

Fábio Manuel Marques Madeira

**Estudos Estruturais e Funcionais da
Fenilalanina Hidroxilase Humana**

LISBOA

2010

nº de arquivo

“Copyright”

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

Fábio Manuel Marques Madeira

**Estudos Estruturais e Funcionais da
Fenilalanina Hidroxilase Humana**

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

Orientador:

Prof^ª. Doutora Maria João Romão (FCT/UNL)

Co-orientador:

Prof^ª. Doutora Ana Paula Leandro (FF/UL)

LISBOA

2010

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e acima de tudo, quero agradecer às minhas orientadoras, Professora Doutora Maria João Romão e Professora Doutora Ana Paula Leandro, a confiança que depositaram em mim para a realização desta tese de mestrado. Quero agradecer todo o suporte, entusiasmo e estímulo demonstrado ao longo desta jornada, onde me foram partilhadas muitas experiências e conhecimentos, nomeadamente em relação à interessante proteína com que tive o prazer de trabalhar. Quero agradecer também o acolhimento que tive nos dois grupos de investigação, onde tive a oportunidade de conhecer pessoas extraordinárias que fazem ciência de grande nível. Por esta oportunidade de crescimento científico e pessoal, e por tudo, quero expressar a minha maior gratidão.

Seguidamente quero agradecer à Catarina Coelho e ao Paulo Roque Lino, por me terem guiado e instruído no seio dos respectivos grupos de investigação. À Catarina por, entre outras coisas, ter construído as proteínas variantes com que trabalhei e ter ajudado este projecto como se seu se tratasse. Ao Paulo por toda a ajuda em aumentar a quantidade e pureza das proteínas nos processos de produção e purificação e pelas abordagens sempre interessantes a todo e qualquer problema.

À Cecília, ao Filipe, ao David, à Joana, e à Diana por toda a ajuda e companheirismo. À Mariza, à Sara, à Cristina e à Andreia pelo apoio, pelo interesse e pelo convívio. Quero agradecer também a todos aqueles que mesmo não referindo o nome vão ficar na minha memória, por terem sido importantes no decorrer deste trabalho de investigação. Obrigado a todos por tornarem este ano memorável e por me fazerem a pessoa que sou hoje.

Finalmente quero agradecer aos meus amigos mais próximos e família por existirem e estarem presentes na minha vida. Em especial à Daniela, à minha Mãe, ao meu Irmão, à Adelaide, aos meus avós, tios e primos. Quero também dedicar esta tese ao meu querido Pai, que sempre estará comigo a saborear os sonhos concretizados.

SUMÁRIO

A fenilalanina hidroxilase humana (hPAH) é uma enzima dependente de ferro não-hémico que catalisa a hidroxilação do aminoácido aromático essencial fenilalanina (L-Phe) a tirosina, na presença do cofactor pterínico tetrahidrobiopterina e do oxigénio molecular. Esta enzima faz parte da via metabólica de degradação catabólica da L-Phe proveniente da dieta e é responsável por 75% da sua utilização. A hPAH assume particular importância na saúde humana uma vez que uma deficiente actividade ou expressão proteica, como consequência de mutações no gene que a codifica, é responsável pela doença hereditária conhecida como fenilcetonúria (PKU), a doença mais frequente no metabolismo dos aminoácidos e que apresenta uma incidência na população Caucasiana de 1:10000. O tratamento universalmente aceite e aconselhado consiste numa restrição dietética da L-Phe, o qual deve ser instaurado logo após o nascimento, de modo a evitar o atraso mental severo. No entanto, e devido à dificuldade em aderir ao tratamento dietético novas abordagens terapêuticas, menos restritivas, estão em estudo, nomeadamente a terapia enzimática de reposição.

Presentemente, são apenas conhecidas as estruturas cristalinas de formas truncadas da PAH humana e de rato, as quais têm contribuído significativamente para a elucidação do mecanismo catalítico da PAH e para a identificação das bases moleculares da PKU. No entanto, e em parte devido à instabilidade da hPAH, ainda não foi obtida a estrutura tri-dimensional da forma intacta.

Neste trabalho, com o objectivo de obter a estrutura completa da hPAH, expressaram-se e purificaram-se duas proteínas quiméricas variantes, hPAH C29S e hPAH E360K, uma vez que apresentam um nível de expressão superior ao da forma selvagem (hPAH_{wt}) o que sugere uma maior estabilidade proteica. A existência destas formas mutantes permitiu ter material de partida para os ensaios de cristalização e estudos de difracção de raios-X. Foram obtidas condições de cristalização para ambos os mutantes que originaram resultados preliminares promissores, importantes para a determinação da estrutura tri-dimensional da forma intacta da hPAH. Procedeu-se ainda à caracterização enzimática das proteínas quiméricas. Curiosamente, apenas a hPAH C29S apresentou um aumento da velocidade máxima da reacção (V_{max}) e da temperatura de desnaturação (T_m), relativamente à hPAH_{wt}. O conhecimento da estrutura 3D será fundamental para a

identificação dos determinantes moleculares dos fenótipos PKU e para uma melhor compreensão do mecanismo catalítico. Adicionalmente, a proteína quimérica C29S mostrou ser uma forte candidata para formulação e utilização no tratamento da PKU por terapia enzimática de reposição.

ABSTRACT

Human phenylalanine hydroxylase (hPAH) is a non-heme iron dependent enzyme that catalyzes the hydroxylation of the essential aromatic amino acid L-phenylalanine (L-Phe) into L-tyrosine in the presence of the pterin co-factor tetrahydrobiopterin and molecular oxygen. This enzyme is part of the catabolic pathway of degradation of dietary L-Phe and accounts for 75% of the L-Phe disposal. Human PAH assumes particular importance in human health since deficient enzymatic activity or loss of enzyme expression as a consequence of mutations in the gene coding for hPAH, is responsible for the inherited metabolic disorder known as phenylketonuria (PKU), the most frequent disorder of amino acid metabolism, and which presents an average incidence in the Caucasian population of 1:10000. The treatment by dietary restriction of L-Phe is largely accepted and recommended, and must be followed for life soon after birth, to avoid severe mental retardation. However, and in light of the difficulty of PKU patients in adhering to the dietary treatment, new and less restrictive therapeutical approaches are under study, namely the enzyme substitution therapy.

Currently, only the crystal structures of truncated forms of both human and rat PAH, are known, which have significantly contributed to the elucidation of the catalytic pathway and to the identification of the molecular determinants of PKU. However, and due to the instability of the hPAH, none three-dimensional structure of the full-length PAH was solved yet.

In this work, with the aim of solving the structure of the full-length PAH, two variant proteins were expressed and purified, namely hPAH C29S and hPAH E360K, as they present a higher level of expression when compared to the wildtype form (hPAH_{wt}), which suggests an increased protein stability. The existence of these stable forms of the protein has endorsed the starting material for crystallization trials and X-ray diffraction assays. Crystallization conditions were obtained for both mutants led to promising preliminary results, important to solve the three-dimensional structure of the full-length hPAH. The enzymatic characterization of the chimeric proteins was also carried out. Interestingly, only hPAH C29S showed an increase in the maximum reaction rate (V_{max}) and in the half-denaturation temperature (T_m), when compared to the hPAH_{wt}. Knowledge of the 3D structure will be fundamental to identify the determinants of PKU phenotypes and to a

better understanding of the catalytic mechanism. Additionally, the chimeric protein C29S proved to be a strong candidate for the development and use in the treatment of PKU by enzyme substitution therapy.

ABREVIATURAS

[C₁mim] [DMP]	1,3-Dimetilimidazol dimetil-fosfato
[C₂mim] [C₂SO₄]	1-Etil-3-metilimidazol etil-sulfato
[C₄mim] [Cl]	Cloreto de 1-n-butil-3-metilimidazol
[C₄mim] [MEES]	1-n-Butil-3-metilimidazol metil-etil-sulfato
[C₄mim] [PF₆]	1-n-Butil-3-metilimidazol hexafluoro-fosfato
AAOH	Hidroxilases de aminoácidos aromáticos
ARS	Sequência auto-reguladora
BCA	Ácido <i>bicinconínico</i>
BH₂	7,8-Dihidrobiopterina
BH₄	6(R)-L-eritro-5,6,7,8-Tetrahidrobiopterina
BSA	Albumina bovina sérica
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CAPS	Ácido N-ciclo-hexil-3-aminopropanosulfónico
cDNA	DNA complementar ao mRNA
DHPR	Dihidropteridina redutase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EK	Enterocinase
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
FPLC	Cromatografia líquida de proteínas
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico
hPAH	Fenilalanina-4-monooxigenase
HPLC	Cromatografia líquida de elevado desempenho
ICP-AES	Espectroscopia de emissão atómica por plasma acoplado indutivamente
IL	Líquidos iónicos
IMAC	Cromatografia de afinidade a metal imobilizado
IPTG	Isopropil-1-tio-β-D-galactosídeo
LB	Meio de cultura <i>Luria-Bertani</i>
L-DOPA	3,4-Dihidroxifenilalanina
LNAA	Aminoácidos aromáticos largos e neutros
MES	Ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
MPD	2-Metil-2,4-pentanodiol

mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MWCO	Massa molecular de corte
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (estado oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (estado reduzido)
PAGE	Electroforese em gel de poli-acrilamida
PAL	Fenilalanina amónia liase
PAH	Fenilalanina hidroxilase
PCD	Pterina 4a-carbinolamina desidratase
PCR	Reacção em cadeia pela polimerase
PEG	Polietileno glicol
PMSF	Fluoreto de fenil-metilsulfonilo
RBS	Local de ligação ao ribossoma
RMSD	Desvio da média quadrática
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
SLS	<i>Swiss Light Source</i>
THA	3-(2-Tienil)-L-alanina
TPH	Triptofano hidroxilase
TRIS	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TYH	Tirosina hidroxilase
wt	Forma selvagem

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
SUMÁRIO	iii
ABSTRACT.....	v
ABREVIATURAS	vii
ÍNDICE	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Fenilcetonúria.....	1
1.2 Hidroxilases de aminoácidos aromáticos	2
1.3 Estudos estruturais da hPAH.....	4
1.3.1 Domínio regulador	8
1.3.2 Domínio catalítico e o centro activo	10
1.3.3 Domínio de oligomerização	11
1.3.4 Proteínas ortólogas bacterianas	12
1.4 Estudos funcionais da hPAH.....	14
1.4.1 Mecanismo catalítico	14
1.4.2 Oligomerização e activação enzimática	14
1.5 Bases estruturais da PKU	17
1.6 Cristalografia de raios-X.....	18
1.6.1 Cristais de proteína.....	19
1.6.2 Difracção de raios-X	23
1.6.3 Medição dos dados de difracção	24
1.6.4 Determinação estrutural	24
2 OBJECTIVOS.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 <i>Constructs</i> de expressão.....	28
3.2 Expressão das proteínas recombinantes	29
3.3 Purificação das proteínas recombinantes	29
3.3.1 Cromatografia de afinidade.....	29
3.3.2 Cromatografia de exclusão molecular.....	30

3.4	Análise por electroforese	31
3.5	Quantificação proteica	32
3.6	Actividade enzimática.....	32
3.7	Perfil de estabilidade térmica.....	33
3.8	Ensaio de Cristalização	34
3.9	Análise por cristalografia de raios-X	35
3.10	Detecção de ferro	35
3.11	Análise estrutural e preparação das figuras	36
4	RESULTADOS	37
4.1	Expressão e purificação das proteínas recombinantes	37
4.2	Perfil de oligomerização	42
4.3	Propriedades enzimáticas.....	44
4.4	Perfil de estabilidade térmica.....	48
4.5	Ensaio de cristalização	49
4.6	Difracção de raios-X.....	62
5	DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS	66
6	BIBLIOGRAFIA	71
7	ANEXOS	77
7.1	Mapa das mutações conhecidas no locus <i>PAH</i>	77
7.2	Vector de expressão procariota pTrcHisB	78
7.3	<i>Screenings</i> usados nos ensaios de cristalização	79
7.3.1	<i>MemStart</i>	79
7.3.2	<i>Crystallization Basic Kit</i>	80
7.3.3	<i>Natrix</i>	81
7.3.4	<i>Crystal Screen 2</i>	82
7.3.5	<i>Wizard 2</i>	83
7.3.6	<i>JBScreen Classic 2</i>	84
7.3.7	<i>JBScreen Classic 3</i>	84
7.3.8	<i>JBScreen Classic 4</i>	85
7.3.9	<i>JBScreen Classic 5</i>	86
7.3.10	<i>JBScreen Classic 10</i>	86
7.3.11	<i>Additive Screen 1</i>	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fenilcetonúria

A fenilalanina hidroxilase humana (hPAH; E.C. 1.14.16.1) é uma enzima citosólica, expressa maioritariamente no fígado e no rim que catalisa a hidroxilação do aminoácido aromático essencial fenilalanina (L-Phe) a tirosina (L-Tyr) na presença do cofactor pterínico 6(R)-L-*eritro*-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄) e do oxigénio molecular (O₂). Deste modo a hPAH suplementa a circulação sistémica com L-Tyr, necessária à síntese proteica e previne a acumulação de fenilalanina nos fluídos corporais a níveis tóxicos, particularmente depois da ingestão de alimentos. A hPAH é assim responsável pela catabolização de cerca de 75% da L-Phe proveniente da dieta (Martinez *et al.*, 1995).

Esta proteína assume particular importância na saúde humana uma vez que uma deficiente expressão e/ou actividade enzimática, como consequência de mutações no gene que a codifica (gene *PAH*), é responsável pela doença metabólica hereditária conhecida como fenilcetonúria (PKU; OMIM 261600), a doença hereditária mais frequente no metabolismo dos aminoácidos. A PKU é uma doença autossómica recessiva com uma incidência média na população Caucasiana de 1:10000 (Scriver, 2007) sendo que 1:50 indivíduos é portador de um alelo mutante. Quando o tratamento não é iniciado o mais cedo possível, após o nascimento, a PKU resulta num atraso mental severo, não só devido ao aumento dos níveis de L-Phe nos fluidos corporais (hiperfenilalaninemia; HPA), particularmente no cérebro, mas também devido aos resultantes níveis baixos de L-Tyr, o que afecta a biossíntese dos neurotransmissores: dopamina, noradrenalina e adrenalina (Surtees e Blau, 2000). Tendo em consideração a tolerância diária de L-Phe, a HPA pode ser classificada em três grupos: PKU clássica (L-Phe > 1,2 mmol/L), PKU moderada (L-Phe 0,6-1,2 mmol/L) e HPA não-PKU (L-Phe < 0,6 mmol/L) (Spaapen e Rubio-Gozalbo, 2003). A restrição dietética de L-Phe permanece o melhor tratamento para os doentes PKU/HPA que, de acordo com normas internacionais, deve ser mantida durante toda a vida. Se implementada cedo após o nascimento, esta aproximação terapêutica previne o atraso psicomotor assim como as alterações do desenvolvimento cerebral (Scriver, 2007).

O atraso no desenvolvimento cognitivo e cerebral a nível do sistema nervoso central tem sido proposto ter como origem uma mielinização deficiente (Surtees e Blau, 2000). Este efeito parece resultar não só de uma acção directa do excesso de L-Phe em sistemas

enzimáticos do cérebro, mas também da depleção de aminoácidos precursores de neurotransmissores, nomeadamente a L-Tyr e o triptofano (L-Trp) (L (Pietz *et al.*, 1999). A L-Phe e os restantes grandes aminoácidos neutros (LNAA), que incluem, entre outros, a L-Tyr, o L-Trp, a asparagina e a valina, são transportados através da barreira hematoencefálica pelo mesmo transportador. Assim, por um mecanismo de competição, a elevada concentração de L-Phe impedirá a passagem dos outros LNAA para o cérebro em níveis normais (Pietz *et al.*, 1999; Groot *et al.*, 2010).

Uma vez que a restrição dietética apresenta diversas limitações, terapêuticas alternativas estão já a ser utilizadas, nomeadamente a administração do cofactor natural BH₄ (Spaapen e Rubio-Gozalbo, 2003), e a administração de LNAAs (Santos *et al.*, 2006). No entanto, nem todos os doentes PKU respondem à administração de BH₄. Sabe-se presentemente que esta resposta depende directamente do genótipo do doente, ou seja, está directamente relacionado com a mutação presente na proteína hPAH expressa. Outras abordagens terapêuticas, como por exemplo a terapia genética (Harding, 2008) e a terapia de substituição enzimática com fenilalanina amónia liase (PAL) (Sarkissian e Gámez, 2005), encontram-se ainda em fase de investigação. Uma eficiente alternativa, ainda pouco explorada devido à instabilidade da hPAH, é a terapia enzimática de reposição, utilizando proteínas hPAH recombinantes (Santos *et al.*, 2006; Spronsen e Enns, 2010).

1.2 Hidroxilases de aminoácidos aromáticos

A hPAH juntamente com a tirosina hidroxilase (TYH; E.C. 1.14.16.2) e a triptofano hidroxilase (TPH; E.C. 1.14.16.4) constituem a família estrutural e funcionalmente relacionada das hidroxilases dos aminoácidos aromáticos (AAOH) dependentes do cofactor não-proteico biopterina. Esta família de enzimas partilha um mecanismo catalítico comum, no qual o di-oxigénio é usado pelo centro activo contendo um átomo de ferro no seu estado reduzido, para hidroxilar um substrato aromático inactivo (actividade de monooxigenase), em simultâneo com a oxidação do cofactor tetrahydrobiopterina a dihydrobiopterina (BH₂), num processo envolvendo dois electrões (Flatmark e Stevens, 1999) (Figura 1).

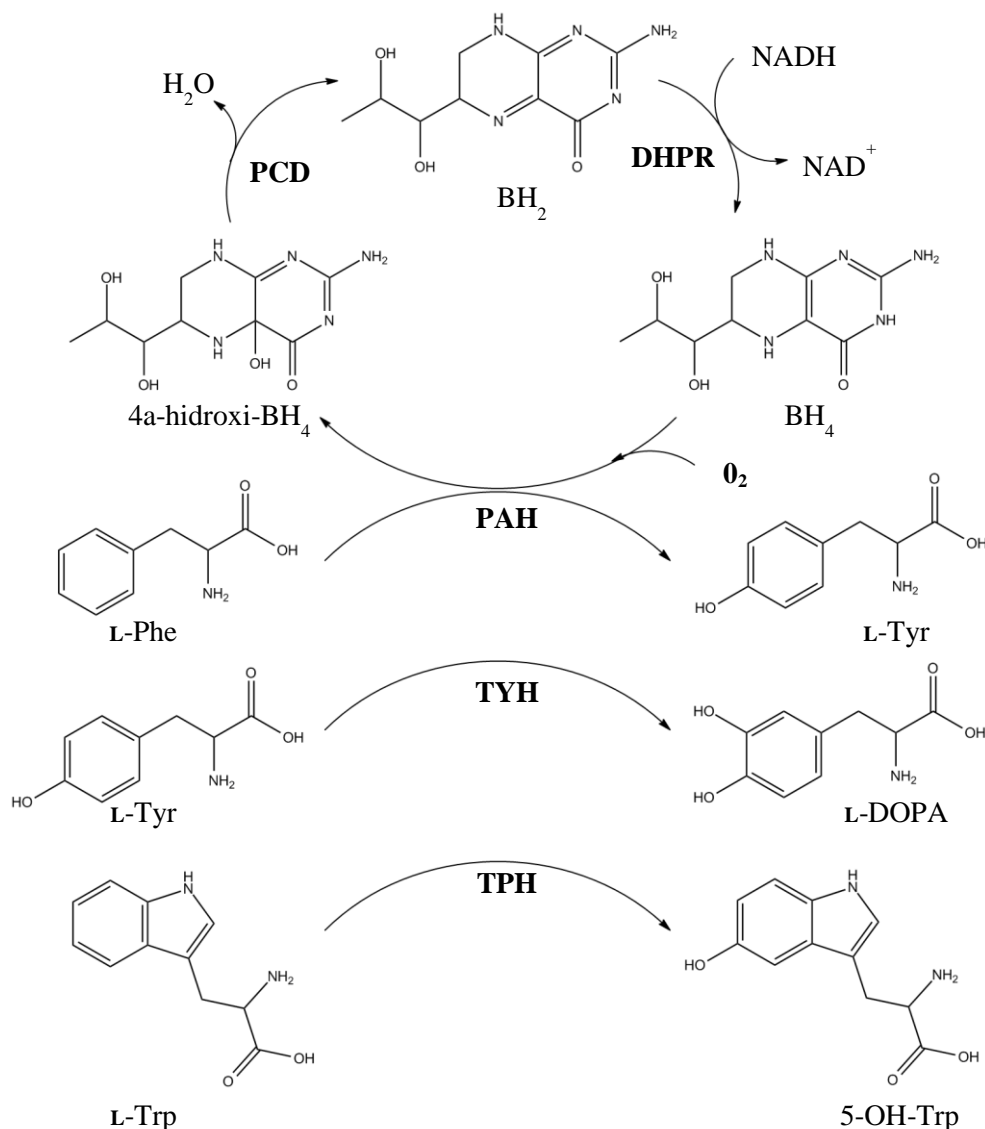


Figura 1 – Mecanismo reaccional simplificado mostrando a hidroxilação da L-Phe, L-Tyr e L-Trp, na presença de tetrahydrobiopterina (BH_4) e oxigénio molecular (O_2), pelas respectivas hidroxilases dos aminoácidos aromáticos: fenilalanina hidroxilase (hPAH), tirosina hidroxilase (TYH) e triptofano hidroxilase (TPH). A regeneração da BH_4 envolve a conversão da 4a-hidroxi- BH_4 (4a-carbinolamina) a dihydrobiopterina oxidada ($q-BH_2$) pela pterina 4a-carbinolamina desidratase (PCD). Esta é por sua vez reduzida a BH_4 pela dihydropteridina redutase (DHPR) num processo dependente de NADH. A L-Tyr é hidroxilada a 3,4-dihydroxifenilalanina (L-DOPA) e o L-Trp a 5-hydroxitriptofano (5-OH-Trp).

As hidroxilases dos aminoácidos aromáticos desempenham um papel preponderante no metabolismo dos mamíferos (Hufton *et al.*, 1995). Como referido anteriormente a hPAH é uma enzima dependente de ferro não hémico, responsável pela hidroxilação da L-Phe a L-Tyr, o primeiro e único passo limitante na completa catabolização da L-Phe. A TYH catalisa a formação de 3,4-dihydroxifenilalanina (L-DOPA) a partir de L-Tyr, o único passo limitante da biossíntese das catecolaminas dopamina, adrenalina e noradrenalina, e a TPH converte o L-Trp em 5-hydroxitriptofano (5-OH-Trp), o primeiro passo na biossíntese do neurotransmissor serotonina (Figura 1).

As três enzimas diferem entre si na sua especificidade para o substrato e nas propriedades reguladoras (Erlandsen e Stevens, 1999). Em solução as AAOH formam homotetrâmeros com massas moleculares entre 204 e 217 kDa. Cada monómero é constituído por 444 a 528 resíduos de aminoácidos, apresentando uma região N-terminal com propriedades reguladoras, uma região central com propriedades catalíticas e uma região C-terminal responsável pela oligomerização (tetramerização). A PAH, a TYH e a TPH apresentam uma elevada homologia em termos de sequência de aminoácidos, especialmente na região do centro catalítico (80% de homologia de sequência e 65% de identidade de sequência, na região catalítica) (Figura 2), o que sugere que tenham evoluído a partir de um gene ancestral comum (proteínas órtologas) (Hufton *et al.*, 1995).

Enquanto, e como referido anteriormente, a deficiência em hPAH é responsável pela PKU, a deficiência em TYH encontra-se associada à distonia dependente de L-DOPA e Parkinsonismo juvenil. Recentemente esta deficiência (TYH) foi também relacionada com a doença afectiva bipolar e com a esquizofrenia (Flatmark e Stevens, 1999).

1.3 Estudos estruturais da hPAH

A hPAH é uma proteína oligomérica cuja estrutura quaternária é estabilizada predominantemente por ligações de van der Waals e pontes de hidrogénio. A proteína recombinante, expressa em *Escherichia coli*, encontra-se em solução num equilíbrio entre homotetrâmeros e homodímeros (80% \rightleftharpoons 20%) (Kowlessur *et al.*, 1996), dependente do pH e da presença de L-Phe (Martinez *et al.*, 1995). Cada subunidade é constituída por 452 aminoácidos, sendo que a massa molecular respectiva é de aproximadamente 52 kDa (50-53 kDa). O homotetrâmero apresenta uma massa molecular de aproximadamente 210 kDa, o que o torna um complexo macromolecular com uma dimensão significativa.

A hPAH, tal como as outras duas hidroxilases de aminoácidos aromáticos, é composta por três domínios (Figura 3): (1) um domínio N-terminal de 12-19 kDa (resíduos 1-142) com propriedades reguladoras (domínio regulador); (2) um domínio catalítico com cerca de 38 kDa (resíduos 143-410) no qual se encontra o centro activo da enzima; e (3) um pequeno domínio C-terminal de aproximadamente 5 kDa, envolvido na oligomerização da enzima (domínio de oligomerização/tetramerização) (resíduos 411-452).

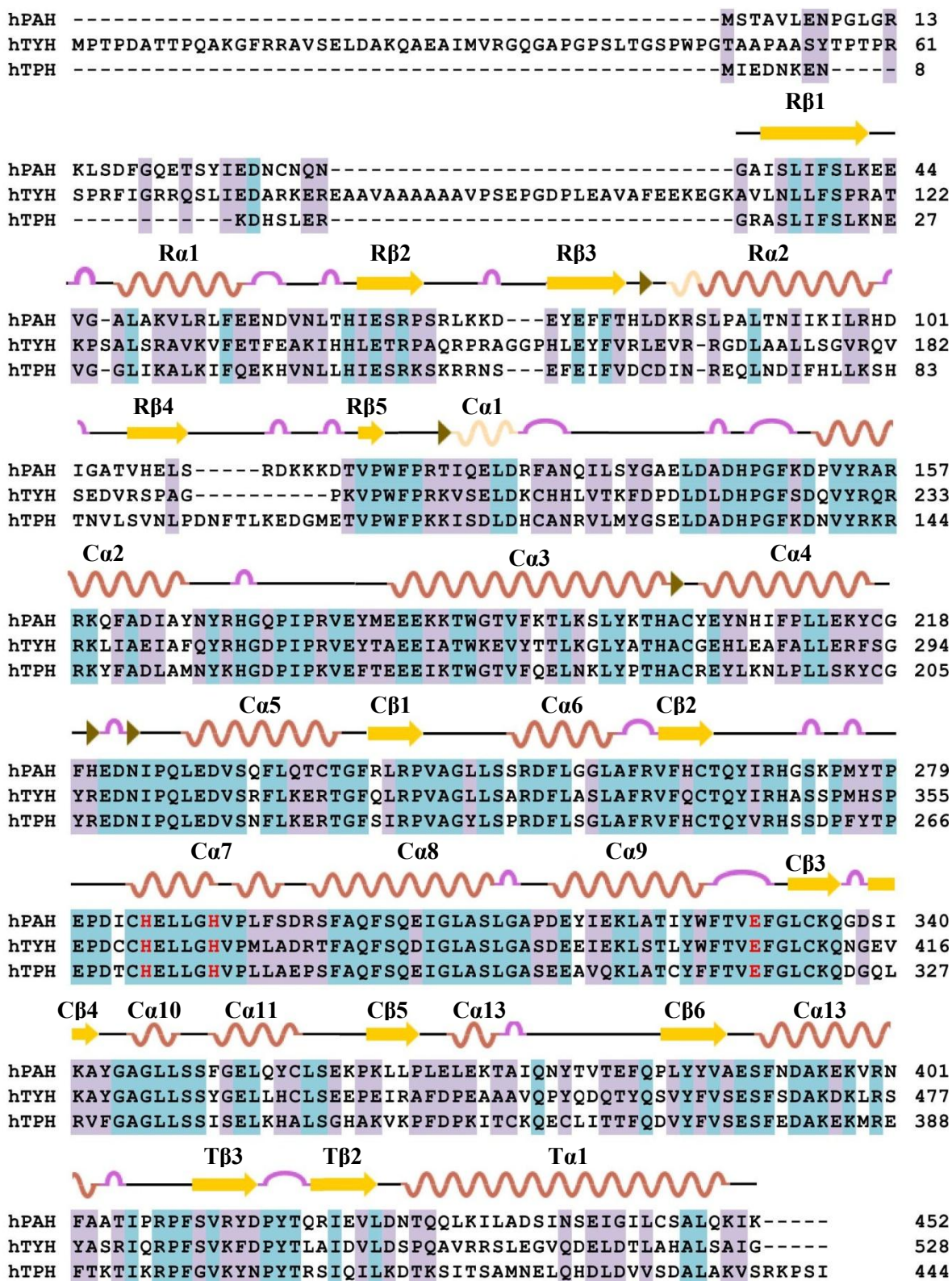


Figura 2 – Alinhamento de seqüências das proteínas humanas PAH, TYH e TPH (UniProt P00439, P07101 e P17752, respectivamente). A estrutura secundária representada foi determinada com base nas coordenadas das estruturas PAH e está numerada seqüencialmente a partir do N-terminal. Os resíduos idênticos nas três estruturas estão coloridos de azul; os resíduos idênticos em duas das seqüências estão coloridos de roxo. Os três resíduos envolvidos na ligação ao átomo de ferro estão apresentados a vermelho. De acordo com Flatmark e Stevens (Flatmark & Stevens, 1999).

Nos últimos anos tem havido um grande incremento na informação estrutural relativa à PAH (Tabela 1). Foram resolvidas estruturas cristalinas de formas truncadas nomeadamente, do domínio catalítico e do domínio de tetramerização da hPAH (Erlandsen *et al.*, 1997; Fusetti *et al.*, 1998), do domínio regulador e catalítico da PAH de rato (rPAH) no estado fosforilado e desfosforilado (Kobe *et al.*, 1999), e também do domínio catalítico da hPAH complexada com inibidores (catecolaminas: adrenalina, noradrenalina, dopamina e L-DOPA) (Erlandsen *et al.*, 1998).

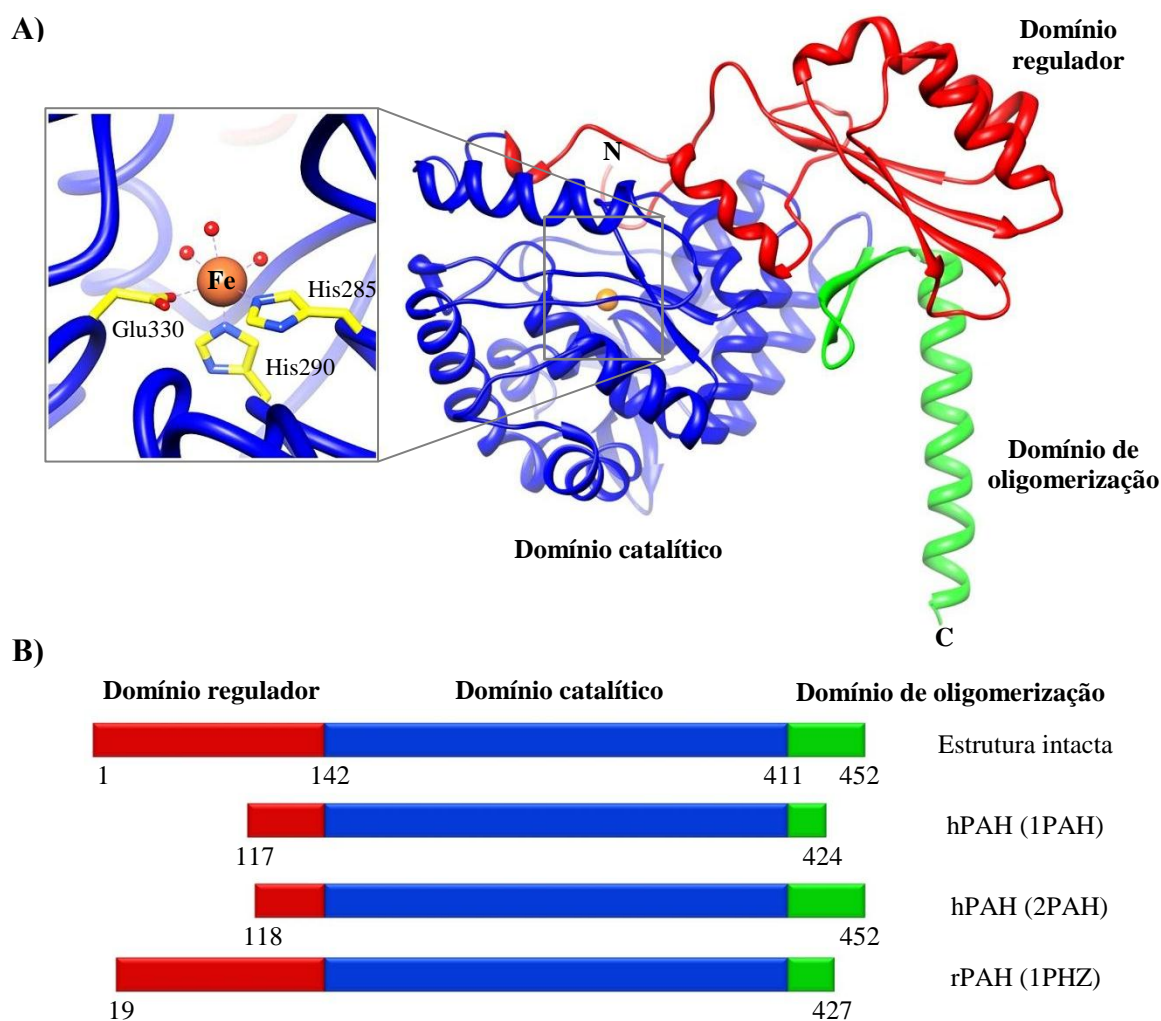


Figura 3 – (A) Representação do modelo composto da hPAH, construído por alinhamento estrutural dos domínios catalíticos das estruturas: hPAH dímérica (2,0Å) (PDB 1PAH), hPAH tetramérica (3,1Å) (PDB 2PAH) e rPAH dímérica (2,2Å) (PDB 1PHZ). Representação de apenas uma subunidade, com átomo de ferro representado a cor-de-laranja. Vista ampliada da estrutura do centro activo em torno do átomo catalítico de ferro. O ferro está coordenado aos resíduos de histidina 285 e 290 e glutamato 330, assim como a três moléculas de água (representadas como esferas vermelhas). (B) Representação comparativa das regiões truncadas usadas na construção do modelo composto, em relação com a forma intacta da hPAH completa e cuja estrutura ainda não foi determinada. De acordo com Erlandsen e Stevens (Erlandsen e Stevens, 1999).

Tabela 1 – Estruturas cristalinas das formas truncadas da PAH humana (hPAH) e de rato (rPAH) resolvidas até à data e depositadas no *Protein Data Bank* (PDB).

Formas truncadas	Unidade Biológica	Resolução (Å)	PDB ID	Referência
hPAH (117-424), Fe(III)	Dímero	2,0	1PAH	(Erlandsen <i>et al.</i> , 1997)
hPAH (118-452), Fe(III)	Tetrâmero	3,1	2PAH	(Fusetti <i>et al.</i> , 1998)
rPAH (19-427) fosforilada, Fe(III)	Dímero	2,2	1PHZ	(Kobe <i>et al.</i> , 1999)
rPAH (19-427) desfosforilada, Fe(III)	Dímero	2,6	2PHM	(Kobe <i>et al.</i> , 1999)
hPAH (117-424), Fe(III), adrenalina	Dímero	2,0	3PAH	(Erlandsen <i>et al.</i> , 1998)
hPAH (117-424), Fe(III), noradrenalina	Dímero	2,0	4PAH	(Erlandsen <i>et al.</i> , 1998)
hPAH (117-424), Fe(III), dopamina	Dímero	2,1	5PAH	(Erlandsen <i>et al.</i> , 1998)
hPAH (117-424), Fe(III), L-DOPA	Dímero	2,5	6PAH	(Erlandsen <i>et al.</i> , 1998)
hPAH (118-424), Fe(III), BH₂	Dímero	2,0	1DMW	(Erlandsen <i>et al.</i> , 2000)
hPAH (118-424), Fe(II)	Dímero	1,7	1J8T	(Andersen <i>et al.</i> , 2001)
hPAH (118-424), Fe(II), BH₄	Dímero	1,5	1J8U	(Andersen <i>et al.</i> , 2001)
hPAH (118-424), Fe(II), BH₄, 3-(2-tienil)-alanina	Dímero	2,5	1KW0	(Andersen <i>et al.</i> , 2002)
hPAH (103-427), Fe(II), BH₄, 3-(2-tienil)-alanina	Dímero	2,0	1MMK	(Andersen <i>et al.</i> , 2003)
hPAH (117-425), Fe(II), BH₄, norleucina	Dímero	2,0	1MMT	(Andersen <i>et al.</i> , 2003)
hPAH A313T^(a) (117-424), Fe(III)	Monómero	2,1	1TDW	(Erlandsen <i>et al.</i> , 2004)
hPAH A313T^(a) (117-424)^b, Fe(III), BH₂	Monómero	2,2	1TG2	(Erlandsen <i>et al.</i> , 2004)

^(a) Alanina na posição 313 foi mutada a treonina (A313T)

Mais recentemente foram também resolvidas estruturas do domínio catalítico da hPAH, complexadas com o cofactor biopterínico no estado reduzido e oxidado (complexos binários) (Erlandsen *et al.*, 2000; Andersen *et al.*, 2001), e complexadas com análogos da L-Phe como a tienilalanina (THA) e a norleucina (complexo ternário) (Andersen *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2003).

Devido a dificuldades de cristalização da forma completa da hPAH humana, não foi contudo ainda possível resolver a estrutura da forma tetramérica intacta. Baseado nas estruturas cristalinas de diversas formas truncadas da hPAH, incluindo os domínios regulador/catalítico da rPAH (Kobe *et al.*, 1999) e os domínios catalítico/tetramerização da hPAH (Erlandsen *et al.*, 1997; Fusetti *et al.*, 1998) pode-se construir, um modelo composto da forma completa tetramérica da hPAH através do alinhamento estrutural dos seus respectivos domínios catalíticos. (Figura 3 e 4 C). A informação que este modelo composto fornece, complementada pelas restantes estruturas resolvidas, tem permitido obter informações extremamente relevantes relativamente à estrutura do centro activo e da ligação do substrato e inibidores, às propriedades reguladoras, assim como para a compreensão das bases moleculares e estruturais do fenótipo HPA/PKU (Erlandsen e Stevens, 1999).

1.3.1 Domínio regulador

A rPAH dimérica truncada (19-427) em ambas as formas fosforilada e desfosforilada, foi expressa em células de insecto, purificada e cristalizada, permitindo assim uma primeira visão do domínio regulador da hPAH. As estruturas foram refinadas a 2,2 Å e 2,6 Å, respectivamente (Kobe *et al.*, 1999) (Figura 4 A).

O domínio regulador apresenta uma estrutura do tipo *sandwich* $\alpha\beta$, construída a partir de um motivo duplo $\beta\alpha\beta$ (topologia $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$). As 4 folhas β antiparalelas são flanqueadas de um lado por duas hélices α , e pelo outro lado pelos segmentos 118-131 e 409-422 do domínio regulador e catalítico/tetramerização, respectivamente. A sequência N-terminal auto-reguladora (ARS) (resíduos 19-33) estende-se ao longo do centro catalítico no domínio catalítico, contactando com resíduos nos segmentos 130-136, 249-252, 315-326 e 376-379 (Horne *et al.*, 2002). Curiosamente, a estrutura $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$, designada por domínio ACT (nome que deriva das enzimas Aspartatocinase, Corismato mutase e TyrA (pfeonato desidrogenase)), foi identificada nalgumas enzimas alóstericas com

características reguladoras. O domínio ACT tem sido associado a enzimas envolvidas na síntese de aminoácidos e purinas sendo identificado como um local de ligação a ligandos (Liberles *et al.*, 2005). Embora sujeito a alguma controvérsia, estudos recentes parecem indicar que o domínio regulador da PAH não apresenta esta propriedade característica do domínio ACT não apresentando portanto nenhum sítio de ligação a ligandos (Liberles e Martinez, 2009).

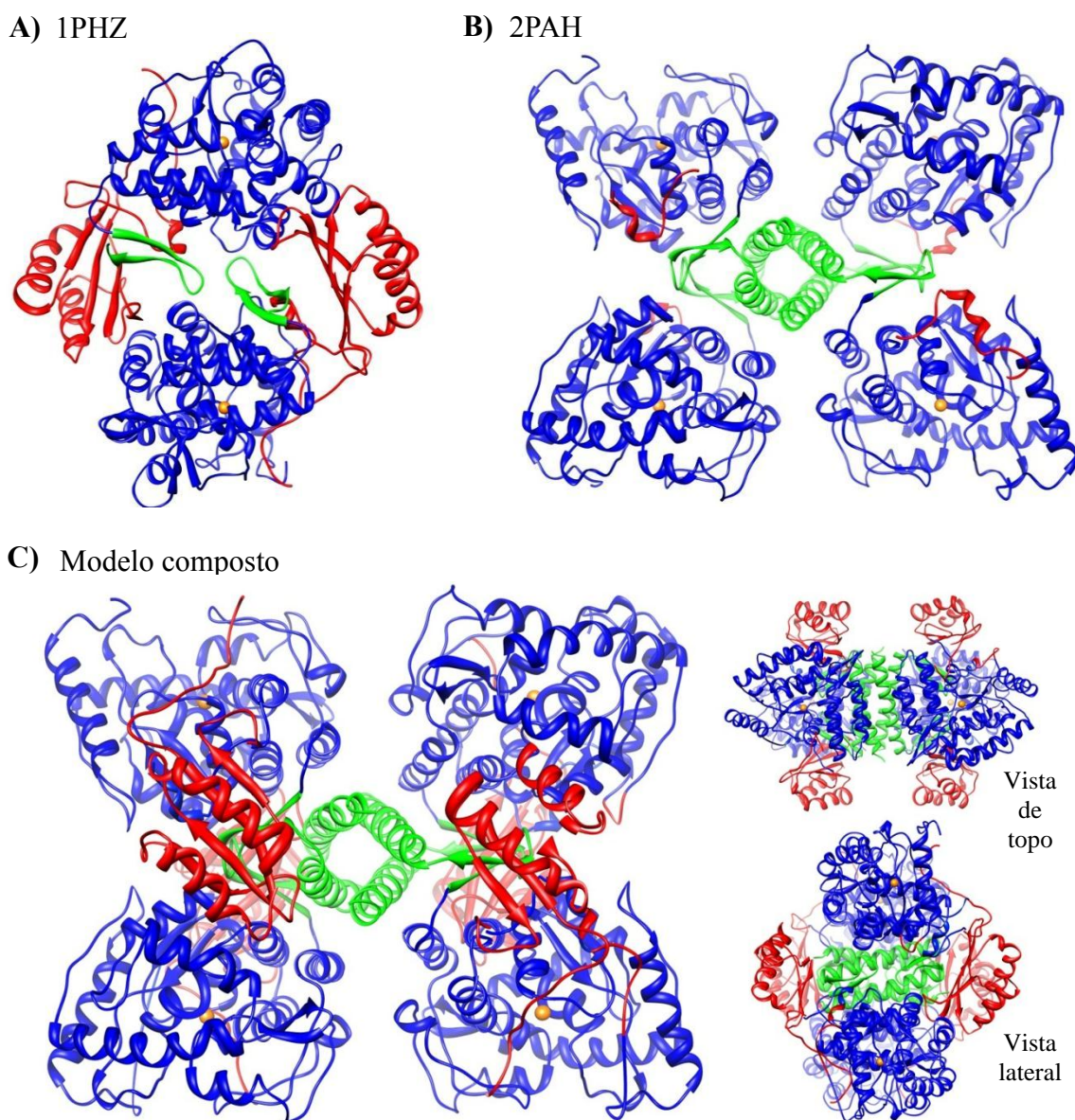


Figura 4 – (A) Estrutura da rPAH dimérica (PDB ID 1PHZ). (B) Estrutura da hPAH tetramérica (PDB 2PAH). (C) Modelo composto da forma intacta da hPAH, construído pela sobreposição dos domínios catalíticos das estruturas 1PHZ, 2PAH e 1PAH (hPAH dimérica). O domínio catalítico está representado a azul. O domínio regulador está representado a vermelho e o domínio de oligomerização está representado a verde. O átomo de ferro está representado como uma esfera cor-de-laranja. Baseado em (Erlandsen e Stevens, 1999).

1.3.2 Domínio catalítico e o centro activo

A forma recombinante dimérica truncada (117-424) da hPAH usada para a análise estrutural (Erlandsen *et al.*, 1997) revela que o domínio catalítico é composto por 13 hélices α e por 6 folhas β (Figura 4 B). O centro activo situa-se numa “bolsa” com 13 Å de profundidade e 10 Å de largura, formando deste modo uma região aberta, acessível ao solvente e a ligandos exógenos. Próximo do centro activo existe um canal de 16 Å de comprimento e 8 Å de largura, através do qual se pensa que o substrato seja conduzido até ao centro activo. Com excepção de três glutamatos, duas histidinas e uma tirosina, a maioria dos 34 aminoácidos que constituem o centro activo são hidrofóbicos. A cobrir a entrada do centro activo, a partir do canal, encontra-se um pequeno *loop* (378-381) cujos átomos apresentam factores B elevados (60-80 Å) quando comparados com os valores médios da estrutura (20-40 Å) o que sugere alguma mobilidade estrutural. O átomo de ferro localiza-se na entrada da bolsa do centro activo, deixando deste modo, espaço para a ligação com a His285, a His290, um átomo de oxigénio do resíduo Glu330 e três moléculas de água. Os ligandos do ferro estão distribuídos de forma octaédrica, numa coordenação hexa-coordenada (Erlandsen e Stevens, 1999) (Figura 3 A). Foi demonstrado por mutagénesis dirigida que ambas as histidinas, His290 e His285, são absolutamente necessárias na ligação ao átomo de ferro (Gibbs *et al.*, 1993).

Um motivo de 27 aminoácidos (Phe263 a Gly289), que é altamente conservado nas hidroxilases de aminoácidos aromáticos, foi sugerido como sendo responsável pela ligação da BH₄ (Hufton *et al.*, 1995) antes de qualquer estrutura ser conhecida. Um total de 10 resíduos deste motivo (Phe263, Cys265, Thr266, Thr278, Pro279, Glu280, Pro281, His285, Glu286 e Gly289), foram sugeridos como tendo grande importância para a ligação da BH₄, e estão presentes no centro activo.

Com base nas estruturas da hPAH duplamente truncadas co-cristalizadas com a forma reduzida do cofactor (BH₄) e com a forma oxidada (BH₂) (Andersen *et al.*, 2001), foi sugerido que a biopterina se liga na segunda esfera de coordenação do ferro catalítico. A biopterina interacciona através de diversas pontes de hidrogénio com duas moléculas de água coordenadas ao ferro, assim como com os oxigénios dos grupos carbonilo da cadeia principal dos resíduos Ala322, Gly247, e Leu249, a amida da cadeia principal da Leu249, o oxigénio da Ser251 e o grupo carbonilo do Glu286 mediado por uma molécula de água (Andersen *et al.*, 2001; Erlandsen *et al.*, 2000) (Figura 5). São observadas algumas

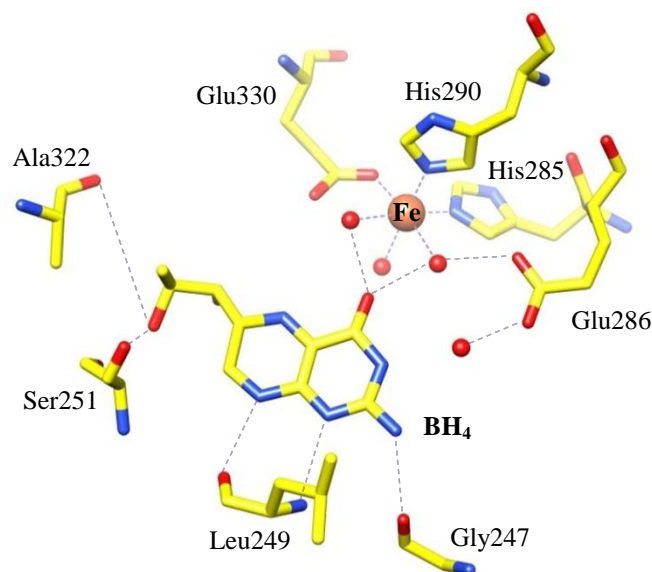


Figura 5 – Vista do centro activo: ligação do átomo de ferro na forma inactiva (ferro oxidado Fe(III)) aos resíduos His285, His290 e Glu330, três moléculas de água e alguns resíduos posicionais que fazem pontes de hidrogénio com o cofactor BH_4 . Representação do complexo binário hPAH-Fe(III)- BH_4 (PDB 1J8U).

alterações conformacionais importantes no centro activo aquando da ligação da biopterina. O *loop* presente entre os resíduos 245-250 move-se na direcção do ferro, permitindo assim que várias pontes de hidrogénio sejam formadas com o anel pterínico. O cofactor está numa conformação ideal para que a ligação do di-oxigénio seja estabelecida entre o ferro e o cofactor, fazendo uma espécie de ponte entre estes.

A estrutura dos complexos ternários da hPAH duplamente truncada complexada com BH_4 e THA ou norleucina (Andersen *et al.*, 2003), revelou que ambos os análogos não fisiológicos da L-Phe ligam no mesmo local, e se encontram posicionados no centro activo. Com base nestes complexos foram identificadas regiões de torção (*hinge bending regions*) que aparentam estar envolvidas nas alterações conformacionais propostas para ligação do substrato à enzima (Flatmark *et al.*, 2001) (Figura 6).

1.3.3 Domínio de oligomerização

A forma truncada da hPAH que inclui o domínio catalítico e o domínio de oligomerização (resíduos 118-452) foi expressa em *Escherichia coli*, e a estrutura foi obtida a 3,1 Å de resolução (Fusetti *et al.*, 1998). Este fragmento da hPAH retém as propriedades catalíticas mas é mais solúvel que a enzima completa (Knappskog *et al.*, 1996).

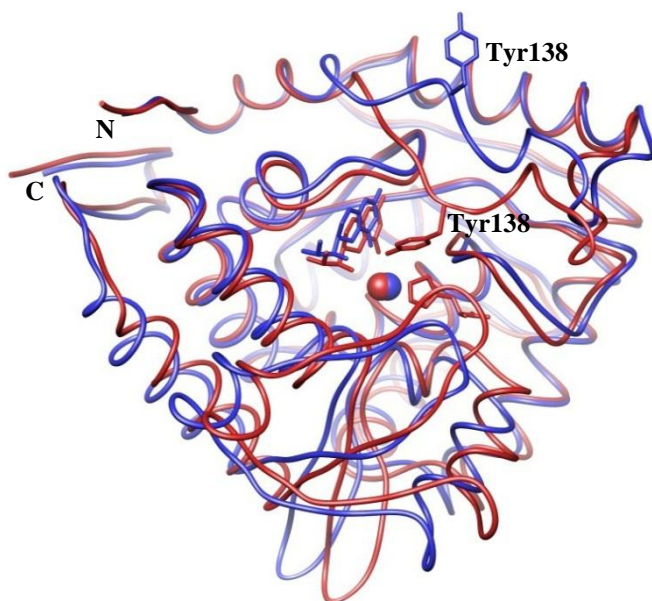


Figura 6 – Sobreposição da cadeia polipeptídica do complexo ternário hPAH-Fe(II)-BH₄-THA representado a vermelho (PDB 1MMK) com a cadeia polipeptídica do complexo binário hPAH-Fe(II)-BH₄ representado a azul (PDB 1J8U) (rmsd 0,882Å). A magnitude das alterações conformacionais desencadeadas pela ligação do análogo do substrato, tienilalanina (THA) (complexo ternário) pode ser observada pela posição do resíduo de tirosina posicional (Tyr138) cuja cadeia lateral foi representada para ambas as estruturas dos complexos.

O domínio de oligomerização é constituído pelo “braço” C-terminal, composto por duas folhas β , formando um barril β , e uma longa hélice α (40 Å). O braço C-terminal estende-se sobre o monómero vizinho, constituindo com as 4 hélices (uma de cada monómero) um motivo *coiled-coil* antiparalelo e empacotado de uma forma bastante apertada, no centro da estrutura (Figura 4 B). Na estrutura da hPAH, o tetrâmero é formado por dois dímeros conformacionalmente diferentes, resultando numa distorção da simetria do homotetrâmero. A sobreposição de dois monómeros, num dos dímeros, mostra que o domínio catalítico e o domínio de tetramerização, se observados separadamente, são idênticos mas adoptam diferentes orientações relativas.

A formação de um tetrâmero funcional pela PAH pode ser descrita como um modelo de movimentação/troca de domínio (*domain swapping*) em que cada elemento de estrutura secundária troca mutuamente a sua posição para promover a oligomerização (Fusetti *et al.*, 1998).

1.3.4 Proteínas ortólogas bacterianas

A recolha de informação estrutural tem sido alargada a proteínas bacterianas ortólogas da hPAH. A função destas enzimas ainda não é clara, mas estudos do sistema hPAH em *Pseudomonas aeruginosa*, e que envolveram estudos de expressão da hPAH e de um ortólogo da PCD (ambos incluídos no mesmo operão), sugerem que ambas as enzimas são necessárias para permitir que o organismo utilize L-Phe como a única fonte de carbono (Leiros *et al.*, 2007).

A determinação da estrutura de proteínas PAHs na sua forma completa de *Chromobacterium violaceum* (CvPAH) e de *Colwellia psychrerythraea 34H* (CpPAH) (Tabela 2), tem fornecido dados importantes quanto à função e enrolamento destas proteínas.

Tabela 2 – Estruturas cristalinas das formas intactas da hPAH ortólogas resolvidas até à data. Estruturas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB).

Formas intactas	Unidade Biológica	Resolução (Å)	PDB ID	Referência
CvPAH (1-297)	Monómero	1,74	1LTU	(Erlandsen <i>et al.</i> , 2002)
CvPAH, (1-297), Fe(III)	Monómero	2,0	1LTV	(Erlandsen <i>et al.</i> , 2002)
CvPAH (1-297), Fe(III), BH ₂	Monómero	1,4	1LTZ	(Erlandsen <i>et al.</i> , 2002)
CpPAH, (1-267), Fe(III)	Monómero	1,5	2V27	(Leiros <i>et al.</i> , 2007)
CpPAH (1-267)	Monómero	1,95	2V28	(Leiros <i>et al.</i> , 2007)

Assim, a CvPAH e a CpPAH apresentam um enrolamento semelhante (Figura 7) e, quando comparadas com a hPAH, possuem cerca de 24 e 17% de identidade de sequência, respectivamente. Estas proteínas, que são funcionais como monómeros, apresentam maior estabilidade geral e maior flexibilidade local no centro activo, apresentando também uma temperatura de desnaturação mais elevada e diferentes velocidades de reacção (Erlandsen *et al.*, 2002; Leiros *et al.*, 2007).

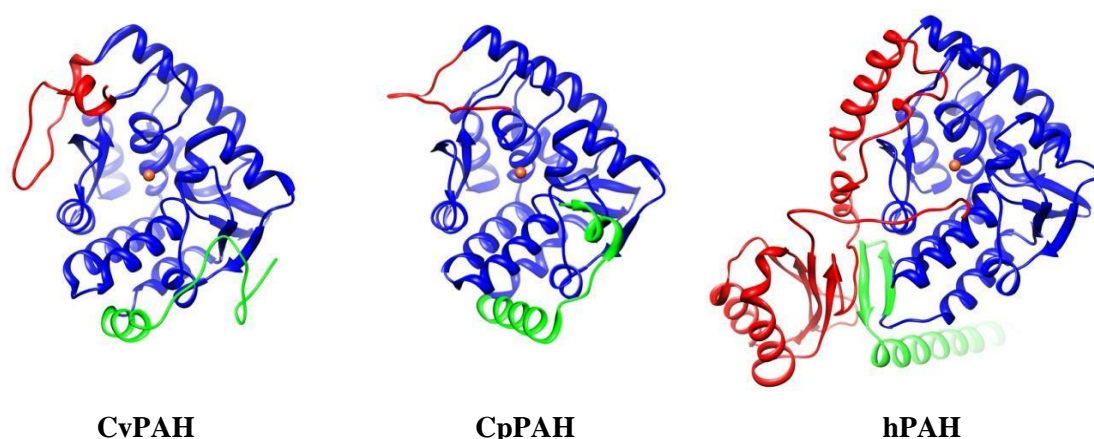


Figura 7 – Representação comparativa das estruturas CvPAH (PDB 1LTV) à esquerda, CpPAH (PDB 2V27) no centro e subunidade do modelo composto da hPAH à direita. O domínio regulador está representado a vermelho, o domínio catalítico está representado a azul e o domínio de oligomerização está representado a verde. O átomo de ferro localizado no centro activo está representado como uma esfera cor-de-laranja.

1.4 Estudos funcionais da hPAH

1.4.1 Mecanismo catalítico

A obtenção de cristais dos complexos binários e terciários da hPAH, quer com ferro e com o cofactor BH_4 (Andersen *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 2002), quer com análogos da L-Phe (Andersen *et al.*, 2003), contribuiu de forma decisiva para a elucidação do mecanismo catalítico desta enzima. Assim, é presentemente aceite que a hPAH apresenta locais específicos de ligação ao substrato, ao cofactor e ao di-oxigénio. É proposto ainda que o ferro desempenhe um papel activo na incorporação do oxigénio. A reacção catalítica consiste na quebra da ligação do di-oxigénio. Um dos oxigénios é incorporado no cofactor para formar o intermediário 4-hidroxi- BH_4 (4-carbinolamina), enquanto que o outro é incorporado no substrato L-Phe dando origem ao produto L-Tyr. A Figura 8 mostra o mecanismo catalítico para a hidroxilação da L-Phe proposto por Andersen e colaboradores (Andersen *et al.*, 2002).

1.4.2 Oligomerização e activação enzimática

Em condições fisiológicas a forma tetraméria da hPAH predomina, enquanto em solução é observado um equilíbrio homodímero/homotetrâmero (Martinez *et al.*, 1995). *In vitro* este equilíbrio pode ser deslocado na direcção da forma tetramérica por incubação com L-Phe ou baixando o pH da solução. Enquanto as formas bacterianas da PAH são activas como monómeros, em mamíferos o dímero é considerado como a unidade estrutural mínima com capacidade de apresentar actividade biológica. No entanto, é reconhecido presentemente que o homodímero e o homotetrâmero apresentam diferentes propriedades enzimáticas (Björge *et al.*, 2001). A forma dimérica da PAH é apenas activada ligeiramente com a pré-incubação com L-Phe, tem uma menor eficiência catalítica e exhibe uma cinética clássica de Michaelis-Menten para a curva de saturação com L-Phe. Pelo contrário, o tetrâmero é activado 5 a 6 vezes com a pré-incubação com L-Phe, demonstrando uma cooperatividade positiva para a ligação ao substrato. Tem sido sugerido que a ligação da L-Phe à PAH é um processo cooperativo homotrópico envolvendo uma transição conformacional lenta, característica de uma enzima alostérica. Assim, a cooperatividade positiva para o seu substrato explica a sua cinética sigmoidal. Para o cofactor BH_4 , observa-se uma cinética hiperbólica, de Michaelis-Menten (Flatmark e Stevens, 1999).

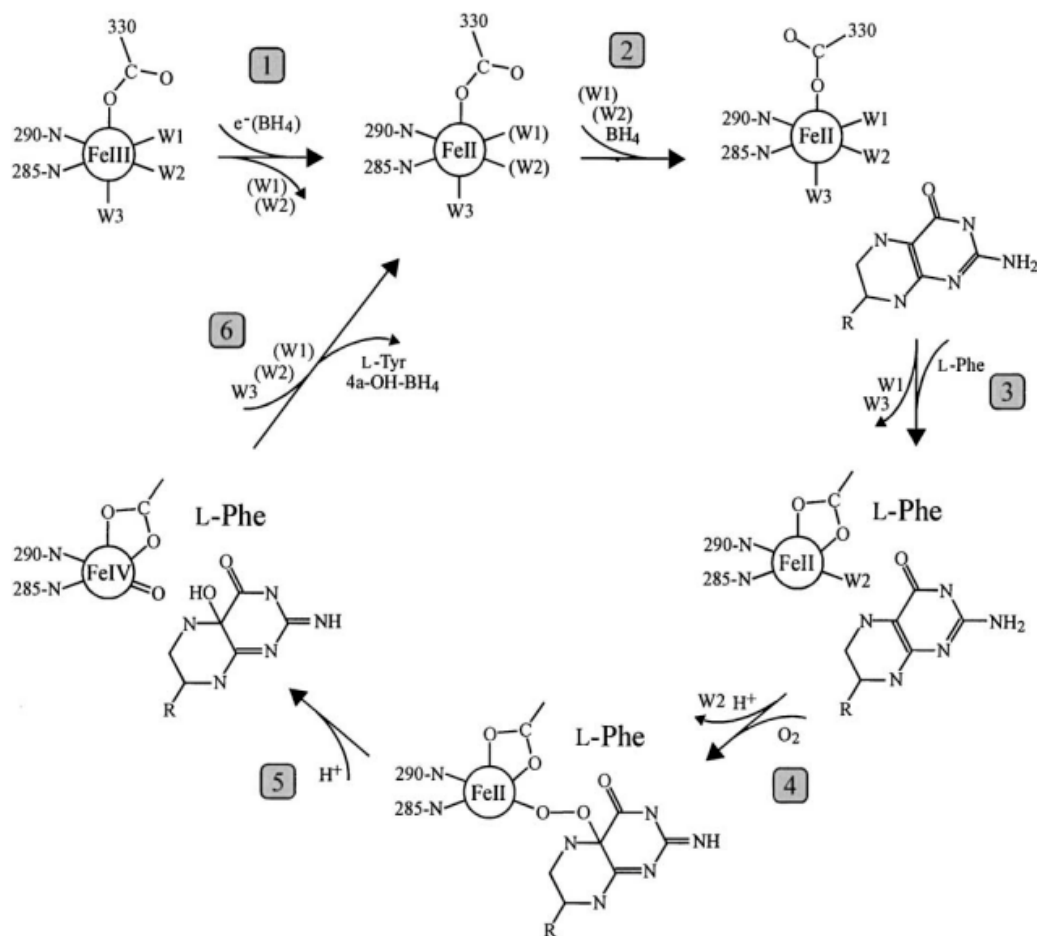


Figura 8 – Mecanismo catalítico proposto para a hidroxilação da L-Phe pela hPAH. O ciclo catalítico consiste na redução do ferro (1) que converte o ferro hexa-coordenado (spin alto Fe(III)) a um estado tetra-coordenado (spin alto Fe(II)). Ligação reversível do BH_4 que resulta num Fe(II) hexa-coordenado e na alteração de coordenação da Glu330 (2). Ligação reversível da L-Phe que produz uma penta-coordenação do ferro (Fe(II)) em forma de pirâmide quadrada distorcida, com uma coordenação bidentada da Glu330 (3). Ligação reversível do di-oxigénio para formar um intermediário penta-coordenado, Fe(II)-O_2 , seguido da formação de um putativo intermediário Fe(II)-O-O-BH_4 (4). Clivagem heterolítica da ligação O-O e formação da 4a-OH-BH_4 e de espécies oxi-fêrris Fe(IV)=O (5). Os produtos são finalmente libertados (6). De acordo com Andersen e colaboradores (Andersen *et al.*, 2002).

A activação pelo substrato tem sido associada a quatro regiões de torção (*hinge bending regions*) inter e intra-domínios, as quais deverão desempenhar um papel importante na transmissão dos movimentos envolvidos nas transições conformacionais (Stokka *et al.*, 2004): 1) resíduos 31-34, pertencentes à ARS; 2) resíduos 111-117, posicionados entre o domínio regulador e o domínio catalítico; 3) resíduos 218-226, posicionados no domínio catalítico; e 4) resíduos 425-429, posicionados na região precedente à hélice anfipática C-terminal envolvida na oligomerização.

A formação do tetrâmero para uma AAOH envolve maioritariamente interações inter-protómero entre as hélices α C-terminal do domínio de oligomerização. Este motivo é composto por aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, posicionados em sítios opostos na hélice α , e contém uma repetição de sete aminoácidos conservados, com cada 3-4 posições ocupadas por resíduos hidrofóbicos e estendendo-se ao longo de três voltas. A formação do complexo macromolecular envolve a interação das hélices α dos diferentes protómeros. Na TYH e na TPH um resíduo de leucina ocupa a quarta posição de cada repetição, formando um *zipper* de leucina, enquanto na PAH a repetição é representada pela leucina e aminoácidos hidrofóbicos como a isoleucina e alanina. Este facto tem sido sugerido como contribuindo para a fraca interação entre os protómeros na PAH tetramérica resultando numa heterogeneidade oligomérica, quando comparado com a TYH e a TPH, que são isoladas apenas exclusivamente com tetrâmeros. Interessantemente, quando um único resíduo de leucina da repetição na TYH é mutado a um resíduo de Ala (como na PAH), a estabilidade do tetrâmero decresce e é observada heterogeneidade oligomérica (Walker *et al.*, 1994).

A fosforilação da PAH, que ocorre apenas num resíduo de serina (Ser16), depende da proteína cinase A dependente de cAMP e é responsável pela activação da enzima. Deste modo, foi proposto que esta fosforilação medeia a regulação catalítica da PAH. Estudos adicionais do papel da Ser16 na regulação da actividade da PAH demonstraram que a introdução de um grupo fosfato carregado negativamente na Ser16 ou a incorporação por mutagénesis dirigida de aminoácidos carregados negativamente neste local levam a uma activação da enzima (Kowlessur *et al.*, 1995), o que sugere um envolvimento de interações electrostáticas entre o domínio catalítico e regulador da PAH neste fenómeno.

A PAH isolada a partir de fígado humano assim como a PAH recombinante expressa em *E. coli* após longos períodos de indução a 37°C (> 8h), apresenta múltiplas formas moleculares com a mesma massa molecular mas diferentes pontos isoelétricos (micro-heterogeneidade) (Solstad e Flatmark, 2000). Estas formas resultam do fenómeno de desaminação não-enzimática de resíduos lábeis de asparagina, particularmente a Asn32 e Asn376. Esta modificação pós-tradução, que se pensa estar relacionada com o envelhecimento e a renovação celular (Solstad *et al.*, 2003), poderá ser um dos factores que contribuem para a dificuldade de obtenção de cristais da forma de hPAH completa.

1.5 Bases estruturais da PKU

O gene humano *PAH* localiza-se no braço curto do cromossoma 12 (região 12q24.1), cobre uma sequência de DNA genómico de 90 kb e contém 13 exões e 12 intrões, sendo transcrito num mRNA com cerca de 2,4 kb (Konecki *et al.*, 1992). O cDNA da hPAH (GenBank U49897) foi clonado e a sequência nucleotídica determinada em 1985 por Kwok e colaboradores (Kwok *et al.*, 1985). As primeiras mutações no gene foram identificadas nos anos 90, dando-se então início à expressão *in vitro* dos diferentes alelos mutantes com intuito de determinar o impacto das várias mutações na função da PAH. Estabeleceu-se o “*PAH Mutation Analysis Consortium*”, uma base de dados *online* (Scriver *et al.*, 2003) onde são depositadas as mutações identificadas no *locus PAH*. Foi assim revelada a enorme heterogeneidade alélica da PKU.

Presentemente estão registadas no “*PAH Locus Knowledgebase*” cerca de 560 mutações diferentes (Setembro de 2010) no gene *PAH* (Anexos 7.1). Cerca de dois terços são mutações *missense*, responsáveis pela substituição de apenas um aminoácido na proteína; as restantes incluem deleções, inserções, mutações *nonsense*, mutações silenciosas e mutações em locais de *splicing*. Embora tenham sido identificadas mutações ao longo de todo o gene, observa-se uma maior percentagem destas na segunda metade (exões 5 a 12) (Erlandsen *et al.*, 2003).

Em Portugal, o espectro mutacional da PKU é bastante alargado (21 mutações diferentes), mas apenas um pequeno número de mutações apresentam uma frequência superior a 5%. As mutações *missense* mais frequentes são a R261Q (16,3%), V388M (9,7%), R270K (9,7%) e I65T (8,2%) (Vilarinho *et al.*, 2006). De entre estas mutações as R261Q e I65T são também das mais prevalentes a nível Mundial. As mutações V388M (Rivera *et al.*, 1998) e R270K terão tido a sua origem geográfica na Península Ibérica (Vilarinho *et al.*, 2006), tendo a mutação R270K, em particular, sido apenas identificada em doentes portugueses ou de origem portuguesa.

Em termos gerais, as mutações no gene *PAH* que originam um fenótipo HPA/PKU levam à tradução de uma proteína mutante que apresenta uma actividade enzimática reduzida e/ou uma estabilidade alterada, sendo que algumas mutações são capazes de alterar o estado oligomérico da proteína. Assim, foram caracterizados três grupos de mutações HPA/PKU, de acordo com o comportamento cinético e/ou estabilidade que as

proteínas mutantes apresentam. O primeiro grupo envolve mutações que afectam quer a cinética quer a estabilidade proteica; o segundo grupo descreve mutações estruturalmente estáveis que apresentam propriedades cinéticas alteradas; e finalmente o terceiro grupo que engloba mutações que exibem cinéticas normais, mas que apresentam uma reduzida estabilidade *in vitro*. Com base no modelo composto da forma intacta da PAH (Erlandsen e Stevens, 1999), as mutações que causam HPA/PKU afectam cinco diferentes categorias de resíduos: 1) resíduos localizados no centro activo; 2) resíduos estruturais; 3) resíduos envolvendo interacções entre domínios; 4) resíduos que interactivam com a ARS na extremidade N-terminal; 5) resíduos na interface entre os monómeros e entre os dímeros.

1.6 Cristalografia de raios-X

A cristalografia de raios-X (Rhodes, 2006) é a técnica experimental que mais tem influenciado a biologia estrutural, contribuindo grandemente para o estudo de macromoléculas, nomeadamente a sua estrutura tridimensional. O conhecimento da estrutura de proteínas, ácidos nucleicos, vírus e outros complexos macromoleculares conseguidos pela cristalografia de raios-X tem permitido compreender uma panóplia de processos biológicos. Tornando-se assim essencial, a cristalografia de proteínas é aplicada ao estudo da arquitectura básica das proteínas, bem como estudar, num detalhe de nível atómico, os centros catalíticos de enzimas, a interacção entre proteínas e moléculas de menores dimensões, tendo igualmente grande importância no desenvolvimento de fármacos (*drug design*) (Tickle *et al.*, 2004). O conhecimento da estrutura tridimensional permite ainda estabelecer relações entre a sequência primária, a estrutura e a função.

Os principais passos envolvidos na resolução da estrutura tridimensional de proteínas por análise cristalográfica (Figura 9) envolvem primeiramente a obtenção de proteína purificada, sendo necessário seguidamente proceder à sua cristalização numa forma adequada à recolha de dados de difracção de raios-X. Uma vez obtidos monocristais da proteína purificada, medem-se as direcções e intensidades dos raios-X difractados por esses cristais. Por tratamento matemático dos dados obtidos é assim calculado um mapa de densidade electrónica correspondendo este à “imagem” do conteúdo do cristal. Por interpretação dos mapas de densidade electrónica, isto é, por construção de um modelo molecular consistente com a imagem, é possível assim chegar a um modelo atómico. Após

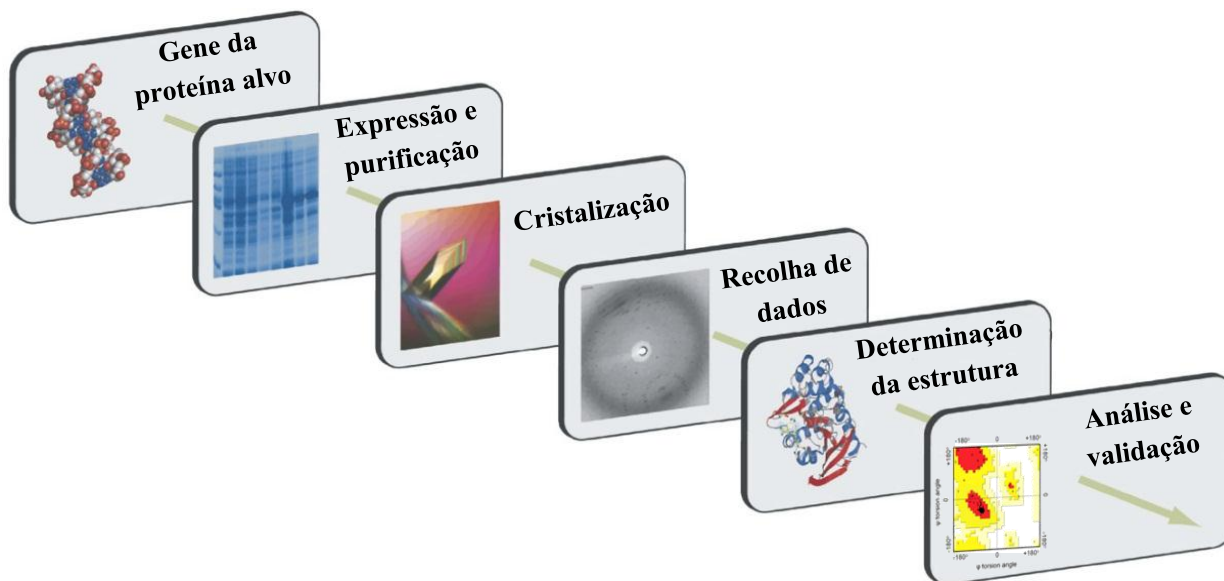


Figura 9 – Principais passos envolvidos na resolução da estrutura tridimensional de proteínas. Complementados com o trabalho desenvolvido *in silico* (bioinformática e *drug design*), a resolução da estrutura 3D de uma proteína envolve a expressão e purificação da proteína alvo, a sua cristalização, seguido da recolha de dados de difracção de raios-X. Estes dados permitem o cálculo dos mapas de densidade electrónica que possibilita a construção de um modelo atómico. Este modelo é sujeito seguidamente a um processo de análise e refinamento cristalográfico que origina um modelo final. Este modelo final permite a análise estrutural (significado biológico) e a publicação da estrutura resolvida.

um longo processo de análise e refinamento cristalográfico é assim obtido um modelo final, consistente com a imagem e quimicamente realista.

A qualidade do modelo final depende não só dos dados experimentais iniciais, como também de parâmetros otimizados durante os processos de cálculo e análise cristalográfica.

1.6.1 Cristais de proteína

Sob determinadas circunstâncias, diversas substâncias moleculares, incluindo proteínas, solidificam para formar cristais. A característica fundamental de um cristal é assim a sua estrutura interna, tridimensionalmente ordenada e periódica, na qual as moléculas estão empacotadas e unidas por meio de interacções não covalentes. Cada uma das menores unidades do cristal que se repete no espaço é designada de célula unitária e é caracterizada por 3 vectores \underline{a} , \underline{b} e \underline{c} e 3 ângulos $\underline{\alpha}$, $\underline{\beta}$ e $\underline{\gamma}$.

A estrutura frágil de um cristal de proteína, resulta de interacções fracas, maioritariamente por pontes de hidrogénio nos átomos à superfície da proteína, por vezes mediados por moléculas de água. Assim, as moléculas formam uma estrutura pouco

compacta com cavidades e canais preenchidos por solvente, que ocupa entre 40-60 % do volume do cristal, possibilitando a incorporação de pequenas moléculas nos canais de solvente formados.

Cristalização

A obtenção de monocristais é o processo menos compreendido em todos os passos envolvidos na resolução da estrutura de proteínas. A cristalização é maioritariamente um processo de tentativa e erro e consiste em atingir lentamente um estado de solubilidade mínima, alcançando-se assim um certo grau de sobressaturação. O ideal é atingir o ponto de saturação muito lentamente de modo a facilitar a ordenação das moléculas na rede cristalina. Assim a cristalização de proteínas envolve uma precipitação lenta e controlada, partindo de uma solução aquosa, em condições que não desnaturem a proteína.

Os métodos empregues na cristalização de proteínas envolvem a variação de um grande número de condições experimentais, nomeadamente o pH, tipo e concentração de agente precipitante, força iónica (sais), temperatura, etc. Um grande número de substâncias causa a precipitação proteica. Os compostos iónicos (sais) precipitam proteínas pelo processo de *salting out*. Os solventes orgânicos também causam a precipitação proteica pela interacção com porções hidrofóbicas da proteína. O polímero solúvel PEG é amplamente usado por ser um potente precipitante mas um fraco desnaturante.

As condições de cristalização iniciais são geralmente identificadas com recurso ao uso de ensaios de varrimento inicial (*screenings* comerciais baseados na aproximação da matriz esparsa (Jancarik e Kim, 1991)), nos quais se varia uma larga variedade de precipitantes a diferentes concentrações, diferentes tampões a diferentes pHs, assim como, compostos aditivos (pequenas moléculas e iões) (Durbin e Feher, 1996), representando uma grande variedade de potenciais condições de cristalização.

Uma técnica de cristalização amplamente usada é a difusão em vapor, pelo método de gota suspensa (Figura 10). Neste método o reservatório contendo a solução precipitante é selado com uma lamela contendo a mistura de solução do reservatório e proteína (gota suspensa). Neste sistema fechado, a difusão de vapor (evaporação e condensação) provoca uma transferência de água da solução proteica da gota para a solução do reservatório, até que a concentração do precipitante seja igual em ambas as soluções.

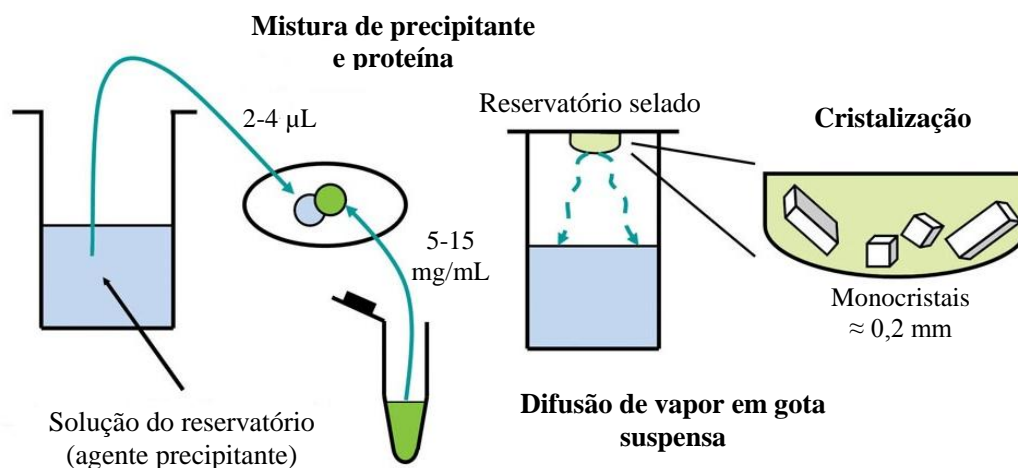


Figura 10 – Representação esquemática de um ensaio de cristalização pela técnica de difusão em vapor, em gota suspensa.

Uma vez atingido este equilíbrio pode-se formar um precipitado amorfo ou microcristalino ou, em alguns casos, material cristalino. De modo geral, após um primeiro conjunto de ensaios torna-se necessário refinar determinados parâmetros de modo a otimizar as condições preliminares até que se obtenham cristais de boa qualidade. De modo geral, a cristalografia de proteínas requer um cristal com 0,2 mm na sua menor dimensão, embora os métodos modernos de recolha de dados permitam, em alguns casos, a recolha de dados para cristais de menores dimensões.

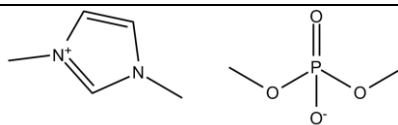
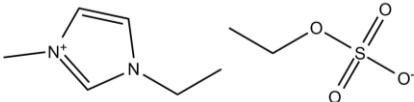
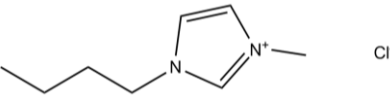
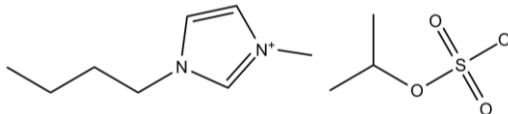
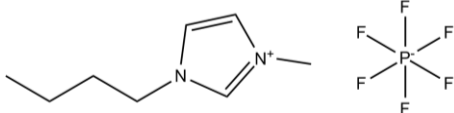
Algumas características visíveis do cristal incluem a nitidez óptica, faces lisas, e arestas bem definidas. Cristais com frestas ou cristais gémeos não são susceptíveis à recolha de dados de difracção de raios-X. No entanto, o critério chave que decide a utilidade dos cristais observados é o modo como difractam os raios-X.

De um modo geral pode assumir-se que quanto maior for a pureza da proteína maior será a probabilidade de se obterem cristais únicos com uma estrutura interna tridimensionalmente ordenada e periódica.

Na procura de novos protocolos para a cristalização foram testados líquidos iónicos (IL) como aditivos da cristalização (Tabela 3). Os IL são sais orgânicos líquidos à temperatura ambiente, que são geralmente compostos por um catião orgânico (e.g. 1-n-butil-3-metilimidazol [C_4mim]) e uma grande variedade orgânica/inorgânica de aniões (e.g. Cl^- , PF_6^- , BF_4^- , metil-etil- sulfato [MEES]).

Devido às suas características únicas, como a sua solubilidade, polaridade e hidrofobicidade, têm diversas aplicações, podendo as suas características ser ainda ajustadas por selecção de um catião ou anião específico. O uso de IL na estabilização proteica (Lange *et al.*, 2005; Kragl *et al.*, 2002) e na cristalização de algumas proteínas padrão tinha sido já descrito (Pusey *et al.*, 2007).

Tabela 3 – Forma estrutural dos líquidos iónicos usados durante este trabalho de investigação.

Líquido iónico	Forma estrutural
[C ₁ min][DMP]	
[C ₂ min][C ₂ SO ₄]	
[C ₄ min][Cl]	
[C ₄ min][MEES]	
[C ₄ min][PF ₆]	

Manuseamento e armazenamento dos cristais

O manuseamento, armazenamento e a montagem dos cristais para análise cristalográfica requer o uso de técnicas muito suaves.

Os cristais de proteína são muito mais frágeis do que os cristais inorgânicos, de modo que uma suave pressão com uma agulha é suficiente para esmagar um cristal de proteína. Esta característica dos cristais de proteína permite uma diferenciação entre estes e os cristais inorgânicos que se podem também observar numa experiência de cristalização. Para diferenciar os cristais observados, usa-se também uma solução corante que entra nas largas cavidades e canais de solvente, apenas presentes nos cristais de proteína, ou a birrefringência inerente aos cristais que é bastante maior para os cristais de sal.

Os cristais de proteína são geralmente recolhidos e estabilizados numa solução de estabilização (*harvesting buffer*). Esta solução é análoga à solução mãe onde o cristal foi observado, sendo que se aumenta a concentração do agente precipitante, de modo a evitar a dissolução do cristal. Os cristais são seguidamente transferidos para uma solução estabilizante contendo, glicerol, xilitol, paratona (óleo), açúcares ou alguns agentes precipitantes como o PEG, que apresentam propriedades crio-protectoras, prevenindo a formação de gelo durante o congelamento. Depois de se transferir o cristal para a solução crio-protectora, este é montado num pequeno *loop* circular de *nylon*, onde permanece suspenso num pequeno filme de solvente. O cristal é depois rapidamente congelado em azoto líquido e armazenado.

1.6.2 Difracção de raios-X

A irradiação de um cristal com raios-X provoca um efeito de dispersão. Os raios-X são dispersos pelos electrões dos átomos. A interferência das ondas difractadas pelas moléculas que constituem o cristal produz um padrão característico conhecido como padrão de difracção.

Existe uma relação inversa entre o espaçamento das células unitárias na rede cristalina, chamada a rede real, e o espaçamento das reflexões no filme de detecção, chamada rede recíproca.

A difracção de raios-X foi explicada por L. Bragg, que demonstrou que os ângulos com que emergem os feixes difractados por cristais poderiam ser calculados tratando o fenómeno da difracção como uma reflexão por conjuntos de planos, paralelos e equivalentes, definidos pelos átomos de um cristal. Os raios-X reflectidos por planos adjacentes percorrem diferentes distâncias e Bragg demonstrou que a difracção ocorre apenas quando a diferença da distância percorrida é um múltiplo do comprimento dos raios-X (interferência construtiva).

Um cristal de proteína contém múltiplas moléculas ordenadas numa rede tridimensional ordenada, com orientações idênticas, de modo que cada reflexão resulta da interferência dos raios-X que emergem de todos os átomos, com o mesmo ângulo de difracção. A cada reflexão podem ser atribuídas três coordenadas tridimensionais ou índices h , k , e l no espaço tridimensional imaginário do padrão de difracção (espaço

recíproco). Os parâmetros que podemos medir e analisar no padrão de difracção de raios-X são a posição hkl e a intensidade I_{hkl} de cada reflexão.

1.6.3 Medição dos dados de difracção

Para medição dos dados de difracção o cristal é montado e alinhado entre a fonte de raios-X e o detector. Para tal é necessária uma aparelhagem constituída por fonte de raios-X, dispositivos ópticos que permitem colimar os raios-X, dispositivos para movimentar e orientar o cristal (goniómetro) e um detector de raios-X.

Os raios-X são radiação electromagnética de comprimento de onda de 0.1-100Å, sendo produzidos por bombardeamento de um alvo metálico (ânodo) com electrões acelerados por um campo eléctrico (Rhodes, 2006). Instalações de grande porte como as de um sincrotrão produzem raios-X de alta intensidade e permitem assim a recolha de dados de difracção a maior resolução (Sorensen *et al.*, 2006). Esta radiação permite otimizar experiências de difracção em especial para cristais pequenos ou complexos macromoleculares muito grandes. As partes ópticas de um difractómetro incluem, monocromadores, filtros e espelhos, destinados a direccionar e otimizar a intensidade do feixe. Para a recolha de dados de difracção de raios-X, o cristal é montado numa cabeça goniométrica, que permite um ajuste muito preciso do cristal por meio de movimentos angulares em direcções perpendiculares. O cristal assim montado é colocado num sistema de círculos móveis, chamado o goniostato, o qual permite uma movimentação do cristal em qualquer direcção em relação ao feixe de raios-X. A grande intensidade dos raios-X usados na recolha de dados requer o uso de uma corrente azoto (temperatura de -100°C) que preserva o cristal. A detecção dos raios-X difractados é feita em detectores de área electrónicos cujos sinais detectados são directamente fornecidos a um computador numa forma digitalizada.

1.6.4 Determinação estrutural

Uma vez que cada reflexão é constituída por um feixe de raios-X, isto é, radiação electromagnética, os cálculos tratam todas as reflexões como ondas, portanto como funções periódicas. Fisicamente as ondas difractadas podem ser descritas como transformadas de Fourier da densidade electrónica. Assim a inversa da transformada de Fourier descreve a densidade electrónica (imagem do cristal) em função das ondas difractadas. Isto significa que se conhecermos as amplitudes (intensidade) e as fases das

ondas difractadas podemos calcular um mapa de densidade electrónica. No entanto a experiência de difracção apenas nos permite obter as posições e intensidades das reflexões, mas não os respectivos ângulos de fase. Aqui reside o problema da fase em cristalografia. Para resolver este problema são necessários métodos que permitem obter informação das fases, ainda que aproximada. Os métodos utilizados são a substituição isomórfica, a dispersão anómala e a substituição molecular (não descritos neste resumo). Uma vez obtida uma aproximação das fases, pode-se então calcular o mapa de densidade electrónica. A interpretação deste mapa está dependente da qualidade dos dados experimentais. A construção de um modelo consiste em traçar a cadeia polipeptídica da sequência de aminoácidos, ajustando as cadeias laterais na densidade electrónica. A interpretação dos mapas de densidade electrónica é um processo progressivo. O modelo construído é submetido a refinamento cristalográfico, de modo a melhorar a sua qualidade final. O modelo final tem de ser consistente com o mapa de densidade iteractivamente calculado e quimicamente realista.

2 OBJECTIVOS

O conhecimento das estruturas cristalinas de formas truncadas da PAH humana e de rato tem contribuído para o estabelecimento da base estrutural da deficiência em hPAH e para a elucidação do mecanismo catalítico daquela enzima.

Contudo, uma estrutura cristalina da forma intacta não foi ainda publicada e até que tal seja uma realidade, a discussão acerca dos efeitos das mutações PKU/HPA e dos sítios de ligação do substrato, do cofactor e inibidores será, em grande parte, especulativa. Por estas razões, a obtenção da estrutura cristalina da hPAH é ainda de grande interesse uma vez que irá permitir obter informação extremamente valiosa, nomeadamente quanto à: estrutura do centro activo; identificação de resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise enzimática e a sua regulação; interacção com o substrato e inibidores.

A observada instabilidade da proteína, a heterogeneidade presente na estrutura quaternária (mistura de dímeros e tetrâmeros), assim como a micro-heterogeneidade, têm sido sugeridos como factores responsáveis pela dificuldade na obtenção de cristais únicos da hPAH completa.

Neste sentido, o objectivo principal deste trabalho é a obtenção da estrutura completa da hPAH tetramérica usando para isso duas formas mutantes quiméricas C29S e E360K. O cumprimento desta meta engloba a concretização dos seguintes objectivos:

1) Transpor o “problema” da heterogeneidade oligomérica e da micro-heterogeneidade, expressando e caracterizando duas proteínas hPAH quiméricas variantes, produzidas por mutagénese dirigida, hPAH C29S e hPAH E360K (mutagénese dirigida);

2) Obter uma solução homogénea, pura e estável das proteínas recombinantes, aumentando desta forma a probabilidade de se conseguirem cristais únicos bem ordenados da hPAH completa (expressão e purificação das proteínas recombinantes);

3) Caracterizar as proteínas recombinantes de modo a avaliar as suas características cinéticas, o seu perfil de oligomerização e o seu perfil de estabilidade térmica (caracterização bioquímica/enzimática das proteínas recombinantes);

4) Obter monocristais susceptíveis de produzir dados de difracção de raios-X viáveis, sendo para tal iniciados ensaios de cristalização, na presença de aditivos e agentes estabilizantes (ensaios de cristalização e análise por cristalografia de raios-X);

5) Interpretar funcionalmente as estruturas 3D resolvidas e correlacioná-las com os estudos funcionais (caracterização estrutural das proteínas recombinantes);

A informação estrutural obtida irá contribuir para uma completa elucidação das bases moleculares do fenótipo HPA/PKU e do mecanismo subjacente às diferentes respostas à terapia com o cofactor natural BH₄. Adicionalmente, a produção das formas estáveis da proteína hPAH e a sua caracterização estrutural e funcional tem como objectivo último o desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica, a terapia enzimática de reposição por formulação e libertação controlada da hPAH recombinante, para o tratamento dos doentes PKU.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Constructs* de expressão

As diferentes formas de hPAH recombinante em estudo foram produzidas em células de *Escherichia coli* TOP10 (F-, *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139 (ara-leu)*7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*), provenientes da Invitrogen. O cDNA hPAH (GenBank U49897) encontrava-se já clonado no local *Bam*HI do sítio de clonagem múltipla (MCS) do vector de expressão procariota pTrcHisB (Invitrogen) (Leandro *et al.*, 2000). Este vector apresenta a 5' do MCS (Figura 27; Anexo 7.2): (1) o promotor *trc* (P_{trc}), constituído por uma parte da sequência do promotor *trp* e parte da sequência do promotor *lac* (*trp-lac*); (2) a sequência do gene *LacI^f* que codifica a proteína repressora *Lac*; (3) um potenciador de tradução, proveniente do gene *10* do bacteriófago T7; (3) a sequência de reconhecimento de ligação ao ribossoma (RBS); (4) o codão de iniciação da tradução ATG; (5) uma sequência de seis codões CAT que codifica 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 (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*; IMAC); (6) a sequência codificante do epítipo Xpress (Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) e; (7) a sequência codificante do péptido reconhecido pela enterocinase (EK; Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-↓-X) e que permite a posterior clivagem e remoção do péptido de fusão. Este vector apresenta ainda a marca de resistência à ampicilina e a origem de replicação ColE1.

Na preparação das duas formas mutantes hPAH C29S e hPAH E360K, foi usado o sistema de mutagénese dirigida *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene) e os primers apresentados na Tabela 4 de acordo com o descrito (Coelho, 2005; Nascimento *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 2007).

Tabela 4 – Oligonucleótidos utilizados na reacção de mutagénese dirigida.

<i>Primers</i>	Sentido	Posição no cDNA	Sequência (5' – 3') ^(a)
C29S	<i>Forward</i>	67-100	GCTATATTGAAGACAAC <u>TCGAATCAA</u> AATGGTGC
C29S	<i>Reverse</i>	100-67	GGCACCATTTTGATT <u>CGAGTTGTCTT</u> CAATATAGC
E360K	<i>Forward</i>	1065-1098	CAGTACTGCTTATCA <u>AGAAGCCAA</u> AGCTTCTCC
E360K	<i>Reverse</i>	1098-1065	GGAGAAGCTTTGGCTTCTT <u>TGATAAGC</u> AGTACTG

^(a) Os nucleótidos mutados encontram-se sublinhados.

3.2 Expressão das proteínas recombinantes

Para proceder à expressão das proteínas hPAH_{wt} e das formas mutantes, uma alíquota de 100 µL de células de *E. coli* TOP10 competentes, foram transformadas com 10 ng de DNA respectivo. De cada placa foi seleccionada uma colónia isolada para inoculação de 5 mL de meio de cultura LB contendo 50 µg/mL de ampicilina. Após incubação com agitação, durante a noite, a 37 °C a suspensão bacteriana foi diluída para 1 L (1:200) no mesmo meio de cultura, tendo sido colocada em agitação constante (< 200 rpm; agitador orbital *Certomat Mo*) até apresentar uma absorvância a 600 nm de ≈0,6 ($A_{600\text{ nm}}$). Neste momento, a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de 1 mM de isopropil-1-tio-β-D-galactosídeo (IPTG; Nzytech), sendo também adicionado 0,1 mM de sulfato de amónio ferroso (Merck). Após um período de incubação de 3 horas, a 37 °C, o sedimento bacteriano foi obtido por centrifugação a 3220xg (*Eppendorf 5810 R*, Eppendorf), durante 10 minutos a 4 °C.

Para se proceder à lise celular, o sedimento obtido foi ressuspensão em tampão de lise (50 mM fosfato de potássio, pH 7,8, 300 mM NaCl) contendo 10% de glicerol, 1 mg/mL de lisozima (Eurobio) e 1 mM fluoreto de fenil-metilsulfonilo (PMSF; Sigma). Após incubação a 4 °C durante 30 minutos, as células foram lisadas num sonicador (*Vibra Cell*; Sonics Materials). Foram efectuados 3 ciclos de 60 segundos com um intervalo de 2 segundos entre sonicação, tendo sido realizados intervalos de 30 segundos entre cada ciclo de modo a evitar sobre-aquecimento da amostra. A suspensão obtida foi centrifugada a 12860xg durante 30 minutos a 4 °C. Ao sobrenadante obtido, correspondente à fracção solúvel, foi adicionado imidazol e de β-mercapto-etanol (Applichem), ambos numa concentração final de 10 mM.

3.3 Purificação das proteínas recombinantes

3.3.1 Cromatografia de afinidade

As proteínas de fusão expressas em *E. coli* foram purificadas por cromatografia de afinidade (IMAC), usando a resina Ni-NTA (Qiagen) empacotada em colunas cónicas de polipropileno de 0,8 cm x 4 cm x 9 cm (Bio-rad).

Antes de ser colocada na coluna, a resina (250 μ L) foi sujeita a três lavagens sucessivas com 500 μ L de água purificada seguidas de um passo de acondicionamento (2x 500 μ L de tampão de lise contendo 10 mM de imidazol). Entre cada passo de lavagem e acondicionamento, a suspensão foi centrifugada a 360xg, durante 2 minutos, a 4 °C, tendo-se desprezado o sobrenadante. A resina foi então colocada em contacto com o lisado celular durante 1 hora, a 4 °C, com agitação constante. Findo este tempo a suspensão foi introduzida na coluna e procedeu-se ao processo de purificação, o qual decorreu a 4 °C. Foram utilizadas concentrações crescentes de imidazol em tampão de lise contendo 10% de glicerol. Assim, as proteínas contaminantes (lavagem) foram eluídas pela passagem de: 2x 5 mL 20 mM imidazol; 2x 5 mL 50 mM imidazol e; 5x 1 mL 75 mM de imidazol. A eluição das proteínas de fusão foi efectuada pela passagem de fracções de 1 mL de tampão de lise contendo 250 mM de imidazol.

Após purificação por IMAC, e de modo a remover o imidazol presente no tampão de eluição, as proteínas foram dialisadas durante a noite a 4 °C. Neste processo foi utilizada a membrana *SpectraPor 4* (MWCO de 12-14 kDa; Spectrum Laboratories) e o tampão de diálise constituído por 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 0,1 M NaCl, 0,1 mM EDTA.

3.3.2 Cromatografia de exclusão molecular

As proteínas recombinantes hPAH_{wt} e hPAH mutantes foram seguidamente purificadas por cromatografia de exclusão molecular (SEC). Esta técnica permitiu não só isolar as formas tetraméricas, usadas posteriormente nos ensaios de actividade enzimática, perfis de estabilidade térmica e em alguns ensaios de cristalização, mas também determinar o perfil oligomérico das proteínas recombinantes.

Assim, foi utilizado o sistema de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) *AKTA Prime Plus* (GE Healthcare), acoplado a um colector de fracções. A separação cromatográfica foi efectuada, a 4 °C, numa coluna pré-empacotada *HiLoad 16/60 Superdex 200* (GE Healthcare) e utilizando como fase móvel o tampão 20 mM Na-HEPES, pH 7,0, 200 mM NaCl com um fluxo de 0,7 mL min⁻¹.

Para identificação das diferentes formas oligoméricas das hPAHs recombinantes em estudo (agregados, octâmeros/hexâmeros, tetrâmeros e dímeros), recorreu-se a uma curva de calibração a qual foi obtida por determinação dos volumes de eluição de um padrão de

massas moleculares (Sigma) constituído por: apoferritina (443 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina (66 kDa).

A determinação da percentagem relativa das diferentes formas oligoméricas das proteínas recombinantes foi efectuada por deconvolução dos cromatogramas utilizando o *software* de análise cromatográfica *PeakFit* (Seasolve).

Após cromatografia (SEC e IMAC) a fracção proteica foi concentrada por ultrafiltração utilizando as membranas *Vivaspin 4* (MWCO de 30 kDa; Sartorius Stedim Biotech) e *Amicon Ultra 15* (MWCO de 50 kDa; Millipore).

3.4 Análise por electroforese

Para monitorização das proteínas eluídas durante a IMAC e também para determinação do grau de pureza das proteínas recombinantes isoladas, foi efectuada uma electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) segundo o método descontínuo de Laemmli (Laemmli, 1970) utilizando no gel de separação uma concentração de acrilamida/bisacrilamida (30% T e 2,6% C; Bio-rad) de 10% e o tampão 0,125 mM TRIS-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS; e no gel de concentração o tampão 0,375 mM TRIS-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS com uma concentração de acril/bisacrilamida de 4%. O tampão de electroforese era constituído por TRIS base 3 g/L, glicina 14,4 g/L, SDS 1 g/L, pH 8,3. As amostras foram aplicadas no sistema de separação após aquecimento durante 10 minutos a 95 °C em solução de deposição (0,24 M TRIS-HCl, pH 6,8, 40% glicerol, 8% SDS, 0,02% azul de bromofenol e 25% β-mercaptoetanol). A electroforese foi realizada num sistema vertical *Mighty Small* (Hoefer) ou *EPS 301* (GE Healthcare). Para induzir a separação electroforética, foi aplicada uma corrente constante de 30 mA. Após separação electroforética as proteínas foram visualizadas por coloração com azul brilhante de Coomassie R250 (Merck).

De modo a determinar a massa molecular das proteínas em estudo foi usado o marcador de massas moleculares pré-corado (*NzyColour protein marker*; Nzytech) constituído por proteínas com massas moleculares de: 9, 12, 19, 27, 54, 78, 123 e 188 kDa.

O grau de pureza das proteínas recombinantes foi determinado por digitalização dos géis obtidos seguidos de análise densitométrica com recurso ao *software* de processamento gráfico *ImageJ* (Abramoff *et al.*, 2004).

3.5 Quantificação proteica

A concentração das proteínas recombinantes foi determinada colorimetricamente por dois métodos de quantificação proteica, utilizando a BSA como solução padrão. Assim, no método de Bradford (Bradford, 1976) foi usado o reagente de Bradford (Bio-rad) e o λ de 595 nm para leitura das absorvâncias (espectrofotómetro *U-2000*; Hitachi). No método do ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985) foi utilizado o reagente BCA (Sigma) e o λ de 562 nm (espectrofotómetro *UV2101*; Shimadzu). Os ensaios foram sempre executados em duplicado.

3.6 Actividade enzimática

A actividade enzimática das proteínas recombinantes hPAH_{wt} e hPAH mutantes foi expressa em nmol de Tyr formada, por minuto e por mg de proteína ($\text{nmol Tyr min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). A reacção enzimática foi efectuada essencialmente de acordo com o descrito anteriormente (Leandro *et al.*, 2000), à temperatura constante de 25 °C, apenas com algumas alterações. Deste modo, a reacção foi efectuada num volume final de 250 μL , contendo 1 mM L-Phe (Merck), tampão (0,1 M Na-HEPES, pH 7,5, 0,2 M NaCl), 1080 U mL^{-1} de catalase (Boehringer), 5 μg de proteína recombinante pura e 100 μM de sulfato de amónio ferroso. Após incubação proteica durante 4 minutos (pré-activação pelo substrato) a reacção foi iniciada pela adição de 5 mM de DTT (Merck) e 75 μM de BH_4 (Sigma). Após 1 minuto, a reacção foi parada pela adição de 250 μL da mistura etanol/ácido acético (98:2), sendo seguidamente centrifugada a 4 °C, durante 5 minutos, a 15300xg. O sobrenadante obtido foi armazenado a -20 °C até posterior análise. Os ensaios enzimáticos foram todos realizados em duplicado.

Nos ensaios onde se pretendia determinar a razão de activação não foi efectuado o passo de incubação de 4 minutos na presença do substrato. Os ensaios de cinética

enzimática foram efectuados para as concentrações de L-Phe de: 4, 2 e 1 mM; e 750, 500, 250, 175, 125, 75, 50, 40, 30, 20 e 10 μ M.

Para determinação da Tyr formada foi utilizado um sistema de HPLC (Waters 2695) equipado com um injector automático e um detector de fluorescência com os comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e de emissão (λ_{em}) ajustados para 274 nm e 304 nm, respectivamente. As amostras foram separadas numa coluna *LiChroCART 60* (Merck), utilizando como fase móvel a mistura etanol/H₂O (20/80) bombeada com um caudal de 0,7 mL min⁻¹. Foram construídas curvas de calibração para diferentes intervalos de concentração de L-Tyr, nomeadamente uma gama baixa (0,1-5 μ M) e uma gama alta (10-40 μ M). Todas as amostras foram injectadas em duplicado.

A hPAH é uma enzima alostérica que sofre activação pelo substrato em concentrações baixas e inibição em concentrações elevadas. Deste modo, a determinação da velocidade máxima (V_{max}), da concentração de substrato para a qual é atingida metade da velocidade máxima ($S_{0,5}$) e do coeficiente de Hill (h) foram calculados através da equação 1 (LiCata e Allewell, 1997) onde x corresponde a um segundo coeficiente de Hill que prevê a possibilidade de a inibição pelo substrato ser também cooperativa. O valor de x deve ser fixado, sendo o mais adequado para a PAH o valor de 2 (LiCata e Allewell, 1997).

$$V = \frac{V_{max} + V_i ([S]^x / K_i^x)}{1 + (K^h / S^h) + ([S]^x / K_i^x)} \quad (\text{equação 1})$$

Os parâmetros cinéticos determinados para as duas experiências independentes foram calculados por regressão não-linear com auxílio do *software SigmaPlot* (Systat Software Inc.).

3.7 Perfil de estabilidade térmica

De modo a estabelecer o perfil de estabilidade térmica das proteínas recombinantes hPAH_{wt}, hPAH C29S e E360K, 16 μ g de proteína foram incubados às temperaturas 25, 27, 30, 37, 42, 45, 50, 55 e 60 °C, durante 10 minutos. Findo este tempo as amostras foram colocadas imediatamente em gelo durante 10 minutos. As actividades enzimáticas foram determinadas como descrito anteriormente, com pré-incubação de 1 mM de L-Phe.

3.8 Ensaios de Cristalização

Nos ensaios de cristalização iniciais foram usados vários *screenings* comerciais, nomeadamente: *MemStart* (Molecular dimensions); *Crystallization Basic Kit for Membrane Protein* (Sigma); *Natrix* e *Crystal Screen 2* (Hampton Research); *Wizard 2*, *JBScreen Classic 2*, *JBScreen Classic 3*, *JBScreen Classic 4*, *JBScreen Classic 5* e *JBScreen Classic 10* (Jena Bioscience) (Anexo 7.3.1-7.3.10). Os ensaios de cristalização foram feitos para as proteínas mutantes hPAH C29S e hPAH E360K purificadas por IMAC, regra geral, usando a técnica de difusão em vapor, pelo método de gota suspensa (*hanging-drop*), a uma temperatura constante de 20 °C, tendo sido feitas repetições de algumas condições à temperatura de 4 °C e 15 °C. A mistura de proteína (≈ 10 mg/mL) e solução do reservatório na gota continha 2 μ L de proteína e 1 μ L de solução precipitante. O reservatório continha 500 μ L de solução precipitante. Foram feitas repetições das condições mais promissoras para a proteína hPAH C29S e para a proteína hPAH E360K, e as condições que originaram os melhores resultados foram optimizadas.

Foram testados líquidos iónicos como aditivos estabilizantes, por co-cristalização da proteína após pré-incubação com os líquidos iónicos nas concentrações 0,2 M, 0,4 M e 0,6 M: [C₄mim] [Cl], [C₄mim] [MEES] e [C₁mim] [DMP] (Sigma); [C₄mim] [PF₆] e [C₂mim] [C₂SO₄] (Solchemar). O cofactor BH₄ (0,5 mM) e o agente redutor DTT (5 mM) foram também testados como agentes estabilizantes. Foi testada a co-cristalização das proteínas com BH₄ e DTT com pré-incubação (mistura da solução proteica com BH₄ e DTT) ou sem pré-incubação (mistura da solução proteica e da solução precipitante, contendo BH₄ e DTT). Foi testada também a co-cristalização das proteínas com BH₄ e DTT (com pré-incubação) suplementada com a adição de BH₄ e DTT à solução precipitante.

Para as condições mais promissoras foram repetidos ensaios de cristalização com as proteínas hPAH C29S e hPAH E360K purificadas por SEC (apenas os tetrâmeros). Para as mesmas condições testadas (hPAH C29S) foi feita a co-cristalização da proteína com BH₄ e DTT (sem pré-incubação). Foi testado ainda um *screening* de aditivos (*Additive Screen I*; Hampton Research); Anexo 7.3.11), para duas das condições mais promissoras, da hPAH C29S. Para as mesmas condições foi ainda testada a adição de óleo mineral (Hampton Research) à solução precipitante do reservatório.

A observação das gotas preparadas foi feita com recurso a um microscópio óptico estéreo *SZH10* (Olympus) a uma ampliação de 50x. Foi utilizado pontualmente um filtro polarizador (Olympus). Para diferenciar os cristais observados e poder distinguir os cristais de sal e os cristais de proteína foi usado o corante azul de metileno (*Izit*; Hampton Research), foi feita observação com luz polarizada e inspecção manual da fragilidade dos cristais.

3.9 Análise por cristalografia de raios-X

Durante o processo de armazenamento e congelamento dos cristais, estes foram previamente transferidos para uma solução de estabilização (*harvesting buffer*), semelhante à condição mãe onde o cristal foi observado mas com uma concentração de precipitante mais elevada. Os cristais foram seguidamente transferidos para uma solução com características crio-protectoras, idêntica à solução estabilizante mas com $\approx 30\%$ de agente crio-protector (glicerol). Alternativamente foi usada uma solução de paratona (Hampton Research). Os cristais foram montados em pequenos *loops* de *nylon* (Hampton Research) com dimensões proporcionais às dimensões do cristal (e.g. 0,2 mm, 0,1 mm, etc), sendo seguidamente congelados em azoto líquido.

Os dados de difracção dos raios-X foram recolhidos nas linhas de sincrotrão da estação europeia de radiação de sincrotrão (ESRF, França), ID-23-1 e ID-14-1, a comprimentos de onda de 0,979 Å e 0,934 Å, respectivamente. Foram ainda recolhidos dados de difracção na linha PXI da estação suíça de radiação de sincrotrão (SLS, Suíça), a 1 Å de comprimento de onda. Na análise preliminar feita para alguns padrões de difracção foi usado a ferramenta *iMosflm* do pacote de *software* para cristalografia de macromoléculas CCP4 (Winn, 2002).

3.10 Detecção de ferro

De modo a detectar a presença de ferro nas proteínas recombinantes purificadas, foi feita a análise ao elemento por espectroscopia de emissão atómica por plasma acoplado indutivamente (ICP-AES). Foi traçada uma curva de calibração para o elemento e medidas as intensidades de radiação emitida para as proteínas mutantes. Foi usado um comprimento

de onda de emissão específico para o ferro ($\lambda_{em} = 259,94$ nm), num espectrómetro *Ultima* (Horiba Jobin-Yvon).

3.11 Análise estrutural e preparação das figuras

O modelo compósito da estrutura tetramérica completa da hPAH foi construído com recurso ao Swiss-Model (Schwede *et al.*, 2003) usando as estruturas depositadas no PDB (RCSB *Protein data bank*) com os códigos de acesso 1hPAH, 1PHZ, 2PHM, 2hPAH, 1J8T, 1J8U. A formação de complexos macromoleculares com significado biológico (estrutura quaternário) a partir das estruturas cristalinas depositadas no PDB (estrutura terciária) foi determinada com recurso à ferramenta *online* PISA (Krissinel e Henrick, 2007). As figuras foram preparadas com recurso ao *software* de visualização molecular Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). Os alinhamentos de sequências apresentados foram construídos usando a ferramenta ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) e correspondem ao alinhamento com melhor pontuação. Na preparação dos alinhamentos foram usadas as sequências com código de acesso no UniProt (*Protein Knowledgebase*) P00439, P07101, P17752, P04176, P30967 e Q47XN7. O modelo de estrutura secundária representada na Figura 2 foi determinada para as coordenadas das estruturas combinadas (estruturas usadas na preparação do modelo compósito) da hPAH com o programa DSSP (Kabsch e Sander, 1983).

4 RESULTADOS

4.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes hPAH_{wt}, hPAH C29S e hPAH E360K foram expressas em *E. coli*, a 37° C, utilizando um tempo de indução de 3 horas. Nestas condições, as proteínas hPAH sobre-expressas são recuperadas maioritariamente na fracção solúvel. Adicionalmente, utilizando tempos de indução curtos (3h), é minimizado o fenómeno de desamidação não-enzimática que, como referido anteriormente, é responsável pela micro-heterogeneidade proteica observada para a hPAH_{wt}.

Para proceder aos ensaios de cristalização e de caracterização enzimática é necessário utilizar uma amostra proteica com um elevado grau de pureza. Deste modo, em primeiro lugar procedeu-se à optimização do processo de purificação proteica, que, no caso da hPAH recombinante, envolveu o processo da purificação por cromatografia de afinidade (IMAC) e por cromatografia de exclusão molecular (SEC). O processo de purificação utilizado, até à data no laboratório, envolvia apenas um passo de purificação por IMAC, utilizando um gradiente de imidazol em tampão fosfato de sódio/potássio 50 mM, pH 7,8, NaCl 0,3 M, 10% de glicerol (4x 5 mL 20 mM imidazol; eluição com 3x 1 mL 150 mM imidazol), e posterior diálise em tampão 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 0,1 mM EDTA e NaCl 100 mM, para remoção do imidazol. Neste trabalho foi introduzido, após IMAC, o passo de purificação por SEC. Uma vez que, de acordo com a literatura (Martinez *et al.*, 1995), a SEC deverá ser efectuada em tampão 20 mM Na-HEPES, pH 7,0, 0,2 M NaCl, foram testados vários tampões, a diferentes pHs, nos diversos passos de purificação proteica de acordo com o descrito na Tabela 5, com o intuito de uniformizar as soluções utilizadas durante o processo cromatográfico. A primeira abordagem passou pela utilização do tampão Na-HEPES no processo de purificação por IMAC, seguido de SEC, obviando assim o passo de diálise. Curiosamente, o perfil cromatográfico (SEC) revelou a presença de uma elevada fracção de formas agregadas. O mesmo aconteceu quando foi efectuada o passo intermédio de diálise, para remoção do imidazol, na presença de Na-HEPES. Neste caso foi possível observar (a olho nu) a formação de agregados no interior da membrana de diálise. Testámos também a utilização de tampão TRIS-HCl durante o processo de lise e de purificação por IMAC, mas neste caso o rendimento de proteína obtida, após este passo cromatográfico, era relativamente baixo. Nem mesmo a alteração do pH das soluções de

lise, IMAC e diálise permitiram alterar os resultados obtidos pelo que optámos pela utilização do tampão de 50 mM fosfato de sódio/potássio, pH 7,8, 0,3 M NaCl, 10% glicerol, no processo de lise e de purificação por IMAC, seguido da utilização do tampão 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 0,1 M NaCl no passo de diálise.

Para optimização da purificação por IMAC, foram testadas várias concentrações de imidazol (Tabela 5), quer nos tampões de lavagem, quer nos tampões de eluição, de modo a eliminar as proteínas contaminantes e recuperar a proteína alvo no menor número possível de fracções de eluição, obviando assim a obtenção de uma solução proteica diluída. Deste modo, o maior grau de pureza foi obtido através da aplicação de diferentes patamares de concentração de imidazol, nomeadamente 20, 50 e 75 mM. De acordo com os resultados apresentados na Figura 11 a lavagem da amostra com 20 e 50 mM de imidazol remove uma grande parte das proteínas contaminantes. Embora a passagem do tampão de eluição contendo 75 mM imidazol elua já uma pequena fracção de hPAH, ele também remove alguns contaminantes. Assim, tendo em vista um compromisso entre pureza e quantidade proteica, decidimos manter estas lavagens. Com 250 mM imidazol foi possível eluir em apenas três fracções as proteínas recombinantes, as quais apresentaram um elevado grau de pureza (Figura 12 B).

Tabela 5 – Condições testadas durante o processo de optimização da purificação das proteínas hPAH recombinantes.

	Tampão	pH	Concentração de imidazol (mM)
Lise Celular	50 mM fosfato de sódio/potássio, 0,3 M NaCl, 10% glicerol	7,5 e 7,8	-
	20 mM TRIS-HCl, 0,3 M NaCl, 10% glicerol	7,5 e 7,8	-
IMAC	50 mM fosfato de sódio/potássio, 0,3 NaCl, 10% glicerol	7,25 e 7,5	10, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 e 500
	20 mM TRIS-HCl, 0,1 NaCl, 10% glicerol	7,25 e 7,5	500
	20 mM Na-HEPES, 0,2 NaCl, 10% glicerol	7,25	500
Diálise	20 mM TRIS-HCl, 0,1 NaCl	7,25 e 7,5	-
	20 mM Na-HEPES, 0,2 NaCl	7,25 e 7,5	-
SEC	20 mM Na-HEPES, 0,2 M NaCl	7,0 e 7,25	-

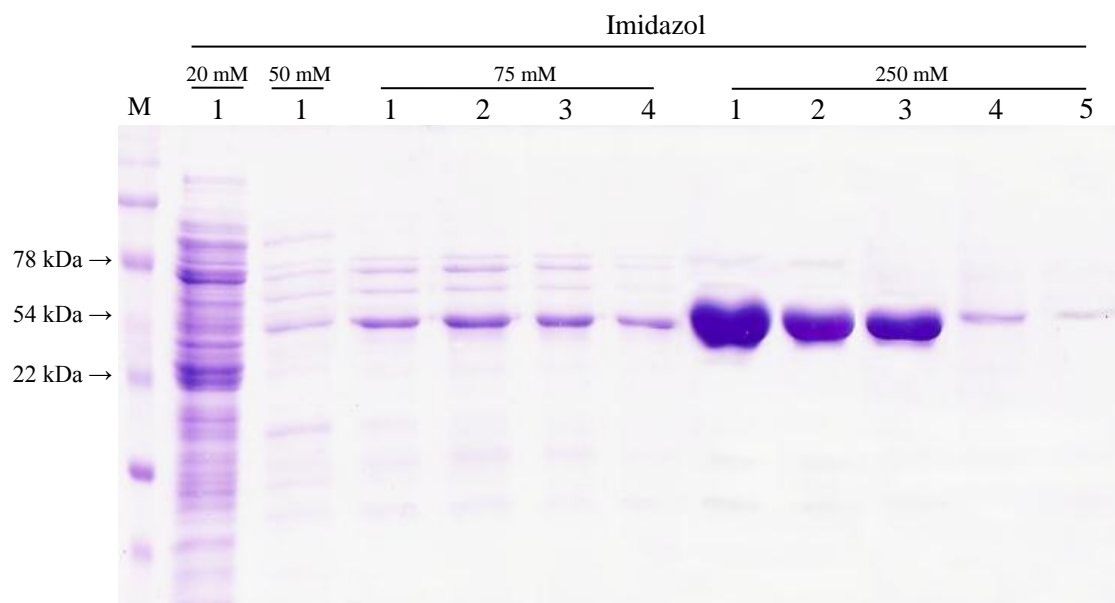


Figura 11 – Análise por SDS-PAGE do perfil de purificação por IMAC, com gradiente de imidazol, da proteína recombinante 6xHis-hPAH C29S, expressa em *E. coli*. As fracções obtidas com 20, 50 e 75 mM de imidazol representam os passos de lavagens. A proteína recombinante foi eluída com 250 mM de imidazol. (M) Marcador de massas moleculares pré-corado *NzyColour* (Nzytech).

Para a hPAH_{wt} e para a hPAH E360K foram obtidos 1,4-2,2 e 1,9-2,4 mg/L de cultura, respectivamente e para a hPAH C29S 2,6-3,8 mg/L de cultura. Com o esquema de purificação otimizado foi conseguido um aumento significativo da quantidade de hPAH_{wt} purificada, uma vez que a quantidade anteriormente obtida era <1 mg/L de cultura. Em comparação com a hPAH_{wt}, a hPAH C29S apresentou um aumento de 1,8x (Figura 12 A), enquanto a hPAH E360K apresentou um rendimento semelhante (1,2x; Figura 12 A). Estes resultados sugerem uma maior estabilidade das proteínas recombinantes quiméricas produzidas.

A optimização do processo de purificação por cromatografia de exclusão molecular envolveu basicamente a selecção de um fluxo de eluente que permitisse a melhor resolução proteica e que simultaneamente não prolongasse o tempo de corrida. Deste modo, foi seleccionado o fluxo de 0,7 mL min⁻¹. Na Figura 13 é apresentado o perfil cromatográfico obtido para uma amostra de padrões de massa molecular. Os volumes de eluição (V_e) apresentados pelas proteínas presentes na mistura padrão foram de: ≈62 mL para a apoferritina (443 kDa); ≈72 mL para a álcool desidrogenase (150 kDa); e ≈77 mL para a albumina (66 kDa). A curva de calibração, traçada, a partir da amostra padrão, permitiu calcular o V_e esperado para as várias formas oligoméricas da hPAH, nomeadamente: 61-

63 mL para as formas octaméricas/hexaméricas (330-440 kDa); ≈ 67 mL para a forma tetramérica (≈ 220 kDa) e; ≈ 73 mL para as formas diméricas (≈ 110 kDa).

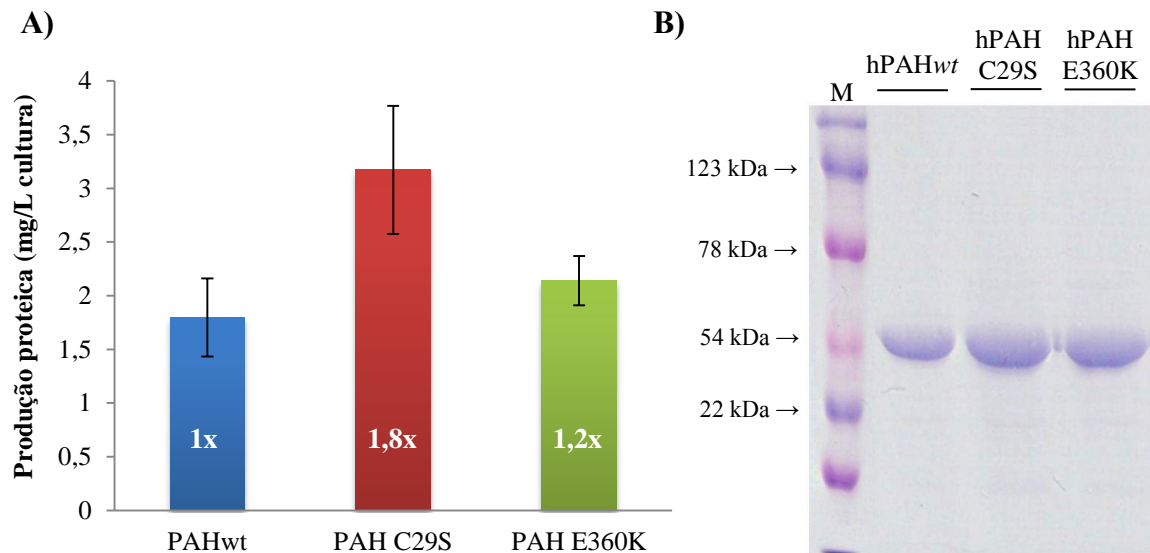
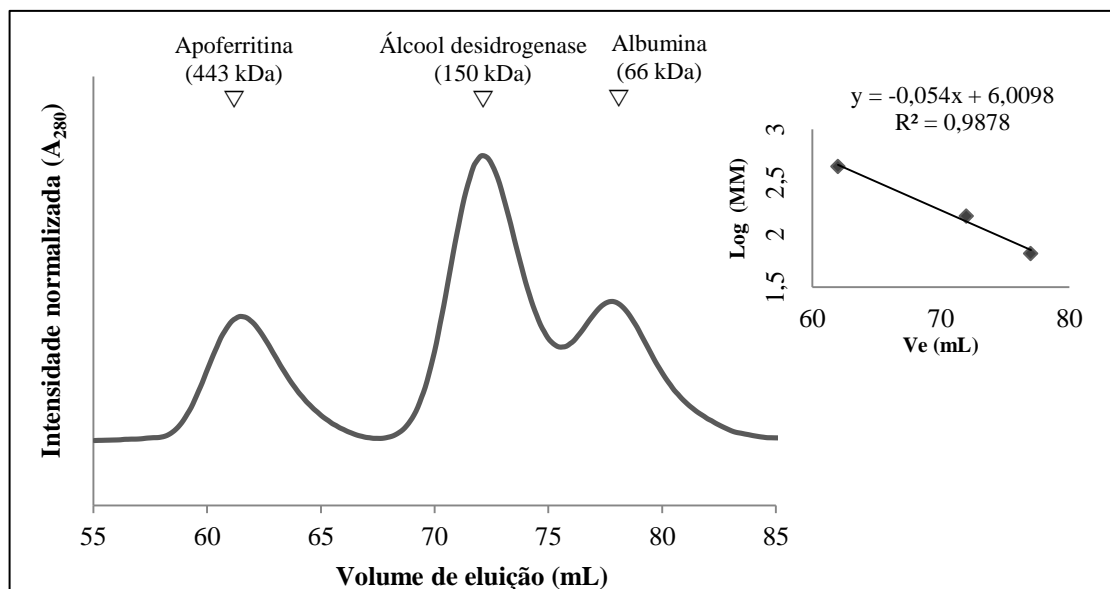


Figura 12 – Rendimento obtido (mg/L de cultura) para as proteínas recombinantes hPAH_{wt}, hPAH C29S e hPAH E360K, no final da purificação por IMAC (A) e grau de pureza, avaliado por análise SDS-PAGE (B). (M) marcador de massas moleculares pré-corado *NzyColour* (Nzytech).



A separação cromatográfica das diferentes formas oligoméricas da hPAH, octâmeros/hexâmeros (Ve 59-60 mL), tetrâmeros (Ve 66 mL) e dímeros (Ve 71-72 mL), revelou uma grande consistência entre os Ve calculados e obtidos. Durante este processo de purificação foi ainda identificado um pico com um Ve de 47-49 mL correspondente a formas agregadas com elevada massa molecular.

Após SEC, os tetrâmeros das proteínas recombinantes hPAH_{wt}, C29S e E360K foram obtidos com rendimentos de 0,8-0,9, 0,8-1 e 0,5 mg/L de cultura, respectivamente (Figura 14).

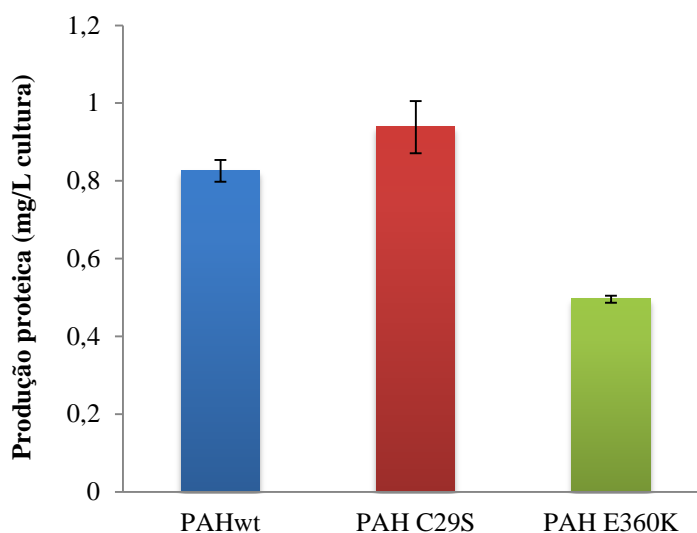


Figura 14 – Rendimento obtido (mg/L de cultura) para as proteínas recombinantes hPAH_{wt}, hPAH C29S e hPAH E360K, no final da purificação por SEC.

Na Tabela 6 é apresentado o rendimento global, o rendimento parcial (após purificação por IMAC) e o grau de pureza das proteínas recombinantes em estudo. Pode assim ser observado que embora, após IMAC, o rendimento obtido para a proteína quimérica E360K seja superior ao da forma selvagem, a quantidade de forma tetramérica obtida é inferior.

De modo a investigar a presença de ferro nas soluções proteicas de ambas as proteínas mutantes recombinantes no final da purificação por IMAC e após diálise, foi feita uma análise por ICP-AES para quantificar o ferro presente. A análise ao elemento Fe confirmou a presença do mesmo na solução de ambas as proteínas. Para a hPAH C29S, obteve-se uma concentração de Fe igual a 0,193 mg/L, sendo que para a hPAH E360K se obteve uma concentração de Fe igual a 0,380 mg/L. Este resultado permite calcular a razão

entre o Fe e um monómero da proteína (1,9 Fe/55000, para a hPAH C29S e 3,6 Fe/55000, para a hPAH E360K). Inesperadamente a quantidade de ferro e a subsequente razão Fe:proteína aparenta ser o dobro para a hPAH E360K em relação à hPAH C29S.

Tabela 6 – Rendimento global e rendimento parcial (após purificação por IMAC e diálise) das proteínas recombinantes, assim como o respectivo grau de pureza.

	Produção proteica ($\mu\text{g/mL}$) ^(a)	Produção proteica (mg/L cultura) ^(a)	Grau de pureza (%)
hPAH_{wt}	598 \pm 122	1,8 \pm 0,36	> 90
hPAH C29S	1107 \pm 153	3,2 \pm 0,59	> 90
hPAH E360K	714 \pm 74	2,1 \pm 0,23	> 90
hPAH_{wt} tetramérica	688 \pm 0,028	0,83 \pm 0,028	> 95
hPAH C29S tetramérica	769 \pm 0,018	0,94 \pm 0,067	> 95
hPAH E360K tetramérica	574 \pm 0,092	0,50 \pm 0,009	> 95

^(a) Os valores apresentados representam o valor médio \pm o desvio padrão amostral ($n \geq 3$).

4.2 Perfil de oligomerização

A cromatografia de exclusão molecular permitiu não só o isolamento das formas tetraméricas mas também determinar o perfil de oligomerização das proteínas recombinantes em estudo. Na Figura 15 são apresentados os perfis cromatográficos obtidos para a hPAH_{wt}, C29S e E360K.

Para quantificação da percentagem relativa das diferentes formas oligoméricas procedeu-se à deconvolução dos picos observados nos cromatogramas. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 16.

A hPAH_{wt} foi eluída maioritariamente na sua forma tetramérica ($\approx 66\%$), com uma pequena porção de dímeros ($\approx 18\%$), octâmeros/hexâmeros ($\approx 10\%$) e agregados ($\approx 5\%$). Relativamente à forma selvagem, a proteína mutante hPAH C29S apresentou um perfil semelhante, observando-se no entanto um ligeiro aumento da forma tetramérica ($\approx 71\%$) e dimérica ($\approx 21\%$) resultante da diminuição dos octâmeros/hexâmeros ($\approx 3\%$). Pelo contrário, a proteína mutante hPAH E360K, apresentou uma diminuição da forma tetramérica ($\approx 54\%$) e dimérica ($\approx 17\%$) e o resultante aumento de agregados ($\approx 15\%$) e

octâmeros/hexâmeros ($\approx 14\%$). Assim, a menor quantidade relativa observada para a forma tetramérica da hPAH E360K explica o menor rendimento obtido no final da purificação por SEC. Embora para a hPAH_{wt} se observe uma produção proteica inferior à observada para a hPAH E360K, no final da purificação por IMAC, o facto de apresentarem percentagens relativas da forma tetramérica diferentes (66% da hPAH_{wt} contra os 54% da hPAH E360K) faz com que a produção proteica seja inferior para a hPAH E360K, no final da purificação por SEC. A análise das percentagens relativas das diferentes formas oligoméricas obtidas para as proteínas recombinantes revela uma percentagem constante para a forma dimérica, o equilíbrio é deslocado na direcção dos agregados e altas formas oligoméricas apenas no caso da hPAH E360K.

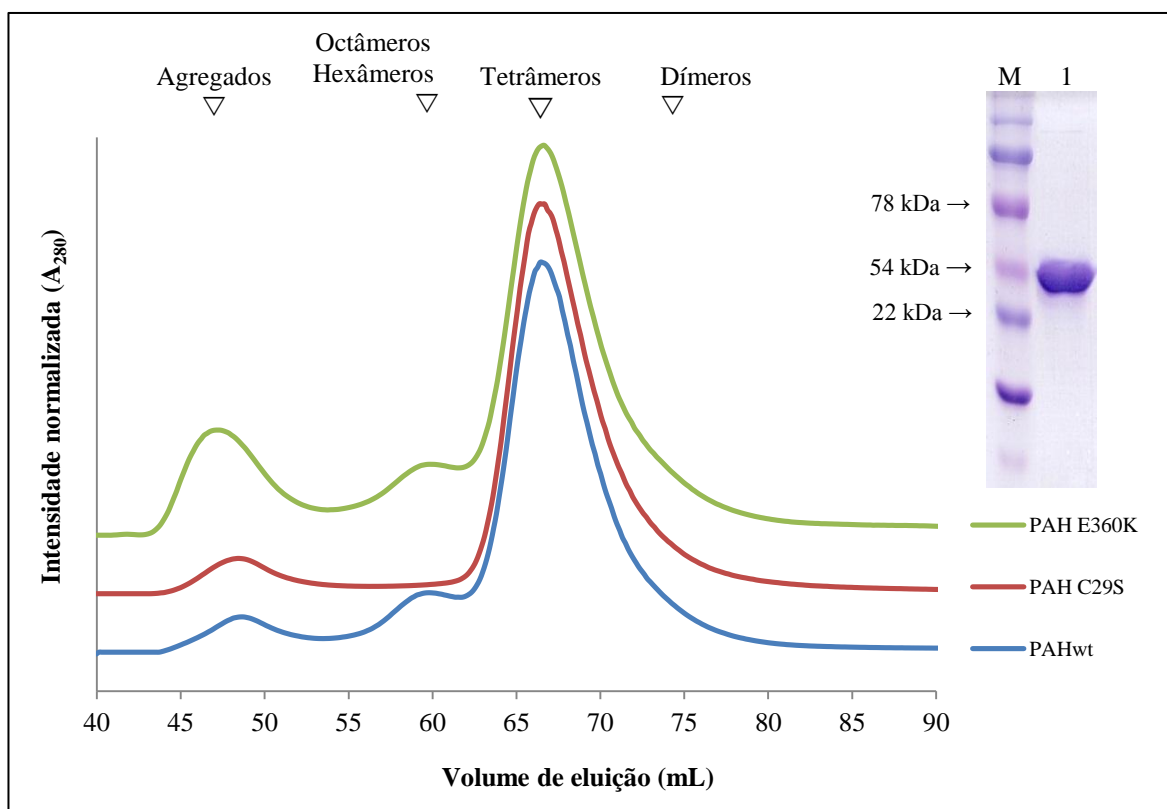


Figura 15 – Perfil cromatográfico das proteínas recombinantes hPAH_{wt}, C29S e E360K, obtido por SEC. As setas indicam os volumes de eluição das formas agregadas (47-49 mL), octâmeros/hexâmeros (59-60 mL), tetrâmeros (66 mL) e dímeros (71-72 mL). É também apresentado, a título ilustrativo, o perfil electroforético (SDS-PAGE) da fracção tetramérica da hPAH_{wt} (1). As condições cromatográficas encontram-se descritas no texto.

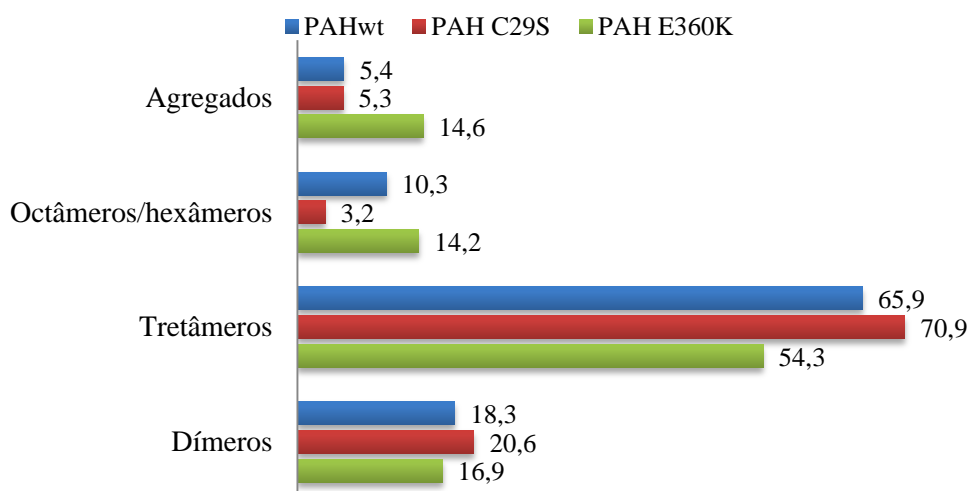


Figura 16 – Análise quantitativa dos perfis de oligomerização das proteínas recombinantes hPAH_{wt}, C29S e E360K. As quantidades relativas das frações eluídas correspondentes aos diferentes perfis oligoméricos estão apresentadas como percentagem e foram calculadas por deconvolução dos cromatogramas obtidos por SEC.

4.3 Propriedades enzimáticas

O método utilizado no laboratório (Leandro *et al.*, 2001) para quantificação do produto formado na reacção enzimática, baseava-se na detecção fluorimétrica de um derivado da L-Tyr por reacção com o o-nitrosoaftol. No entanto, este método apresentava algumas desvantagens tais como a falta de sensibilidade, a interferência (embora baixa) da L-Phe presente no meio reaccional (substrato da reacção enzimática) e alguma carência de reprodutibilidade uma vez que o processo de formação do derivado o-nitrosoaftol fluorescente envolve diversos passos, incluindo uma extracção com solvente orgânico o que aumenta a possibilidade de erro.

Assim, foi desenvolvido um método por HPLC com detecção fluorimétrica para separação e identificação da Tyr formada na reacção enzimática. Das diferentes colunas, tampões e agentes desproteinizantes testados (resultados não apresentados) foi seleccionado o sistema de separação em fase reversa que incluiu a utilização de uma coluna Lichrospher RP-select B (hidrofobicidade equivalente a C8) e o solvente etanol/H₂O (20/80) como eluente e a mistura etanol/ácido acético (98/2) como agente precipitante de proteínas. No sistema cromatográfico desenvolvido o tempo de retenção da L-Tyr e da L-Phe é de $\approx 3,86$ e ≈ 7 min, respectivamente (Figura 17). Aos comprimentos de onda de excitação e de emissão seleccionados ($\lambda_{exc} = 274$ nm e $\lambda_{em} = 304$) a L-Tyr apresenta uma intensidade de fluorescência cerca de 100x superior à L-Phe (Figura 17 **B**).

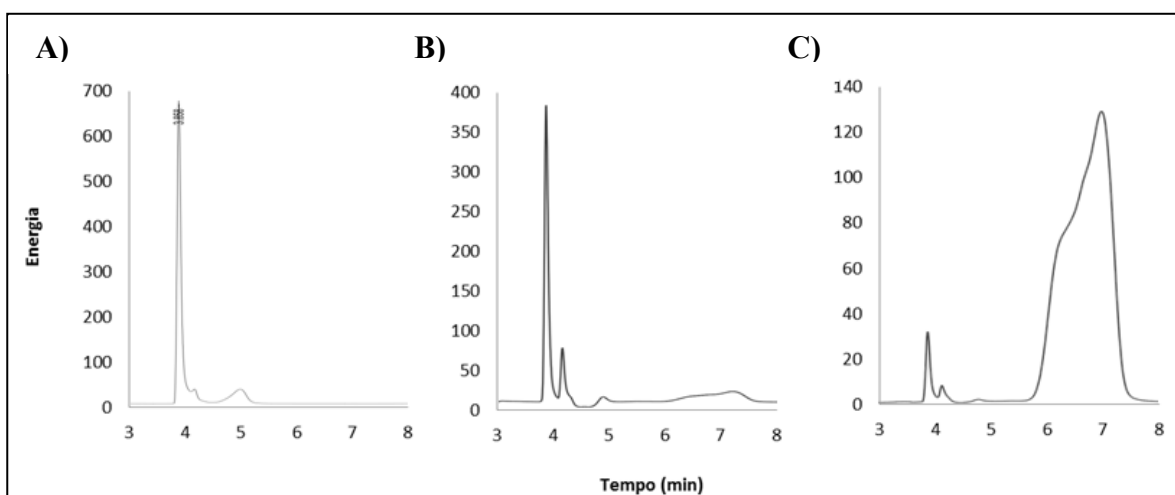


Figura 17 – Perfil cromatográfico de uma solução padrão de L-Tyr a 20 μM (**A**) e de uma mistura de L-Tyr e L-Phe com detecção fluorimétrica ao λ_{exc} de 274 nm e λ_{em} de 304 (**B**). O cromatograma (**C**) representa o perfil cromatográfico da mistura de L-Tyr e L-Phe mas com detecção fluorimétrica ao λ_{exc} de 260 nm e λ_{em} de 282 nm característico dos aminoácidos aromáticos. As condições cromatográficas encontram-se descritas no texto.

Para determinação da quantidade de L-Tyr formada durante a reacção enzimática foi efectuada uma curva de calibração para uma gama baixa (0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 μM), uma gama alta (10, 15, 20, 25, 30 e 40 μM). Ambas as curvas apresentaram um bom coeficiente de correlação, nomeadamente 0,9968 para a gama baixa e 0,9480 para a gama alta.

Na Figura 18 encontram-se exemplificados os perfis cromatográficos obtidos para uma reacção enzimática (Figura 18 **A**) e para o seu branco (reacção enzimática na ausência de hPAH; Figura 18 **B**).

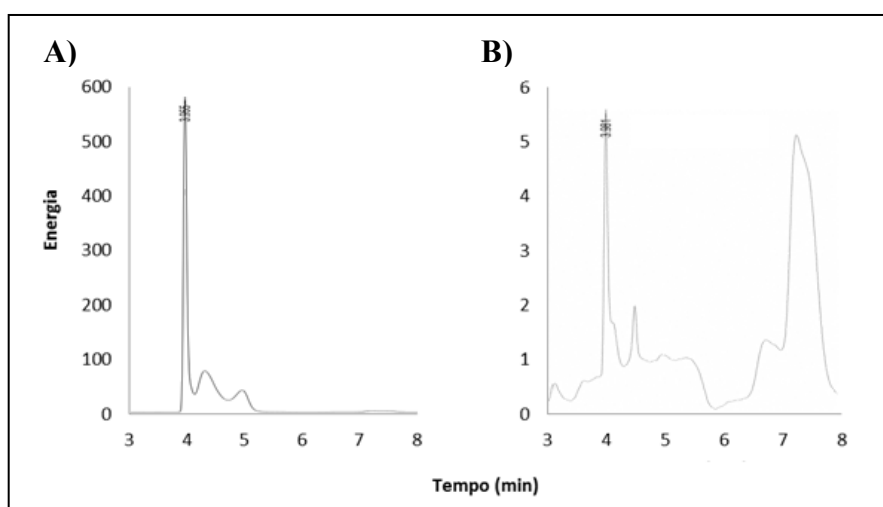


Figura 18 – Perfil cromatográfico de uma reacção enzimática (**A**) e do seu branco (**B**) com detecção fluorimétrica ao λ_{exc} de 274 nm e λ_{em} de 304. As condições cromatográficas encontram-se descritas no texto.

As actividades enzimáticas obtidas para as enzimas quiméricas C29S e E360K são apresentadas na Tabela 7. Como pode ser observado, ambas as formas mutantes quiméricas apresentaram alterações nas suas actividades enzimáticas que, quando comparadas com a forma selvagem, são estatisticamente significativas ($P < 0,01$). No entanto, enquanto a forma C29S revelou um aumento de 1,3x, a forma E360K apresentou uma actividade enzimática mais baixa (0,7x).

Tabela 7 – Análise comparativa das actividades enzimáticas residuais para as proteínas recombinantes.

	Actividade enzimática (nmol Tyr min ⁻¹ mg ⁻¹) ^(a)	Aumento relativo ^(b)	<i>P</i> ^(c)
hPAH_{wt}	4530 ± 606	-	-
hPAH C29S	5739 ± 406	1,3	< 0,01
hPAH E360K	3001 ± 346	0,7	< 0,01

^(a) Ensaio enzimático realizado em condições padrão (1 mM L-Phe; 75 mM BH₄, 25° C). Os valores apresentados representam o valor médio ± o desvio padrão amostral.

^(b) Aumento relativo à proteína selvagem.

^(c) Determinado utilizando o teste de *t*-student, relativamente ao valor da actividade enzimática para a proteína selvagem.

Uma das características da hPAH é a sua resposta sigmoideal a diferentes concentrações de L-Phe e a sua activação pelo substrato. Assim, estas propriedades foram determinadas para as proteínas quiméricas em estudo neste trabalho.

Uma análise detalhada dos parâmetros cinéticos para o estado estacionário foi conseguida para todas as proteínas tetraméricas purificadas (Figura 19, Tabela 8).

Quando comparada com a hPAH_{wt}, a forma C29S apresentou uma cooperatividade positiva semelhante (*h* de 1,3 e 1,4, respectivamente) e afinidade para o substrato dentro da mesma ordem de grandeza: 107 ± 6 μM (hPAH_{wt}) e 131 ± 18 μM (hPAH C29S). No entanto, relativamente à velocidade máxima da reacção (*V*_{max}) e à razão de activação, a C29S apresentou comportamentos diferentes. Assim, esta forma quimérica revelou um *V*_{max} de 9414 ± 796 nmol Tyr min⁻¹ mg⁻¹, superior ao da forma da hPAH_{wt} (5860 ± 150 nmol Tyr min⁻¹ mg⁻¹) e uma fraca activação pelo substrato (1,2x). Para a forma E360K foi determinado um valor *V*_{max} de 3666 ± 219 nmol Tyr min⁻¹ mg⁻¹ (inferior ao da hPAH_{wt}), maior afinidade para o substrato (88 ± 12 μM), ausência de cooperatividade (*h* = 0,8) e de activação pela L-Phe (1,0). Como resultado, a hPAH C29S apresenta uma eficiência catalítica ($K_{cat}/S_{0,5} = 16 \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$) ligeiramente superior à da hPAH_{wt} (12 μM⁻¹min⁻¹), enquanto a forma quimérica E360K revelou uma menor eficiência catalítica (9 μM⁻¹min⁻¹), essencialmente devido ao menor valor de *V*_{max} (Tabela 8).

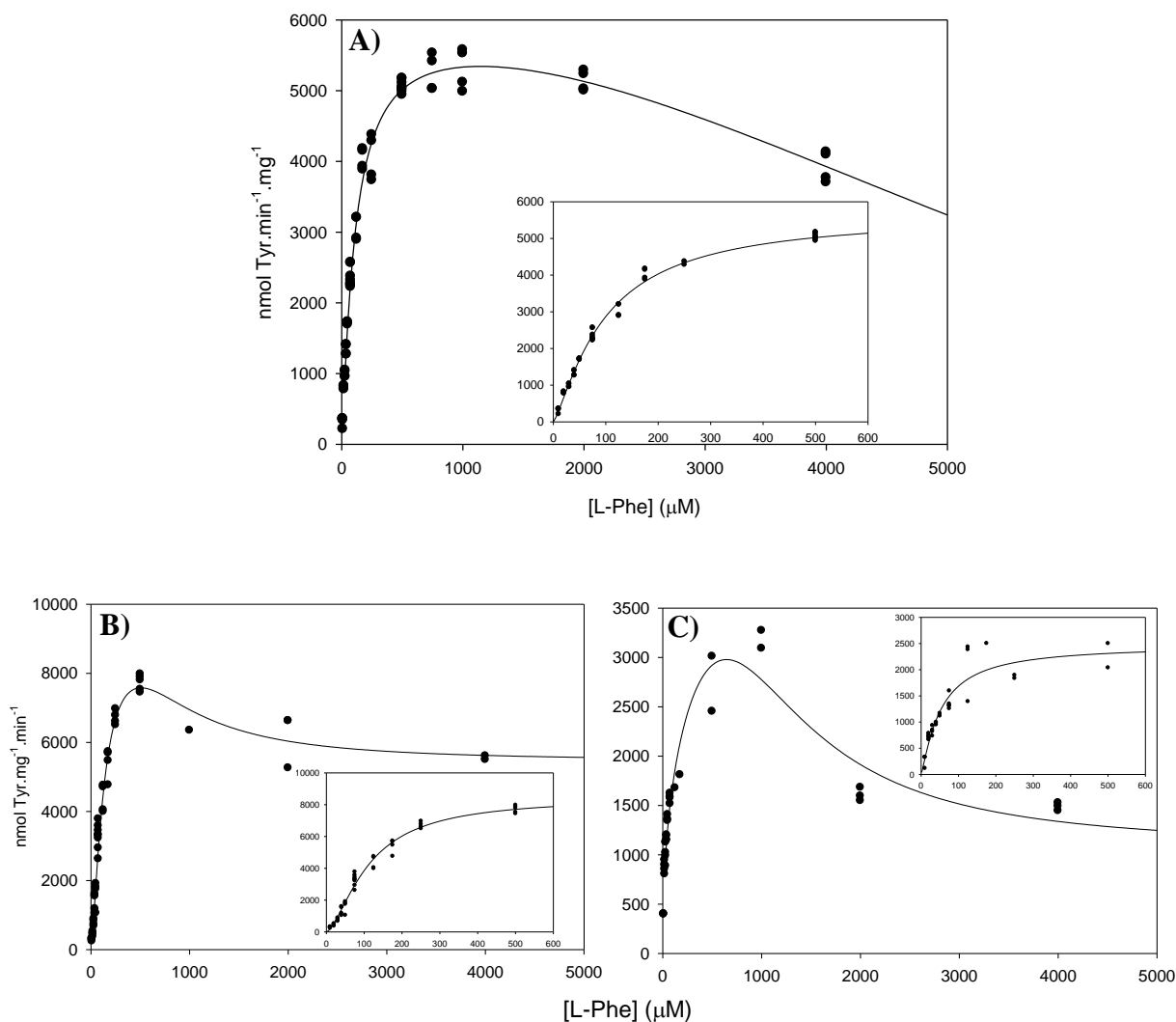


Figura 19 – Efeito da concentração do substrato L-Phe sobre a actividade catalítica das proteínas recombinantes hPAH_{wt} (A), hPAH C29S (B) e hPAH E360K (C) na sua forma tetramérica. Actividade enzimática foi medida a condições padrão (0-4 mM L-Phe, 75 μM de BH₄ e 25 °C). O gráfico inserido representa os dados obtidos para a gama de concentrações 0-600 μM L-Phe.

Tabela 8 – Propriedades cinéticas para as formas tetraméricas purificadas das proteínas recombinantes.

	Vmax (nmol Tyr min ⁻¹ mg ⁻¹) ^(a)	S _{0,5} L-Phe (μM) ^(a)	<i>h</i> ^(a)	<i>K</i> _{cat} /S _{0,5} ^(b) (μM ⁻¹ min ⁻¹)	Razão de activação ^(c)
hPAH_{wt}	5860 ± 150	107 ± 6	1,3 ± 0,07	12	15
hPAH C29S	9414 ± 796	131 ± 18	1,4 ± 0,12	16	1,2
hPAH E360K	3666 ± 219	88 ± 12	0,8 ± 0,10	9	1,0

^(a) Os valores apresentados representam o valor médio ± o desvio padrão amostral.

^(b) *K*_{cat}/S_{0,5} representa a eficiência catalítica das proteínas purificadas e foi determinada utilizando a massa molecular do tetrâmero (≈220 kDa).

^(c) Razão entre a actividade enzimática determinada com pré-incubação com L-Phe (4 min) e a actividade enzimática determinada sem pré-incubação com L-Phe.

4.4 Perfil de estabilidade térmica

De modo a caracterizar a estabilidade das proteínas recombinantes quiméricas, determinou-se o perfil de estabilidade térmica (Figura 20). Estes ensaios permitem-nos determinar o valor da temperatura de desnaturação (T_m), ou seja o valor de temperatura (°C) para o qual se atinge metade da actividade máxima. Os valores calculados foram de $50 \pm 0,16$, $53 \pm 2,4$ e $45 \pm 0,9$ °C para a hPAH $_{wt}$, hPAH C29S e hPAH E360K, respectivamente.

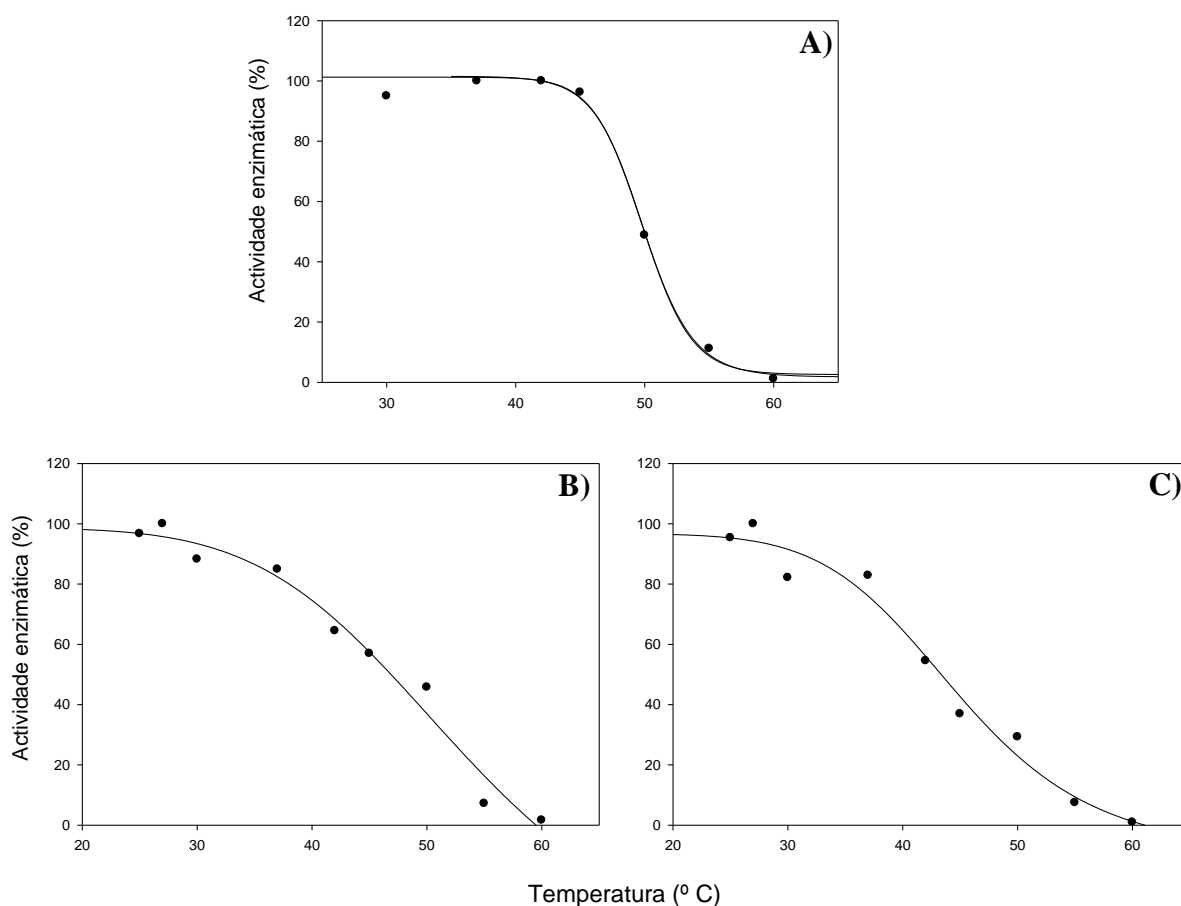


Figura 20 – Perfil de estabilidade térmica para as proteínas recombinantes hPAH $_{wt}$ (A), hPAH C29S (B) e hPAH E360K (C) na sua forma tetramérica.

4.5 Ensaio de cristalização

No sentido de se caracterizar estruturalmente as proteínas quiméricas recombinantes, foram iniciados ensaios de cristalização, que visavam a obtenção de cristais únicos de qualidade suficiente para permitir a resolução da estrutura 3D da forma intacta da hPAH.

As condições de cristalização iniciais foram identificadas com recurso ao uso de ensaios de varrimento inicial baseados na aproximação da matriz esparsa. Os ensaios de cristalização iniciais foram feitos para as proteínas mutantes hPAH C29S e hPAH E360K a uma concentração de 10 mg/mL. Para tal foi usada a técnica de difusão em vapor, pelo método da gota suspensa.

A observação microscópica das gotas decorrentes dos ensaios de cristalização revelou uma grande heterogeneidade de resultados, observando-se uma interdependência do resultado observado com a concentração inicial do agente precipitante assim como com o tempo de cristalização. Assim foram identificados três resultados padrão relativos aos diferentes níveis de precipitação proteica: gota limpa na qual a proteína se encontra maioritariamente em solução (baixa concentração de agente precipitante); gota com algum precipitado proteico (concentração do agente precipitante média); e gota com a proteína completamente precipitada/agregada (concentração do agente precipitante elevada) (Figura 21 **A**, **B** e **C**). Foram ainda identificados diferentes tipos de cristais, nomeadamente microcristais, cristais múltiplos e esferulites (Figura 21 **D**, **E** e **F**), geralmente na presença de algum precipitado proteico. A identificação de diferentes tipos de cristais revela a diversidade de resultados possíveis. A morfologia dos cristais inicialmente observados revela que as soluções mãe, apresentaram uma composição, que em alguns casos, favoreceu uma rápida sobressaturação, promovendo assim a rápida e desordenada cristalização.

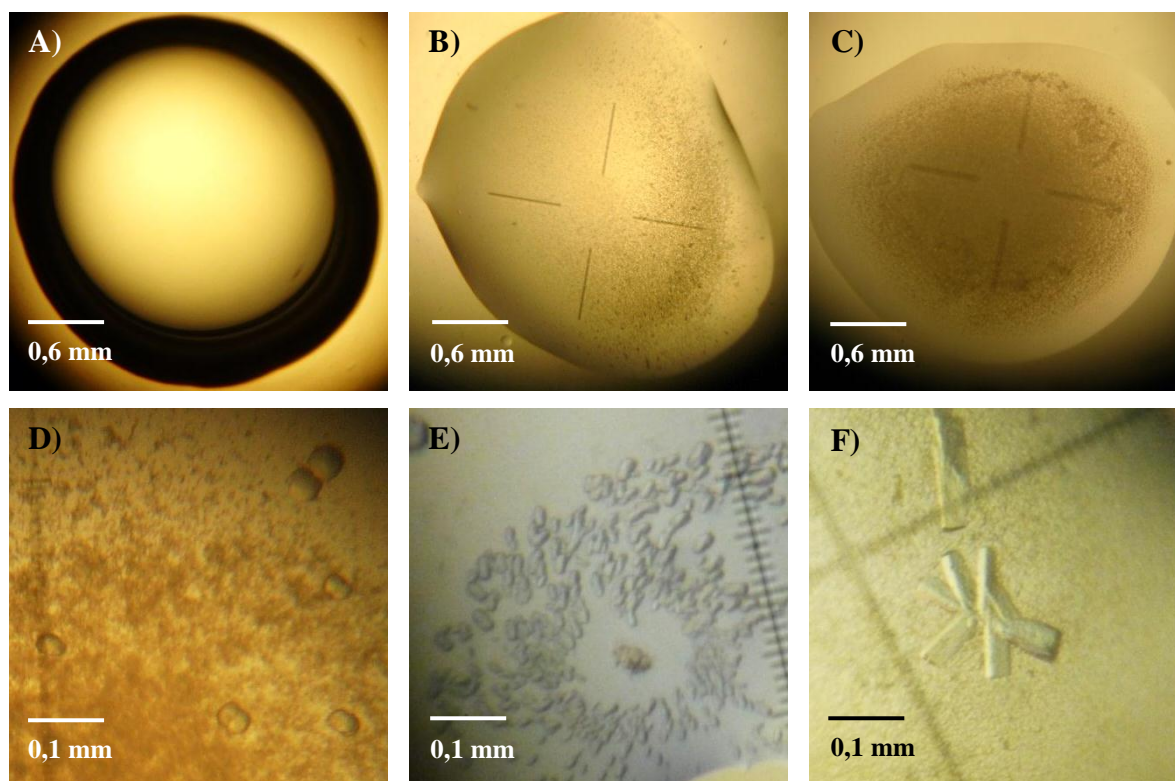


Figura 21 – Resultados obtidos nos ensaios de cristalização para os diferentes níveis de precipitação proteica: gota limpa (**A**); gota com algum precipitado proteico (**B**); gota com bastante precipitação proteica (**C**). Diferentes tipos de cristais obtidos nas condições iniciais de cristalização: esferulites (**D**); microcristais (**E**); e cristais múltiplos (**F**).

Para a proteína hPAH C29S purificada por IMAC, foram feitos os ensaios de varrimento iniciais *MemStart*, *Crystallization Basic Kit*, *Natrix*, *Crystal Screen 2*, *Wizard 2*, *JBScreen 2*, *JBScreen 3*, *JBScreen 4*, *JBScreen 5* e *JBScreen 10*, perfazendo um total de 360 condições testadas. Nestes ensaios de cristalização foram identificadas várias condições onde se observaram cristais para a proteína hPAH C29S (Tabela 9).

Para a proteína hPAH E360K purificada por IMAC, foram feitos apenas os ensaios de varrimento iniciais *MemStart*, *Crystallization Basic Kit*, *Natrix*, *Crystal Screen 2*, *JBScreen 5* e *JBScreen 10*, num total de 240 condições testadas. Apesar do menor número de ensaios de varrimento iniciais testados, foram iniciados aqueles para os quais se tinham obtido melhores resultados para a hPAH C29S. Nestes ensaios de cristalização foram também identificadas várias condições onde se observaram cristais para a proteína hPAH E360K (Tabela 10).

Tabela 9 – Composição das condições de cristalização onde foram observados cristais para a proteína hPAH C29S.

Condição	Precipitante	Tampão	pH	Sal
MS_14	2 M Formato de sódio			
MS_16	1,4 M Acetato de sódio	0,1 M MES	6,5	
MS_30	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Sulfato de lítio
MS_31	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Cloreto de sódio
MS_32	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,1 M Sulfato de lítio
MS_33	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Cloreto de sódio
MS_34	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Sulfato de amónio
MS_37	12% (p/v) PEG 4000			0,2 M Sulfato de amónio
MS_45	12% (p/v) PEG 8000	0,1 M MES	6,5	0,2 M Acetato de cálcio
MS_47	12% (p/v) PEG 8000			0,2 M Sulfato de amónio
CBK_7	1 M Tartarato de Sódio/Potássio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
CBK_15	4 % (v/v) PEG 400	0,1M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Sulfato de lítio
CBK_16	12 % (p/v) PEG 6000	0,1M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Sulfato de lítio
CBK_20	12 % (p/v) PEG 6000	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,1 M Cloreto de magnésio
NT_18	1,3 M Sulfato de lítio	0,05 M Cacodilato de sódio	6,5	0,01 M Acetato de magnésio
NT_24	10 % (p/v) PEG 4000	0,05 M Cacodilato de sódio	6,5	0,2 M Acetato de amónio
NT_25	30% (p/v) PEG 4000	0,05 M Cacodilato de sódio	6,5	0,08 M Acetato de magnésio
NT_26	10% (p/v) PEG 8000	0,05 M Cacodilato de sódio	6,5	0,2 M Cloreto de potássio 0,1 M Acetato de magnésio
NT_35	5% (v/v) PEG 400	0,05 M Na-HEPES	7,0	0,1 M Cloreto de potássio 0,01 M Cloreto de magnésio
NT_45	1,8 M Sulfato de amónio	0,05 M TRIS-HCl	8,5	0,025 M Sulfato de magnésio
CS2_22	12% (p/v) PEG 20000	0,1 M MES	6,5	
CS2_37	10% (p/v) PEG 8000 8% (v/v) Etileno glicol	0,1 M Na-HEPES	7,5	
CS2_42	12% (v/v) Glicerol 1,5 M Sulfato de lítio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
WZ2_41	2 M Sulfato de amónio	0,1 M TRIS-HCl	7,0	0,2 M Sulfato de lítio
JB2_5	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Acetato de sódio
JB2_12	20% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Cloreto de cálcio
JB3_8	15% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,2 M Acetato de amónio
JB4_7	16% (p/v) PEG 6000			0,01 M Citrato de sódio
JB5_2	15% (p/v) PEG 8000			0,2 M Sulfato de amónio
JB5_3	15% (p/v) PEG 8000			0,5 M Sulfato de lítio
JB5_5	15% (p/v) PEG 8000			0,1 M Citrato de sódio 0,05 M Sulfato de amónio
JB10_15	1,6 M Tartarato de sódio/potássio	0,1M MES	6,5	

MemStart (MS); Crystallization Basic Kit (CBK); Natrix (NT); Crystal Screen 2 (CS2); Wizard 2 (WZ2); JBScreen 2 (JB2); JBScreen 3 (JB3); JBScreen 4 (JB4); JBScreen 5 (JB5); JBScreen 10 (JB10)

Tabela 10 – Composição das condições de cristalização onde foram observados cristais para a proteína hPAH E360K.

Condição	Precipitante	Tampão	pH	Sal
MS_4	2 M Sulfato de amônio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
MS_14	2 M Formato de sódio			
MS_18	1,4 M Acetato de sódio	0,1 M MES	6,5	
MS_30	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Sulfato de lítio
MS_31	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Cloreto de sódio
MS_32	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,1 M Sulfato de lítio
MS_37	12% (p/v) PEG 4000			0,2 M Sulfato de amônio
CBK_1	1 M Fosfato de sódio/potássio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Fosfato de amônio
CBK_7	1 M Tartarato de Sódio/Potássio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
CBK_8	1 M Citrato de sódio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
CBK_15	4% (v/v) PEG 400	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Sulfato de lítio
CBK_16	12% (p/v) PEG 6000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Sulfato de lítio 0,1 M Sulfato de amônio
NT_6	20% (p/v) PEG 8000	0,05 M MES	5,5	0,01 M Cloreto de magnésio
NT_30	1,6 M Sulfato de amônio	0,05 M Na-HEPES	7,0	0,01 M Cloreto de magnésio
NT_40	1,6 M Sulfato de amônio	0,05 M TRIS-HCl	7,5	0,01 M Cloreto de magnésio
NT_45	1,8 M Sulfato de amônio	0,05 M TRIS-HCl	8,5	0,025 M Sulfato de magnésio
NT_48	30% (p/v) PEG 4000	0,05 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Cloreto de amônio 0,01 M Cloreto de cálcio
CS2_32	1,6 M Sulfato de amônio	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Cloreto de sódio
CS2_42	12% (v/v) Glicerol 1,5 M Sulfato de lítio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
JB5_9	18% (p/v) PEG 8000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Sulfato de lítio
JB10_2	0,7 M Citrato de sódio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
JB10_4	0,8 M Tartarato de sódio/potássio	0,1 M Na-HEPES	8,5	
JB10_12	1,5 M Sulfato de lítio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	1,5 M Sulfato de lítio
JB10_15	1,3 M Tartarato de sódio/potássio	0,1 M MES	6,5	

MemStart (MS); *Crystallization Basic Kit* (CBK); *Natrix* (NT); *Crystal Screen 2* (CS2); *JBScreen 5*(JB5); *JBScreen 10* (JB10)

Dentro das condições testadas nos ensaios de cristalização iniciais, um grande conjunto de soluções favoreceram a cristalização de ambas as proteínas (Tabela 9 e 10). A composição destas soluções abrange uma grande variedade de agentes precipitantes, tampões e sais. A análise destes resultados revelou que a hPAH C29S cristalizou em ≈9% das condições de cristalização iniciais testadas (32/360). A hPAH E360K apresentando um comportamento semelhante cristalizou em ≈10% das condições de cristalização iniciais testadas (24/240). A percentagem de condições de cristalização iniciais onde foram observados cristais das proteínas mutantes é semelhante (9% e 10%), e apenas cerca de

42% das condições de cristalização obtidas para a hPAH E360K correspondem a condições também identificadas para a hPAH C29S (Tabela 11). Dessa forma os agentes precipitantes, tampões, pHs e sais não se distribuem igualmente pelas duas proteínas na sua totalidade (Figura 22 A e B).

Tabela 11 – Composição das condições de cristalização identificadas para ambas as proteínas mutantes, hPAH C29S e hPAH E360K.

Condição	Precipitante	Tampão	pH	Sal
MS_14	2 M Formato de sódio			
MS_30	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Sulfato de lítio
MS_31	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Cloreto de sódio
MS_32	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,1 M Sulfato de lítio
MS_37	12% (p/v) PEG 4000			0,2 M Sulfato de amônio
CBK_7	1 M Tartarato de Sódio/Potássio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
CBK_15	4% (v/v) PEG 400	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Sulfato de lítio
CBK_16	12% (p/v) PEG 6000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Sulfato de lítio
NT_45	1,8 M Sulfato de amônio	0,05 M TRIS-HCl	8,5	0,025 M Sulfato de magnésio
JB10_15	1,3 M Tartarato de sódio/potássio	0,1 M MES	6,5	

MemStart (MS); *Crystallization Basic Kit* (CBK); *Natrix* (NT); *JBScreen 10* (JB10)

A Figura 22 A e B mostra que apesar da divergência existente a nível das condições de cristalização identificadas para ambas as proteínas mutantes, observa-se uma conformidade de agentes precipitantes, tampões e respectivos pHs, presentes na composição destas condições de cristalização.

O PEG 4000 foi o agente precipitante com maior prevalência na composição das condições de cristalização identificadas para a hPAH C29S (32%), tendo a mesma prevalência que o agente precipitante sulfato de amônio (20%), presente na composição das condições de cristalização identificadas para a hPAH E360K. Embora o PEG 4000 tenha uma prevalência acrescida para ambas as proteínas, observa-se que agentes precipitantes tais como o sulfato de amônio e o tartarato de sódio/potássio foram capazes de favorecer a cristalização com maior frequência a hPAH E360K (20% e 12% na hPAH E360K contra 6% na hPAH C29S, respectivamente). Por outro lado os agentes precipitantes tais como o PEG 8000 e o PEG 6000 favoreceram com maior frequência a cristalização da hPAH C29S (21% e 9% da hPAH C29S contra 8% e 4% da hPAH E360K, respectivamente). Foram também identificados agentes precipitantes capazes de favorecer

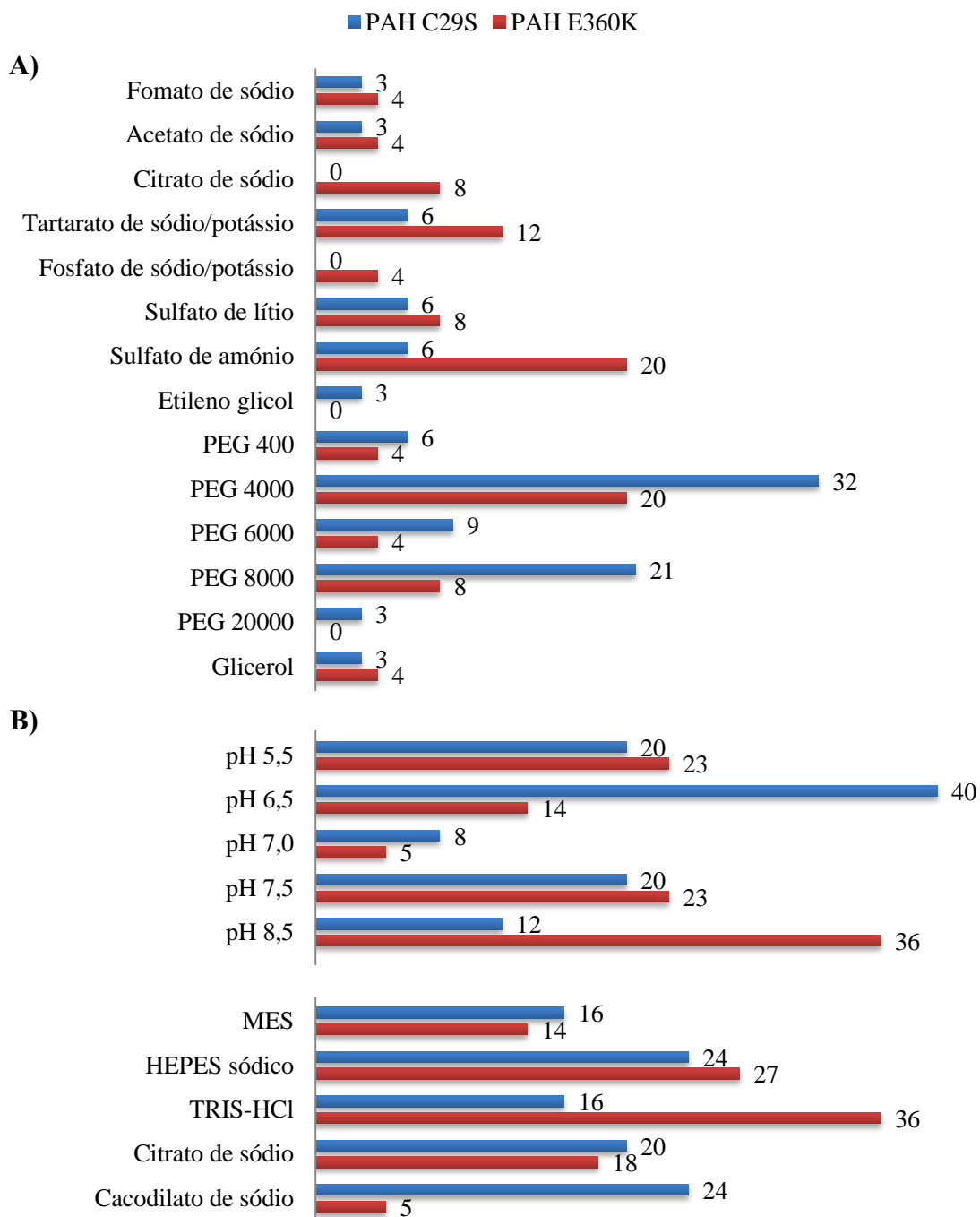


Figura 22 – (A) Representação das percentagens relativas (%) de agentes precipitantes identificados nas condições iniciais que cristalizaram as proteínas mutantes hPAH C29S e hPAH E360K. (B) Representação das percentagens relativas (%) correspondentes aos pHs e tampões identificados nas mesmas condições iniciais.

a cristalização de apenas uma das proteínas mutantes (etileno glicol e PEG 2000 para a hPAH C29S, e fosfato de sódio/potássio e citrato de sódio para a hPAH E360K).

Em relação aos tampões e respectivos pHs das condições de cristalização identificadas para ambas as proteínas mutantes, hPAH C29S e hPAH E360K, pode concluir-se que todos os pHs na gama 5,5-8,5 favoreceram a cristalização de ambas as proteínas mutantes. Observa-se uma distribuição relativa uniforme dos valores de pH, não havendo assim valores de pH na gama de 5,5-8,5 que se demarquem grandemente. A única excepção a esta uniformidade é o pH 7,0 que apresenta uma frequência relativa menor.

A análise comparativa dos resultados obtidos para as duas proteínas mutantes revela no entanto uma prevalência do pH 6,5 para a hPAH C29S (40% da hPAH C29S contra 14% da hPAH E360K), observando-se por outro lado uma maior prevalência do pH 8,5 para a hPAH E360K (36% da hPAH E360K contra 12% da hPAH C29S). Esta divergência é uniforme com a maior prevalência do tampão cacodilato de sódio presente na composição de diferentes condições de cristalização (para a hPAH C29S), e observada também para o tampão TRIS-HCl (para a hPAH E360K). Estes resultados sugerem que a hPAH C29S tem maior tendência a cristalizar a pH mais ácido (cacodilato de sódio, pH 6,5) quando comparado com a hPAH E360K que terá maior tendência a cristalizar a pH mais básico (TRIS-HCl, pH 8,5).

Para as 32 condições de cristalização identificadas nos ensaios de cristalização iniciais, feitos para a hPAH C29S, foram iniciadas repetições dos ensaios a fim de confirmar os resultados anteriormente obtidos. Foram seguidamente seleccionadas e melhoradas as condições de cristalização onde se observaram cristais de proteína. As condições de cristalização CBK_7 (tartarato de sódio/potássio), CBK_16 (PEG 6000), CBK_20 (PEG 6000), NT_26 (PEG 8000), JB2_5 (PEG 4000) e JB10_15 (tartarato de sódio/potássio), foram as que apresentaram maior potencial para serem melhoradas e optimizadas (Figura 23). A optimização das condições de cristalização seleccionadas envolveu a variação de diversos parâmetros da composição. Nesse sentido foram feitos pequenos varrimentos nos quais se variou a concentração do agente precipitante, o pH do tampão e a adição ou remoção de sais e outros aditivos, assim como a variação da sua concentração. Foram também testadas diferentes proporções da mistura proteína-solução do reservatório e diferentes volumes da solução do reservatório. A Tabela 12 resume as experiências feitas no âmbito da optimização das condições, de modo a aumentar a qualidade dos cristais observados para as 6 condições iniciais seleccionadas.

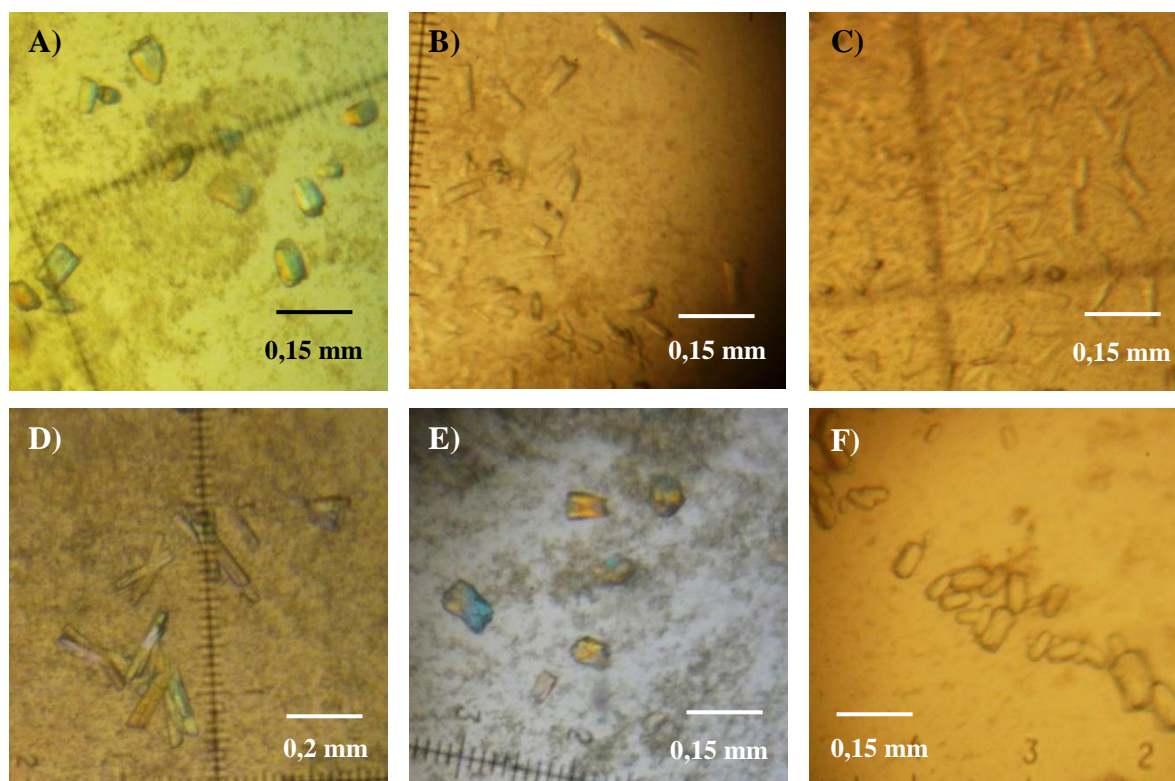


Figura 23 - Cristais relativos às condições de cristalização seleccionadas (hPAH C29S): (A) CBK_7 (1 M tartarato de sódio/potássio, 0,1 M Na-HEPES, pH 7,5); (B) CBK_16 (12% PEG 6000, 0,1 M citrato de sódio, pH 5,5, 0,1 M sulfato de lítio); (C) CBK_20 (12% PEG 6000, 0,1 M cacodilato de sódio, pH 6,5, 0,1 M cloreto de magnésio, 0,1 M acetato de magnésio); (D) NT_26 (10% PEG 8000, 0,05 M cacodilato de sódio, pH 6,5, 0,2 M cloreto de potássio, 0,1 M acetato de magnésio); (E) JB2_5 (12% PEG 4000, 0,1 M Na-HEPES, pH 7,5, 0,1 M acetato de sódio); (F) JB10_15 (1,6 M tartarato de sódio/potássio, 0,1 M MES, pH 6,5).

Os ensaios de optimização feitos para as condições de cristalização seleccionadas permitiram identificar algumas variações às condições iniciais, originando cristais de melhor qualidade. A composição final destas condições (Tabela 13), revela alterações quer a nível de tampões e pHs, como a nível de concentração dos agentes precipitantes. A optimização da condição CBK_7 envolveu a alteração do tampão e do seu respectivo pH (de Na-HEPES, pH 7,5 a TRIS-HCl, pH 8,5) assim como o aumento da concentração do agente precipitante tartarato de sódio/potássio (de 1,0 M a 1,3 M). A optimização da condição CBK_16 envolveu a alteração do pH do tampão citrato de sódio (de 5,5 para 6,5) e o aumento da percentagem de agente precipitante PEG 6000 (de 12% para 22%). Do

mesmo modo a otimização da condição CBK_20 necessitou da alteração do pH do tampão cacodilato de sódio (de 6,5 a 7,1) e da percentagem do agente precipitante PEG 6000 de 12% para 20%.

Tabela 12 – Ensaios de optimização efectuados para as condições de cristalização que apresentaram maior potencial de evolução.

Condição	Experiência
<p>CBK_7</p> <p>1 M tartarato de sódio/potássio 0,1 M Na-HEPES, pH 7,5</p>	<p>Varrimento da concentração do agente precipitante:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,4, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 e 1,5M • Varrimento da concentração do precipitante com TRIS-HCL, pH 7,5 e com 1000 µL solução de reservatório <p>Varrimento de diferentes pHs e/ou diferentes tampões:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Na-HEPES pH 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0 • TRIS-HCl pH 7,5, 8,0 e 8,5 <p>Diferentes proporções da gota e diferentes volumes de reservatório:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Solução de reservatório: 1000 µL • Proporção na gota: 4 µL proteína + 2 µL solução do reservatório • Proporção na gota: 1 µL proteína + 1 µL solução do reservatório
<p>CBK_16</p> <p>12% PEG 6000 0,1 M citrato de sódio, pH 5,5, 0,1 M sulfato de lítio</p>	<p>Repetição da condição sem um dos compostos presentes na condição:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sem sulfato de lítio • Sem citrato de sódio, pH 5,5 <p>Varrimento da concentração do agente precipitante:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 e 26% • Varrimento da concentração do precipitante com citrato de sódio, pH 6,5 <p>Varrimento de diferentes pHs e/ou diferentes tampões:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Citrato de sódio pH 6,0, 6,5, 7,0 e 8,0 <p>Diferentes proporções da gota e diferentes volumes de reservatório:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Solução de reservatório: 1000 µL • Proporção na gota: 4 µL proteína + 2 µL solução do reservatório
<p>CBK_20</p> <p>12% PEG 6000 0,1 M cacodilato de sódio, pH 6,5 0,1 M cloreto de magnésio 0,1 M acetato de magnésio</p>	<p>Repetição da condição sem um dos compostos presentes na condição:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sem cloreto de magnésio • Sem cacodilato de sódio, pH 6.5 <p>Varrimento da concentração do agente precipitante:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 e 26% <p>Varrimento de diferentes pHs e/ou diferentes tampões:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cacodilato de sódio, pH 5,5, 5,7, 6,0, 6,5, 7,1 e 7,5 <p>Diferentes proporções da gota e diferentes volumes de reservatório:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Solução de reservatório: 1000 µL • Proporção na gota: 4 µL proteína + 2 µL solução do reservatório

Tabela 12 – Ensaios de otimização efectuados para as condições de cristalização que apresentaram maior potencial de evolução (continuação).

Condição	Experiência
<p>NT_26</p> <p>10% PEG 8000 0,05 M cacodilato de sódio, pH 6,5 0,2 M cloreto de potássio 0,1 M acetato de magnésio</p>	<p>Repetição da condição sem um dos compostos presentes na condição:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sem cloreto de potássio • Sem acetato de magnésio • Sem cacodilato de sódio, pH 6,5 <p>Varrimento da concentração do agente precipitante:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22% • Varrimento da concentração do precipitante sem cacodilato de sódio, pH 6,5 <p>Diferentes proporções da gota e diferentes volumes de reservatório:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Solução de reservatório: 1000 µL • Proporção na gota: 4 µL proteína + 2 µL solução do reservatório • Proporção na gota: 1 µL proteína + 1 µL solução do reservatório
<p>JB2_5</p> <p>12% PEG 4000 0,1 M Na-HEPES, pH 7,5 0,1 M acetato de sódio</p>	<p>Repetição da condição sem um dos compostos presentes na condição:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sem Na-HEPES, pH 7,5 • Sem acetato de sódio <p>Varrimento da concentração do agente precipitante:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 6, 8, 10, 12, 14 e 16% <p>Diferentes proporções da gota e diferentes volumes de reservatório:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Solução de reservatório: 1000 µL • Proporção na gota: 4 µL proteína + 2 µL solução do reservatório
<p>JB10_15</p> <p>1,6 M tartarato de sódio/potássio 0,1 M MES, pH 6,5</p>	<p>Varrimento da concentração do agente precipitante:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1,0M, 1,2M, 1,4M, 1,6M, 1,8M e 1,9M <p>Varrimento de diferentes tampões e/ou diferentes pHs:</p> <ul style="list-style-type: none"> • MES, pH 5,5, 6,0 e 7,0 • Citrato de sódio, pH 5,5, 6,0 e 6,5 <p>Diferentes proporções da gota e diferentes volumes de reservatório:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Proporção na gota: 4 µL proteína + 2 µL solução do reservatório • Proporção na gota: 1 µL proteína + 1 µL solução do reservatório

A alteração da condição NT_26 requereu a remoção do tampão cacodilato de sódio e a alteração da percentagem do agente precipitante PEG 8000 (de 10% para 16%). A melhoria da qualidade dos cristais observados para a condição JB2_5, envolveu o aumento da percentagem do agente precipitante (12% para 16%). O melhoramento da condição JB10_15 envolveu mais uma vez a alteração do tampão e do seu respectivo pH (de MES, pH 6,5 a citrato de sódio, pH 5,5), e a alteração da concentração do agente precipitante tartarato de sódio/potássio, sendo que neste caso ocorreu a diminuição desta concentração em relação à concentração inicial (de 1,6 M a 1,2 M). A análise das composições finais

para estas condições otimizadas revela a proximidade existente entre algumas destas condições. Esta proximidade observa-se em especial para as condições CBK_7 e JB10_15, que partilham o mesmo agente precipitante (tartarato de sódio/potássio a semelhante concentração), diferindo apenas no tampão e respectivo pH, e para as condições CBK_16 e CBK_20, que partilham o mesmo agente precipitante (PEG 6000 e semelhante percentagem).

Os cristais observados para as condições otimizadas, aparentam ser menos múltiplos e apresentam menos frestas e imperfeições, apresentando ainda um tamanho significativamente maior (Figura 24). Estas características morfológicas tornou-os bons candidatos à recolha de dados de difracção de raios-X.

Tabela 13 – Composição das condições de cristalização otimizadas, conseguidas nas experiências de melhoramento iniciadas para a proteína hPAH C29S.

Condição	Precipitante	Tampão	pH	Sal
CBK_7	1,3 M Tartarato de Sódio/Potássio	0,1 M Tris-HCl	8,5	
CBK_16	22% (p/v) PEG 6000	0,1 M Citrato de sódio	6,5	0,1 M Sulfato de lítio
CBK_20	20% (p/v) PEG 6000	0,1 M Cacodilato de sódio	7,1	0,1 M Cloreto de magnésio
NT_26	16% (p/v) PEG 8000			0,2 M Cloreto de potássio 0,1 M Acetato de magnésio
JB2_5	16% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Acetato de sódio
JB10_15	1,2 M Tartarato de sódio/potássio	0,1 M Citrato de sódio	5,5	

Crystallization Basic Kit (CBK); Natrix (NT); JBScreen 2 (JB2); JBScreen 10 (JB10)

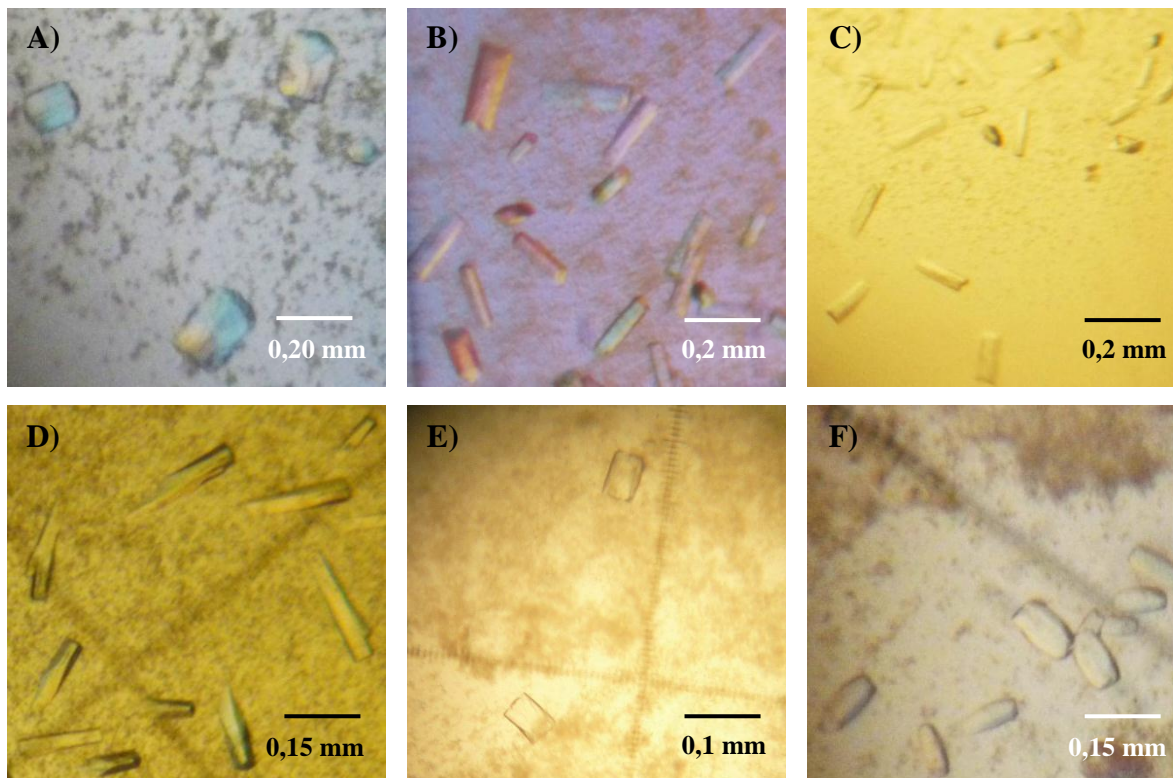


Figura 24 - Cristais relativos às condições de cristalização seleccionadas (hPAH C29S): (A) CBK_7 (1,3 M tartarato de sódio/potássio, 0,1 M TRIS-HCl, pH 8,5); (B) CBK_16 (22% PEG 6000, 0,1 M citrato de sódio, pH 6,5, 0,1 M sulfato de lítio); (C) CBK_20 (20% PEG 6000, 0,1 M cacodilato de sódio, pH 7,1, 0,1 M cloreto de magnésio, 0,1 M acetato de magnésio); (D) NT_26 (10% PEG 8000, 0,2 M cloreto de potássio, 0,1 M acetato de magnésio); (E) JB2_5 (16% PEG 4000, 0,1 M Na-HEPES, pH 7,5, 0,1 M acetato de sódio); (F) JB10_15 (1,2 M tartarato de sódio/potássio, 0,1 M citrato de sódio, pH 5,5).

Para as 24 condições de cristalização identificadas nos ensaios de cristalização iniciais, feitos para a hPAH E360K, foram feitas repetições dos ensaios a fim de confirmar os resultados anteriores. Foram seguidamente seleccionadas as condições de cristalização que apresentaram resultados mais promissores, isto é, onde se observaram cristais de proteína, maiores e menos múltiplos. Os cristais observados para as condições MS_31 (PEG 4000) e JB10_2 (citrato de sódio), embora não tendo sido optimizados, apresentaram potencial para serem testados em sincrotrão (Figura 25).

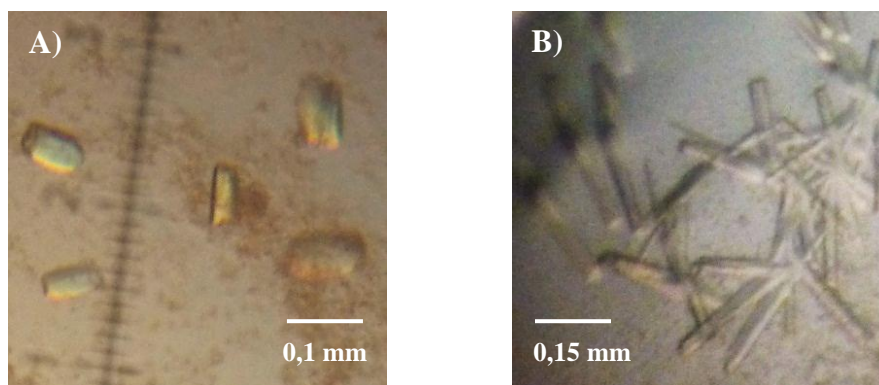


Figura 25 - Cristais relativos às condições de cristalização seleccionadas (hPAH E360K): (A) MS_31 (12% PEG 4000, 0,1 M citrato de sódio, pH 5,5, 0,1 M cloreto de sódio); (B) JB10_2 (0,7 M citrato de sódio, 0,1 M Na-HEPES, pH 7,5).

De modo a experimentar novas abordagens aos ensaios de optimização dos cristais obtidos para as condições seleccionadas (hPAH C29S), testou-se a co-cristalização da proteína com líquidos iónicos, numa tentativa de estabilizar a proteína e favorecer a formação ordenada dos cristais. Os ensaios de cristalização feitos com a pré-incubação de líquidos iónicos foram produzidos para as condições melhoradas da hPAH C29S. Para as condições melhoradas CBK_7, CBK_16, NT_26 e JB10_15 foram usados os líquidos iónicos $[C_4mim][Cl]$ e $[C_4mim][MEES]$ pré-incubados a 0,2 M, 0,4 M e 0,6 M com a proteína. Para a condição CBK_7 foi usado ainda o IL $[C_1mim][DMP]$, e para a condição JB10_15 foram ainda usados os IL $[C_2mim][C_2SO_4]$ e $[C_4mim][PF_6]$. Estes ensaios não geraram no entanto resultados significativos, observando-se apenas proteína precipitada nas gotas.

Foram iniciados para a mesmas condições e para a proteína hPAH C29S ensaios de co-cristalização da proteína com o cofactor BH_4 e o agente redutor DTT (que preserva a forma reduzida do cofactor). A co-cristalização da proteína com BH_4 (0,5 mM) e DTT (5 mM) (pré-incubação proteica) não originou resultados satisfatórios, e em nenhuma das experiências foram observados cristais. A simultânea co-cristalização da proteína com BH_4 e DTT (com pré-incubação proteica (mistura da solução proteica com BH_4 e DTT) e sem pré-incubação (mistura da solução proteica e da solução precipitante contendo BH_4 e DTT)) originou apenas microcristais. Por outro lado a co-cristalização da proteína com BH_4 e DTT (sem pré-incubação), originou cristais aparentemente bem ordenados e únicos, embora de tamanho reduzido ($< 0,1$ mm).

As condições testadas e optimizadas foram repetidas para as proteínas hPAH C29S (CBK_7, CBK_16, CBK_20, NT_26, JB2_5 e JB10_15) e hPAH E360K (MS_31, JB10_2) na sua forma tetramérica (purificação por SEC). Para as condições melhoradas (hPAH C29S) foi testada também a co-cristalização da proteína com BH₄ e DTT (sem pré-incubação). Para duas das condições obtidas para a hPAH C29S (CBK_7 e CBK_16) foi ainda testado um *screening* de aditivos (*Additive screen I*), usando a hPAH C29S na sua forma tetramérica. A incubação da proteína com os aditivos não promoveu a cristalização proteica, não se tendo observado cristais nestes ensaios. Para as mesmas condições e para promover uma difusão de vapor mais lenta no ensaio de cristalização, foi adicionado óleo mineral à solução do reservatório. A adição deste óleo promoveu a sobressaturação mais lenta da proteína na gota, observando-se neste caso cristais aparentemente mais perfeitos, embora de pequenas dimensões (apenas para a condição CBK_16). Embora não se tenham conseguido cristais de dimensões razoáveis (> 0,15 mm), este resultado sustenta uma sistematização do seu uso, uma vez que para a generalidade das cristalizações efectuadas neste trabalho, observou-se uma cristalização bastante rápida.

Ao contrário do esperado, e apesar do pequeno número de experiências feitas, as formas mais puras da proteína (hPAH tetramérica) não produziram um ganho significativo na qualidade dos cristais, tendo-se obtido resultados similares ou mesmo piores (em alguns casos).

4.6 Difraccção de raios-X

Antes de proceder ao armazenamento e congelamento dos cristais, estes foram transferidos para uma solução de estabilização (Tabela 14), idêntica à condição mãe onde o cristal foi observado mas com uma maior concentração do agente precipitante. Uma vez estabilizados, os cristais foram transferidos para uma solução com características crioprotectoras e depois de congelados numa corrente de azoto líquido, foram montados no goniómetro para a recolha de dados.

Foram obtidos dados preliminares de difracção de raios-X para os cristais seleccionados de ambas as proteínas. As Tabelas 15 e 16 sumarizam os dados recolhidos, após medições efectuadas com radiação de sincrotrão. Embora se confirme a natureza proteica dos cristais medidos, a sua qualidade ainda não é suficiente para recolha de dados

de difracção a elevada resolução. Os cristais medidos para ambas as proteínas mutantes hPAH C29S e hPAH E360K difractaram apenas a baixa resolução (até 5 Å). Para alguns dos cristais testados, o padrão de difracção obtido permitiu o processamento e indexação das reflexões (intensidade e posição) que permitiu calcular as constantes da célula e o grupo espacial.

Tabela 14 – Composição das soluções de estabilização usadas no manuseamento e armazenamento dos cristais testados no ESRF (França) e SLS (Suíça), para as proteínas hPAH C29S (A) e E360K (B).

Condição	Precipitante	Tampão	pH	Sal
A- CBK_7	1,5 M Tartarato de Sódio/Potássio	0,1 M Tris-HCl	8,5	
A- CBK_16	25% (p/v) PEG 6000	0,1 M Citrato de sódio	6,5	0,1 M Sulfato de lítio
A- CBK_20	25% (p/v) PEG 6000	0,1 M Cacodilato de sódio	7,1	0,1 M Cloreto de magnésio
A- NT_26	20% (p/v) PEG 8000			0,2 M Cloreto de potássio 0,1 M Acetato de magnésio
B- MS_31	20% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Sulfato de lítio
B- JB10_2	1,2 M Citrato de sódio	0,1 M Na-HEPES	7,5	

Crystallization Basic Kit (CBK); Natrix (NT); MemStart (MS); JBScreen 10 (JB10)

Tabela 15 – Resultados de difracção de raios-X para os cristais seleccionados, para as proteínas mutantes hPAH C29S.

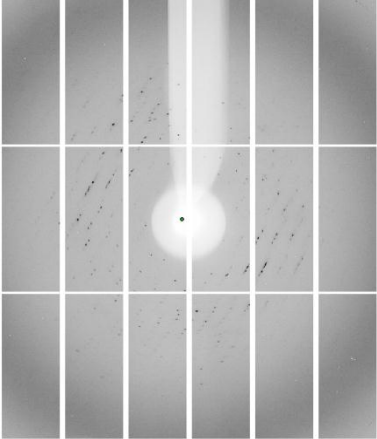
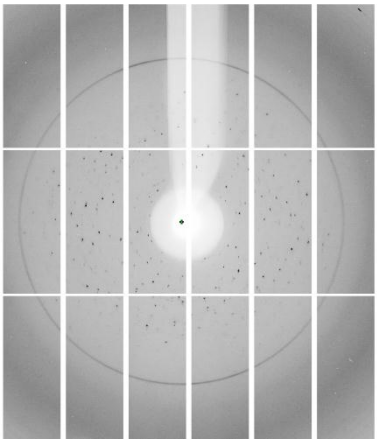
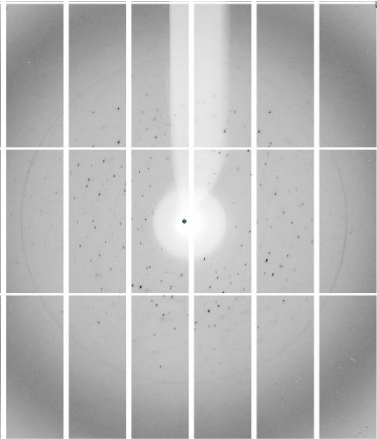
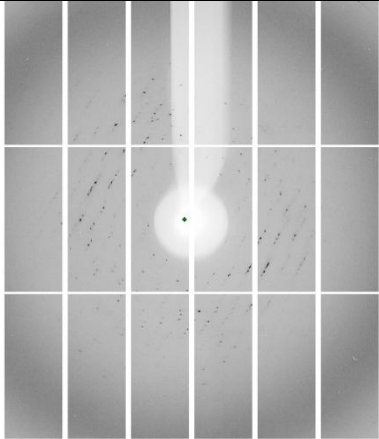
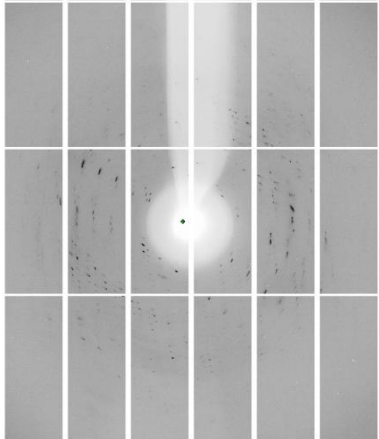
Condição	Resolução	Grupo Espacial	Constantes da célula unitária	Padrão de difracção
<p>CBK_7</p> <p>1,3 M tartarato de sódio/potássio 0,1 M TRIS-HCl, pH 8,5</p>	Até 6 Å	P 4	$a = 72,9 \text{ \AA}$ $b = 72,9 \text{ \AA}$ $c = 203,4 \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	
<p>CBK_16</p> <p>22% PEG 6000 0,1 M citrato de sódio, pH 6,5 0,1 M sulfato de lítio</p>	Até 5 Å	P 4	$a = 71,7 \text{ \AA}$ $b = 71,7 \text{ \AA}$ $c = 201,1 \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	
<p>NT_26</p> <p>16% PEG 8000 0,2 M cloreto de potássio 0,1 M acetato de magnésio</p>	Até 6 Å	P 222	$a = 101,5 \text{ \AA}$ $b = 101,5 \text{ \AA}$ $c = 201,0 \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	

Tabela 16 – Resultados de difracção de raios-X para os cristais seleccionados, para as proteínas mutantes hPAH E360K.

Condição	Resolução	Grupo Espacial	Constantes da célula unitária	Padrão de difracção
<p>MS_31</p> <p>12% PEG 4000 0,1 M citrato de sódio, pH 5,5 0,1 M cloreto de sódio</p>	Até 7 Å	P 4	Não determinado	
<p>JB10_2</p> <p>0,7M citrato de sódio 0,1M Na-HEPES, pH 7,5</p>	Até 5 Å	P 4	$a = 70,1 \text{ \AA}$ $b = 70,1 \text{ \AA}$ $c = 199,2 \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	

5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

Com o objectivo de obter proteínas hPAH com maior estabilidade do que a forma selvagem, foram produzidas duas formas mutantes quiméricas, nomeadamente a hPAH C29S e a hPAH E360K. Estudos preliminares realizados pelo nosso grupo (Coelho, 2005; Nascimento *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 2007) indicavam que estas proteínas mutantes apresentavam não só um nível de expressão mais elevado mas também uma maior actividade catalítica, sendo por estas razões excelentes candidatas para ensaios de cristalização.

A mutação C29S (Figura 26) localiza-se na região do *loop* Asp27-Gly33 pertencente à ARS e que antecede a primeira folha β ($R\beta 1$). Desta forma posiciona-se na região mais desordenada do domínio regulador, interagindo intimamente com o domínio catalítico. A mutação E360K (Figura 26) localiza-se num *loop* voltado para o exterior e situado entre a hélice $C\alpha 11$ (resíduos 250-356) e a folha $C\beta 5$ (resíduos 362-366), sendo importante para a manutenção destes elementos de estrutura secundária.

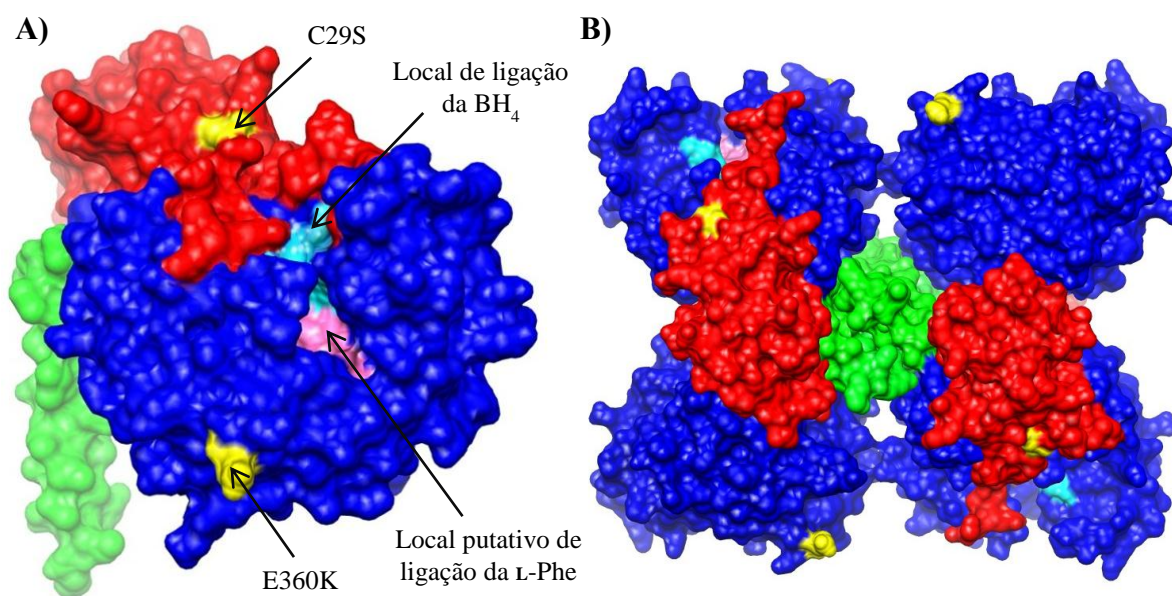


Figura 26 – (A) Subunidade do modelo composto da hPAH. (B) Estrutura completa do modelo composto da hPAH. Representação das posições das mutações efectuadas: mutação C29S e mutação E360K (amarelo). No centro catalítico foi ainda representado o local de ligação do cofactor BH_4 (azul claro) e o local putativo de ligação do substrato L-Phe (cor-de-rosa). Representação do domínio regulador (vermelho), domínio catalítico (azul) e domínio de oligomerização (verde).

A alteração dos resíduos de aminoácidos na construção das proteínas mutantes quiméricas teve como objectivo a alteração da carga exterior da proteína (hPAH E360K) e o aumento da estabilidade por impedimento da oxidação dos resíduos de cisteína da superfície proteica (hPAH C29S). A oxidação dos resíduos de cisteína expostos ao solvente foi descrita como uma das modificações químicas mais frequentes, que conduz a uma alteração funcional das proteínas (Wang, 1999). Nesse sentido a substituição de um resíduo de cisteína por um resíduo de serina, não afectando funcionalmente a enzima poderá levar no entanto a um aumento da estabilidade proteica em solução.

Uma vez que ensaios enzimáticos anteriores tinham sido efectuados com as diferentes formas oligoméricas das proteínas C29S e E360K, este trabalho foi iniciado pela introdução de um passo adicional de purificação por cromatografia de exclusão molecular para isolamento das formas tetraméricas. A optimização do processo de purificação levou à obtenção de formas tetraméricas das proteínas hPAH recombinantes com um elevado grau de pureza.

Curiosamente, apesar de ambas as proteínas quiméricas apresentarem um nível de expressão mais elevado do que a hPAH_{wt}, apenas a forma C29S possui uma maior percentagem de formas tetraméricas, sugerindo uma maior estabilidade desta estrutura, quando comparada com a forma selvagem. Este incremento nas formas tetraméricas foi também acompanhado por um aumento do V_{max} . No entanto, a pré-activação pelo substrato L-Phe é praticamente nula o que sugere que a Cys29 do domínio regulador participe activamente na acessibilidade da L-Phe ao centro catalítico. Sabe-se presentemente, que a regulação da hPAH envolve alterações conformacionais pela ligação do substrato, o qual actua como um activador alostérico da enzima. A ligação da L-Phe causa uma alteração conformacional no domínio regulador que desloca a sua posição expondo assim o domínio catalítico. Adicionalmente, a maior resistência à temperatura (T_m) sugere um aumento da estabilidade da forma tetramérica da hPAH C29S.

O aumento de expressão da proteína quimérica E360K deveu-se ao aumento das formas agregadas (solúveis) e de octâmeros/hexâmeros uma vez que a percentagem das formas tetraméricas sofreu uma diminuição. Estes resultados parecem indicar que a substituição de um aminoácido com carga negativa por outro com carga positiva na superfície da proteína é responsável por uma maior susceptibilidade de agregação. A presença, nesta proteína com maior percentagem de agregados solúveis, de uma maior

presença de octâmeros/hexâmeros vem reforçar a hipótese destas últimas formas constituírem estados intermédios no “caminho” para a formação de agregados.

Para avaliar se a introdução das mutações envolveu uma alteração conformacional mais pronunciada ao nível dos elementos de estrutura secundária, poderiam ser realizadas experiências de dicroísmo circular no UV longínquo (*Far-UV CD*). Adicionalmente, poder-se-ia recorrer a ensaios de dispersão dinâmica de luz (*Dynamic Light Scattering*). Esta técnica complementar à informação relativa à distribuição das populações oligoméricas da proteína e poderia ajudar na previsão da capacidade das proteínas em estudo formarem cristais ordenados (Rupp, 2009).

A confirmação de que a solução proteica de ambas as proteínas recombinantes (hPAH C29S e hPAH E360K) continham ferro não-hémico, foi importante uma vez que este elemento, para além do seu papel catalítico, contribui para a estabilidade cinética e térmica da hPAH (Pey e Martinez, 2009). Assim, a confirmação da sua presença nas soluções proteicas foi importante para os subsequentes ensaios de cristalização e caracterização enzimática. De qualquer forma, as actividades enzimáticas foram feitas com a incubação proteica com 10 mM de sulfato de amónio ferroso, durante dois minutos, o que garantiu a presença do ferro em todos os ensaios enzimáticos realizados.

Para ambas as formas mutantes da hPAH foram realizadas numerosas experiências de cristalização, tendo-se obtido cristais em diversas condições experimentais. Mediram-se alguns dos cristais usando radiação de sincrotrão tendo-se observado difracção mas apenas a baixa resolução (entre 5 a 9 Å). Para cinco diferentes tipos de cristais, foi possível medir algumas imagens de difracção as quais, nalguns casos, permitiram indexar as reflexões e determinar as constantes da célula e o grupo espacial (Tabela 15 e 16). Apesar da qualidade insuficiente dos cristais, estes resultados permitiram contudo confirmar que os cristais eram de proteína e não de sal. Para além disso, o facto de se terem obtido diferentes condições de cristalização, forneceu um ponto de partida para a tentativa de optimização do tipo de cristais obtidos.

Com o objectivo de melhorar o poder de difracção dos cristais, procedeu-se à cristalização das proteínas na presença de agentes estabilizantes. Como agentes estabilizantes/aditivos testaram-se líquidos iónicos (IL) e o co-factor BH₄ suplementado com o agente redutor DTT, além de diversos aditivos presentes num *screening* comercial,

nomeadamente pequenos compostos (chaperones químicos), aditivos polióis, açucares e metilaminas (Leandro e Gomes, 2008; Nascimento *et al.*, 2009). A maioria destas tentativas de optimização não conduziu contudo aos resultados pretendidos e será provavelmente necessário realizar um estudo mais sistemático e detalhado.

Embora as estruturas resolvidas do complexo proteína-cofactor correspondam a proteínas duplamente truncadas (domínio catalítico), o correspondente complexo com as proteínas mutadas poderá ter uma estrutura mais rígida por alteração conformacional que tornará a proteína mais susceptível à cristalização. O complexo proteína-ligando poderá ter assim uma maior tendência a cristalizar do que a proteína livre.

O uso de IL solúveis em água, especialmente como aditivos ou precipitantes para as condições de cristalização, foi seguido devido a um recente caso de sucesso no grupo (Coelho *et al.*, 2010), onde o uso destes IL permitiu ultrapassar um problema de escala observado aquando da repetição de uma condição de cristalização obtida para gotas com volume na ordem dos nL, em gotas normais com volume na ordem dos μL . De alguma forma os IL estabilizaram a proteína e fomentaram assim a sua cristalização, permitindo a optimização dos cristais e o aumento do seu tamanho. Os líquidos iónicos usados nos ensaios de cristalização da hPAH não induziram contudo uma melhoria na cristalização das proteínas recombinantes mas tal pode ter sido devido ao número insuficiente de ensaios realizados. Estudos posteriores usando líquidos iónicos, como agentes estabilizantes deverão ser feitos de forma mais sistemática, variando por exemplo o tipo e concentração dos líquidos iónicos.

Entre outras estratégias e abordagens para melhorar a qualidade dos cristais, poder-se-á ainda testar técnicas de *seeding* (*macro-seeding*, *micro-seeding* e *cross-seeding*) para tentar a cristalização em diferentes condições de cristalização, e para melhorar o tamanho dos cristais. Poder-se-á testar ainda diferentes concentrações de proteína e repetir ensaios de varrimento iniciais, para as formas mais puras da proteína (formas tetraméricas), e em sistemas automatizados de cristalização e/ou a diferentes temperaturas (e.g. 4 °C, 15 °C, 37 °C, etc). Para os cristais obtidos poder-se-á testar a desidratação ou desumidificação controlada, demonstrado como capaz de, em determinadas situações, promover a ordenação das moléculas dentro da rede do cristal (Heras e Martin, 2005).

De modo a alargar a abrangência da nossa análise estrutural e funcional, com o objectivo de produzir uma forma proteica estável e pura em solução e subsequente determinação estrutural, poderão ser construídas novas formas mutantes da proteína. As mutações poderão incidir em especial no domínio de tetramerização, substituindo aminoácidos hidrofóbicos por Ala e Ile, por comparação com o homólogo da TYH (forma exclusivamente tetrâmeros). Poderão ser ainda produzidas formas desamidadas da proteína, pela substituição de resíduos de asparagina (e.g. N32D e N376D). Com o mesmo objectivo com que foram efectuadas as mutações C29S e E360K, poderão ser mutados outros resíduos de cisteína expostos (e.g. C445S) e alterada a carga de alguns aminoácidos à superfície (e.g. D245S).

A produção de formas quiméricas da hPAH suplementada com o uso de agentes estabilizantes (e.g. glicerol, cofactor BH_4), permitiu a identificação de condições de cristalização preliminares susceptíveis de serem optimizadas e que constitui uma base de partida para a determinação da estrutura tri-dimensional da hPAH tetramérica completa. Estes dados irão contribuir para a elucidação do mecanismo catalítico e da sua regulação e para uma melhor compreensão das bases estruturais do fenótipo HPA/PKU. De acordo com a literatura, em alguns doentes com HPA a administração de sapropterina (cofactor BH_4), como chaperone farmacológico/químico, estabiliza *in vivo* as proteínas mutantes restaurando a sua actividade, baixando deste modo os níveis plasmáticos de L-Phe (Spaapen e Rubio-Gozalbo, 2003). No entanto, apenas algumas proteínas mutantes respondem à BH_4 (Blau *et al.*, 2003), particularmente as proteínas mutantes que apresentem uma actividade residual *in vitro* de $\approx 30\%$ e que maioritariamente se localizam no domínio catalítico, em regiões envolvidas na ligação ao cofactor (Erlandsen *et al.*, 2003). Deste modo, o conhecimento da estrutura da forma intacta da hPAH irá também contribuir para elucidar o mecanismo molecular subjacente à ausência ou presença de resposta ao tratamento com suplementação em BH_4 . Será assim possível instaurar a terapêutica mais adequada, de acordo com o genótipo apresentado pelo doente, o mais cedo possível evitando o desenvolvimento de danos cerebrais irreversíveis.

6 BIBLIOGRAFIA

- Abramoff, M., Magelhaes, P., e Ram, S. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11(7):36-42.
- Andersen, O. A., Stokka, A. J., Flatmark, T., e Hough, E. 2003. 2.0 Å resolution crystal structures of the ternary complexes of Human Phenylalanine Hydroxylase catalytic domain with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine or L-norleucine: Substrate specificity and molecular motions related to substrate binding. *Journal of Molecular Biology* 333(4):747-757.
- Andersen, O. A., Flatmark, T., e Hough, E. 2001. High resolution crystal structures of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase in its catalytically active Fe(II) form and binary complex with tetrahydrobiopterin. *Journal of Molecular Biology* 314(2):279-91.
- Andersen, O. A., Flatmark, T., e Hough, E. 2002. Crystal structure of the ternary complex of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation. *Journal of Molecular Biology* 320(5):1095-1108.
- Bjørøgo, E., Carvalho, R. M., Flatmark, T. 2001. A comparison of kinetic and regulatory properties of the tetrameric and dimeric forms of wild-type and Thr427-->Pro mutant human phenylalanine hydroxylase: contribution of the flexible hinge region Asp425-Gln429 to the tetramerization and cooperative substrate binding. *European Journal of Biochemistry* 268(4):997-1005.
- Blau, N., Bernegger, C., e Trefz, F. 2003. Tetrahydrobiopterin responsive hyperphenylalaninaemia due to homozygous mutations in the phenylalanine hydroxylase gene. *European Journal of Pediatrics*, 162:192.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Coelho, C. 2005. Fenilalanina hidroxilase humano recombinante: produção de formas quiméricas para estabilização proteica. Tese de Licenciatura. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa
- Coelho, C., Trincão, J., e Romão, M. J. 2010. The use of ionic liquids as crystallization additives allowed to overcome nanodrop scaling up problems: A success case for producing diffraction-quality crystals of a nitrate reductase. *Journal of Crystal Growth* 312(5):714-719.
- Durbin, S. D., e Feher, G. 1996. Protein crystallization. *Annual Review of Physical Chemistry* 47:171-204.
- Erlandsen, H., e Stevens, R. C. 1999. The structural basis of phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism* 68(2):103-125.
- Erlandsen, H., Bjørøgo, E., Flatmark, T., e Stevens, R. C. 2000. Crystal structure and site-specific mutagenesis of pterin-bound human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 39(9):2208-2217.

- Erlandsen, H., Flatmark, T., Stevens, R. C., e Hough, E. 1998. Crystallographic analysis of the human phenylalanine hydroxylase catalytic domain with bound catechol inhibitors at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* 37(45):15638-15646.
- Erlandsen, H., Fusetti, F., Martinez, A., Hough, E., Flatmark, T., e Stevens, R. C. 1997. Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nature Structural Biology* 4(12):995-1000.
- Erlandsen, H., Kim, J., Patch, M. G., Han, A., Volner, A., Abu-Omar, M., e Stevens, R. C. 2002. Structural comparison of bacterial and human iron-dependent phenylalanine hydroxylases similar fold, different stability and reaction rates. *Journal of Molecular Biology* 320:645-661.
- Erlandsen, H., Patch, M. G., Gamez, A., Straub, M., e Stevens, R. C. 2003. Structural studies on phenylalanine hydroxylase and implications toward understanding and treating phenylketonuria. *Pediatrics* 112(6):1557-1565.
- Erlandsen, H., Pey, A. L., Gámez, A., Pérez, B., Desviat, L. R., Aguado, C., Koch, R., Surendran, S., Tyring, S., Matalon, R., Scriver, C. R., Ugarte, M., Martínez, A., e Stevens, R. C. 2004. Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(48):16903-16908.
- Flatmark, T., e Stevens, R. C. (1999). Structural insight into the aromatic amino acid hydroxylases and their disease-related mutant forms. *Chemical Reviews* 99(8):2137-2160.
- Flatmark, T., Stokka, A. J., e Berge, S. V. 2001. Use of surface plasmon resonance for real-time measurements of the global conformational transition in human phenylalanine hydroxylase in response to substrate binding and catalytic activation. *Analytical Biochemistry* 294(2):95-101.
- Fusetti, F., Erlandsen, H., Flatmark, T., e Stevens, R. C. 1998. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *The Journal of Biological Chemistry* 273(27):16962-16967.
- Gibbs, B. S., Wojchowski, D., e Benkovic, S. J. 1993. Expression of rat liver phenylalanine hydroxylase in insect cells and site-directed mutagenesis of putative non-heme iron-binding sites. *The Journal of Biological Chemistry* 268(11):8046-8052.
- Harding, C. 2008. Progress toward cell-directed therapy for phenylketonuria. *Clinical Genetics* 74(2):97-104.
- Heras, B., e Martin, J. L. 2005. Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals. *Acta Crystallographica* 61(9):1173-1180.
- Horne, J., Jennings, I. A., Teh, T., Gooley, P. R., e Kobe, B. 2002. Structural characterization of the N-terminal autoregulatory sequence of phenylalanine hydroxylase. *Protein Science* 11:2041-2047.
- Hufton, S., Jennings, I., e Cotton, R. 1995. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochemical Journal* 311:353-366.

- Jancarik, J., e Kim, S. H. 1991. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography* 24:409-411.
- Kabsch, W., 3 Sander, C. 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22(12):2577-2637.
- Knappskog, P. M., Flatmark, T., Aarden, J., Haavik, J., e Martinez, A. 1996. Structure/function relationships in human phenylalanine hydroxylase: Effect of terminal deletions on the oligomerization, activation and cooperativity of substrate binding to the enzyme. *European Journal of Biochemistry* 242:813-821.
- Kobe, B., Jennings, I. G., House, C. M., Michell, B. J., Goodwill, K. E., Santarsiero, B. D., Stevens, R. C., Cotton, R. G., e Kemp, B. E. 1999. Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nature Structural Biology* 6(5):442-448.
- Konecki, D. S., Wang, Y., Trefz, F. K., Lichter-Konecki, U., e Woo, S. L. 1992. Structural characterization of the 5' regions of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 31(35):8363-8368.
- Kwok, S. C., Ledley, F. D., DiLella, A. G., Robson, K. J., e Woo, S. L. 1985. Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 29(3):556-561.
- Kowlessur, D., Citron, B. a., e Kaufman, S. 1996. Recombinant human phenylalanine hydroxylase: novel regulatory and structural properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 333(1):85-95.
- Kowlessur, D., Yang, X., e Kaufman, S. 1995. Further studies of the role of Ser-16 in the regulation of the activity of phenylalanine hydroxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(11):4743-4747.
- Kragl, U., Eckstein, M., e Kaftzik, N. 2002. Enzyme catalysis in ionic liquids. *Current Opinion in Biotechnology* 13(6):565-571.
- Krissinel, E., e Henrick, K. 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology* 372(3):774-97.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Lange, C., Patil, G., e Rudolph, R. 2005. Ionic liquids as refolding additives: N'-alkyl and N'-(omega-hydroxyalkyl) N-methylimidazolium chlorides. *Protein Science* 14:2693-2701.
- Leandro, P., Lechner, M. C., Almeida, I. T., e Konecki, D. 2001. Glycerol increases the yield and activity of human phenylalanine hydroxylase mutant enzymes produced in a prokaryotic expression system. *Molecular Genetics and Metabolism* 73(2):173-178.
- Leandro, P., Rivera, I., Lechner, M. C., Almeida, I. T., e Konecki, D. 2000. The V388M mutation results in a kinetic variant form of phenylalanine hydroxylase. *Molecular Genetics and Metabolism* 69(3):204-212.

- Leandro, P., e Gomes, C. M. 2008. Protein misfolding in conformational disorders: rescue of folding defects and chemical chaperoning. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 8(9):901-11.
- Leiros, H. S., Pey, A. L., Inneset, M., Moe, E., Leiros, I., Steen, I. H., e Martinez, A. 2007. Structure of phenylalanine hydroxylase from *Colwellia psychrerythraea 34H*, a monomeric cold active enzyme with local flexibility around the active site and high overall stability. *The Journal of Biological Chemistry* 282(30):21973-21986.
- Liberles, J. S., e Martinez, A. 2009. Searching distant homologs of the regulatory ACT domain in phenylalanine hydroxylase. *Amino Acids* 36(2):235-249.
- Liberles, J. S., Thórólfsson, M., e Martínez, A. 2005. Allosteric mechanisms in ACT domain containing enzymes involved in amino acid metabolism. *Amino Acids*, 28(1):1-12.
- LiCata, V. J., Allewell, N. M. 1997. Is substrate inhibition a consequence of allostery in aspartate transcarbamylase?. *Biophysical Chemistry* 64:225-234.
- Martinez, A., Knappskog, P., Olafsdottir, S., Doskland, A., Eiken, H., Svebak, R., Bozzini, M., Apold, J., e Flatmark, T. 1995. 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. *Biochemistry Journal* 306:589-597.
- Nascimento, C., Coelho, C., Leandro, J., Almeida, I. T., e Leandro., P. 2005. Biochemical characterization of chimerical mutant forms of human phenylalanine hydroxylase: a contribution to the understanding of enzyme stabilization. *FEBS Journal* 272(Suppl. 1):382.
- Nascimento, C., Coelho, C., Oliveira, C., Acosta, C., Almeida, I. T., e Leandro, P. 2007. Modification of phenylalanine hydroxylase by site-directed mutagenesis: production of chimerical proteins with higher stability. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 30(Suppl. 1): 11.
- Nascimento, C., Leandro, J., Almeida, I. T., e Leandro, P. 2008. Modulation of the activity of newly synthesized human phenylalanine hydroxylase mutant proteins by low-molecular-weight compounds. *The Protein Journal* 27(6):392-400.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., e Ferrin, T. E. 2004. UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25(13):1605-1612.
- Pey, A. L., e Martinez, A. 2009. Iron binding effects on the kinetic stability and unfolding energetics of a thermophilic phenylalanine hydroxylase from *Chloroflexus aurantiacus*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 14(4):521-531.
- Pietz, J., Kreis, R., Rupp, a., Mayatepek, E., Rating, D., Boesch, C., e Bremer, H.J. 1999. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *The Journal of Clinical Investigation* 103(8):1169-1178.
- Pusey, M. L., Paley, M. S., Turner, M. B., e Rogers, R. D. 2007. Protein crystallization using room temperature ionic liquids. *Crystal Growth & Design* 7(4):787-793.

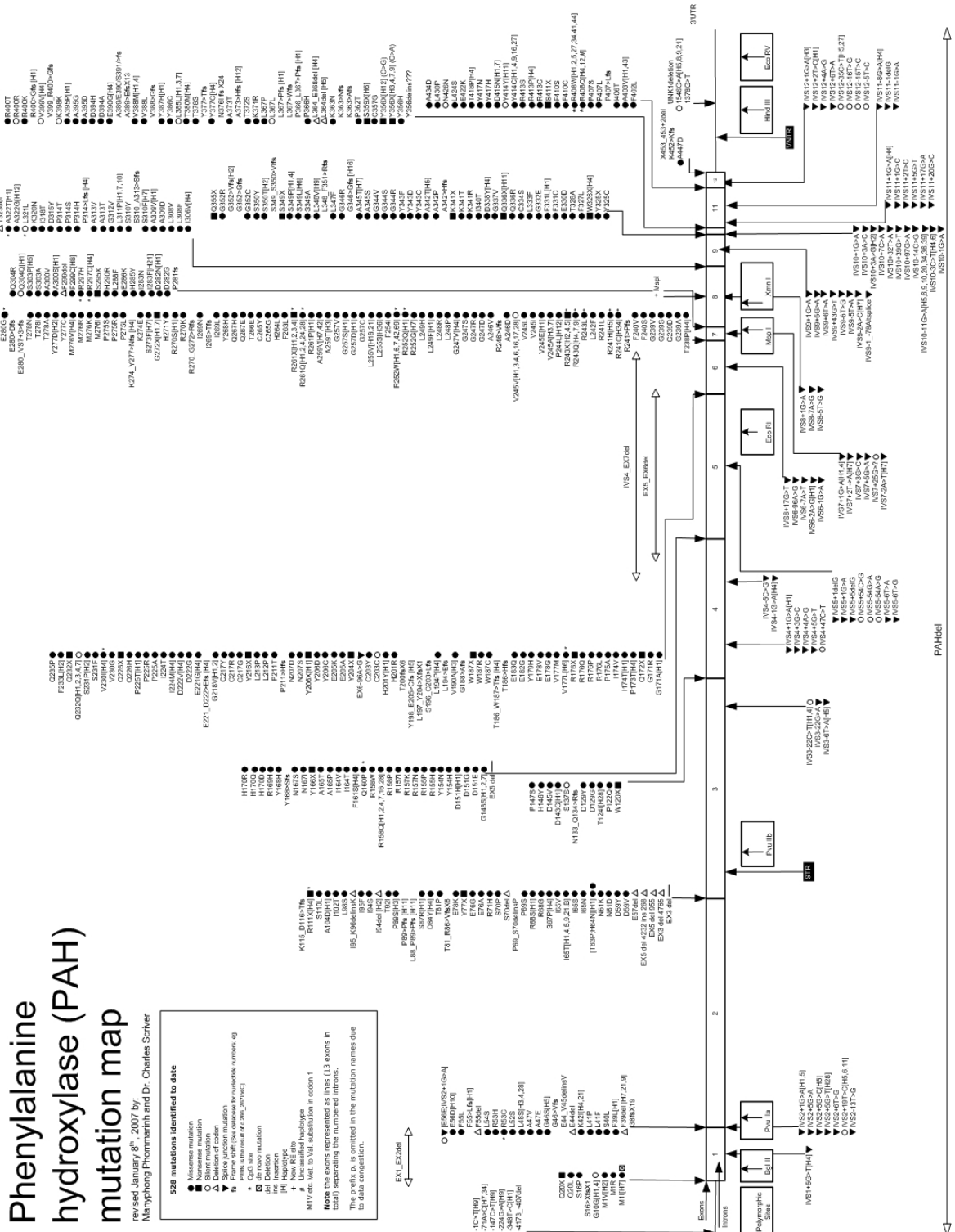
- Rhodes, G. 2006. *Crystallography Made Crystal Clear - A Guide for Users of Macromolecular Models*, 3^a ed. Elsevier. Boston.
- Rivera, I., Leandro, P., Lichter-konecki, U., Almeida, I. T., e Lechner, M. C. 1998. Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. *Medical Genetics* 35:301-304.
- Rupp, B. 2009. Proteins for crystallography. *Biomolecular crystallography: Principles, practice, and application to structural biology*. pp 141-194, Garland Science, New York.
- Santos, L. L., Magalhães, M. D., Januário, J. N., Aguiar, M. J., e Carvalho, M. R. 2006. The time has come: a new scene for PKU treatment. *Genetics and Molecular* 5(1):33-44.
- Sarkissian, C. N., e Gámez, A. 2005. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now?. *Molecular Genetics and Metabolism* 86 (Suppl 1):22-26.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., e Peitsch, M. C. 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31(13):3381-3385.
- Scriver, C. 2007. The hPAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Human Mutation* 28(9):831-845.
- Scriver, C. R., Hurtubise, M., Konecki, D., Phommarinh, M., Prevost, L., Erlandsen, H., Stevens, R. C., Waters, P. J., Ryan, P., McDonald, D., e Sarkissian, C. 2003. hPAHdb 2003: what a locus-specific knowledgebase can do. *Human Mutation* 21(4):333-344.
- Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., e Klenk, D.. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150(1):76-85.
- Solstad, T., e Flatmark, T. 2000. Microheterogeneity of recombinant human phenylalanine hydroxylase as a result of nonenzymatic deamidations of labile amide containing amino acids: Effects on catalytic and stability properties. *European Journal of Biochemistry* 267(20):6302-6310.
- Solstad, T., Carvalho, R. N., Andersen, O. A., Waidelich, D., e Flatmark, T. 2003. Deamidation of labile asparagine residues in the autoregulatory sequence of human phenylalanine hydroxylase: Structural and functional implications. *European Journal of Biochemistry* 2705:929-938.
- Sorensen, T. L., McAuley, K. E., Flaig, R., e Duke, E. M. 2006. New light for science: synchrotron radiation in structural medicine. *Trends in biotechnology* 24(11):500-508.
- Spaapen, L., e Estela Rubio-Gozalbo, M. 2003. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, state of the art. *Molecular Genetics and Metabolism* 78(2):93-99.
- Stokka, A. J., Carvalho, R. N., Barroso, J. F., e Flatmark, T. 2004. Probing the role of crystallographically defined/predicted hinge-bending regions in the substrate-induced global conformational transition and catalytic activation of human phenylalanine hydroxylase by single-site mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 279(25):26571-26580.

- Surtees, R., e Blau, N. 2000. The neurochemistry of phenylketonuria. *European Journal of Pediatrics* 159(Suppl):109-113.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., e Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22):4673-4680.
- Tickle, I., Sharff, A., Vinkovic, M., Yon, J., e Jhoti, H. 2004. High-throughput protein crystallography and drug discovery. *Chemical Society Reviews* 33(8):558-65.
- Vilarinho, L., Queirós, A., Leandro, P., Almeida, I. T., e Rivera, I. 2006. Fenilcetonúria revisitada. *Arquivos de Medicina* 20:161-172.
- Walker, S., Rucker, P., e Liu, X. 1994. A carboxyl terminal leucine zipper is required for tyrosine hydroxylase tetramer formation. *Journal of Neurochemistry* 63(6):2014-2020.
- Wang, W. 1999. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* 185(2):129-188.
- Winn, M. D. 2002. An overview of the CCP4 project in protein crystallography: an example of a collaborative project. *Journal of Synchrotron Radiation* 10(1):23-25.
- Groot, M. J., Hoeksma, M., Blau, N., Reijngoud, D. J., e Spronsen, F. J. 2010. Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: review of hypotheses. *Molecular Genetics and Metabolism* 99(Suppl 1):86-89.
- Spronsen, F. J., e Enns, G. M. 2010. Future treatment strategies in phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism* 99(Suppl 1):90-95.

7 ANEXOS

7.1 Mapa das mutações conhecidas no locus PAH

Revisto a 8 de Agosto de 2007, pelo Dr. Charles Scriver e Manyphong Phommarrinh.



7.2 Vector de expressão procariota pTrcHisB

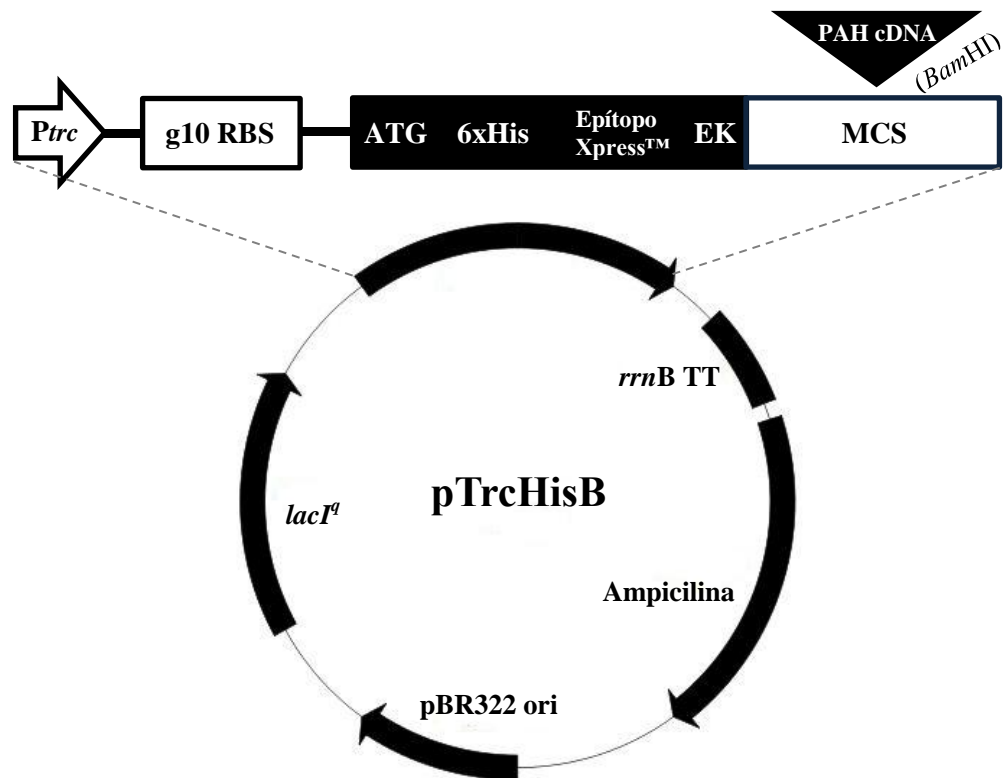


Figura 27 – Representação esquemática do vector de expressão procariota pTrcHisB (Invitrogen). A região da cassette de expressão encontra-se ampliada (ver texto para detalhes).

7.3 Screenings usados nos ensaios de cristalização

7.3.1 MemStart

Solução	Precipitante	Tampão	pH	Sal
1	2 M Sulfato de amônio	0,1 M Acetato de sódio	4,5	
2	1 M Sulfato de amônio	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	
3	2 M Sulfato de amônio			
4	2 M Sulfato de amônio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
5	1,5 M Sulfato de lítio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
6	1 M Sulfato de magnésio	0,1 M Acetato de sódio	4,5	
7	1 M Sulfato de magnésio	0,1 M Citrato de sódio	5,5	
8	1 M Sulfato de magnésio	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,1 M Sulfato de lítio
9	1 M Fosfato de amônio			
10	0,5 M Fosfato de potássio			0,1 M Sulfato de amônio
	0,5 M Fosfato de sódio			
11	1 M Fosfato de amônio	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,1 M Sulfato de lítio
12	1 M Fosfato de amônio	0,1 M Citrato de sódio	5,5	
13	2 M Fosfato de amônio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
14	2 M Formato de sódio			
15	4 M Formato de sódio			
16	1,4 M Acetato de sódio	0,1 M MES	6,5	
17	1,4 M Citrato de sódio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
18	1 M Tartarato de sódio/potássio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
19	2% (p/v) PEG 400	0,1 M Na-HEPES	7,5	
	2 M Sulfato de amônio			
20	30% (p/v) PEG 400	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,1 M Cloreto de magnésio
21	30% (p/v) PEG 400	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Cloreto de sódio
22	30% (p/v) PEG 400	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Sulfato de lítio
23	30% (p/v) PEG 400	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,3 M Sulfato de lítio
24	30% (p/v) PEG 400	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Cloreto de magnésio
25	30% (p/v) PEG 400	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Sulfato de amônio
26	30% (p/v) PEG 400	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Citrato de sódio de sódio
27	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,1 M Acetato de sódio de zinco
28	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,2 M Sulfato de amônio
29	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	
30	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Sulfato de lítio
31	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,1 M Cloreto de sódio
32	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,1 M Sulfato de lítio
33	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Cloreto de sódio
34	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Sulfato de amônio
35	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Cloreto de magnésio
36	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Sulfato de lítio
37	12% (p/v) PEG 4000			0,2 M Sulfato de amônio
38	12% (p/v) PEG 6000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,1 M Cloreto de sódio
39	12% (p/v) PEG 6000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,1 M Cloreto de magnésio
40	12% (p/v) PEG 6000	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,1 M Cloreto de magnésio
41	12% (p/v) PEG 6000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Fosfato de amônio
42	12% (p/v) PEG 8000			
	1 M Sulfato de lítio			
43	12% (p/v) PEG 8000	0,1 M MES	6,5	0,2 M Acetato de sódio
44	12% (p/v) PEG 8000	0,1 M MES	6,5	0,2 M Acetato de zinco
45	12% (p/v) PEG 8000	0,1 M MES	6,5	0,2 M Acetato de cálcio
46	12% (p/v) PEG 8000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
47	12% (p/v) PEG 8000			0,2 M Sulfato de amônio
48	12% (p/v) PEG 8000			
	0,5 M Sulfato de lítio			

7.3.2 Crystallization Basic Kit

Solução	Precipitante	Tampão	pH	Sal
1	1 M Fosfato de sódio/potássio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Fosfato de amónio
2	12% (p/v) PEG 6000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Fosfato de amónio
3	0,5 M Fosfato de sódio 0,5 M Fosfato de potássio	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Sulfato de amónio
4	18% (v/v) PEG 400	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Sulfato de amónio
5	10% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Sulfato de amónio
6	10% (p/v) PEG 4000	0,1 M Acetato de sódio	4,6	0,1 M Sulfato de amónio
7	1 M Tartarato de sódio/potássio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
8	1 M Citrato de sódio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
9	0,4 M Sulfato de magnésio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Tartarato de sódio/potássio
10	0,1 M Tartarato de sódio/potássio	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Sulfato de lítio
11	1 M Sulfato de magnésio	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,1 M Sulfato de lítio
12	12% (p/v) PEG 4000 20% (v/v) Isopropanol	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,1 M Sulfato de lítio
13	1 M Fosfato de amónio	0,1 M Acetato de sódio	4,6	0,1 M Sulfato de lítio
14	4% (v/v) PEG 400	0,1 M Citrato de sódio	5,6	0,1 M Sulfato de lítio
15	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,6	0,1 M Sulfato de lítio
16	12% (p/v) PEG 6000	0,1 M Citrato de sódio	5,6	0,1 M Sulfato de lítio
17	12% (v/v) MPD	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Sulfato de lítio
18	4% (v/v) PEG 400	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,3 M Sulfato de lítio
19	18% (v/v) PEG 400	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Cloreto de magnésio
20	12% (p/v) PEG 6000	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,1 M Cloreto de magnésio
21	18% (v/v) PEG 400	0,1 M Acetato de sódio	4,6	0,1 M Cloreto de magnésio
22	12% (p/v) PEG 6000	0,1 M Acetato de sódio	4,6	0,1 M Cloreto de magnésio
23	4% (v/v) MPD	0,1 M Citrato de sódio	5,6	0,1 M Cloreto de magnésio
24	4% (v/v) MPD	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,6 M Sulfato de magnésio
25	12% (v/v) MPD	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	
26	1 M Fosfato de amónio	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	
27	1 M Sulfato de amónio	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	
28	1 M Sulfato de amónio	0,1 M Acetato de sódio	4,6	
29	1 M Sulfato de magnésio	0,1 M Acetato de sódio	4,6	
30	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Acetato de sódio	4,6	
31	12% (v/v) MPD	0,1 M Acetato de sódio	4,6	0,1 M Cloreto de sódio
32	12% (p/v) PEG 6000	0,1 M TRIS-HCl	8,0	0,15 M Cloreto de sódio
33	10% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Cloreto de sódio
34	12% (v/v) Isopropanol	0,1 M Acetato de sódio	4,6	0,1 M Cloreto de sódio
35	12% (p/v) PEG 6000	0,1 M Acetato de sódio	4,6	0,1 M Cloreto de sódio
36	12% (v/v) MPD	0,1 M Citrato de sódio	5,6	0,1 M Cloreto de sódio
37	12% (v/v) PEG 400	0,1 M Citrato de sódio	5,6	0,1 M Cloreto de sódio
38	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,6	0,1 M Cloreto de sódio
39	12% (v/v) MPD	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Cloreto de sódio
40	12% (v/v) MPD	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Citrato de sódio
41	5% (v/v) PEG 400	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Citrato de sódio
42	10% (v/v) Isopropanol	0,1 M Citrato de sódio	5,6	
43	1 M Sulfato de magnésio	0,1 M Citrato de sódio	5,6	
44		0,1 M Citrato de sódio	5,6	0,1 M Cloreto de sódio
45	0,5 M Sulfato de amónio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
46		0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Sulfato de lítio
47		0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Acetato de sódio
48		0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Cloreto de sódio

7.3.3 *Natrix*

Solução	Precipitante	Tampão	pH	Sal
1	1,8 M Sulfato de lítio	0,05 M MES	5,6	0,01 M Cloreto de magnésio
2	2,5 M Sulfato de amônio	0,1 M MES	5,6	0,01 M Acetato de magnésio
3	20% (v/v) MPD	0,05 M MES	5,6	0,1 M Acetato de magnésio
4	10% (v/v) PEG 400	0,05 M MES	5,6	0,2 M Cloreto de potássio 0,01 M Sulfato de magnésio
5	5% (p/v) PEG 8000	0,05 M MES	5,6	0,2 M Cloreto de potássio 0,01 M Cloreto de magnésio
6	20% (p/v) PEG 8000	0,05 M MES	5,6	0,1 M Sulfato de amônio 0,01 M Cloreto de magnésio
7	15% (v/v) Isopropanol	0,05 M MES	6,0	0,02 M Cloreto de magnésio
8	0,6 M Cloreto de sódio	0,1 M MES	6,0	0,1 M Acetato de amônio 5m M Sulfato de magnésio
9	10% (v/v) PEG 400	0,1 M MES	6,0	0,1 M Cloreto de potássio 0,01 M Cloreto de magnésio
10	5% (p/v) PEG 4000	0,05 M MES	6,0	0,005 M Sulfato de magnésio
11	1 M Sulfato de lítio	0,05 M Cacodilato de sódio	6,0	0,01 M Cloreto de magnésio
12	1,8 M Sulfato de lítio	0,05 M Cacodilato de sódio	6,0	0,01 M Sulfato de magnésio
13	1,7 Sulfato de amônio	0,05 M Cacodilato de sódio	6,0	0,015 M Acetato de magnésio
14	15% (v/v) Isopropanol	0,05 M Cacodilato de sódio	6,0	0,1 M Cloreto de potássio 0,025 M Cloreto de magnésio
15	5% (v/v) MPD	0,05 M Cacodilato de sódio	6,0	0,04 M Cloreto de magnésio
16	30% (v/v) MPD	0,05 M Cacodilato de sódio	6,0	0,04 M Acetato de magnésio
17	10% (p/v) PEG 4000	0,05 M Cacodilato de sódio	6,0	0,2 M Cloreto de potássio 0,01 M Cloreto de cálcio
18	1,3 M Sulfato de lítio	0,05 M Cacodilato de sódio	6,5	0,01 M Acetato de magnésio
19	2 M Sulfato de amônio	0,05 M Cacodilato de sódio	6,5	0,01 M Sulfato de magnésio
20	10% (v/v) Isopropanol	0,05 M Cacodilato de sódio	6,5	0,1 M Acetato de amônio 0,015 M Acetato de magnésio
21	10% (p/v) Hexanodiol	0,05 M Cacodilato de sódio	6,5	0,2 M Cloreto de potássio 0,005 M Cloreto de magnésio
22	15% (v/v) PEG 400	0,05 M Cacodilato de sódio	6,5	0,08 M Acetato de magnésio
23	10% (p/v) PEG 4000	0,05 M Cacodilato de sódio	6,5	0,2 M Cloreto de potássio 0,01 M Cloreto de magnésio
24	10% (p/v) PEG 4000	0,05 M Cacodilato de sódio	6,5	0,2 M Acetato de amônio
25	30% (p/v) PEG 4000	0,05 M Cacodilato de sódio	6,5	0,08 M Acetato de magnésio
26	10% (p/v) PEG 8000	0,05 M Cacodilato de sódio	6,5	0,2 M Cloreto de potássio 0,1 M Acetato de magnésio
27	30% (p/v) PEG 8000	0,05 M Cacodilato de sódio	6,5	0,2 M Acetato de amônio 0,01 M Acetato de magnésio
28	1,6 M Sulfato de lítio	0,05 M Na-HEPES	7,0	0,05 M Sulfato de magnésio
29	4 M Cloreto de lítio	0,05 M Na-HEPES	7,0	0,01 M Cloreto de magnésio
30	1,6 M Sulfato de amônio	0,05 M Na-HEPES	7,0	0,01 M Cloreto de magnésio
31	25% (p/v) PEG 550 monometil éter	0,05 M Na-HEPES	7,0	0,005 M Cloreto de magnésio
32	20% (p/v) Hexanodiol	0,05 M Na-HEPES	7,0	0,01 M Cloreto de magnésio
33	30% (p/v) Hexanodiol	0,05 M Na-HEPES	7,0	0,2 M Cloreto de amônio
34	15% (v/v) MPD	0,05 M Na-HEPES	7,0	0,1 M Cloreto de potássio 0,005 M Sulfato de magnésio
35	5% (v/v) PEG 400	0,05 M Na-HEPES	7,0	0,1 M Cloreto de potássio 0,01 M Cloreto de magnésio
36	10% (v/v) PEG 400	0,05 M Na-HEPES	7,0	0,1 M Cloreto de potássio 0,01 M Cloreto de cálcio
37	20% (v/v) PEG 200	0,05 M Na-HEPES	7,0	0,2 M Cloreto de potássio 0,025 M Sulfato de magnésio
38	5% (p/v) PEG 4000	0,05 M Na-HEPES	7,0	0,2 M Acetato de amônio 0,15 M Acetato de magnésio
39	5% (p/v) PEG 8000	0,05 M Na-HEPES	7,0	0,1 M Acetato de amônio 0,02 M Cloreto de magnésio
40	1,6 M Sulfato de amônio	0,05 M TRIS-HCl	7,5	0,01 M Cloreto de magnésio
41	10% (p/v) PEG 550 monometil éter	0,05 M TRIS-HCl	7,5	0,1 M Cloreto de potássio
42	5% (v/v) Isopropanol	0,05 M TRIS-HCl	7,5	0,01 M Cloreto de magnésio

Solução	Precipitante	Tampão	pH	Sal
43	10% (v/v) MPD	0,05 M TRIS-HCl	7,5	0,05 M Acetato de amônio 0,01 M Cloreto de magnésio
44	10% (p/v) PEG 4000	0,05 M TRIS-HCl	7,5	0,2 M Cloreto de potássio 0,05 M Cloreto de magnésio
45	1,8 M Sulfato de amônio	0,05 M TRIS-HCl	8,5	0,025 M Sulfato de magnésio
46	35% (p/v) Hexanodiol	0,05 M TRIS-HCl	8,5	0,005 M Sulfato de magnésio
47	30% (v/v) PEG 400	0,05 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Cloreto de potássio 0,01 M Cloreto de magnésio
48	30% (p/v) PEG 4000	0,05 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Cloreto de amônio 0,01 M Cloreto de cálcio

7.3.4 Crystal Screen 2

Solução	Precipitante	Tampão	pH	Sal
1	10% (p/v) PEG 6000			2 M Cloreto de sódio
2	0,5 M Cloreto de sódio 0,01 M Cloreto de magnésio			0,01 M Brometo de amônio
3	25% (v/v) Etileno glicol			
4	35% (v/v) Dioxano			
5	5% (v/v) Isopropanol 2 M Sulfato de amônio			
6	1 M Imidazol			
7	10% (p/v) PEG 1000 10% (p/v) PEG 8000			
8	10% (v/v) Etanol			1,5 M Cloreto de sódio
9	2 M Cloreto de sódio	0,1 M Acetato de sódio	4,5	
10	30% (v/v) MPD	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,2 M Cloreto de sódio
11	1 M Hexanodiol	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,01 M Cloreto de cobalto
12	30% (v/v) PEG 400	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,1 M Cloreto de cádmio
13	30% (p/v) PEG 2000 monometil éter	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,2 M Sulfato de amônio
14	2 M Sulfato de amônio	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,2 M Tartarato de sódio/potássio
15	1 M Sulfato de lítio	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,5 M Sulfato de amônio
16	2% (v/v) Polietilenimina	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,5 M Cloreto de sódio
17	35% (v/v) t-Butanol	0,1 M Citrato de sódio	5,5	
18	10% (v/v) Jeffamina M-600	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,01 M Cloreto de ferro (II)
19	2,5 M Hexanodiol	0,1 M Citrato de sódio	5,5	
20	1,6 M Sulfato de magnésio	0,1 M MES	6,5	
21	2 M Cloreto de sódio	0,1 M MES	6,5	0,1 M Fosfato de sódio 0,1 M Fosfato de potássio
22	12% (p/v) PEG 20000	0,1 M MES	6,5	
23	10% (v/v) Dioxano 1,6 M Sulfato de amônio	0,1 M MES	6,5	
24	30% (v/v) Jeffamina M-600	0,1 M MES	6,5	0,05 M Cloreto de céscio
25	1,8 M Sulfato de amônio	0,1 M MES	6,5	0,01 M Cloreto de cobalto
26	30% (p/v) PEG 5000 monometil éter	0,1 M MES	6,5	0,2 M Sulfato de amônio
27	25% (p/v) PEG 5000 monometil éter	0,1 M MES	6,5	0,01 M Sulfato de zinco
28	1,5 M Citrato de sódio		5,6	
29	30% (v/v) MPD 0,5 M Sulfato de amônio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
30	10% (p/v) PEG 6000 5% (v/v) MPD	0,1 M Na-HEPES	7,5	
31	20% (v/v) Jeffamina M-600	0,1 M Na-HEPES	7,5	
32	1,6 M Sulfato de amônio	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Cloreto de sódio
33	2 M Formato de sódio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
34	1 M Acetato de sódio	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,05 M Sulfato de cádmio
35	70% (v/v) MPD	0,1 M Na-HEPES	7,5	
36	4,3 M Cloreto de sódio	0,1 M Na-HEPES	7,5	

Solução	Precipitante	Tampão	pH	Sal
37	10% (p/v) PEG 8000 8% (v/v) Etileno glicol	0,1 M Na-HEPES	7,5	
38	20% (p/v) PEG 20000	0,1 M Na-HEPES	7,5	
39	3,4 M Hexanodiol	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Cloreto de magnésio
40	25% (v/v) t-Butanol	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
41	0,1 M Sulfato de lítio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,01 M Cloreto de níquel
42	12% (v/v) Glicerol 1,5 M Sulfato de lítio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
43	50% (v/v) MPD	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Fosfato de amônio
44	20% (v/v) Etanol	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
45	20% (p/v) PEG 2000 monometil éter	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,01 M Cloreto de níquel
46	20% (p/v) PEG 550 monometil éter	0,1 M Bicina	9,0	0,1 M Cloreto de sódio
47	2 M Cloreto de magnésio	0,1 M Bicina	9,0	
48	2% (v/v) Dioxano 10% (p/v) PEG 20000	0,1 M Bicina	9,0	

7.3.5 Wizard 2

Solução	Precipitante	Tampão	pH	Sal
1	10% (p/v) PEG 3000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,2 M Acetato de zinco
2	35% (v/v) MPD	0,1 M MES	6,0	0,2 M Sulfato de lítio
3	20% (p/v) PEG 8000	0,1 M TRIS-HCl	8,0	0,2 M Cloreto de magnésio
4	2 M Sulfato de amônio	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,2 M Cloreto de sódio
5	20% (v/v) Dioxano	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Cloreto de sódio
6	10% (v/v) Isopropanol	0,1 M Fosfato/citrato de sódio	4,2	0,2 M Sulfato de lítio
7	30% (p/v) PEG 3000	0,1 M TRIS-HCl	7,0	0,2 M Cloreto de sódio
8	10% (p/v) PEG 8000	0,1 M Fosfato de sódio	6,2	0,2 M Cloreto de sódio
9	2 M Sulfato de amônio	0,1 M Fosfato/citrato de sódio	4,2	
10	1 M Fosfato de amônio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
11	10% (v/v) Isopropanol	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,2 M Acetato de zinco
12	30% (v/v) PEG 400	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,2 M Sulfato de lítio
13	15 % (v/v) Etanol	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,2 M Sulfato de lítio
14	20% (p/v) PEG 1000	0,1 M Fosfato de sódio	6,2	0,2 M Cloreto de sódio
15	1,26 M Sulfato de amônio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
16	1 M Citrato de sódio	0,1 M CAPS	9,7	
17	2,5 M Cloreto de sódio	0,1 M TRIS-HCl	7,0	0,2 M Cloreto de magnésio
18	20% (p/v) PEG 3000	0,1 M TRIS-HCl	7,0	0,2 M Acetato de cálcio
19	1,26 M Fosfato de sódio 0,4 M Fosfato de potássio	0,1 M Fosfato/citrato de sódio	4,2	
20	15% (v/v) Etanol	0,1 M MES	6,0	0,2 M Acetato de zinco
21	35% (v/v) MPD	0,1 M Acetato de sódio	4,5	
22	10% (v/v) Isopropanol	0,1 M Imidazol	8,0	
23	15% (v/v) Etanol	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Cloreto de magnésio
24	30% (p/v) PEG 8000	0,1 M Imidazol	8,0	0,2 M Cloreto de sódio
25	35% (v/v) MPD	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Cloreto de sódio
26	30% (v/v) PEG 400	0,1 M CAPS	9,7	
27	10% (p/v) PEG 3000	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,2 M Cloreto de magnésio
28	20% (p/v) PEG 8000	0,1 M MES	6,0	0,2 M Acetato de cálcio
29	1,26 M Sulfato de amônio	0,1 M CAPS	9,7	0,2 M Cloreto de sódio
30	20% (v/v) Dioxano	0,1 M Imidazol	8,0	0,2 M Acetato de zinco
31	1 M Citrato de sódio	0,1 M TRIS-HCl	7,0	0,2 M Cloreto de sódio
32	20% (p/v) PEG 1000	0,1 M TRIS-HCl	7,0	
33	1 M Fosfato de amônio	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,2 M Cloreto de sódio
34	10% (p/v) PEG 8000	0,1 M Imidazol	8,0	
35	0,8 M Fosfato de sódio 1,2 M Fosfato de potássio	0,1 M Acetato de sódio	4,5	
36	10% (p/v) PEG 3000	0,1 M Fosfato/citrato de sódio	4,2	0,2 M Cloreto de sódio
37	1 M Tartarato de sódio/potássio	0,1 M TRIS-HCl	7,0	0,2 M Sulfato de lítio
38	2,5 M Cloreto de sódio	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,2 M Sulfato de lítio
39	20% (p/v) PEG 8000	0,1 M CAPS	10,5	0,2 M Cloreto de sódio

Solução	Precipitante	Tampão	pH	Sal
40	20% (p/v) PEG 3000	0,1 M Imidazol	8,0	0,2 M Acetato de zinco
41	2 M Sulfato de amônio	0,1 M TRIS-HCl	7,0	0,2 M Sulfato de lítio
42	30% (v/v) PEG 400	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Cloreto de sódio
43	10% (p/v) PEG 8000	0,1 M TRIS-HCl	7,0	0,2 M Cloreto de magnésio
44	20% (p/v) PEG 1000	0,1 M Cacodilato de sódio	6,5	0,2 M Cloreto de magnésio
45	1,26 M Sulfato de amônio	0,1 M MES	6,0	
46	1 M Fosfato de amônio	0,1 M Imidazol	8,0	0,2 M Cloreto de sódio
47	2,5 M Cloreto de sódio	0,1 M Imidazol	8,0	0,2 M Acetato de zinco
48	1 M Tartarato de sódio/potássio	0,1 M MES	6,0	

7.3.6 JBScreen Classic 2

Solução	Precipitante	Tampão	pH	Sal
1	4% (p/v) PEG 4000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	
2	8% (p/v) PEG 4000			
3	8% (p/v) PEG 4000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	
4	10% (p/v) PEG 4000	0,1 M MES	6,5	0,2 M Cloreto de magnésio
5	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Acetato de sódio
6	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
7	16% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Sulfato de lítio
8	16% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Acetato de sódio
9	16% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Cloreto de magnésio
10	18% (p/v) PEG 4000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	
11	20% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Sulfato de lítio
12	20% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Cloreto de cálcio
13	22% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Acetato de sódio
14	25% (p/v) PEG 4000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	
15	25% (p/v) PEG 4000	0,1 M MES	6,5	0,2 M Cloreto de magnésio
16	25% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Cloreto de cálcio
17	30% (p/v) PEG 4000			
18	30% (p/v) PEG 4000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,1 M Cloreto de magnésio
19	30% (p/v) PEG 4000	0,1 M MES	6,5	
20	30% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Cloreto de cálcio
21	30% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Sulfato de lítio
22	30% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Acetato de sódio
23	30% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Cloreto de magnésio
24	35% (p/v) PEG 4000			

7.3.7 JBScreen Classic 3

Solução	Precipitante	Tampão	pH	Sal
1	8% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,8 M Cloreto de lítio
2	10% (p/v) PEG 4000			
	20% (v/v) Isopropanol			
3	10% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	
	10% (v/v) Isopropanol			
4	10% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	
	5% (v/v) Isopropanol			
5	10% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	
	20% (v/v) Isopropanol			
6	12% (p/v) PEG 4000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,2 M Acetato de amônio
7	15% (p/v) PEG 4000			0,2 M Sulfato de amônio
	10% (v/v) Isopropanol			
8	15% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,2 M Acetato de amônio
9	16% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Sulfato de amônio
	10% (v/v) Isopropanol			
10	20% (p/v) PEG 4000			0,2 M Acetato de amônio
11	20% (p/v) PEG 4000			0,2 M Sulfato de magnésio
	10% (v/v) Glicerol			

Solução	Precipitante	Tampão	pH	Sal
12	20% (p/v) PEG 4000 5% (v/v) Isopropanol			0,1 M Citrato de sódio
13	20% (p/v) PEG 4000 20% (v/v) Isopropanol			0,1 M Citrato de sódio
14	20% (p/v) PEG 4000	0,1 M MES	6,5	0,6 M Cloreto de sódio
15	20% (p/v) PEG 4000 10% (v/v) Isopropanol	0,1 M Na-HEPES	7,5	
16	22% (p/v) PEG 4000			0,2 M Sulfato de amônio 0,1 M Acetato de sódio
17	25% (p/v) PEG 4000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,2 M Sulfato de amônio
18	25% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,2 M Acetato de amônio
19	25% (p/v) PEG 4000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Sulfato de lítio 0,1 M Acetato de sódio
20	25% (p/v) PEG 4000 8% (v/v) Isopropanol			0,1 M Acetato de sódio
21	30% (p/v) PEG 4000			0,2 M Sulfato de amônio
22	30% (p/v) PEG 4000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	0,2 M Sulfato de amônio
23	30% (p/v) PEG 4000	0,1 M Citrato de sódio	5,5	0,2 M Acetato de amônio
24	32% (p/v) PEG 4000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,8 M Cloreto de lítio

7.3.8 JBScreen Classic 4

Solução	Precipitante	Tampão	pH	Sal
1	25% (p/v) PEG 5000 monometil éter	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Sulfato de lítio
2	30% (p/v) PEG 5000 monometil éter	0,1 M MES	6,5	0,2 M Sulfato de amônio
3	3% (p/v) PEG 6000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Cloreto de potássio
4	10% (p/v) PEG 6000			0,01 M Cloreto de magnésio
5	12% (p/v) PEG 6000			2 M Cloreto de sódio
6	15% (p/v) PEG 6000 5% (v/v) Glicerol			
7	15% (p/v) PEG 6000			0,05 M Cloreto de potássio 0,1 M Cloreto de magnésio
8	16% (p/v) PEG 6000			0,1 M Citrato de sódio
9	20% (p/v) PEG 6000	0,1 M Imidazol	8,0	0,1 M Cloreto de cálcio
10	25% (p/v) PEG 6000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Cloreto de lítio
11	28% (p/v) PEG 6000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Cloreto de lítio
12	30% (p/v) PEG 6000			1 M Cloreto de lítio 0,1 M Acetato de sódio
13	33% (p/v) PEG 6000			0,01 M Citrato de sódio
14	2% (p/v) PEG 8000			0,5 M Sulfato de lítio
15	2% (p/v) PEG 8000			1 M Sulfato de lítio
16	4% (p/v) PEG 8000			
17	8% (p/v) PEG 8000			0,2 M Cloreto de lítio 0,05 M Sulfato de magnésio
18	8% (p/v) PEG 8000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
19	10% (p/v) PEG 8000	0,1 M MES	6,5	0,2 M Acetato de zinco
20	10% (p/v) PEG 8000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Acetato de sódio
21	10% (p/v) PEG 8000			0,05 M Acetato de magnésio 0,1 M Acetato de sódio
22	10% (p/v) PEG 8000			0,2 M Acetato de magnésio
23	10% (p/v) PEG 8000 10% (v/v) Etileno glicol	0,1 M Na-HEPES	7,5	
24	10% (p/v) PEG 8000 10% (p/v) PEG 1000			

7.3.9 JBScreen Classic 5

Solução	Precipitante	Tampão	pH	Sal
1	12% (p/v) PEG 8000 5% (v/v) Glicerol			0,1 M Cloreto de potássio
2	12% (p/v) PEG 8000 10% (v/v) Glicerol			0,1 M Cloreto de potássio
3	15% (p/v) PEG 8000			0,2 M Sulfato de amônio
4	15% (p/v) PEG 8000			0,5 M Sulfato de lítio
5	15% (p/v) PEG 8000	0,1 M MES	6,5	0,2 M Acetato de sódio
6	15% (p/v) PEG 8000			0,05 M Sulfato de amônio 0,1 M Citrato de sódio
7	18% (p/v) PEG 8000	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,2 M Acetato de cálcio
8	18% (p/v) PEG 8000 2% (v/v) Isopropanol	0,1 M Na-HEPES	7,5	0,1 M Acetato de sódio
9	18% (p/v) PEG 8000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,2 M Sulfato de lítio
10	20% (p/v) PEG 8000	0,1 M Na-HEPES	7,5	
11	20% (p/v) PEG 8000	0,1 M MES	6,5	0,2 M Acetato de magnésio
12	20% (p/v) PEG 8000	0,1 M TRIS-HCl	9,5	
13	22% (p/v) PEG 8000	0,1 M MES	6,5	0,2 M Sulfato de amônio
14	25% (p/v) PEG 8000			0,2 M Cloreto de lítio
15	30% (p/v) PEG 8000			0,2 M Sulfato de amônio
16	8% (p/v) PEG 10000	0,1 M Acetato de sódio	4,5	
17	14% (p/v) PEG 10000	0,1 M Imidazol	8,0	
18	16% (p/v) PEG 10000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
19	18% (p/v) PEG 10000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Cloreto de sódio
	20% (v/v) Glicerol			
20	20% (p/v) PEG 10000	0,1 M Na-HEPES	7,5	
21	30% (p/v) PEG 10000	0,1 M TRIS-HCl 8,5		
22	10% (p/v) PEG 20000	0,1 M MES	6,5	
23	17% (p/v) PEG 20000	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,1 M Cloreto de magnésio
24	20% (p/v) PEG 20000			

7.3.10 JBScreen Classic 10

Solução	Precipitante	Tampão	pH	Sal
1	0,5 M Acetato de sódio	0,1 M Imidazol	8,0	
2	0,7 M Citrato de sódio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
3	0,7 M Sulfato de lítio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
4	0,8 M Tartarato de sódio/potássio	0,1 M Na-HEPES	8,5	
5	1 M Fosfato de amônio	0,1 M Citrato de sódio	5,5	
6	1 M Fosfato de amônio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
7	1 M Sulfato de lítio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	0,01 M Cloreto de níquel
8	1 M Acetato de sódio	0,1 M Imidazol	8,0	
9	1 M Formato de sódio	0,1 M Acetato de sódio	4,5	
10	1,4 M Acetato de sódio	0,1 M MES	6,5	
11	1,4 M Citrato de sódio	0,1 M Na-HEPES	7,5	
12	1,5 M Sulfato de lítio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
13	1,5 M Citrato de sódio			
14	1,6 M Sulfato de magnésio	0,1 M MES	6,5	
15	1,6 M Tartarato de sódio/potássio	0,1 M MES	6,5	
16	2 M Fosfato de amônio	0,1 M MES	6,5	
17	2 M Fosfato de amônio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
18	2 M Formato de sódio			
19	2 M Cloreto de magnésio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
20	2 M Cloreto de sódio	0,1 M MES	6,5	
21	2 M Formato de sódio	0,1 M Acetato de sódio	4,5	
22	1 M Fosfato de amônio	0,1 M TRIS-HCl	8,5	
	30% (v/v) Glicerol			
23	4 M Cloreto de sódio			
24	3 M Formato de sódio			

7.3.11 Additive Screen 1

Solução	Aditivo	Classificação	Massa molecular (Da)
1	0,1 M Cloreto de bário	Catião divalente	244,28
2	0,1 M Cloreto de cádmio	Catião divalente	219,34
3	0,1 M Cloreto de cobalto	Catião divalente	237,93
4	0,1 M Cloreto de cobre	Catião divalente	170,48
5	0,1 M Cloreto de manganês	Catião divalente	197,91
6	0,1 M Cloreto de estrôncio	Catião divalente	266,62
7	0,1 M Cloreto de ítrio	Catião divalente	353,14
8	0,1 M Cloreto de zinco	Catião divalente	136,29
9	30% (v/v) Etileno glicol	Orgânico	62,07
10	30% (v/v) Glicerol anidro	Orgânico	92,10
11	30% (v/v) MPD	Orgânico	118,18
12	50% (v/v) PEG 400	Orgânico	400,00
13	0,1 M Hidrocloro de trimetilamina	Agente caotrópico	95,57
14	1,0 M Hidrocloro de guanidina	Agente caotrópico	95,53
15	0,1 M Ureia	Agente caotrópico	60,06
16	15% (p/v) 1,2,3-Heptanotriol	Anfipático	148,20
17	20% (p/v) Hidrocloro de benzamidina	Anfipático	156,62
18	30% (v/v) Dioxano	Orgânico volátil	88,11
19	30% (v/v) Etanol	Orgânico volátil	46,07
20	30% (v/v) Isopropanol	Orgânico volátil	60,10
21	30% (v/v) Metanol	Orgânico volátil	32,04