₂) Marcador de massas moleculares SDS-PAGE Pre-Stained Low Range (1) última fracção da lavagem com 20 mM de imidazol; (2-3) amostras eluídas com 150 mM de imidazol; (4-8) amostras eluídas com 250 mM de imidazol). As massas moleculares da hPAH (55 kDa), GroEL (60 kDa), DnaK (70 kDa) e DnaJ (40 kDa) encontram-se assinaladas.

Após diálise, foi determinado o teor proteico das amostras eluídas. O valor de hPAH *full-length* (wt e mutantes) presente em cada uma das amostras, bem como o seu grau de pureza, foi calculado após análise das imagens dos géis de SDS-PAGE com o programa *Gel-Pro analyser*, versão 4.5 (MediaCybernetics).

Os dados obtidos (Tabela 5) foram utilizados para calcular o rendimento de proteína hPAH (wt e mutantes) após co-expressão com os chaperones moleculares, na ausência e presença do chaperone químico glicerol a 1% (Figura 10).

Tabela 5 – Quantidade de proteína obtida ao longo do processo de produção da forma selvagem e de formas mutantes da hPAH sem e com sobre-expressão de chaperones moleculares na ausência (-) e presença (+) de glicerol (1%) no meio de cultura.

	Glicerol	Proteína total solúvel (g/L cultura)	Proteína total eluído (µg/mL) ¹	Proteína hPAH (µg/mL) ¹	Grau de pureza (%)
hPAHwt	-	114	1206	977	81
	+	88	846	761	90
hPAHwt/GroESL	-	117	1729	1262	73
	+	128	1161	894	77
hPAHwt/DnaKJ	-	106	269	54	20
	+	80	215	129	60
hPAHwt/DnaKJE	-	63	270	181	67
	+	71	92	75	82
I65T	-	30	349	157	45
	+	39	369	148	40
I65T/GroESL	-	51	414	108	26
	+	38	409	61	15
I65T/DnaKJ	-	65	335	37	11
	+	79	263	45	17
I65T/DnaKJE	-	28	43	18	42
	+	43	74	16	22
R261Q	-	73	409	389	95
	+	58	302	272	90
R261Q/GroESL	-	112	426	426	100
	+	92	567	454	80
R261Q/DnaKJ	-	47	406	41	10
	+	49	423	42	10
R261Q/DnaKJE	-	31	206	76	37
	+	28	144	43	30
R270K	-	41	139	26	19
	+	57	236	45	19
R270K/GroESL	-	69	436	65	15
	+	97	509	102	20
R270K/DnaKJ	-	57	14	3	19
	+	99	122	21	17
R270K/DnaKJE	-	40	34	11	31
	+	53	0	0	-
V388M	-	59	859	301	35
	+	88	972	204	21
V388M/GroESL	-	82	1436	215	15
	+	78	1006	151	15
V388M/DnaKJ	-	66	447	22	5
	+	79	510	26	5
V388M/DnaKJE	-	29	386	19	5
	+	32	300	15	5

Nota: Os cálculos apresentados referem-se aos valores obtidos partindo de 1 L de cultura.

¹Valores referentes apenas à fracção eluída com 150 mM de imidazol.

Relativamente ao sistema GroESL, este apenas induziu um aumento da quantidade das proteínas hPAH selvagem e R270K, muito significativo para esta última proteína. Para as restantes formas mutantes, a alteração “negativa” observada, após co-expressão com o GroESL, deve-se provavelmente ao facto de, na presença destas

moléculas, as proteínas totais da célula aumentarem significativamente (tabela 5), pelo que o valor do rendimento da hPAH é mais baixo. Podemos ainda constatar que, na presença do sistema DnaKJ e DnaKJ/GrpE, de um modo geral, todas as proteínas hPAH recombinantes, incluindo a forma selvagem, apresentam um menor rendimento. Estes resultados deverão estar directamente relacionadas com a toxicidade mencionada anteriormente.

A presença de um chaperone químico no meio de cultura, em simultâneo à co-expressão das proteínas hPAH e os chaperones moleculares, não parece condicionar a quantidade de proteína recombinante purificada. Exceptua-se o caso da proteína R261Q que, quando co-expressa com GroESL, a presença simultânea de glicerol leva a um aumento bastante acentuado da sua quantidade.

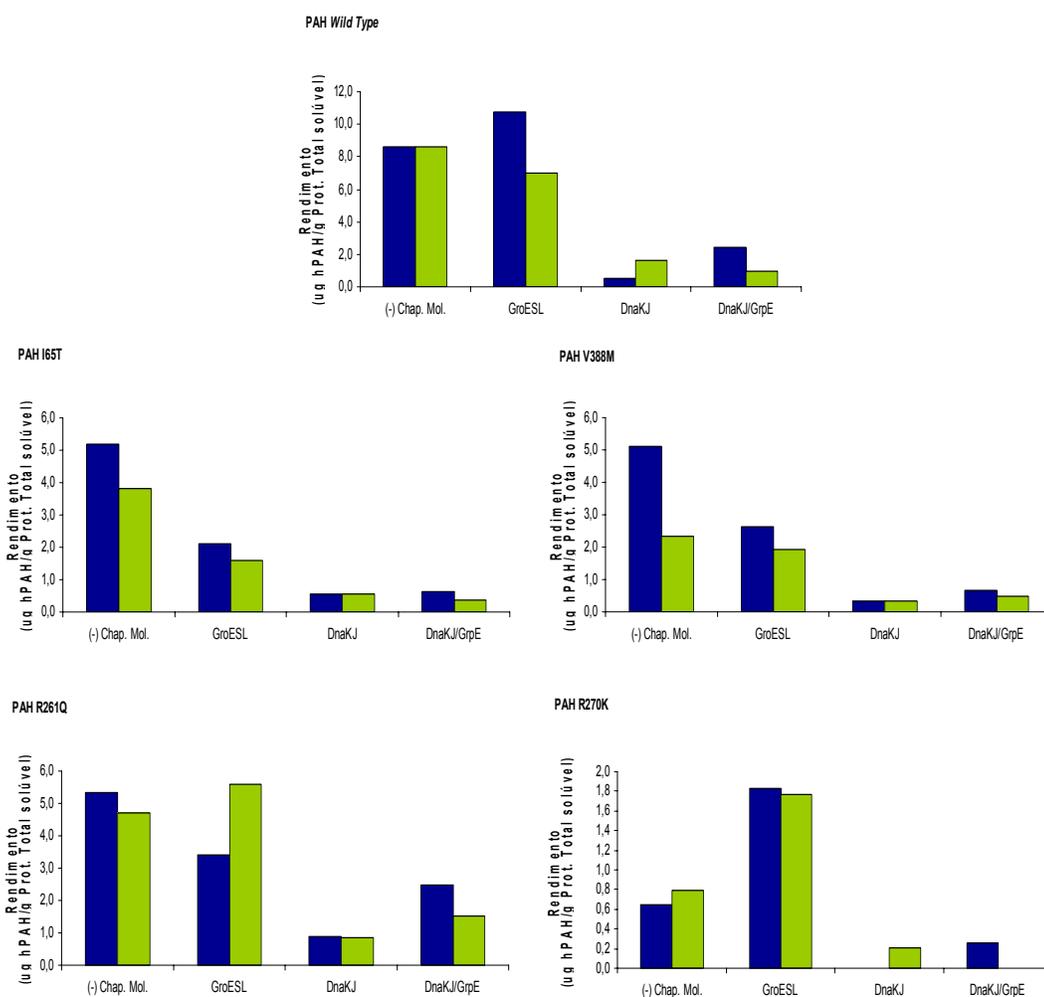


Figura 10 – Rendimento de proteína hPAH recombinante obtida (µg hPAH/g proteína total solúvel) após expressão na ausência (-) e presença de co-expressão de chaperones moleculares, com (■) e sem (-) glicerol no meio de cultura.

3.1.4. Actividade enzimática das proteínas hPAH co-expressas com chaperones moleculares na ausência e presença de glicerol

A actividade enzimática das proteínas hPAH (wt e mutantes) foi também determinada nas condições anteriormente referidas. Assim, pela análise da Figura 11, podemos concluir que, provavelmente devido ao efeito tóxico referido anteriormente, apenas na presença do sistema DnaKJ/GrpE foi observada uma diminuição da actividade enzimática da forma selvagem. Na presença de GroESL e DnaKJ, não houve alteração da actividade desta enzima. Estes resultados podem ser explicados pelo facto de, nestas condições, a presença do chaperone molecular não irá alterar ou condicionar a conformação desta proteína, que já se encontra no seu estado estruturalmente mais estável (forma nativa), não alterando deste modo a sua funcionalidade.

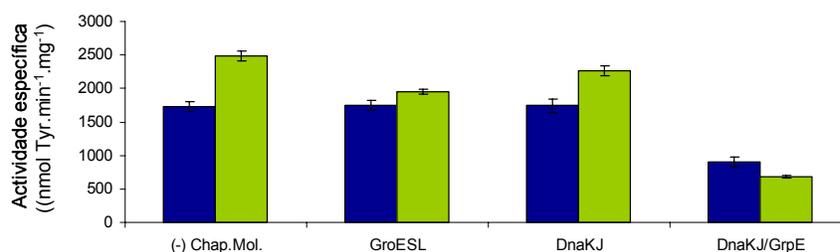


Figura 11 – Actividade enzimática específica (nmol Tyr.min⁻¹.mg⁻¹) da forma selvagem da hPAH (hPAHwt) produzida na ausência (-) e presença de co-expressão dos diferentes sistemas de chaperones moleculares, com (■) e sem (■) glicerol no meio de cultura.

Relativamente às formas mutantes da hPAH, os resultados foram surpreendentes, uma vez que na presença do sistema GroESL, todas as proteínas mutantes apresentaram um aumento da sua actividade enzimática (Figura 12). Este aumento foi mais pronunciado para as formas mutantes R261Q (2,8 vezes), R270K (2,6 vezes) e V388M (2,4 vezes). Relativamente à forma mutante I65T, esta sofreu um aumento de apenas 1,3 vezes. Na presença do sistema DnaKJ, as proteínas I65T e R270K foram as únicas onde se verificou um aumento de actividade enzimática de 1,3 e 2,6 vezes, respectivamente.

A presença simultânea do glicerol e dos chaperones moleculares aquando da síntese das proteínas mutantes não apresentou, de um modo geral, um efeito potenciador, não contribuindo para um aumento das actividades obtidas (ausência de efeito aditivo).

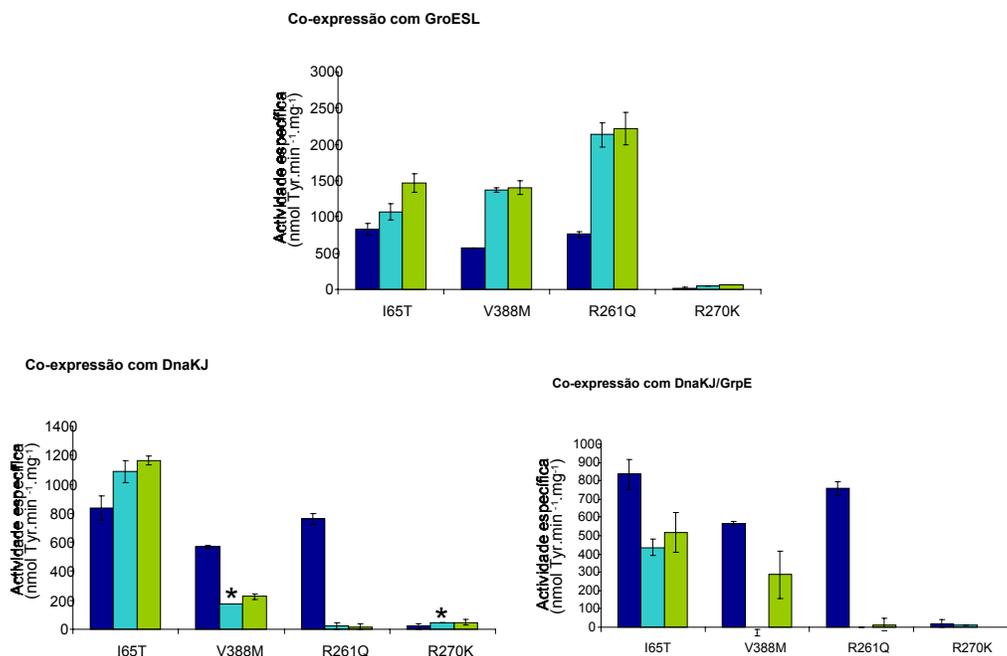


Figura 12 – Actividade enzimática específica ($\text{nmol Tyr}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) da formas hPAH mutantes I65T, R261Q, R270K e V388M produzidas na ausência de co-expressão dos diferentes sistemas de chaperones moleculares (■), na presença dos chaperones moleculares (■) e na presença de chaperones moleculares e glicerol a 1% (■).

*Valores não apresentam desvio padrão pois tratam-se da média entre apenas 2 ensaios.

3.1.5. Ensaio de *cross-linking*

O aumento da actividade enzimática observado para as diferentes formas mutantes de hPAH expressas, na presença de alguns dos chaperones estudados, pode estar directamente relacionado com um aumento da proporção das formas tetraméricas mais activas. Deste modo, o perfil de oligomerização destas proteínas foi identificado após separação electroforética em geis nativos (Figura 15). Para preservar a estrutura quaternária das proteínas recombinantes, estas foram previamente sujeitas a uma reacção de *cross-linking* com o BS³.

Relativamente à proteína hPAH wt (Figura 13A), a percentagem das formas diméricas e tetraméricas que ronda os 20 e 60%, respectivamente, não parece sofrer alterações na presença de glicerol. As proteínas mutantes onde geralmente é observado uma deslocação daquele equilíbrio no sentido das formas diméricas e um aumento da percentagem de formas agregadas, não parecem sofrer grandes alterações quando produzidas na presença de GroESL e do sistema DnaKJ. No entanto, a proteína mutante V388M, na presença de GroESL, apresenta uma banda que parece corresponder às formas diméricas mas aparenta ter sofrido uma alteração da sua mobilidade, o que pode indicar uma alteração na estrutura tridimensional destas formas

oligoméricas (Figura 13C). Uma vez que embora tenha sido observado um aumento da actividade das enzimas mutantes, sem ter sido acompanhada por uma estabilização de uma forma tetramérica da hPAH aparentemente, os sistemas estudados actuarão apenas ao nível da estabilização dos dímeros um processo que se pensa ocorrer num processo de co-tradução.

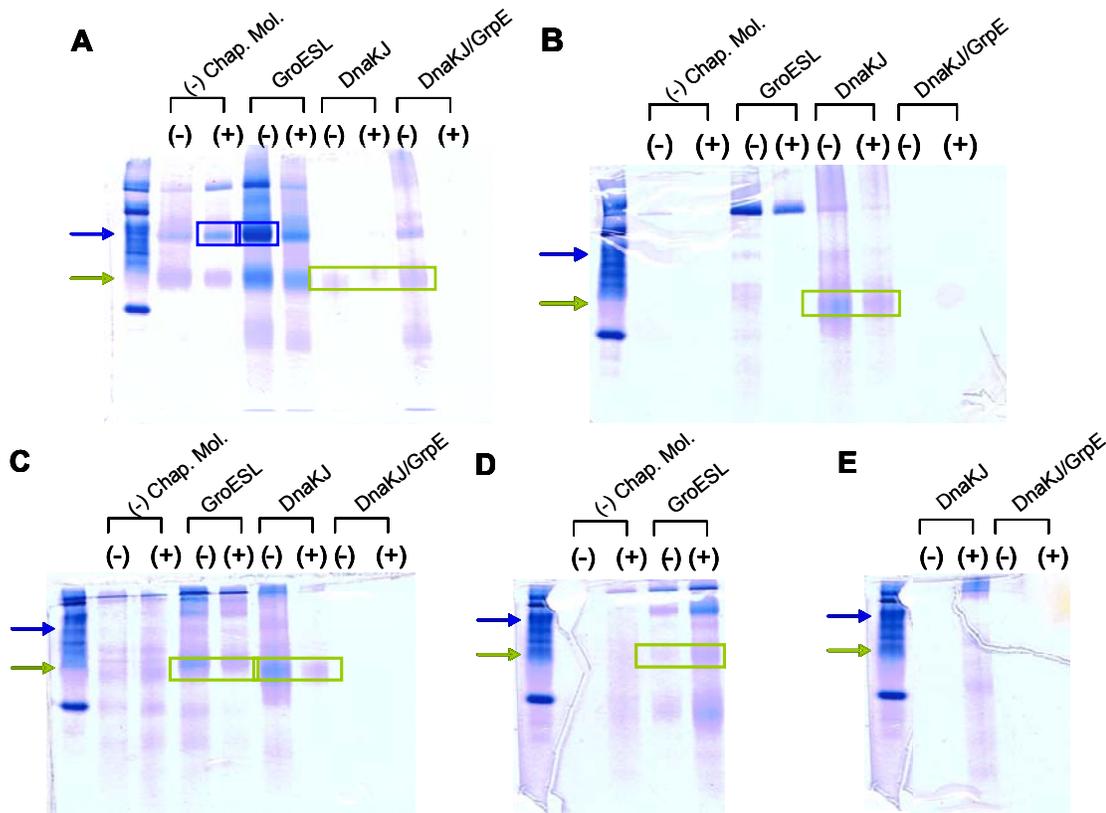


Figura 13 – Análise por separação electroforética em géis nativos de poliacrilamida das proteínas recombinantes hPAH produzidas na presença (+) e ausência (-) de glicerol e diferentes chaperones moleculares. A – hPAH wt; B – hPAH I65T; C - hPAH V388M; D – hPAH R261Q*; E – hPAH R270K*. Pesos moleculares assinalados: ~220 kDa (tetrâmeros) e ~110 kDa (dímeros). *Não foi possível utilizar todas as conjugações devido à fraca quantidade de amostras obtidas.

3.2. Clonagem e preparação de sistema de expressão eucariótica *in vitro* para avaliação do mecanismo de degradação da hPAH recombinante

Uma vez que todas as tentativas prévias para clonagem do cDNA da PAHwt (phPAH247) no vector de expressão eucariota pSG5 foram infrutíferas, foi desenvolvida uma estratégia de clonagem orientada. Como referido anteriormente (alínea 2.2.3), o cDNA phPAH247 encontra-se clonado no sítio EcoRI do plasmídeo pBR322 e apresenta, a 11 bp a montante do codão de iniciação de transcrição ATG, um sítio *Xma*I. Dado que o MCS do pSG5 apenas apresenta apenas 3 sítios de restrição (*Bam*HI, *Eco*RI e *Bgl*II), foi criado neste DNA um novo sítio de restrição *Xma*I, por

mutagénese dirigida. Assim, a reacção de ligação entre o fragmento do cDNA da PAHwt e do vector de expressão, ambos obtidos após hidrólise com *Xma*I e *Eco*RI, teria mais hipóteses de ser bem sucedida.

Na Figura 14A, encontra-se representado o perfil electroforético do produto da hidrólise, com *Xma*I, das mini-preps referentes à reacção de mutagénese dirigida. A correcta modificação do vector traduziu-se pela sua linearização (fragmento de 4,1 kb), após hidrólise com *Xma*I.

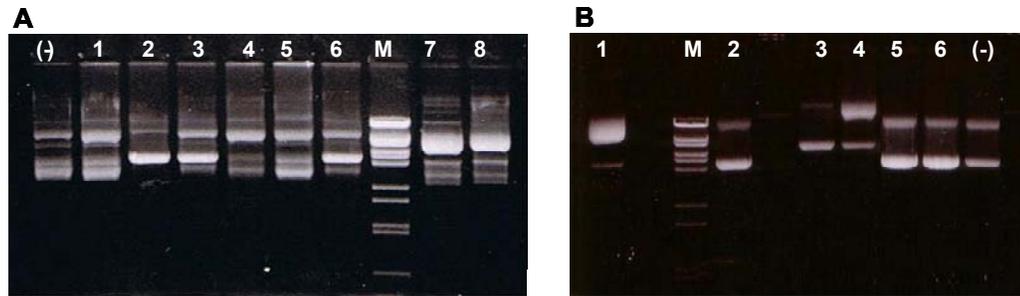


Figura 14 – Análise em gel de agarose (1%) do perfil electroforético dos fragmentos obtidos após hidrólise com a enzima *Xma*I. (A) Amostras provenientes da reacção de mutagénese dirigida (pSG5Xma); (-) amostra controlo constituída por pSG5. (B) Amostras provenientes da reacção de ligação entre o cDNA-PAHwt e pSG5Xma; (-) pSG5/Xma digerido com *Xma*I (M) Marcador de massas moleculares λ DNA-BstEII.

Após efectuar a reacção de ligação, foram novamente preparados DNAs, os quais foram hidrolisados com a enzima *Xma*I. A presença de um fragmento com o tamanho de 6,3 kb (Figura 14B) apontou para o sucesso da reacção de ligação, o qual foi posteriormente confirmado por sequenciação do DNA obtido (Figura 15).

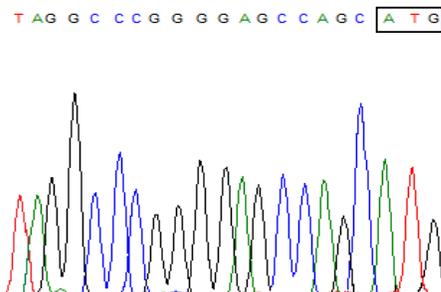


Figura 15 – Electroforetograma do DNA proveniente da reacção de ligação entre o cDNA-PAHwt e pSG5Xma. O codão de iniciação ATG encontra-se assinalado.

4. Conclusões

Presentemente foram já identificadas mais de 500 mutações no gene *PAH*, a maioria das quais resulta na síntese de proteínas hPAH mutantes conformacionalmente alteradas que sendo reconhecidas pelo sistema PQC são rapidamente degradadas. Neste contexto os chaperones moleculares poderão assumir um papel relevante nos teores intracelulares destas proteínas se tiverem capacidade de interagir com estados não-nativos da hPAH mutantes, quer a nível das proteínas recém-sintetizadas quer a nível do *folding de novo*.

Os resultados obtidos no decurso deste trabalho indicam que, à semelhança de outras proteínas humanas, também a PAH interage com os chaperones moleculares, particularmente com o sistema GroESL, no processo de aquisição da sua estrutura nativa. O aumento de actividade das formas mutantes simultaneamente com a ausência do incremento das formas tetraméricas, mais activas, sugere que estas interacções estabilizam uma estrutura dimérica da proteína, que no entanto não apresenta a capacidade para tetramerizar. Deste modo, seria extremamente interessante isolar estas formas e caracterizá-las relativamente às suas propriedades cinéticas, estruturais e de estabilidade. A estabilização de uma estrutura dimérica parece indicar que os chaperones moleculares actuam cedo na aquisição da estrutura quaternária da proteína, já que este fenómeno está postulado ocorrer co-tradução. Particularmente interessante foi o facto de o chaperone químico glicerol, que individualmente estabiliza proteínas hPAH mutantes, em conjunto com a co-expressão dos chaperones moleculares não conduziu a um aumento da actividade das proteínas mutantes. Assim, poderemos concluir que o glicerol não parece estabilizar as interacções entre os chaperones moleculares e as proteínas hPAH mutantes.

No contexto da PKU o efeito da co-expressão destes sistemas conduziu a aumentos de actividades, que no caso das mutações I65T, R261Q e V388M, foram suficientes para transformar um fenótipo de PKU moderada (~30% de actividade residual) em HPA não-PKU (~60% de actividade residual). Assim, é de maior importância desenvolver um sistema de expressão eucariota onde os homólogos eucariotas dos chaperones moleculares estudados neste trabalho, nomeadamente o sistema Hsp70 e chaperoninas do grupo II, possam ser investigados. Para atingir este objectivo foi já dado o primeiro passo, com a clonagem do cDNA da PAHwt no vector de expressão eucariota pSG5. Esta abordagem experimental irá permitir extrapolar os resultados obtidos no sistema procariota para a célula eucariota.

Não é ainda possível antever uma possível aplicação terapêutica às doenças conformacionais que passe pela modulação do nível de expressão dos chaperones moleculares. No entanto, o conhecimento do papel dos chaperones moleculares nas proteínas estruturalmente alteradas irá sem dúvida contribuir para desvendar o mecanismo patofisiológico daquelas anomalias.

5. Referências

1. Pey, A.L., et al., *Phenylketonuria: genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH*. Hum Mutat, 2003. **21**(4): p. 370-8.
2. Leandro, P., et al., *Glycerol increases the yield and activity of human phenylalanine hydroxylase mutant enzymes produced in a prokaryotic expression system*. Mol Genet Metab, 2001. **73**(2): p. 173-8.
3. Leandro, P., et al., *The V388M mutation results in a kinetic variant form of phenylalanine hydroxylase*. Mol Genet Metab, 2000. **69**(3): p. 204-12.
4. Castanie, M.P., et al., *A set of pBR322-compatible plasmids allowing the testing of chaperone-assisted folding of proteins overexpressed in Escherichia coli*. Anal Biochem, 1997. **254**(1): p. 150-2.
5. McCarty, J.S., et al., *The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system*. J Mol Biol, 1995. **249**(1): p. 126-37.
6. Teter, S.A., et al., *Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains*. Cell, 1999. **97**(6): p. 755-65.
7. Frydman, J., *Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 603-47.
8. Tomala, K. and R. Korona, *Molecular chaperones and selection against mutations*. Biol Direct, 2008. **3**: p. 5.
9. Rudiger, S., et al., *Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries*. Embo J, 1997. **16**(7): p. 1501-7.
10. Horwich, A.L., E.U. Weber-Ban, and D. Finley, *Chaperone rings in protein folding and degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11033-40.
11. Martin, J. and F.U. Hartl, *Chaperone-assisted protein folding*. Curr Opin Struct Biol, 1997. **7**(1): p. 41-52.
12. Palleros, D.R., et al., *ATP-induced protein-Hsp70 complex dissociation requires K⁺ but not ATP hydrolysis*. Nature, 1993. **365**(6447): p. 664-6.
13. Palleros, D.R., et al., *hsp70-protein complexes. Complex stability and conformation of bound substrate protein*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13107-14.
14. Kelley, W.L., *The J-domain family and the recruitment of chaperone power*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(6): p. 222-7.
15. Liberek, K., et al., *Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(7): p. 2874-8.
16. Bukau, B. and A.L. Horwich, *The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines*. Cell, 1998. **92**(3): p. 351-66.
17. Mayer, M.P. and B. Bukau, *Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action*. Biol Chem, 1998. **379**(3): p. 261-8.
18. Hartl, F.U., *Molecular chaperones in cellular protein folding*. Nature, 1996. **381**(6583): p. 571-9.
19. Saibil, H., *Molecular chaperones: containers and surfaces for folding, stabilising or unfolding proteins*. Curr Opin Struct Biol, 2000. **10**(2): p. 251-8.
20. Gottesman, M.E. and W.A. Hendrickson, *Protein folding and unfolding by Escherichia coli chaperones and chaperonins*. Curr Opin Microbiol, 2000. **3**(2): p. 197-202.
21. Mayhew, M., et al., *Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex*. Nature, 1996. **379**(6564): p. 420-6.
22. Hayer-Hartl, M.K., et al., *Conformational specificity of the chaperonin GroEL for the compact folding intermediates of alpha-lactalbumin*. Embo J, 1994. **13**(13): p. 3192-202.
23. Farr, G.W., et al., *Multivalent binding of nonnative substrate proteins by the chaperonin GroEL*. Cell, 2000. **100**(5): p. 561-73.
24. Chen, L. and P.B. Sigler, *The crystal structure of a GroEL/peptide complex: plasticity as a basis for substrate diversity*. Cell, 1999. **99**(7): p. 757-68.
25. Hunt, J.F., et al., *The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution*. Nature, 1996. **379**(6560): p. 37-45.
26. Ellis, R.J., *Chaperoning nascent proteins*. Nature, 1994. **370**(6485): p. 96-7.
27. Weber, F., et al., *The oligomeric structure of GroEL/GroES is required for biologically significant chaperonin function in protein folding*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(11): p. 977-85.
28. Horwich, A.L., et al., *Folding in vivo of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL*. Cell, 1993. **74**(5): p. 909-17.

29. Fink, A.L., *Chaperone-mediated protein folding*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(2): p. 425-49.
30. Petsko, G., *Protein Structure and Function*. 2004.
31. Hesterkamp, T., et al., *Escherichia coli trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(9): p. 4437-41.
32. Blum, P., et al., *Physiological consequences of DnaK and DnaJ overproduction in Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1992. **174**(22): p. 7436-44.
33. Gaitanaris, G.A., et al., *Successive action of Escherichia coli chaperones in vivo*. *Mol Microbiol*, 1994. **14**(5): p. 861-9.
34. Gragerov, A., et al., *Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(21): p. 10341-4.
35. Lin, Z. and E. Eisenstein, *Nucleotide binding-promoted conformational changes release a nonnative polypeptide from the Escherichia coli chaperonin GroEL*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(5): p. 1977-81.
36. Thomas, J.G. and F. Baneyx, *Protein folding in the cytoplasm of Escherichia coli: requirements for the DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES molecular chaperone machines*. *Mol Microbiol*, 1996. **21**(6): p. 1185-96.
37. Young, J.C., et al., *Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(10): p. 781-91.
38. Carrell, R.W. and D.A. Lomas, *Conformational disease*. *Lancet*, 1997. **350**(9071): p. 134-8.
39. Kopito, R.R. and D. Ron, *Conformational disease*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(11): p. E207-9.
40. *Methods in Molecular Biology (Protein Misfolding and Disease - Principles and Protocols)*, ed. N.B. Gregersen, P. Vol. 232, Totowa, NJ: Humana Press Inc.
41. Guttler, F. and P. Guldberg, *Mutations in the phenylalanine hydroxylase gene: genetic determinants for the phenotypic variability of hyperphenylalaninemia*. *Acta Paediatr Suppl*, 1994. **407**: p. 49-56.
42. Guldberg, P., et al., *Molecular heterogeneity of nonphenylketonuria hyperphenylalaninemia in 25 Danish patients*. *Genomics*, 1994. **21**(2): p. 453-5.
43. Rivera, I., et al., *Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal*. *J Med Genet*, 1998. **35**(4): p. 301-4.
44. Vilarinho, L., Queirós, A, Leandro, P, Tavares de Almeida, I, Rivera, I, *Fenilcetonúria revisitada*. *Arquivos de Medicina*, 2006. **20**(5-6): p. 161-172.
45. Leandro, J., et al., *Co-expression of different subunits of human phenylalanine hydroxylase: evidence of negative interallelic complementation*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1762**(5): p. 544-50.
46. Scriver, C., Kaufman, S, *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. eight edition ed. 2001, New York: McGraw- Hill.
47. Lidsky, A.S., et al., *Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(18): p. 6221-5.
48. Lichter-Konecki, U., C.M. Hipke, and D.S. Konecki, *Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues*. *Mol Genet Metab*, 1999. **67**(4): p. 308-16.
49. Schallreuter, K.U., et al., *Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin*. *Science*, 1994. **263**(5152): p. 1444-6.
50. Devi, K.S., A.R. Devi, and P. Kondaiah, *Amplification of phenylalanine hydroxylase and cystathionine beta-synthase transcripts in human peripheral lymphocytes by RT-PCR*. *Biochem Mol Biol Int*, 1998. **45**(4): p. 643-50.
51. Chelly, J., et al., *Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(8): p. 2617-21.
52. Sarkar, G. and S.S. Sommer, *Access to a messenger RNA sequence or its protein product is not limited by tissue or species specificity*. *Science*, 1989. **244**(4902): p. 331-4.
53. Kwok, S.C., et al., *Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase*. *Biochemistry*, 1985. **24**(3): p. 556-61.
54. Flatmark, T. and R.C. Stevens, *Structural Insight into the Aromatic Amino Acid Hydroxylases and Their Disease-Related Mutant Forms*. *Chem Rev*, 1999. **99**(8): p. 2137-2160.

55. Kappock, T.J., et al., *Spectroscopic and kinetic properties of unphosphorylated rat hepatic phenylalanine hydroxylase expressed in Escherichia coli. Comparison of resting and activated states.* J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30532-44.
56. Martinez, A., et al., *Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in Escherichia coli circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme.* Biochem J, 1995. **306** (Pt 2): p. 589-97.
57. Doskeland, A., et al., *Phenylalanine 4-monooxygenase from bovine and rat liver: some physical and chemical properties.* Neurochem Res, 1982. **7**(4): p. 407-21.
58. Knappskog, P.M., et al., *Structure/function relationships in human phenylalanine hydroxylase. Effect of terminal deletions on the oligomerization, activation and cooperativity of substrate binding to the enzyme.* Eur J Biochem, 1996. **242**(3): p. 813-21.
59. Nascimento, C., et al., *Modulation of the Activity of Newly Synthesized Human Phenylalanine Hydroxylase Mutant Proteins by Low-Molecular-Weight Compounds.* Protein J, 2008.
60. Feldman, D.E. and J. Frydman, *Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones.* Curr Opin Struct Biol, 2000. **10**(1): p. 26-33.
61. *Current Protocols in Molecular Biology.* 1994: Greenne Publishing Associates and John Wiley & Sons, Inc.
62. 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, 1976. **72**: p. 248-54.
63. Kaufman, S., *Phenylalanine 4-monooxygenase from rat liver.* Methods Enzymol, 1987. **142**: p. 3-17.
64. Mattson, G., et al., *A practical approach to crosslinking.* Mol Biol Rep, 1993. **17**(3): p. 167-83.
65. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
66. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
67. *pSG5 Vector Instruction Manual.* Stratagene.
68. *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual.* Stratagene.
69. Makarova, O., E. Kamberov, and B. Margolis, *Generation of deletion and point mutations with one primer in a single cloning step.* Biotechniques, 2000. **29**(5): p. 970-2.
70. Konecki, D.S. and J.J. Phillips, *TurboPrep II: an inexpensive, high-throughput plasmid template preparation protocol.* Biotechniques, 1998. **24**(2): p. 286-8, 290-3.
71. Qiagen, *Qiaquick Gel Extraction Manual.*

7. Anexos

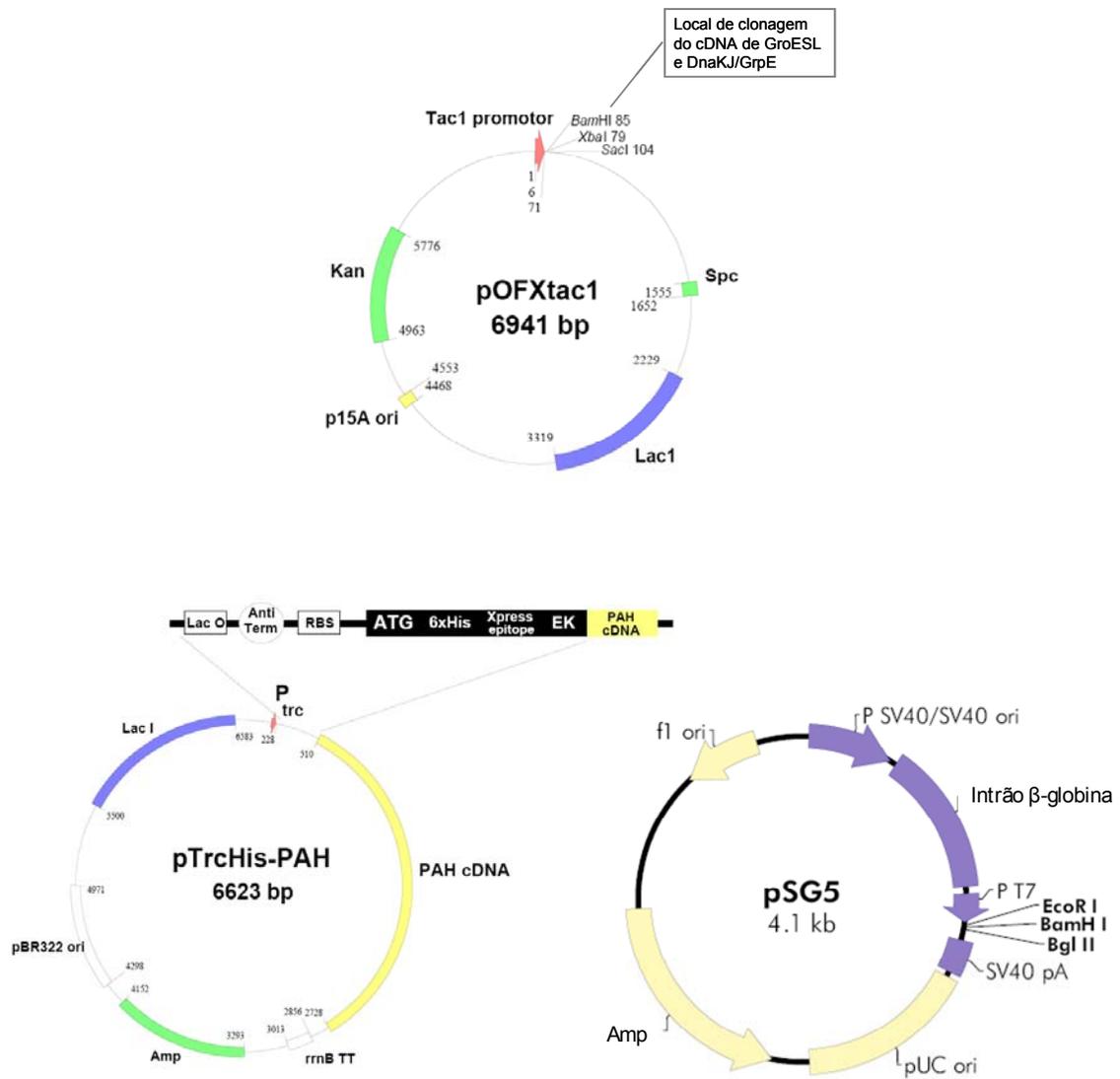
A.1. Sequência completa do clone pHPAH247, incluindo a sequência nucleotídica do cDNA da hPAH e correspondente tradução.

```

15          30          45          60          75
CTT CAT CGT CGT CCA ACT GAC CTT GAG TGT TAG TTT CGC GGT AAG TTT GGG TAT AAG TGC CAC CAC CAG TGC CGG
90          105         120         135         150
CAG TGT AGT CAG TAG TTT GTT GCT GGA AGT CGT TAC CGC CAA ACT GCG TGT TAC CGC CTA GAT TAG ACT GTG GCT
165         180         195         210         225
GCT GGC GTT GAG GGA AAC CTG CCT GTA CGT GAG GCC CTA AAA AGC CAG AGA CCT CAC TCC CGG GGA GCC AGC ATG
Met
240         255         270         285         300
TCC ACT CGG GTC CTG GAA AAC CCA GGC TTG GGC AGG AAA CTC TCT GAC TTT GGA CAG GAA ACA AGC TAT ATT GAA
Ser Thr Ala Val Leu Glu Asn Pro Gly Leu Gly Arg Lys Leu Ser Asp Phe Gly Gln Thr Ser Tyr Ile Gln
315         330         345         360         375
GAC AAC TGC AAT CAA AAT GGT GCC ATA TCA CTG ATC TTC TCA CTC AAA GAA GAA GTT GGT GCA TTG GCC AAA GTA
Asp Asn Cys Asn Gln Asn Gly Ala Ile Ser Leu Ile Phe Ser Leu Lys Glu Val Gly Ala Leu Ala Lys Val
390         405         420         435         450
TTG CGC TTA TTT GAG GAG AAT GAT GTA AAC CTG ACC CAC ATT GAA TCT AGA CCT TCT CGT TTA AAG AAA GAT GAG
Leu Arg Leu Phe Glu Glu Asn Asp Val Asn Leu Thr His Ile Glu Ser Arg Pro Ser Arg Leu Lys Lys Asp Glu
465         480         495         510         525
TAT GAA TTT TTC ACC CAT TTG GAT AAA CGT AGC CTG CCT GCT CTG ACA AAC ATC ATC AAG ATC TTG AGG CAT GAC
Tyr Glu Thr Phe Thr His Leu Asp Lys Arg Ser Leu Pro Ala Leu Thr Asn Ile Ile Lys Ile Leu Arg His Asp
540         555         570         585         600
ATT GGT GCC ACT GTC CAT GAG CTT TCA CGA GAT AAG AAG AAA GAC ACA GTG CCC TGG TTC CCA AGA ACC ATT CAA
Ile Gly Ala Thr Val His Glu Leu Ser Arg Asp Lys Lys Lys Asp Thr Val Pro Trp Phe Pro Arg Thr Ile Gln
615         630         645         660         675
GAG CTG GAC AGA TTT GCC AAT CAG ATT CTC AGC TAT GGA GCG GAA CTG GAT GCT GAC CAC CCT GGT TTT AAA GAT
Glu Leu Asp Arg Phe Ala Asn Gln Ile Leu Ser Tyr Gly Ala Glu Leu Asp Ala Asp His Pro Gly Phe Lys Asp
690         705         720         735         750
CCT GTG TAC CGT GCA AGA CGG AAG CAG TTT GCT GAC ATT GCC TAC AAC TAC CGC CAT GGG CAG CCC ATC CCT CGA
Pro Val Tyr Arg Ala Arg Arg Lys Gln Phe Ala Asp Ile Ala Tyr Asn Tyr Arg His Gly Gln Pro Ile Pro Arg
765         780         795         810         825
GTG GAA TAC ATG GAG GAA GAA AAG AAA ACA TGG GGC ACA GTG TTC AAG ACT CTG AAG TCC TTG TAT AAA ACC CAT
Val Glu Tyr Met Glu Glu Glu Lys Lys Thr Trp Gly Thr Val Phe Lys Thr Leu Lys Ser Leu Tyr Lys Thr His
840         855         870         885         900
GCT TGC TAT GAG TAC AAT CAC ATT TTT CCA CTT CTT GAA AAG TAC TGT GGC TTC CAT GAA GAT AAC ATT CCC CAG
Ala Cys Tyr Glu Tyr Asn His Ile Phe Pro Leu Leu Glu Lys Tyr Cys Gly Phe His Glu Asp Asn Ile Pro Gln
915         930         945         960         975
CTG GAA GAC GTT TCT CAA TTC CTG CAG ACT TGC ACT GGT TTC CGC CTC CGA CCT GTG GCT GGC CTG CTT TCC TCT
Leu Glu Asp Val Ser Gln Phe Leu Gln Thr Cys Thr Gly Phe Arg Leu Arg Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ser
990         1005        1020        1035        1050
CGG GAT TTC TTG GGT GGC CTG GCC TTC CGA GTC TTC CAC TGC ACA CAG TAC ATC AGA CAT GGA TCC AAG CCC ATG
Arg Asp Phe Leu Gly Gly Leu Ala Phe Arg Val Phe His Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Gly Ser Lys Pro Met
1065        1080        1095        1110        1125
TAT ACC CCC GAA CCT GAC ATC TGC CAT GAG CTG TTG GGA CAT GTG CCC TTG TTT TCA GAT CGC AGC TTT GCC CAG
Tyr Thr Pro Glu Pro Asp Ile Cys His Glu Leu Leu Gly His Val Pro Leu Phe Ser Asp Arg Ser Phe Ala Gln
1140        1155        1170        1185        1200
TTT TCC CAG GAA ATT GGC CTT GCC TCT CTG GGT GCA CCT GAT GAA TAC ATT GAA AAG CTC GCC ACA ATT TAC TGG
Phe Ser Gln Glu Ile Gly Leu Ala Ser Leu Gly Ala Pro Asp Glu Tyr Ile Glu Lys Leu Ala Thr Ile Tyr Trp
1215        1230        1245        1260        1275
TTT ACT GTG GAG TTT GGG CTC TGC AAA CAA GGA GAC TCC ATA AAG GCA TAT GGT GCT GGG CTC CTG TCA TCC TTT
Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln Gly Asp Ser Ile Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Phe
1290        1305        1320        1335        1350
GGT GAA TTA CAG TAC TGC TTA TCA GAG AAG CCA AAG CTT CTC CCC CTG GAG CTG GAG AAG ACA GCC ATC CAA AAT
Gly Glu Leu Gln Tyr Cys Leu Ser Glu Lys Pro Lys Leu Leu Pro Leu Glu Leu Glu Lys Thr Ala Ile Gln Asn
1365        1380        1395        1410        1425
TAC ACT GTG ACC GAG TTC CAG CCC CTG TAT TAC GTG GCA GAG AGT TTT AAT GAT GCC AAG GAG AAA GTA AGG AAC
Tyr Thr Val Thr Glu Phe Gln Pro Leu Tyr Tyr Val Ala Glu Ser Phe Phe Asn Asp Ala Lys Gly Lys Val Arg Asn
1440        1455        1470        1485        1500
TTT GCT GCC ACA ATA CCT CGG CCC TTC TCA GTT CGC TAC GAC CCA TAC ACC CAA AGG ATT GAG GTC TTG GAC AAT
Phe Ala Ala Thr Ile Pro Arg Pro Phe Ser Val Arg Tyr Asp Pro Tyr Thr Gln Arg Ile Glu Val Leu Asp Asn
1515        1530        1545        1560        1575
ACC CAG CAG CTT AAG ATT TTG GCT GAT TCC ATT AAC AGT GAA ATT GGA ATC CTT TGC AGT GCC CTC CAG AAA ATA
Thr Gln Gln Leu Lys Ile Leu Ala Asp Ser Ile Asn Ser Glu Ile Gly Ile Leu Cys Ser Ala Leu Gln Lys Ile
1590        1605        1620        1635        1650
AAG TAA AGC CAT GGA CAG AAT GTG GTC TGT CAG CTG TGA ATC TGT TGA TGG AGA TCC AAC TAT TTC TTT CAT CAG
Lys ***
1665        1680        1695        1710        1725
AAA AAG TCC GAA AAG CAA ACC TTA ATT TGA AAT AAC AGC CTT AAA TCC TTT ACA AGA TGG AGA AAC AAC AAA TAA
1740        1755        1770        1785        1800
GTC AAA ATA ATC TGA AAT GAC AGG ATA TGA GTA CAT ACT CAA GAG CAT AAT GGT AAA TCT TTT GGG GTC ATC TTT
1815        1830        1845        1860        1875
GAT TTA GAG ATG ATA ATC CCA TAC TCT CAA TTG AGT TAA ATC AGT AAT CTG TCG CAT TTC ATC AAG ATT AAT TAA
1890        1905        1920        1935        1950
AAT TTG GGA CCT GCT TCA TTC AAG CTT CAT ATA TGC TTT GCA GAG AAC TCA TAA AGG AGC ATA TAA GGC TAA ATG
1965        1980        1995        2010        2025
TAA AAC ACA AGA CTG TCA TTA GAA TTG AAT TAT TGG GCT TAA TAT AAA TCG TAA CCT ATG AAG TTT ATT TTC TAT
2040        2055        2070        2085        2100
TTT AGT TAA CTA TGA TTC CAA TTA CTA CTT TGT TAT TGT ACC TAA GTA AAT TTT CTT TAG GTC AGA AGC CCA TTA
2115        2130        2145        2160        2175
AAA TAG TTA CAA GCA TTG AAC TTC TTT AGT ATT ATA TTA ATA TAA AAA CAT TTT TGT ATG TTT TAT TGT AAT CA1
2190        2205        2220        2235        2250
AAA TAC TGC TGT ATA AGG TAA TAA AAC TCT GCA CCT AAT CCC CAT AAC TTC CAG TAT CAT TTT CCA ATT AAT TAT
2265        2280        2295        2310        2325
CAA GTC TGT TTT GGG AAA CAC TTT GAG GAC ATT TAT GAT GCA GCA GAT GTT GAC TAA AGG CTT GGT TGG TAG ATA
2340        2355        2370        2385        2400
TTC AGG AAA TGT TCA CTG AAT AAA TAA GTA AAT ACA TTA TTG AAA AGC AAA TCT GTA TAA ATC TGA AAT TTT TAT
2415        2430        2445
TTG TAT TAG TAA TAA AAC ATT AGT AGT TTA AAA AAA AAA AAA AAA AAA

```

A.2. Mapas dos vetores utilizados: pTrcHis-PAH, pOFXtac1 e pSG5.

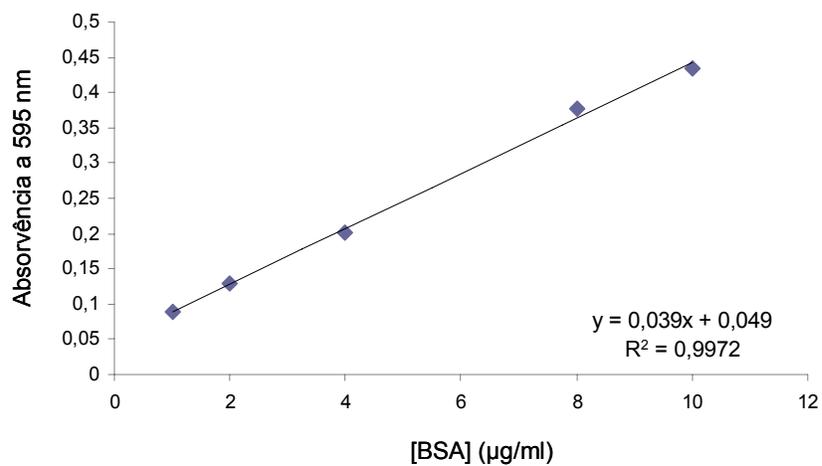


Para mais detalhes, consultar alíneas 2.1.1. e 2.2.1.

A.3. Curva de calibração utilizada na quantificação proteica pelo método de Bradford.

Valores de Absorvência a 595 nm para as diferentes soluções padrão de BSA.

[BSA] ($\mu\text{g/ml}$)	Abs _{595nm}	Abs _{595nm} média
1	0,088	0,089
	0,083	
	0,095	
2	0,125	0,129
	0,128	
	0,133	
4	0,210	0,202
	0,183	
	0,213	
8	0,374	0,377
	0,369	
	0,388	
10	0,420	0,434
	0,436	
	0,447	

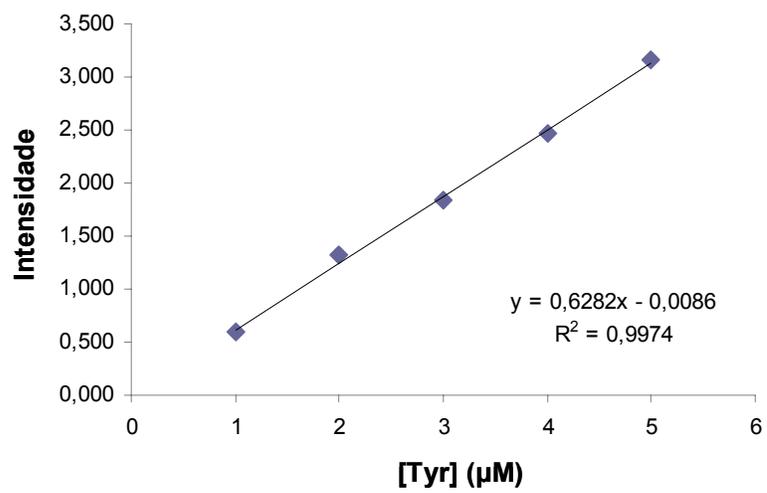


A.4. Curva de calibração gama baixa (A) e gama alta (B) para quantificação de L-tirosina, pelo método do nitrosonaftol.

Valores de intensidade de fluorescência (I) para as diferentes soluções padrão de tirosina (λ_{exc} 460 nm e λ_{em} 570nm).

[Tirosina] (μM)	I	I _{média}	I _{média corrigida}
	0,486		
0	0,464	0,498	0
	0,545		
	1,098		
1	1,136	1,089	0,591
	1,034		
	1,778		
2	1,777	1,821	1,323
	1,909		
	2,376		
3	2,361	2,338	1,840
	2,278		
	3,036		
4	2,819	2,964	2,465
	3,036		
	3,544		
5	3,709	3,659	3,161
	3,725		
	6,382		
10	6,211	6,184	5,686
	5,96		
	9,299		
15	9,035	9,167	8,669
	11,58		
	11,89		
20	11,51	11,660	11,162
	13,99		
	13,65		
25	13,38	13,673	13,175
	0,486		

A



B

