



Ana Rita Castro Otrelo Cardoso

Licenciada em Química Aplicada

Caracterização estrutural de enzimas de molibdénio e suas chaperonas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Doutora Teresa Sacadura Santos-Silva,
Investigadora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista
Arguente: Doutor Tiago Miguel Guerra Miranda Bandeiras
Vogal: Doutora Teresa Sacadura Santos-Silva



Ana Rita Castro Otrelo Cardoso

Licenciada em Química Aplicada

Caracterização estrutural de enzimas de molibdénio e suas chaperonas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Doutora Teresa Sacadura Santos-Silva,
Investigadora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista
Arguente: Doutor Tiago Miguel Guerra Miranda Bandeiras
Vogal: Doutora Teresa Sacadura Santos-Silva

Título: Caracterização estrutural de enzimas de molibdénio e suas chaperonas.

“*Copyright*” em nome de Ana Rita Castro Otrelo Cardoso.

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

Agradecimentos

Dedico esta dissertação à minha mãe, Anabela, por nunca ter duvidado. Espero poder compensar-te no futuro por tudo o que fizeste e continuas a fazer por mim. Um profundo obrigada mamã!

Aos meus avós, Luz e João, que (mesmo sem saberem bem o que faço) acreditaram e apoiaram-me incondicionalmente.

Ao meu tio, Jorge, pelo entusiasmo com que encara a ciência e pelo apoio.

Ao meu priminho Francisco.

Ao meu querido Milton, companheiro nesta jornada e na vida. Sem ti, nunca teria sido capaz de chegar aqui. O esforço e a dedicação irão compensar-nos no futuro.

À Professora Doutora Maria João Romão pela oportunidade de poder realizar o meu trabalho no Grupo de Cristalografia.

Um enorme agradecimento à minha orientadora, Doutora Teresa Santos-Silva, por ter acreditado em mim desde o início, pela ajuda e formação. És uma inspiração para mim.

Aos membros do Xtal: Ana Luísa, Abhik, Angelina, Benedita, Catarina, Carmen, Cecília, Diana V., Diana R., Filipe, Hugo, Márcia e Marino. Obrigada pelos bons momentos que passámos juntos e pela imensa ajuda que me deram.

Ao meu fiel companheiro, Snoopy.

Aos meus amigos: Sara, Susana, Catarina, Diana, Joana, Pedro, Luís, Carlos e Saúl, pelo carinho e apoio. É bom caminhar ao vosso lado. São fantásticos!

Obrigada a todos!

Resumo

O molibdénio encontra-se no centro activo de diversas enzimas, presentes em todas as formas de vida. O passo final da produção destas proteínas é a inserção do cofactor modificado (Moco) e requer a acção de proteínas específicas, identificadas como chaperonas. O objectivo deste trabalho é compreender o funcionamento das chaperonas na inserção do Moco nas apoenzimas, utilizando várias técnicas como a Cristalografia de raios X, *Small-Angle X-ray Scattering* (SAXS) e Ressonância Plasmónica de Superfície (SPR). Assim pretende-se estudar a enzima de molibdénio aldeído oxidoreductase periplasmática ABC de *Escherichia coli* (PaoABC), a sua chaperona PaoD, bem como outras chaperonas da mesma família: a YqeB, também de *E. coli* e a XdhC de *Rhodobacter capsulatus*.

Na presente dissertação descreve-se a resolução da primeira estrutura da PaoABC por cristalografia de raios X e SAXS. Usando polietilenoglicol (PEG), como agente precipitante, foi possível obter cristais desta proteína que permitiram a determinação da sua estrutura tridimensional a uma resolução de 1,87 Å. Recorrendo à técnica de SAXS foi possível obter um modelo a baixa resolução da PaoABC em solução.

Em relação à chaperona PaoD, foram identificadas duas condições de cristalização, utilizando sulfato de amónio ou PEG como agentes precipitantes. Os cristais obtidos permitiram a recolha de dois conjuntos de dados a uma resolução máxima de 3,4 e 2,6 Å, respectivamente. Atendendo à elevada instabilidade da proteína utilizaram-se líquidos iónicos (IL) como estabilizadores e experiências de Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de Transferência de Saturação (RMN-STD) permitiram identificar uma interacção específica entre a proteína e o anel imidazol do IL. A técnica de *thermofluor* também foi utilizada para determinar o tampão ideal para esta proteína. Novos ensaios de cristalização foram realizados com a chaperona em tampão Bis-Tris a pH 5,5 e a optimização dos cristais está em curso.

De modo a estudar as interacções entre a chaperona PaoD e a PaoABC, recorreu-se à técnica SPR. Nos ensaios foi utilizada uma terceira proteína, a MocA, identificada como responsável pela formação do cofactor MCD (*Molybdopterin cytosine dinucleotide*). Os dados obtidos mostraram que esta, para além de interagir com a chaperona PaoD, interage também com a enzima PaoABC. Este resultado sugere a formação de um complexo PaoABC-PaoD-MocA e a sua presença *in vivo* pode estar relacionada com o aumento da eficácia do processo de expressão da enzima de molibdénio.

A proteína YqeB, também foi cristalizada usando PEG ou isopropanol como agentes precipitantes. As condições de cristalização estão de momento a ser optimizadas de modo a obter cristais únicos passíveis de serem usados numa experiência de difracção que possibilite a determinação da sua estrutura.

O processo de expressão e purificação da XdhC encontra-se em fase de optimização, de forma a ser possível obter proteína para a realização dos ensaios de cristalização.

Termos chave: Cristalografia de raios X; Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de Transferência de Saturação; *Thermofluor*; Ressonância Plasmónica de Superfície; Molibdoenzimas; Chaperonas

Abstract

Molybdenum is found on the active site of many enzymes in all life forms. The final step of the productions of this kind of enzymes is the insertion of the molybdenum cofactor (Moco) which requires the presence of specific proteins, the chaperones. The objective of the present dissertation is to understand how the chaperones interact with the molybdenum enzymes, while they insert the cofactor in the apoenzyme. For that, X-ray crystallography, Small-Angle X-ray Scattering (SAXS) and Superficial Plasmon Resonance (SPR) were used to study the periplasmic aldehyde oxidoreductase ABC from *Escherichia coli* (PaoABC), its chaperone PaoD, as well other chaperones of the same family, YqeB, also from *E. coli* and XdhC, from *Rhodobacter capsulatus*.

In the present dissertation, the first structure of PaoABC using X-ray crystallography and SAXS is described. With polyethylene glycol (PEG) as the precipitant agent, it was possible to obtain crystals that allow the determination of the tridimensional structure with a resolution of 1,87 Å. Using SAXS technique, a low resolution model of PaoABC in solution could also be obtained.

For the chaperone PaoD, it was possible to identify two crystallization conditions using ammonium sulphate or PEG as precipitating agents. These crystals were used in a diffraction experiment and two data sets with a maximum resolution of 3,4 and 2,6 Å were collected. Due to the PaoD instability, ionic liquids (IL) were used as protein stabilizers. Through Saturation Transfer Difference - Nuclear Magnetic Resonance (STD-NMR) it was observed that PaoD interacts specifically with the imidazole ring of the IL. Thermofluor assays were also used to determine the ideal buffer for this protein. New crystallizations assays were performed in Bis-Tris pH 5,5 buffer, and crystal optimization is being performed.

To study the interactions of the chaperone PaoD and PaoABC, the SPR technique was used. The assays were performed in the presence of a third protein, MocA, responsible for the production of the MCD (Molybdopterin cytosine dinucleotide) cofactor. The obtained data showed that MocA interacts not only with PaoD, but also with PaoABC. This result suggests the formation of a PaoABC-PaoD-MocA complex and its presence in vivo may be related with a higher efficiency of the expression process of the molybdenum enzyme.

The YqeB protein was also crystallized using PEG and isopropanol as precipitant agents. The crystallization conditions are being optimized for the production of single crystals to be used for diffraction experiments and structure determination of its structure.

The expression and purification procedures of XdhC are being optimized in order to obtain protein for crystallization assays.

Keywords: X-ray crystallography; Saturation Transfer Difference - Nuclear Magnetic Resonance; Small Angle X-ray Scattering; Thermofluor; Molybdoenzymes; Chaperones

Índice Geral

Agradecimentos.....	I
Resumo	III
<i>Abstract</i>	V
Índice Geral	VII
Índice de Figuras	IX
Índice de Tabelas	XI
Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos	XIII
1. Introdução	1
1.1. Molibdoenzimas.....	3
1.1.1. Cofactor de molibdénio	3
1.1.2. Enzimas com cofactor de molibdénio	6
1.2. Cristalografia de Raios X.....	14
1.2.1. Raios X.....	14
1.2.2. Cristalização de proteínas.....	16
1.2.3. Experiência de difracção e resolução da estrutura.....	18
1.2.4. Refinamento e validação.....	21
1.3. <i>Small-angle X-ray scattering</i>	22
2. Objectivos	25
3. Procedimento experimental	29
3.1. Estudos com a PaoABC	31
3.1.1. Sobre-expressão em <i>Escherichia coli</i> e purificação	31
3.1.2. Ensaio de cristalização.....	32
3.1.3. <i>Small angle X-ray scattering</i>	32
3.2. Estudos com a PaoD.....	33
3.2.1. Sobre-expressão em <i>Escherichia coli</i> e purificação da PaoD	33
3.2.2. Ensaio de cristalização.....	34
3.2.3. Ensaio de <i>Thermofluor</i>	35
3.2.4. Ensaio de Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de transferência de saturação..	35
3.2.5. Ensaio de Ressonância Plasmónica de Superfície	36
3.3. Ensaio para a XdhC de <i>Rhodobacter capsulatus</i>	36
3.3.1. Sobre-expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> e purificação	36
3.4. Ensaio para a YqeB.....	37
3.4.1. Sobre-expressão em <i>Escherichia coli</i> e purificação	37
3.4.2. Ensaio de cristalização.....	38
4. Resultados e discussão	39
4.1. Estudos com a PaoABC	41
4.1.1. Sobre-expressão em <i>Escherichia coli</i> e purificação	41
4.1.2. Cristalografia de Raios X	44

4.1.3. <i>Small angle X-ray scattering</i>	57
4.2. Estudos com PaoD	58
4.2.1. Sobre-expressão em <i>Escherichia coli</i> e purificação da PaoD	58
4.2.2. Ensaio de cristalização e experiências de difracção	60
4.2.3. Ensaio de <i>Thermofluor</i>	66
4.2.4. Ensaio de Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de transferência de saturação..	68
4.2.5. Ensaio de Ressonância Plasmónica de Superfície	69
4.3. Estudos com a XdhC	71
4.3.1. Sobre-expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> e purificação	71
4.4. Estudos com a YqeB	72
4.4.1. Sobre-expressão em <i>Escherichia coli</i> e purificação	72
4.4.2. Ensaio de cristalização e experiência de difracção	74
5. Conclusões e perspectivas futuras	77
5.1. Conclusões	79
5.2. Perspectivas futuras	81
6. Bibliografia	83
7. Anexos	93

Índice de Figuras

Figura 1.1. Via biossintética para a formação do cofactor de molibdénio em eucariontes e procariontes..	4
Figura 1.2. Biossíntese da molibdopterina dinucleótido em <i>E. coli</i> ..	5
Figura 1.3. Representação do centro activo de molibdoenzimas..	6
Figura 1.4. Diversidade de enzimas dependentes do molibdénio que constituem a família Xantina Oxidase..	9
Figura 1.5. Biossíntese e inserção do MCD sulfurado na PaoABC..	11
Figura 1.6. Modelo para a formação de XDH de <i>R. capsulatus</i> e formação do MCD sulfurado..	12
Figura 1.7. Representação esquemática da organização dos operões que incluem os genes homólogos ao <i>xdhC</i> em <i>E. coli</i> e <i>R. capsulatus</i> ..	13
Figura 1.8. Espectro electromagnético..	15
Figura 1.9. Fontes de raios X..	15
Figura 1.10. Representação da rede cristalina de um cristal, composta por várias células unitárias.	16
Figura 1.11. Diagrama de fases para a cristalização de proteínas..	17
Figura 1.12. Técnicas de cristalização por difusão de vapor..	18
Figura 1.13. Representação da Lei de Bragg..	19
Figura 1.14. Representação da experiência de SAXS e dos respectivos dados..	23
Figura 4.1. SDS-PAGE a 12,5% com as fracções resultantes do primeiro passo de purificação da PaoABC com a coluna de Ni-NTA..	42
Figura 4.2. Cromatografia de troca iónica correspondente ao segundo passo de purificação da PaoABC utilizando uma coluna Q-Sepharose..	43
Figura 4.3. SDS-PAGE a 12,5% com as fracções resultantes do segundo passo de purificação da PaoABC com cromatografia de troca iónica em coluna Q-Sepharose..	43
Figura 4.4. Cristais de PaoABC obtidos a 20 °C..	44
Figura 4.5. Padrão de difracção para o cristal de PaoABC obtido a 20 °C..	45
Figura 4.6. Representação gráfica da função de distribuição cumulativa de $ L $ obtido no programa <i>Scala</i> do CCP4 para o cristal de PaoABC obtido a 20 °C..	47
Figura 4.7. Cristais de PaoABC obtidos a 4 °C..	48
Figura 4.8. Padrão de difracção para o cristal de PaoABC obtido a 4 °C..	48
Figura 4.9. Representação gráfica da função de distribuição cumulativa de $ L $ obtido no programa <i>Scala</i> do CCP4 para o cristal de PaoABC obtido a 4 °C..	50
Figura 4.10. Vista dos cofactores com representação da densidade electrónica antes e depois do primeiro refinamento..	56

Figura 4.11. Sobreposição do modelo <i>ab initio</i> da PaoABC com um modelo de alta resolução da 4-hidroxibenzoil-CoA redutase resolvido por cristalografia de raios X.	58
Figura 4.12. SDS-PAGE a 12,5% com as fracções resultantes da purificação da PaoD com a coluna de Ni-TED.....	59
Figura 4.13. Cristal de PaoD previamente incubada com 0,4 M [C ₄ mim]Cl.....	61
Figura 4.14. Padrão de difracção do cristal de PaoD previamente incubada com 0,4 M [C ₄ mim]Cl..	61
Figura 4.15. Cristal de PaoD previamente incubada com 0,4 M [C ₂ OHmim]PF ₆	63
Figura 4.16. Padrão de difracção do cristal de PaoD previamente incubada com 0,4 M [C ₂ OHmim]PF ₆	64
Figura 4.17. Cristal de PaoD obtido a 20 °C.....	65
Figura 4.18. Padrão de difracção do cristal de PaoD.....	66
Figura 4.19. Curvas de fluorescência resultantes da experiência de <i>thermofluor</i> para a PaoD em duas soluções tampão..	67
Figura 4.20. Detalhe da região aromática do espectro de RMN-STD da PaoD na presença do líquido iónico [C ₂ OHmim]PF ₆ (A).....	69
Figura 4.21. SDS-PAGE a 12,5% com as fracções resultantes da purificação com a coluna de <i>Chitin Beads</i> da XdhC.....	72
Figura 4.22. SDS-PAGE a 12,5% com as fracções resultantes da purificação da YqeB com a coluna de Ni-TED.....	73
Figura 4.23. Cristais de YqeB obtidos a 20 °C.....	74
Figura 7.1. Representação esquemática dos sete sistemas cristalinos.	95
Figura 7.2. Cromatografia de exclusão molecular da proteína PaoD.....	100

Índice de Tabelas

Tabela 3.1. Composição dos tampões em que se encontrou a proteína em estudo, PaoD.....	34
Tabela 4.1. Valores para o Momento de E para o cristal de PaoABC obtido a 20 °C	47
Tabela 4.2. Estatísticas de qualidade dos dados de difracção e coeficiente de Matthews para o cristal de PaoABC.....	49
Tabela 4.3. Informação relativa aos modelos utilizados para a resolução da estrutura da PaoABC. .	52
Tabela 4.4. Estatísticas obtidas para o primeiro ciclo de refinamento estrutura da PaoABC.....	55
Tabela 4.5. Estatísticas de qualidade dos dados de difracção e coeficiente de Matthews para os cristais de PaoD.	62
Tabela 4.6. Medições de SPR para a análise de interacções específicas proteína-proteína.....	70
Tabela 7.1. Composição dos meios de cultura utilizados para um litro de crescimento de <i>E. coli</i>	95
Tabela 7.2. Composição das 80 soluções baseadas no <i>screen</i> de Jancarik <i>et al.</i>	96
Tabela 7.3. Composição do <i>screen</i> utilizado para os ensaios de <i>thermofluor</i>	99

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

α - Fases da onda

ϵ - Coeficiente de extinção molar

λ - Comprimento de onda

ϕ - Ângulo em torno da ligação N-C α da cadeia polipeptídica

ψ - Ângulo em torno da ligação C-C α da cadeia polipeptídica

I_{hkl} - Intensidade da reflexão

σ_{hkl} - Erro associado a cada intensidade

ρ_{xyz} - Densidade electrónica

$|F_{hkl}|$ - Amplitude do Factor de Estrutura

$|F_{calc}|$ - Amplitude do Factor de Estrutura calculado

$|F_{obs}|$ - Amplitude do Factor de Estrutura observado

AO - Aldeído oxidase

AOR - Aldeído oxidoreductase

A. thaliana - *Arabidopsis thaliana*

Bis-Tris - Bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano

BSA - Albumina de soro bovino (do inglês *Bovine serum albumin*)

CBD - Domínio de ligação a quitina (do inglês *Chitin binding domain*)

CCP4 - *Collaborative Computational Project Number 4*

CMP - Citidina Monofosfato

Crio-EM - Microscopia Electrónica a Temperatura Criogénica (do inglês *Cryo-electron microscopy*)

CODH - Monóxido de Carbono Desidrogenase

COOT - *Crystallographic Object-Oriented Toolkit*

cPMP - Piranopterina cíclica monofosfato

Cv - Volume de coluna (do inglês *Column Volume*)

DESY - *Deutsches Elektronen-Synchrotron*

D. gigas - *Desulfovibrio gigas*

DPFGE - *Double Pulsed Field Gradient Spin Echo*

DMSO - Dimetilsulfóxido

E. coli - *Escherichia coli*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMBL - *European Molecular Biology Laboratory*

ESRF - *European Synchrotron Radiation Facility*

EPR - Ressonância Paramagnética Electrónica

F - Amplitude da onda

F_{hkl} - Factor de estrutura

F_{cal} - Factor de estrutura calculado

F_{obs} - Factor de estrutura observado

FAD - Dinucleótido de flavina e adenina

FT - Transformada de Fourier
FT⁻¹ - Transformada de Fourier inversa
G. gallus – *Gallus gallus*
GMP - Guanosina monofosfato
GTP - Guanosina trifosfato
HEPES - (4-(2-hidroxietil) - ácido 1-piperazinoetanosulfônico)
His₆ - seis resíduos de histidina
IL – Líquido iônico (do inglês *ionic liquid*)
IPTG - Isopropil-β-D-tiogalactósido
kDa - kiloDalton
LLG - *Log Likelihood Gain*
LB - Luria-Bertani
MAD - Dispersão Anômala Múltipla (do inglês *Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*)
MCD - *Molybdopterin cytosine dinucleotide*
MGD - *Molybdopterin guanine dinucleotide*
MIR - Substituição Isomórfica Múltipla (do inglês *Multiple Isomorphous Replacement*)
Moco - Cofactor de molibdênio (do inglês *molybdenum cofactor*)
MOPS - Ácido 3-(N-morfolino)-propano sulfônico
MPT - Molibdopterina
MR - Substituição Molecular (do inglês *Molecular Replacement*)
NAD - Nicotinamida Adenina Dinucleótido
Ni-NTA - Níquel - ácido nitrilotriacético (do inglês *nickel-nitrilotriacetic acid*)
Ni-TED -Níquel-tris(carboximetil)etilenodiamina (do inglês *nickel-tris-carboxymethyl ethylene diamine*)
O. carboxidovorans - *Oligotropha carboxidovorans*
OD - Densidade óptica (do inglês *Optical Density*)
ORF - Grelha de leitura aberta (do inglês *Open Reading Frame*)
PaoABC - Aldeído oxidoreductase periplasmática ABC de *Escherichia coli*
PCR - Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)
PDB - *Protein Data Bank*
PEG - Polietilenoglicol
QOR - Quinolina oxidoreductase
R. capsulatus - *Rhodobacter capsulatus*
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
RMSD - *Root Mean Square Deviation*
SAD - Dispersão Anômala Simples (do inglês *Single Wavelength Anomalous Dispersion*)
SAM - S-Adenosilmetionina
SAXS - *Small-angle X-ray scattering*
SDH - Sulfito Desidrogenase
SDS-PAGE - Electroforese em Gel de Poliacrilamida e Dodecil-Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SLS - *Swiss Light Source*

SO - Sulfito Oxidase

SPR - Ressonância Plasmônica de Superfície (do inglês *Surface Plasmon Resonance*)

STD - Diferença de Transferência de Saturação (do inglês *Saturation Transfer Difference*)

TMAO - N-óxido de trimetilamina

T_m - Temperatura de fusão de proteína

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

V_M - Coeficiente de Matthews

XDH - Xantina Desidrogenase

XO - Xantina Oxidase

1. Introdução

1.1. Molibdoenzimas

1.1.1. Cofactor de molibdénio

Uma variedade de metais de transição tem sido encontrada em sistemas biológicos de forma a proporcionar uma elevada diversidade catalítica. A importância do elemento de transição molibdénio, para diferentes formas de vida, foi reportada pela primeira vez em 1932, onde se sugeria que este metal seria essencial ao crescimento das plantas, bactérias e animais [1]. Encontra-se abundantemente nos oceanos sob a forma de ião molibdato (MoO_4^{2-}) sendo, aliás, esta a única fonte de molibdénio nos solos para plantas e bactérias. Uma vez que não se registou uma grande alteração da composição dos mares desde a sopa primordial que deu origem à vida, não é surpreendente que este elemento seja factor comum em inúmeros mecanismos biológicos de diferentes tipos organismos [2], [3].

O molibdénio (e também o tungsténio) apresenta(m) uma versatilidade química única como: actividade redox em condições fisiológicas, variando o seu estado de oxidação entre VI e IV e a capacidade de catalisar reacções de hidroxilação de centros de carbono em condições moderadas [3], [4]. Esta versatilidade atribui às molibdoenzimas um papel muito importante no metabolismo do carbono, enxofre e azoto [5].

O molibdénio, com excepção do centro multinuclear MoFe_7 presente na nitrogenase bacteriana, está presente nas molibdoenzimas na sua forma mononuclear, possuindo um cofactor orgânico tricíclico, a piranopterina, coordenado ao metal através do grupo ditioleno [6], [7]. Uma vez que o metal é a chave da actividade da enzima, a função do cofactor é posicioná-lo correctamente no seu centro activo, de forma a controlar o seu comportamento redox. Como é necessário em quantidades muito reduzidas, considera-se um elemento vestigial [4], [8].

A unidade piranopterina pode apresentar diferentes formas dependendo dos organismos onde se encontra. Enquanto que em eucariontes apresenta a forma de monofosfato simples, designando-se por molibdopterina (MPT), em procariontes encontra-se complexada com nucleótidos, como a guanidina (*molybdopterin guanine dinucleotide* – MGD) ou a citosina (*molybdopterin cytosine dinucleotide* – MCD) [7].

O primeiro modelo da síntese do cofactor de molibdénio (Moco) derivou de estudos envolvendo a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) e tem sido alvo de debate desde então [9]. Esta via biossintética, conservada em humanos, plantas e bactérias, é constituída por quatro etapas principais (Figura 1.1). A primeira etapa envolve a transformação do derivado de guanosina (5'-GTP: guanosina 5'- trifosfato) no precursor Z (ou piranopterina cíclica monofosfato - cPMP). Quando comparado com o Moco ou MPT, o precursor Z é muito estável, com um tempo de meia-vida de várias horas a pH baixo [10]. Em todos os organismos, este passo é catalisado por duas enzimas, sendo que uma delas pertence à super-família de enzimas dependentes da S-Adenosilmetionina (SAM). Conhecidas na literatura são a Cnx2 nas plantas, MOCS1A nos humanos e MoaA em *E. coli* [11]. Esta última pertence ao operão *moaABCDE*, que codifica mais quatro enzimas, MoaB-MoaE, igualmente envolvidas na biossintese do Moco e referidas nos parágrafos seguintes [12], [13].

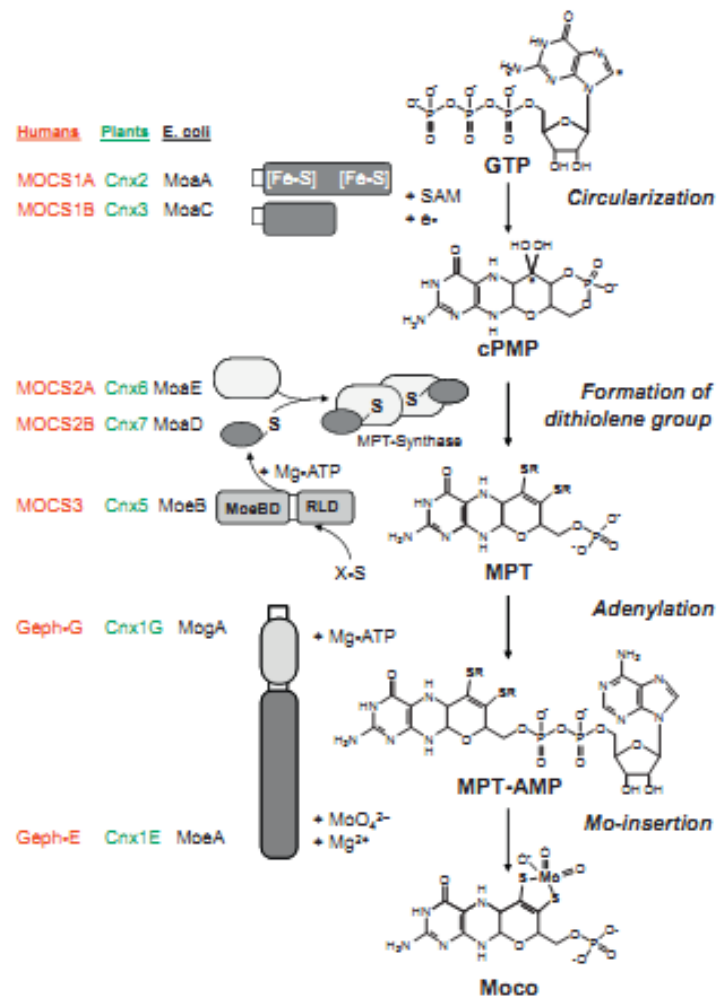


Figura 1.1. Via biossintética para a formação do cofactor de molibdénio em eucariontes e procariontes. O nome das proteínas envolvidas em cada passo encontram-se a vermelho para humanos, a verde para plantas e a preto para *E. coli* [14].

Outra enzima envolvida no primeiro passo da biossíntese do Moco em *E. coli* é a MoaC. Esta actua em conjunto com a enzima MoaA, contudo ainda não foi possível clarificar se formam um complexo proteína-proteína *in vivo* [15], [16]. Estudos realizados com estas duas enzimas de *E. coli* servem como base para a compreensão de efeitos causados por mutações nos ortólogos humanos (MOCS1A e MOCS1B) que levam à deficiência do cofactor de molibdénio. Esta deficiência induz uma doença geralmente fatal que é acompanhada de sintomas neurológicos graves [15].

A segunda etapa da síntese do Moco consiste na inserção de dois átomos de enxofre no precursor Z, convertendo-o em MPT. Esta reacção é catalisada pela enzima sintase de MPT. Em *E. coli* trata-se de um heterotetrâmero, composto por duas subunidades codificadas pelos genes *moaD* e *moaE*, igualmente inseridos no operão referido anteriormente, *moa* [17]. Ligado à subunidade mais pequena (MoaD) deste complexo encontra-se um enxofre sob a forma de tiocarboxilato [18]. Depois de sintase de MPT transferir os dois enxofres para o precursor Z tem de ser re-sulfurada de forma a estar activa no próximo ciclo de conversão. Em *E. coli* essa função é desempenhada pela proteína

MoeB, que activa novamente a sintase através da inserção do tiocarboxilato na glicina do C-terminal da Moad [11], [19].

Os dois passos seguintes culminam na síntese do Moco. O átomo de molibdénio, ao ser transferido para o MPT, liga a via de captação de molibdato à via de produção do Moco. Em *E. coli*, esta etapa é catalisada por duas proteínas (MogA e MoeA), enquanto que para os organismos superiores estas proteínas fundiram-se numa só com dois domínios. É o caso da Cnx1 com os domínios G e E, presente nas plantas [2].

As proteínas MoeA e MogA catalisam a incorporação específica do molibdénio no MPT, utilizando o complexo MPT-AMP como intermediário. A sua formação foi reportada pela primeira vez por Llamas *et al.*, numa variante da proteína Cnx1 de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) [20], [21]. Enquanto a proteína MogA forma o intermediário MPT-AMP, a MoeA medeia a ligação do molibdénio ao MPT em concentrações fisiológicas de MoO_4^{2-} . Em ensaios *in vitro*, a utilização de elevadas concentrações de molibdato de sódio (superiores a 5 μM), leva a que o passo de adenilação deixe de ser crucial para a formação do Moco, uma vez que a estas concentrações a inserção do molibdénio directamente ao precursor MPT deixa de necessitar de ser catalisada por MogA [22], [23].

Em procariontes soma-se um passo adicional à biossíntese previamente descrita, com a adição ao Moco de diferentes nucleótidos dependendo do tipo de proteína e microrganismo (Figura 1.2). Especificamente em *E. coli*, o cofactor MGD é formado pela adição covalente da guanosina 5'-fosfato - GMP (proveniente do GTP) ao Moco, mediada pela proteína MobA [24]. Durante muitos anos, pensou-se que a *E. coli* seria incapaz de sintetizar outras formas de cofactor dinucleótido para além do MGD. Este facto devia-se ao insucesso na expressão heteróloga em *E. coli* de proteínas que continham o MCD. Contudo, foram encontradas recentemente três enzimas deste microrganismo que ligam o cofactor MCD. Elas são duas xantinas desidrogenases (XdhABC e XdhD) e uma aldeído oxidoreductase periplasmática (PaoABC), onde o MCD resulta da adição do composto citidina monofosfato (CMP) ao Moco pela proteína MocA [22].

Actualmente em *E. coli* só existe reportada uma proteína, a YedY, capaz de ligar o directamente o Moco sem qualquer modificação adicional [25].

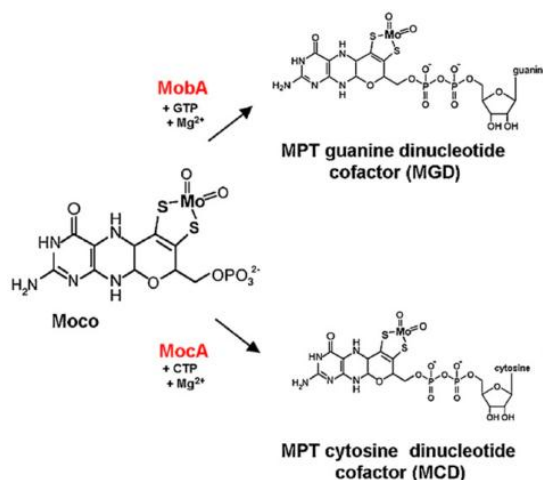


Figura 1.2. Biossíntese da molibdopterina dinucleótido em *E. coli*. O MGD é formado pela proteína MobA que liga especificamente GTP. Analogamente, o MCD é formado pela proteína MocA que liga CTP. Em ambos os casos, a adição do dinucleótido ao cofactor só ocorre depois da inserção do molibdénio. Adaptado [22].

Depois da síntese e maturação, o Moco pode ser incorporado na apoenzima apropriada. Como se trata de um cofactor lábil e sensível ao oxigénio, assume-se que este não existe livre na célula. Assim, pode ocorrer a transferência imediatamente após a síntese para a apoenzima ou o Moco pode ser armazenado em proteínas transportadores que o estabilizam e retêm até futuras utilizações [5], [9]. Para ambos os casos, as células têm que recorrer à intervenção de chaperonas específicas que têm um papel essencial para a actividade das enzimas de molibdénio. Algumas destas proteínas serão caracterizadas no subcapítulo 1.1.2.2.

1.1.2. Enzimas com cofactor de molibdénio

As enzimas de molibdénio encontram-se presentes em todas as formas de vida, desempenhando um papel muito importante e variado ao nível do metabolismo. Em geral, as reacções catalisadas pelas molibdoenzimas são caracterizadas pela transferência de um átomo de oxigénio proveniente da água para o produto (ou vice versa), envolvendo a troca de dois electrões entre a enzima e o substrato e acompanhada pela variação do estado de oxidação do molibdénio entre IV e VI [2]. O molibdénio pode coordenar-se pelo grupo *cis*-ditioleno a uma ou duas piranopterinas, mas também a átomos de oxigénio (sob a forma de grupo oxo ou hidroxilo), enxofre (sob a forma de grupo sulfido) ou cadeias laterais de aminoácidos (como a cisteína) [7], [26]. A variabilidade de ligandos coordenados a este átomo, causa diferenças estruturais relevantes ao nível do centro activo e no tipo de reacção que catalisam. Assim, com base nestas diferenças procedeu-se à sua classificação e divisão em três grandes famílias: a família xantina oxidase (XO), a família sulfito oxidase (SO) e a família dimetilsulfóxido redutase (DMSO) (Figura 1.3) [3], [5], [7].

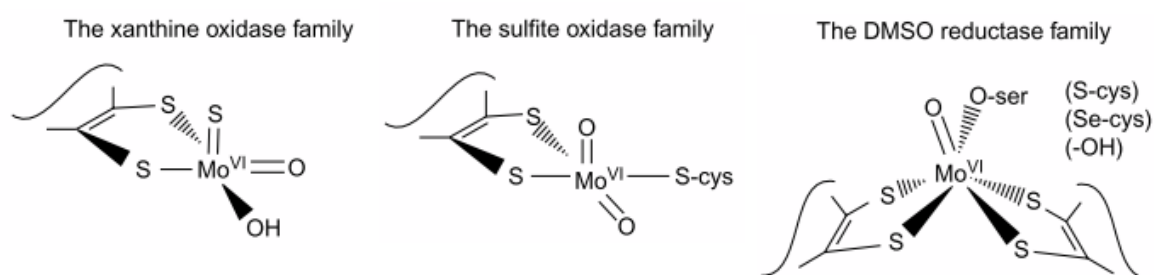


Figura 1.3. Representação do centro activo de molibdoenzimas. Encontram-se presentes três famílias de enzimas: a Xantina Oxidase (inclui a xantina oxidase e desidrogenase, aldeído oxidase e oxidoreductase e a monóxido de carbono desidrogenase), a Sulfito Oxidase (sulfito oxidase e nitrato redutase assimilativa) e a Dimetilsulfóxido redutase (DMSO redutase, nitrato redutase dissimilativa, formato desidrogenase e arsenito oxidase). Adaptado [3].

As enzimas da família SO são essenciais no metabolismo do enxofre em plantas, animais e bactérias. Os seus membros catalisam a transferência de um átomo de oxigénio de ou para um par de electrões no substrato, sendo o seu centro activo do tipo $\text{LMo}^{\text{VI}}\text{O}_2(\text{S-Cys})$, onde o L corresponde ao MPT [3].

Esta família inclui as enzimas oxidantes de sulfitos e a nitrato redutase assimilativa de plantas [3], [7]. As primeiras encontram-se divididas em duas classes, segundo a capacidade de

transferência electrónica para o oxigénio molecular: a sulfito oxidase (SO, de plantas e animais) e a sulfito desidrogenase (SDH, de bactérias) [27]. À excepção da SO de plantas (como a SO de *A. thaliana* [28]) todas as enzimas oxidantes de sulfitos contêm dois centros redox (Moco e hemo) [7], [27].

Em animais, as SO catalisam a oxidação de sulfito a sulfato. Esta oxidação é acompanhada da redução do Mo(VI) para Mo(IV), sendo o citocromo *c* o aceitador final de electrões. É o passo final na degradação oxidativa da metionina e cisteína, sendo muito importante na desintoxicação por excesso de sulfitos [7], [27], [29]. Esta conversão é vital para os humanos, uma vez que uma deficiência nesta enzima causa graves anomalias neurológicas e morte precoce. Este fenótipo pode resultar de um problema na via biossintética do Moco ou no próprio gene que codifica a sulfito oxidase [29].

Grande parte da informação existente sobre esta família deriva dos estudos estruturais realizados para a SO de fígado de *Gallus gallus* (*G. gallus*). Este homodímero (α_2) possui três domínios, onde o primeiro liga um hemo do tipo *b*, o segundo o Moco e o terceiro encontra-se envolvido na ligação entre os dois monómeros [30].

A SO das plantas é responsável pela desintoxicação do excesso de sulfitos resultante da assimilação de enxofre. A SO de *A. thaliana* é um exemplo desta família apresentando igualmente a forma de homodímero. Apesar de pertencerem a Reinos diferentes, verificou-se que do ponto de vista estrutural o centro activo de SO *A. thaliana* e SO de *G. gallus* são muito semelhantes [28]. Contudo, ao contrário de todas as enzimas oxidantes de sulfitos que possuem dois centros redox (Moco e hemo), em plantas a SO apenas possui o Moco [7], [27].

Em bactérias apenas existe a SDH. Este tipo de enzima possui a classificação de desidrogenase, uma vez que não é capaz de transferir electrões para o oxigénio molecular [31]. A SHD de *Starkeya novella* designada por SorAB, por exemplo, tem um papel importante na conversão do sulfito formado durante a dissimilação oxidativa de compostos de enxofre reduzidos. À excepção dos restantes membros da família, a sulfito desidrogenase é um heterodímero formado pela subunidade A, com o Moco e a subunidade B, com o citocromo *c* [7], [31].

O outro tipo de enzimas pertencentes à família SO são as nitrato redutase assimilativas. Estas enzimas catalisam o primeiro passo limitante na velocidade de assimilação de nitrato em plantas, algas e fungos. São activas na forma de homodímero, sendo este apenas formado na presença do Moco. Cada monómero contém três domínios para o Moco, o hemo e para o FAD [32]. Ao nível da estrutura primária e terciária são totalmente diferentes das nitrato redutases de bactérias, pertencentes a outra família de molibdoenzimas, DMSO [7], [33].

A família DMSO é caracterizada por possuir um centro activo do tipo $L_2Mo^{VI}O(X)$, onde L_2 representa os dois grupos MGD coordenados ao metal. O ligando X pode ser uma serina (no caso da DMSO redutase), uma cisteína (na nitrato redutase), uma selenocisteína (formato desidrogenase) ou um grupo hidróxido e/ou uma molécula de água (para a arsenito oxidase). Esta variabilidade faz desta família a mais diversificada das três inicialmente mencionadas [3].

Ao contrário da família XO e SO, as enzimas que a constituem a família DMSO são encontradas exclusivamente em *Archaeobacteria* e *Eubacteria*, incluindo um variado leque de

membros: desde a nitrato redutase (dissimilação e respiração), a formato desidrogenase, etilbenzeno desidrogenase, DMSO redutase e a N-óxido de trimetilamina redutase (TMAO) e arsenito oxidase [7].

À excepção da enzima formato desidrogenase (que catalisa a oxidação de formato a dióxido de carbono), as restantes catalisam a transferência de um átomo de oxigénio de ou para o substrato. Assim, a possibilidade dos membros desta família actuarem como desidrogenases e redutase atribui-lhes um papel principal na respiração anaeróbia de procariontes [33], [34].

O primeiro membro desta família a ser caracterizado estruturalmente foi a enzima DMSO redutase de *Rhodobacter capsulatus* (*R. capsulatus*). É o aceitador final de electrões na cadeia respiratória e catalisa, no periplasma da bactéria, a redução de substratos altamente oxidados, como o dimetilo sulfóxido [35]. A esta podem somar-se outras, como a nitrato redutase periplasmática de *Desulfovibrio desulfuricans* [36], revelando-se um elevado grau de similaridade ao nível da estrutura tridimensional global entre as enzimas desta família.

Existem algumas particularidades associadas às enzimas que constituem esta família. A formato desidrogenase, por exemplo, é das poucas enzimas capaz de incorporar molibdénio ou tungsténio no seu centro activo e a arsenito oxidase é a única da família que não tem nenhum ligando proveniente da cadeia polipeptídica [7].

Por fim temos a família da Xantina Oxidase. Como a enzima alvo de estudo deste trabalho pertence a esta família daremos maior destaque no subcapítulo seguinte.

1.1.2.1. Família xantina oxidase

Os membros da família XO são as molibdoenzimas melhor estudadas até à data, sendo encontradas em eucariontes, procariontes e *archaeobacteria*. São caracterizadas por possuírem um centro activo do tipo $L\text{Mo}^{\text{VI}}\text{OS/O}(\text{OH}_x)$, onde o L representa o MCD ou MPT coordenado ao metal [3], [7]. Com raras excepções, catalisam a hidroxilação de diferentes tipos de substratos de acordo com a reacção:



Esta reacção ocorre no centro activo com o átomo de molibdénio que, após a interacção com o substrato, reduz-se de Mo(VI) para Mo(IV). Os electrões resultantes da reacção são transferidos para um aceitador externo, sendo o processo de transferência electrónica mediado pelos restantes cofactores presentes na proteína [37]. Esta família inclui, entre outras proteínas, a xantina oxidase (XO) e desidrogenase (XDH), a aldeído oxidase (AO) e oxidoreductase (AOR), a monóxido de carbono desidrogenase (CODH) e quinolina oxidoreductase (QOR) (Figura 1.4) [7], [26].

Tipicamente, as molibdoenzimas desta família apresentam a forma de homodímeros com os vários cofactores confinados a uma única cadeia polipeptídica, α_2 , ou em múltiplas subunidades, $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. As enzimas XO/XDH e AO de mamíferos são exemplos de proteínas homodiméricas, α_2 , constituídas por dois centros ferro-enxofre (do tipo [2Fe-2S]), localizados no domínio N-terminal, seguidos do domínio flavina e, por fim do Moco no domínio C-terminal. Contudo, existe uma

Por fim, as enzimas CODH e QOR são exemplos de proteínas com múltiplas subunidades organizadas como $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. A CODH de *Oligotropha carboxidovorans* (*O. carboxidovorans*) catalisa a oxidação reversível do monóxido de carbono a dióxido de carbono e é um exemplo deste tipo de organização estrutural. Cada heterotrímero é composto por três subunidades distintas com o MCD na subunidade L, o FAD na subunidade M e dos centros ferro-enxofre [2Fe-2S] na subunidade S. Esta enzima possui a particularidade de ser a única a possuir um centro catalítico binuclear do tipo [CuSMo(=O)OH] [45], [46].

De seguida daremos destaque a uma proteína pertencente a esta família, a PaoABC. Por reunir características estruturais únicas e ser um dos alvos de estudo desta dissertação encontra-se em destaque de seguida.

Aldeído oxidoreductase periplasmática de *Escherichia coli*

Aquando do projecto do genoma de *E. coli* K-12 [47] foram identificadas três regiões, *paoABCD*, *xdhABC* e *xdhD*, que codificam para proteínas homólogas putativas da XDH. Mais tarde identificou-se que três dos genes do operão *paoABCD*, codificavam para uma aldeído oxidoreductase periplasmática designada por PaoABC (previamente referida como YagTSR) [48].

A PaoABC é a única molibdoenzima da família XO que apresenta uma estrutura heterotrímero não covalente ($\alpha\beta\gamma$). Como dito anteriormente, enzimas da família XO apresentam, geralmente, formas estruturais do tipo α_2 ou $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, fazendo desta enzima um interessante e desafiante caso de estudo. É constituída pela subunidade A com dois centros [2Fe-2S] (21,0 kDa), a subunidade B com o cofactor FAD (33,9 kDa) e a subunidade C com o Moco (78,1 kDa). A subunidade A contém um péptido de sinalização de 49 aminoácidos (Tat – *twin arginine protein transport*) de forma a ser transportada para o periplasma de *E. coli*, onde exerce a sua função. Para além de exibir características estruturais únicas, a PaoABC foi a primeira enzima de *E. coli* a ser identificada que liga a forma MCD (sulfurado) do Moco [22], [48].

Com base no alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas de *E. coli* XdhABC, XdhD e PaoABC, constatou-se uma elevada identidade das subunidades que ligam o Moco (XdhA, XdhD e PaoC, respectivamente) como a AOR de *D. gigas* e a CoxL de *O. carboxidovorans*, duas proteínas que ligam MCD. Isto levanta a suspeita de que para além da PaoABC, também a XdhABC e XdhD de *E. coli* liguem a forma MCD do Moco [48].

Em relação ao transporte electrónico, experiências de EPR (Ressonância Paramagnética Electrónica) para a PaoABC demonstraram um perfil muito semelhante ao obtido para a XDH de *R. capsulatus*. A existência de sinais para os dois centros Fe-S e a similaridade de parâmetros indica que a constituição e geometria dos centros redox da PaoABC são muito semelhantes à XDH de *R. capsulatus* ([2Fe-2S]) [48].

Estudos cinéticos revelaram que a PaoABC tem a capacidade de oxidar aldeídos aromáticos, como o cinamaldeído e o benzaldeído, nos seus ácidos menos lesivos no periplasma de *E. coli*. As enzimas da família XO são conhecidas por catalisar reacções de conversão de várias purinas, como a xantina, hipoxantina e cafeína. Contudo, a PaoABC não demonstrou qualquer actividade catalítica

para este tipo de compostos, reforçando a hipótese de ser específica para oxidação de aldeídos aromáticos [48].

Os aldeídos aromáticos encontram-se abundantemente na natureza, como aromatizantes e corantes das plantas, sendo também produtos da degradação química e enzimática da lenhina. Outros aldeídos aromáticos, como o cinamaldeído, têm actividade anti-microbiana, uma vez que danificam a superfície estrutural da *E. coli*, levando a um crescimento deficiente e/ou à morte da bactéria [49]. Neste sentido, pode afirmar-se que a PaoABC tem um papel essencial na destoxificação e manutenção da integridade da celular da *E. coli*.

A reacção de oxidação dos aldeídos aromáticos a ácidos, através da transferência de oxigénio proveniente da água, ocorre no centro catalítico acompanhada pela alteração do estado de oxidação do molibdénio. Os electrões resultantes da reacção são transferidos para o FAD, localizado na subunidade B, através dos dois centros [2Fe-2S]. A PaoABC não utiliza NAD⁺ ou O₂ como aceitador final de electrões. A ausência de superóxidos como subprodutos da reacção reforça a afirmação de que o oxigénio não é o aceitador final de electrões. Existem evidências que suportam que a ferredoxina de *E. coli* possa desempenhar esse papel [48].

Estudos de expressão demonstraram que a PaoABC depende de uma pequena proteína para se encontrar na sua forma activa, a chaperona PaoD. Esta proteína é codificada pelo gene *paoD*, pertencente ao mesmo operão que a PaoABC. O seu papel será clarificado no subcapítulo seguinte (em conjunto com outras proteínas homólogas) [48].

A aldeído oxidoreductase periplasmática é, igualmente, dependente da proteína MocA de *E. coli*. Esta dependência prende-se com o facto da MocA catalisar a transformação de Moco em MCD, que é o precursor sulfurado que a enzima contém no seu centro activo (ver Figura 1.5) [50], [51].

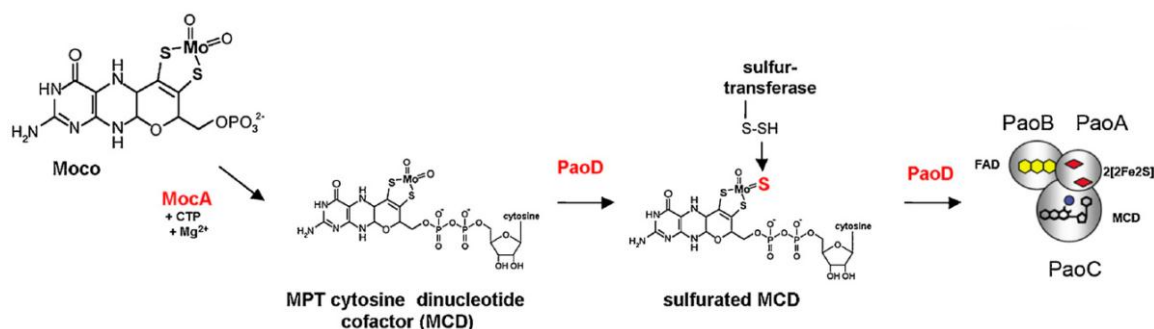


Figura 1.5. Biossíntese e inserção do MCD sulfurado na PaoABC. A síntese do MCD a partir do Moco é realizada pela enzima MocA. Posteriormente, a enzima PaoD transporta e insere o cofactor na enzima PaoABC. A enzima que insere o átomo de enxofre no MCD é ainda desconhecida. Adaptado [22].

1.1.2.2. Família da xantina desidrogenase C

As estruturas tridimensionais de várias enzimas dependentes do molibdénio, como a XDH de *R. capsulatus*, demonstraram que o Moco apenas é acessível através de um canal de ligação do substrato [43]. Esta inacessibilidade ao local catalítico revelou a necessidade de existirem proteínas, designadas por chaperonas, que facilitem a inserção do cofactor e o *fold*ing da apoenzima [51].

Como designado anteriormente a XDH de *R. capsulatus* resulta da expressão de dois genes: *xdhA* e *xdhB*. A jusante destes dois genes, encontra-se o gene *xdhC* (co-transcrito com *xdhAB*). Da expressão deste gene resulta a proteína XdhC, identificada como sendo essencial para a obtenção do complexo XDH activo [52].

A formação do complexo XDH segue uma ordem muito rígida. Envolve: 1) a síntese de XdhA e XdhB; 2) a dimerização de ambas as subunidades; 3) a inserção dos centros Fe-S e o FAD na subunidade XdhA; 4) a dimerização dos dois dímeros ($\alpha\beta$) através da XdhB e 5) a inserção do Moco sulfurado na subunidade XdhB. O papel da XdhC está bem caracterizado, estando esta proteína envolvida no processo de sulfuração e inserção do Moco nas subunidades XdhB.

Quando a XdhC liga o Moco, interage com a enzima L-cisteína desulfurase, NifS4. Desta interacção resulta o Moco com um átomo de enxofre adicional, sendo protegido da oxidação pela XdhC até ser inserido na apoenzima XDH. A transferência do cofactor é dependente da organização estrutural da apoenzima, acontecendo somente quando esta se encontra na forma $\alpha_2\beta_2$ (Figura 1.6). Como o centro catalítico é de difícil acesso, pensa-se que a XdhC actue como chaperona, auxiliando no *folding* da XDH após a inserção do Moco [53], [54].

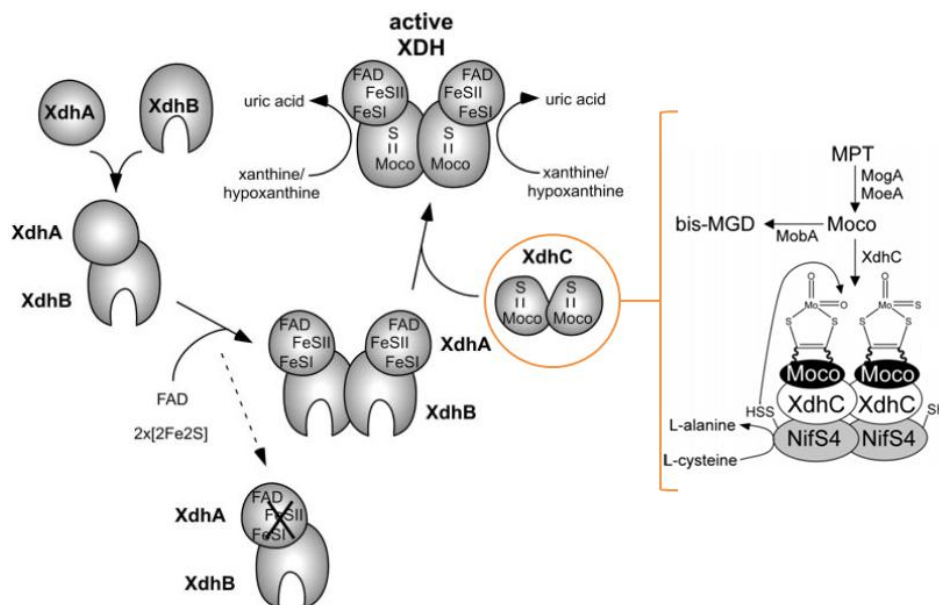


Figura 1.6. Modelo para a formação de XDH de *R. capsulatus* e formação do Moco sulfurado. A formação da XDH envolve a síntese da XdhA e XdhB, dimerização de ambas as subunidades, inserção dos dois centros ferro-enxofre e FAD na subunidade A. Segue-se a dimerização dos dímeros ($\alpha\beta$) através da subunidade B. Depois da transferência do átomo de enxofre para o Moco pela proteína NifS4, a XdhC insere-o nas subunidades XdhB. Quando a inserção de um dos centros ferro-enxofre é incorrecta, a proteína permanece com a forma heterodímero não ocorrendo a ligação do Moco. Adaptado [53], [54].

Genes semelhantes ao *xdhC* de *R. capsulatus* foram identificados noutras espécies procaríotas, nomeadamente em *E. coli* (Figura 1.7). Em alguns casos, a organização do operão é semelhante à existente para a XDH de *R. capsulatus*, no entanto a XdhC é a única chaperona desta

família até agora caracterizada do ponto de vista reaccional [55]. Esta proteína dá assim o nome a uma família de proteínas envolvidas na maturação de molibdoenzimas pertencentes à família XO.

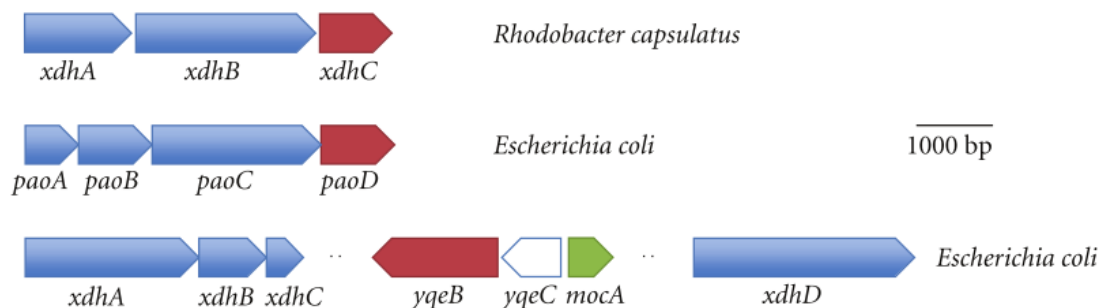


Figura 1.7. Representação esquemática da organização dos operões que incluem os genes homólogos ao *xdhC* em *E. coli* e *R. capsulatus*. Os genes correspondentes a molibdoenzimas estão representados a azul. A vermelho, os genes que se prevêem homólogos do *xdhC*. A verde, o gene que codifica para a proteína MocA e a branco a grelha de leitura aberta que codifica para proteínas com diferentes (ou desconhecidos) papéis. Adaptado [51].

No genoma de *E. coli* encontra-se o operão *paoABCD*, que codifica a aldeído oxidoreductase periplasmática, PaoABC. Tal como a XdhC, do mesmo operão de onde provém a apoenzima, resulta também uma proteína independente de 35 kDa, a PaoD.

Estudos anteriores demonstraram que quando a PaoABC é expressa na ausência de PaoD não possui actividade catalítica, uma vez que não contém o MCD sulfurado inserido na subunidade C. A não incorporação do cofactor leva a uma rápida degradação durante a expressão/purificação da subunidade C e, conseqüentemente, da apoenzima. Neste sentido, demonstrou-se que a PaoD é essencial para a inserção do MCD sulfurado, possuindo também um efeito estabilizador na subunidade C [48].

Reforçando a ideia de que a chaperona PaoD está envolvida na inserção e ligação do MCD sulfurado na subunidade C da PaoABC, verificou-se por ensaios de Ressonância Plasmónica de Superfície (SPR) que interage com a proteína responsável pela conversão do Moco em MCD, a MocA (ver Figura 1.5) [56]. À semelhança da XdhC, é possível que a PaoD também seja responsável pela maturação da enzima depois da inserção do MCD. Estas características são muito semelhantes às da XdhC, contudo os mecanismos de actuação da PaoD ainda não estão clarificados [48], [51].

Foram identificadas no genoma de *E. coli* duas grelhas de leitura abertas (ORF – *Open Reading Frame*) adicionais, cuja transcrição resulta na expressão de duas proteínas homólogas à XDH de *R. capsulatus*, *xdhABC* e *xdhD*. Existem indícios de que tenham um papel biológico semelhante à XDH, contudo não se detectou a co-transcrição de um gene homólogo a *xdhC*. Todavia, foi identificada uma nova proteína, a YqeB, organizada como uma única unidade transcricional no genoma de *E. coli*. Continua por esclarecer se esta proteína pertence efectivamente à família de chaperonas semelhante a XdhC, e se actua como chaperona sobre as proteínas XdhD e XdhABC de *E. coli* (Figura 1.7) [51].

As estruturas tridimensionais das proteínas XdhC, PaoD e YqeB, pertencentes à família de chaperonas XdhC, e da molibdoenzima PaoABC continuam desconhecidas. Uma das metodologias possíveis para resolução desta lacuna é a utilização da cristalografia de raios X – abordada no capítulo seguinte.

1.2. Cristalografia de Raios X

A resolução da estrutura tridimensional de proteínas é essencial na compreensão do seu papel biológico. Apesar de, com o avanço científico, terem surgido outras técnicas, como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Microscopia Electrónica a Temperatura Criogénica (Crio-EM), a Cristalografia de Raios X é ainda hoje a técnica com maior sucesso e aplicabilidade.

Em 1950, Max Perutz e John Kendrew resolveram a primeira estrutura cristalina de uma proteína, mioglobina de baleia. O Prémio Nobel da Química de 1964, Dorothy Hodgkin, deu um contributo excepcional para as ciências biológicas através da resolução de estruturas de moléculas pequenas (como colesterol, penicilina e vitamina B12) [57]. Actualmente, Setembro de 2012, existem depositadas na base de dados *online* PDB (*Protein Data Bank*) 74131 estruturas (proteínas, ácidos nucleicos, entre outras) resolvidas por cristalografia de raios X [58].

A determinação de estruturas proteicas por cristalografia de raios X envolve inúmeros passos, que vão desde a selecção da proteína alvo, à obtenção de cristais e, por fim, à determinação e validação da estrutura. Alguns destes serão detalhadamente abordados ao longo da presente dissertação.

1.2.1. Raios X

Os raios X foram descobertos em 1895 por Wilhelm Conrad Röntgen, físico alemão. O comprimento de onda (λ) desta radiação situa-se entre os 0,1 e os 100 Å, encontrando-se no espectro electromagnético entre os ultravioleta e os raios gama (Figura 1.8). Em regra, para um objecto difractar a radiação e, essa difracção ser visível por ampliação, o comprimento de onda da radiação incidente não deve ser maior que o objecto. Por exemplo, a radiação electromagnética entre os 4000 e 7000 Å (luz visível), não permite obter uma imagem dos átomos individuais de uma molécula, onde os comprimentos de ligação são cerca de 1,5 Å. A comprimentos de onda entre os 0,5 Å e os 2,5 Å, onde se situa a faixa dos raios X, a radiação é difractada por pequenas moléculas. Os raios X não podem ser focados por lentes e a radiação difractada por uma única molécula é muito baixa e difícil de detectar. De forma a contornar estes problemas são utilizados computadores como lente, que reconstroem a imagem a partir do objecto, e cristais de proteína que aumentam o sinal gerado por várias moléculas equivalentes. Os feixes difractados pelo cristal de proteína possuem uma intensidade detectável e quantificável, podendo permitir a identificação dos átomos que a constituem [59], [60].

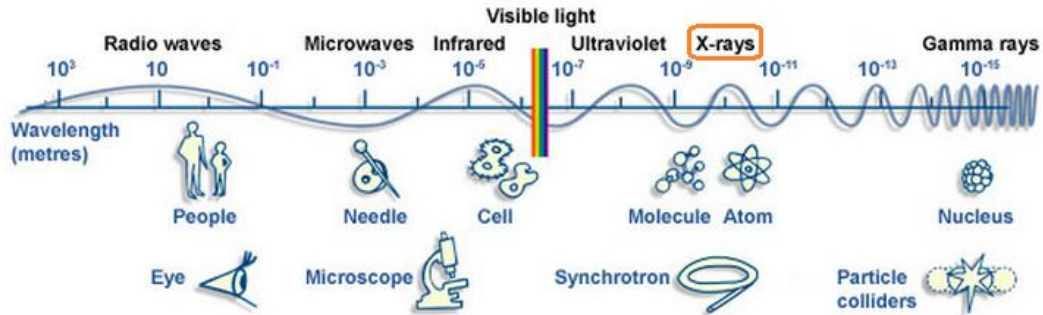


Figura 1.8. Espectro eletromagnético. Os raios X estão destacados com a caixa laranja [61].

O Tubo de *Coolidge* e o Ânodo rotativo são duas formas comumente utilizadas para produzir raios X (Figura 1.9. - A e B, respectivamente). O seu funcionamento baseia-se no bombardeamento de um metal (como o cobre ou molibdênio) com elétrons produzidos por um filamento aquecido e acelerados por um campo elétrico. Os elétrons acelerados removem os elétrons do metal de um dos níveis energéticos internos, produzindo-se radiação X quando estes transitam de uma orbital externa para uma orbital interna livre. Os raios X são emitidos em todas as direções (sem possibilidade de focar), possuindo o comprimento de onda característico do metal, o que restringe a sua utilização [59]. No entanto, a fonte mais poderosa de raios X é o sincrotrão (Figura 1.9 - C). Estes aceleradores de partículas têm a forma de anel, com elétrons (ou pósitrons) a circular a altas velocidades (perto da velocidade da luz). Durante este movimento, os elétrons perdem energia sob a forma de radiação X. Estes raios X são, posteriormente, canalizados por sistemas de espelhos e monocromadores originando feixes de raios X monocromáticos, com comprimento de onda variável e de alta energia [59], [62]. Como a radiação de sincrotrão é muito intensa e sintonizável, melhora a qualidade e rapidez da recolha de dados, sendo igualmente útil na resolução do Problema da Fase (abordado no subcapítulo 1.2.3).

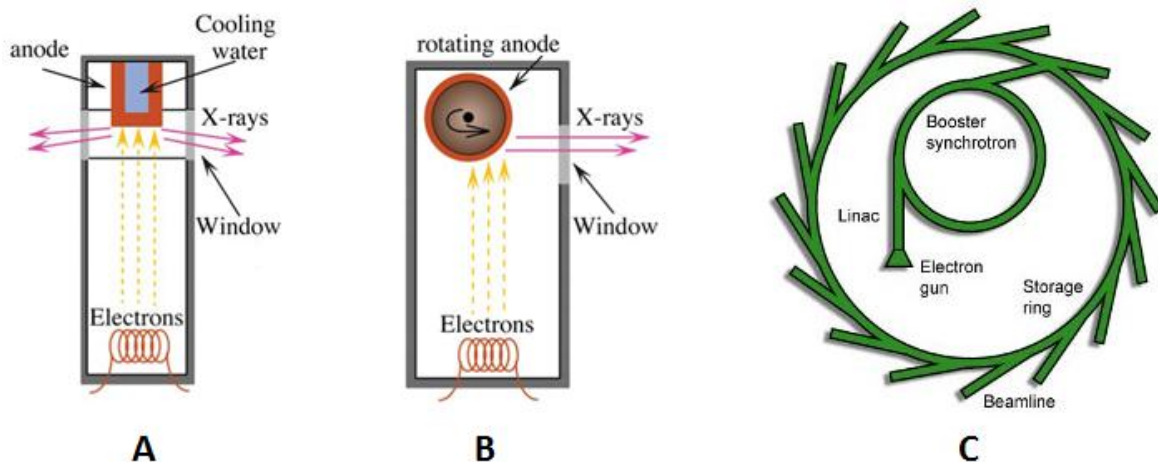


Figura 1.9. Fontes de raios X. A – Tubo de *Coolidge*; B – Ânodo rotativo; C – Sincrotrão. Adaptado [59], [62].

A evolução da tecnologia associada à cristalografia de raios X tem contribuído para um aumento do conhecimento ao nível estrutural de diferentes formas de vida. A aplicabilidade desta técnica depende da obtenção de cristais de proteína, sendo este o tema do subcapítulo seguinte.

1.2.2. Cristalização de proteínas

A obtenção de cristais de proteína para a determinação da estrutura tridimensional é o passo limitante na aplicação da técnica de cristalografia de raios X. Implica a obtenção de proteína com elevado grau de pureza e concentração (normalmente, entre os 5-15 mg/mL) e o teste/optimização de várias condições de cristalização [63], [64].

Um cristal é caracterizado por uma estrutura interna ordenada e periódica no espaço tridimensional. A célula unitária é o elemento volumétrico mais pequeno e simples que representa na totalidade o cristal. Esta célula unitária, repetida infinitamente numa rede (*lattice*) tridimensional com operações de translação associadas, define a estrutura e simetria do cristal. Estas células são definidas por parâmetros de rede, comprimentos e ângulos dos limites da célula. As posições precisas dos átomos na célula unitária são descritas pelas coordenadas cartesianas tridimensionais (x , y e z) e os parâmetros da célula unitária por a , b e c , com os ângulos respectivos α (entre b e c), β (entre a e c) e γ (entre a e b) (Figura 1.10).

A célula unitária pode conter uma ou mais unidades assimétricas. A unidade assimétrica é a unidade volumétrica mais pequena que contém toda a informação estrutural e, dentro da célula unitária as unidades assimétricas estão relacionadas entre si por operações de simetria. Os parâmetros da célula unitária podem variar, originando sete sistemas cristalinos, que representam diferentes organizações internas do cristal (ver Figura 7.1 em Anexos). Como a proteína é uma molécula quiral, as operações de simetria cristalina apenas incluem a translação e rotação. Esta limitação de simetria das células unitárias, face a outras moléculas não quirais, reduz o número de grupos espaciais de 230 para 65 [59].

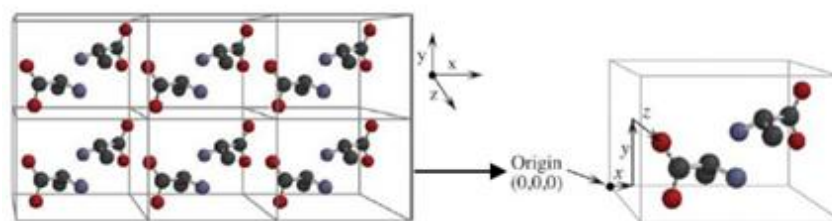


Figura 1.10. Representação da rede cristalina de um cristal, composta por várias células unitárias. A rede cristalina resulta de operações de translação da célula unitária. Esta é gerada pela unidade assimétrica através de operações de simetria cristalográfica. Adaptado [59].

Os cristais de proteína são frágeis e tipicamente de menores dimensões, quando comparados com os cristais inorgânicos. A integridade estrutural dos cristais de proteína é mais fraca, uma vez

que são estruturas pouco compactas, preenchidas por canais de solvente que ocupam entre 27 - 78% do seu volume. Estes canais de solvente podem ser muito úteis no estudo das interações proteína-ligando, uma vez que permitem o acesso do composto de interesse a diferentes zonas da proteína e, principalmente, ao centro activo [64], [65].

De forma a induzir a cristalização de proteínas é necessário atingir um estado de solubilidade mínima de forma lenta, alcançando-se o grau de sobressaturação. É desejável atingir o ponto de saturação lentamente de modo a facilitar o ordenamento das moléculas na rede cristalina. Geralmente, a cristalização de macromoléculas é alcançada através da mistura de uma solução de proteína com uma solução precipitante [64], [66].

A cristalização é um fenómeno de transição de fase que pode ser ilustrado por um diagrama (Figura 1.11) onde se encontram representados os diferentes estados físicos da proteína em função da sua concentração e de diferentes parâmetros, como a concentração de precipitante, pH e temperatura. Neste diagrama de fases é possível distinguir quatro regiões principais: sobressaturação, nucleação (ou lábil), metaestável e não saturada. A cristalização ocorre entre a região de nucleação e metaestável. Na fase de nucleação são exigidas concentrações de proteína e/ou precipitante superiores às da zona metaestável, necessárias para ocorrer uma precipitação lenta e favorecer a formação de agregados proteicos. Isto leva à diminuição da concentração de proteína em solução e à entrada na região metaestável. Aqui, ocorre exclusivamente crescimento ordenado cristalino [59], [63].

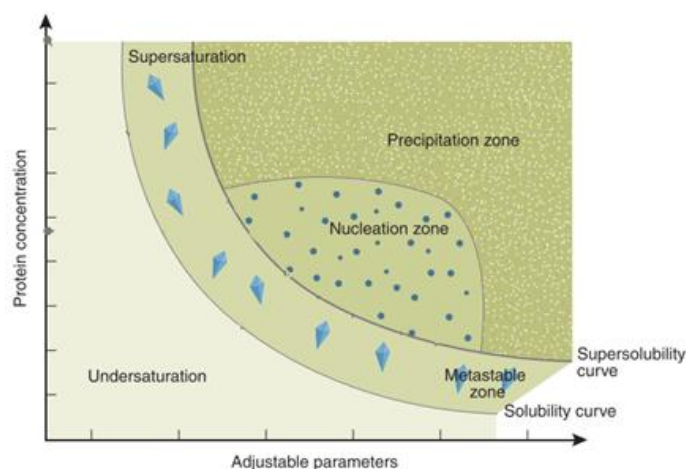


Figura 1.11. Diagrama de fases para a cristalização de proteínas. Como parâmetros ajustáveis entende-se: concentração do agente precipitante ou aditivo, pH e temperatura. Apresenta duas zonas distintas: a região de não-saturação e a região sobressaturada, que inclui a região de nucleação, metaestável e de precipitação. Adaptado [63].

A técnica mais popular para a obtenção de cristais é a de difusão de vapor. Consiste no estabelecimento do equilíbrio, em sistema fechado, entre uma gota que contém a solução de proteína e a solução precipitante e o reservatório que contém um elevado volume de solução precipitante. Esta técnica inclui o método de gota suspensa, onde a gota é colocada numa lamela

situada acima do reservatório (Figura 1.12 – A) e o método de gota assente, em que a gota é colocada numa microponte localizada no reservatório (Figura 1.12 - B) [66].

Como a gota contém a solução de proteína misturada com a solução precipitante, a concentração desta última é inferior à existente no reservatório. Assim, ao selar-se o reservatório com uma lamela e silicone (ou cera) o sistema estabelece uma difusão de vapor de forma a igualar as concentrações de solução precipitante na gota e no reservatório. Tal ocorre através da difusão de moléculas de água da gota para o reservatório até se atingir o equilíbrio. O sistema desloca-se da zona de não-saturação do diagrama de fase para a região de sobressaturação, podendo registar-se crescimento cristalino (Figura 1.12. – C).

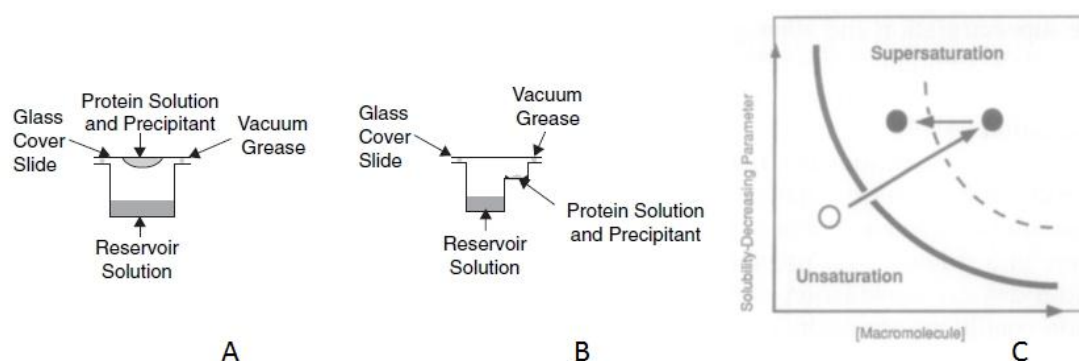


Figura 1.12. Técnicas de cristalização por difusão de vapor. A – gota suspensa, normalmente utilizadas para os ensaios de cristalização realizados manualmente; B – gota assente, geralmente utilizada em ensaios robotizados; C – representação esquemática do método de difusão de vapor. O processo inicia-se na região não-saturada, evoluindo para a região de nucleação devido à evaporação de água da gota que provoca um aumento na concentração de proteína. Adaptado [67], [68]

Geralmente, a cristalização de proteínas é um processo moroso, dependente do tipo de proteína em estudo. Como tal, para determinar as condições de cristalização é necessário testar diferentes soluções precipitantes, variando a natureza e concentração dos agentes precipitante, tipicamente sais, álcoois de baixo peso molecular e polietilenoglicóis (PEG), a temperatura e o pH. Hoje em dia, os robôs de cristalização tornaram este processo mais simples, mas não menos desafiante.

1.2.3. Experiência de difracção e resolução da estrutura

Após a obtenção de cristais o passo que se segue é a experiência de difracção. Esta consiste em incidir um feixe de raios X num cristal. Através da interacção desta radiação com os electrões dos átomos que constituem o cristal origina-se um padrão de difracção com reflexões, que provém a organização interna da rede cristalina. Uma nota experimental importante é a necessidade de congelar os cristais na presença de agentes crio-protectores (como o glicerol ou a paratona), antes da realização da experiência de difracção. A utilização de baixas temperaturas durante a experiência de difracção visa reduzir os danos causados pela radiação, possibilitando a recolha de um conjunto

de dados completos a partir de um único cristal. Os agentes crio-protectores minimizam a dispersão dos raios X pelas moléculas de água, uma vez que impedem a formação de cristais de gelo na superfície do cristal de proteína [59], [69].

O fenómeno de difracção é explicado pela Lei de Bragg, formulada em 1913 por William L. Bragg e William H. Bragg. Durante a experiência de difracção, os átomos que constituem a molécula dispersam a radiação aleatoriamente. Contudo, se existirem planos cristalinos, haverá direcções preferenciais, nas quais se regista interferência construtiva (Figura 1.13). Esta interferência irá originar as reflexões que constituem padrão de difracção. Cada reflexão resulta da contribuição de todos os átomos que possuem o mesmo ângulo de difracção [59], [64], [69].

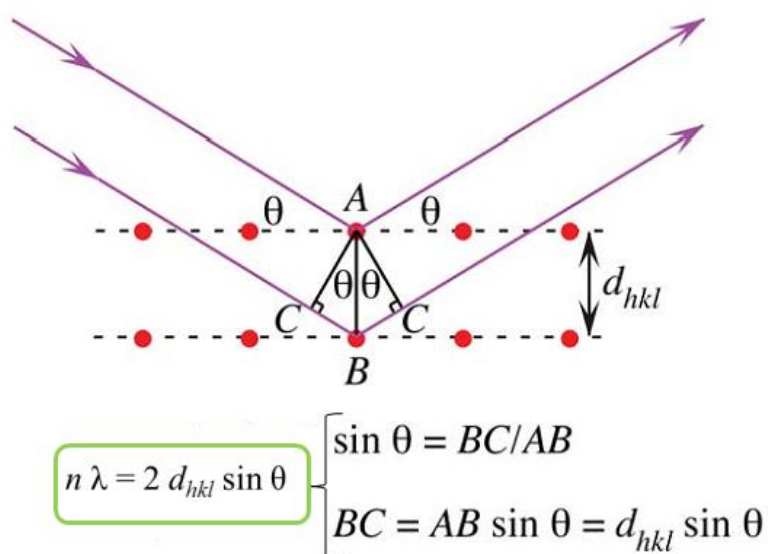


Figura 1.13. Representação da Lei de Bragg. Na caixa verde encontra-se a equação de Bragg que, quando se verifica, resulta no fenómeno de interferência construtiva. Adaptado [59].

As reflexões presentes no padrão de difracção são caracterizadas pelos Índices de Miller (hkl) e pertencem ao espaço recíproco. Como cada reflexão é constituída por um feixe de raios X, pode ser definida como uma função periódica (onda), caracterizada pelas grandezas: amplitude (F), fase (α) e comprimento de onda (λ). Esta característica permite que as reflexões sejam definidas com uma série de Fourier, através da equação dos factores de estrutura (F_{hkl}) que relaciona o espaço recíproco com o conteúdo da célula unitária, o espaço real. Nesta equação, o V representa o volume da célula unitária e (x,y,z) a posição dos átomos no espaço real. A transformada de Fourier (FT) é uma operação reversível, onde a sua inversa (FT^{-1}) descreve a densidade electrónica, ρ_{xyz} , em função das ondas difractadas, F_{hkl} [60], [64], [69].

$$F_{hkl} = \int_V \rho(x,y,z) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dV \xrightleftharpoons[FT]{FT^{-1}} \rho(x,y,z) = \sum_{h,k,l} |F_{hkl}| \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz-\alpha_{hkl})}$$

É a densidade electrónica que permite identificar a posição dos átomos que constituem a proteína. A sua determinação depende de dois parâmetros: amplitude dos factores de estrutura, $|F_{hkl}|$ e as fases, α . Quando as reflexões resultantes da experiência de difracção são indexadas, atribuindo um índice de Miller, obtém-se uma lista de intensidades, I_{hkl} , com os respectivos erros associados, σ_{hkl} . A partir da raiz quadrada das intensidades é possível determinar as amplitudes $|F_{hkl}|$. Contudo, a experiência não permite a determinação das fases das ondas que atingem o detector, impossibilitando a obtenção do mapa de densidade electrónica, surgindo o famoso 'Problema da Fase' em cristalografia [59], [69].

A resolução deste problema consiste na utilização de diferentes metodologias que permitam determinar as fases, nomeadamente o método de Substituição Molecular (MR - *Molecular Replacement*), a Substituição Isomórfica Múltipla (MIR - *Multiple Isomorphous Replacement*) ou Dispersão Anómala Múltipla ou Simples (MAD ou SAD - *Multiple/Single Wavelength Anomalous Dispersion*).

A Substituição Molecular é o método aplicado quando existem estruturas de proteínas homólogas. Consiste em determinar matematicamente a posição correcta do modelo de uma proteína homóloga na célula unitária da proteína desconhecida. O primeiro passo consiste na orientação do modelo na célula unitária pela função de rotação, através da aplicação do Método de Patterson. De seguida, determina-se a posição correcta do modelo já orientado por comparação dos factores de estrutura calculados, F_{cal} , e os obtidos experimentalmente, F_{obs} . Depois de encontrada a melhor orientação e posição do modelo na nova célula unitária utilizam-se as fases calculadas, α_{cal} , para desenhar o primeiro mapa de densidade electrónica [59], [64], [70].

Apesar de ser um método relativamente simples e rápido de resolver uma estrutura, acarreta o problema do *model bias*. Este pode levar a erros na interpretação do mapa de densidade electrónica uma vez que, apesar de possuir as características globais da nova estrutura, também apresenta características da proteína homóloga utilizada como modelo [59], [71]. Uma cuidadosa inspecção visual dos mapas de densidade electrónica é crucial para ultrapassar este problema e determinar com exactidão a nova estrutura.

Para os casos em que a estrutura é completamente desconhecida, um dos métodos possíveis para a determinação das fases é a Substituição Isomórfica Múltipla. Para a sua aplicação é necessário obter cristais de proteína nativa e derivatizados. A derivatização consiste na incubação de cristais nativos com átomos de elevado número atómico, como o ósmio, platina, ouro ou mercúrio, que através dos canais de solvente se ligam à proteína. A diferença isomórfica das amplitudes dos dados nativos e derivatizados permite estimar a amplitude dos factores de estrutura dos átomos pesados e determinar a sua posição (x,y,z). Através da posição dos átomos pesados é possível determinar as fases e calcular o primeiro mapa de densidade electrónica. Esta abordagem tem a limitação de a célula unitária do cristal derivatizado ter de ser isomórfica do cristal nativo [64], [69], [70].

Existem outros métodos também dependentes da existência de átomos pesados. É o caso da Dispersão Anómala Múltipla. Baseia-se na detecção da dispersão anómala dos raios X em função do seu comprimento de onda. Os raios X, a um determinado comprimento de onda, são absorvidos

pelos electrões dos átomos pesados, provocando uma alteração da fase das reflexões – efeito de dispersão anómala. Esta alteração causa pequenas diferenças entre conjuntos de dados recolhidos a diferentes comprimentos de onda, que permitem o cálculo das fases iniciais. Ao contrário do método anterior, podem utilizar-se átomos pesados intrínsecos à proteína como centros inorgânicos, metioninas modificadas com selénio (selenometioninas) ou até os próprios átomos de enxofre dos aminoácidos. É de notar que esta técnica só é aplicável utilizando radiação de sincrotrão, pois é necessário variar o comprimento de onda da radiação incidente durante a experiência. No caso da detecção do efeito anómalo a um único comprimento de onda, a técnica denomina-se por Dispersão Anómala Simples [64], [69].

Depois da determinação das fases e do primeiro mapa de densidade electrónica entramos numa nova etapa. O mapa obtido pode ser alvo de novas FT, de forma a melhorar as fases e, conseqüentemente, a densidade electrónica. A melhoria dos mapas de densidade permite a obtenção de um modelo estrutural fiável e coerente com os dados experimentais.

1.2.4. Refinamento e validação

O primeiro modelo obtido pode conter erros que necessitam de ser removidos através do processo de refinamento. Este processo iterativo envolve vários ciclos de optimização automática (ajuste de parâmetros matemáticos) e correcções manuais, de forma a minimizar as diferenças entre as amplitudes observadas $|F_{obs}|$ e as amplitudes calculadas $|F_{calc}|$ [60], [69].

O parâmetro mais importante na avaliação da qualidade do refinamento é o factor R, uma vez que reflecte a concordância entre o modelo construído e os dados observados [60]:

$$R = \frac{\sum ||\mathbf{F}_{obs}| - |\mathbf{F}_{calc}||}{\sum |\mathbf{F}_{obs}|}$$

O valor de R deve ser o menor possível, demonstrando assim a proximidade entre as amplitudes calculadas e as observadas. Apesar deste parâmetro estar relacionado com a resolução dos dados de difracção, para estruturas bem resolvidas espera-se um valor de $R < 0,2$. Para valores superiores ($R > 0,25$) é necessário inspeccionar a estrutura cuidadosamente porque podem ter ocorrido erros importantes durante o refinamento e construção do modelo [60], [64].

Outro parâmetro importante na avaliação da concordância entre o modelo calculado e os dados observados é o R_{free} . É determinado de forma análoga ao factor R, utilizando entre 5-10% das reflexões não contabilizadas para o processo de refinamento. É importante comparar este parâmetro com o factor R, uma vez que pode indicar se existem problemas no ajuste do modelo. Se o factor R diminuir, mas o R_{free} não acompanhar a tendência podemos estar na presença de uma sobre interpretação do mapa. Assim, para dados de alta resolução a diferença entre o R e o R_{free} não deve exceder os 5% [60], [69].

Para uma análise local do modelo construído é necessário considerar o factor B. Este parâmetro está relacionado com a oscilação dinâmica de um átomo numa dada posição, variando entre $\sim 2 \text{ \AA}^2$ e $\sim 100 \text{ \AA}^2$. É, tal como os parâmetros anteriormente descritos, uma ferramenta importante na detecção de erros na construção do modelo, uma vez que quando um átomo se encontra mal posicionado apresenta um factor B superior ao dos átomos vizinhos [60], [69].

Por fim, é importante analisar o modelo do ponto de vista estereoquímico. Uma ferramenta útil para essa análise é o diagrama de Ramachandran, que permite verificar se a conformação do par de ângulos diedros em torno do $C\alpha$, ϕ e Ψ , se encontram nas regiões permitidas [59], [60]. Por outro lado, o RMSD (sigla do inglês *Root-mean-square deviation*) permite avaliar qual o desvio dos parâmetros geométricos do modelo, como os comprimentos e ângulos de ligação, face ao que é considerado típico. Para um modelo bem refinado, o valor de RMSD para os comprimentos de ligação deve encontra-se perto dos $0,02 \text{ \AA}$ e para os ângulos de ligação, próximo, dos 4° [59].

1.3. *Small-angle X-ray scattering*

Como abordado anteriormente a cristalografia de raios X é a técnica mais utilizada para a obtenção de uma estrutural tridimensional de macromoléculas biológicas a nível atómico. Apesar de ser a técnica mais utilizada para a análise estrutural, está condicionada pela obtenção de cristais da proteína de interesse.

A técnica de *Small-angle X-ray scattering* (SAXS) permite a análise da flexibilidade de macromoléculas biológicas em solução, através da obtenção de um modelo de baixa-resolução ($10\text{--}20 \text{ \AA}$). Esta técnica requer amostras de proteína com elevado grau de pureza, monodispersa e solúvel a elevadas concentrações. Estes requisitos são comuns com as restantes técnicas de análise estrutural, contudo o SAXS tem a vantagem da recolha e caracterização da amostra ser extremamente rápida quando utilizada radiação de sincrotrão [72–74]. A experiência consiste em expor uma solução de proteína a um feixe monocromático de raios X. A intensidade de dispersão da radiação é detectada como uma função de ângulos de dispersão (Figura 1.14 - A). No caso dos raios X, esta dispersão é dependente da concentração de proteína e do contraste, $\Delta\rho(r)$. Este último parâmetro resulta da diferença entre a densidade electrónica do soluto e solvente, que no caso de proteínas em solução aquosa é muito pequena [72].

Os padrões de dispersão dos raios X obtidos são apresentados sob a forma de uma curva (Figura 1.14 – B). A partir destas curvas podem ser obtidos parâmetros específicos, que permitem determinar o tamanho e a forma geral (envelope) da proteína. O SAXS permite ainda obter modelos de baixa-resolução e, como pode ser aplicado a soluções de proteínas com pesos moleculares muito variáveis, é uma excelente ferramenta no estudo de complexos proteicos em solução [72], [75].

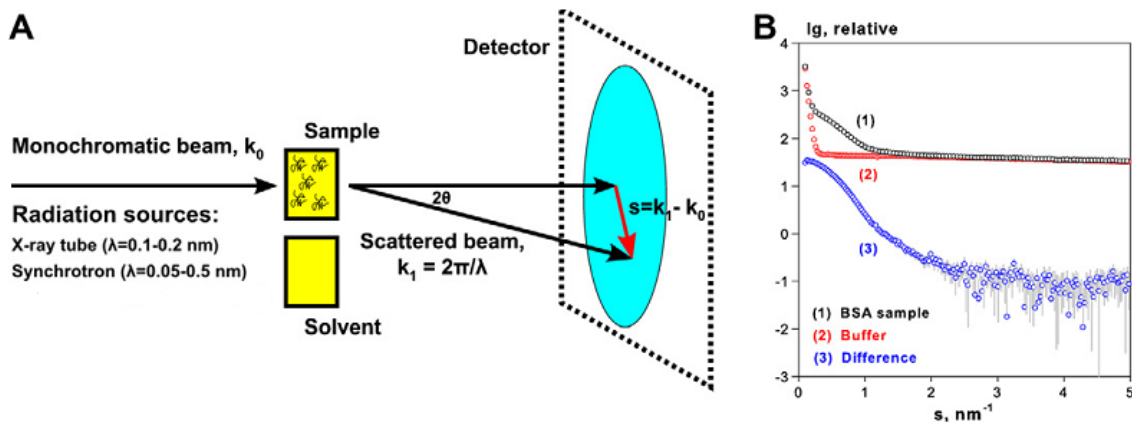


Figura 1.14. Representação da experiência de SAXS e dos respectivos dados. A – esquema da experiência de SAXS; B – dados de SAXS, onde se encontram representados os dados recolhidos para uma solução de albumina de soro bovino (1), o respectivo tampão (2) e a diferença que contém somente a contribuição da proteína. Adaptado [72].

Nesta técnica, as regiões flexíveis das proteínas provocam um aumento da dispersão dos raios X. Como, em cristalografia estas regiões podem contribuir para a obtenção de um modelo incompleto, os dados de SAXS podem ser utilizados para completar essas regiões e aperfeiçoar o modelo tridimensional [74].

2. Objetivos

A presente dissertação tem como principal objectivo clarificar, do ponto de vista estrutural, a interacção entre enzimas de molibdénio e as suas chaperonas. Assim, como alvo deste estudo seleccionou-se a molibdoenzima PaoABC de *E. coli*, a sua chaperona PaoD e outras duas proteínas: a XdhC de *R. capsulatus*, chaperona da XDH e a YqeB de *E. coli*, uma hipotética chaperona da XdhABC e da XdhD.

Para tal foi necessário sobre-expressar em *E. coli* e purificar cada uma destas proteínas. Estes passos foram executados no laboratório de cristalografia de proteínas do REQUIMTE-CQFB (FCT-UNL), bem como no laboratório da Prof. Silke Leimkühler (*Institute of Biochemistry and Biology, University of Potsdam, Germany*), com quem temos uma forte colaboração. As metodologias aplicadas para cada caso já tinham sido determinadas antes da execução desta dissertação.

Após os passos de expressão e purificação, tem-se como objectivo determinar e otimizar as condições de cristalização das quatro proteínas, de forma a resolver as suas estruturas tridimensionais por cristalografia de raios X. Este será um marco importante no conhecimento desta família de enzimas.

Utilizando a técnica de SAXS, pretende-se obter o modelo da molibdoenzima PaoABC em solução. Este será utilizado para comparação com a estrutura cristalográfica determinada e permitirá identificar possíveis diferenças na estrutura da proteína, que poderão estar associadas à flexibilidade ou a artefactos de empacotamento. Estes resultados também serão úteis para estudar, num futuro próximo, e pela mesma técnica, o complexo PaoABCD que corresponde à interacção entre enzima e chaperona. A técnica de SPR vai permitir averiguar/comprovar a ocorrência desta interacção bem como analisar o papel da MocA, conhecida como responsável pela maturação do Moco a MCD.

Devido à instabilidade registada para a chaperona PaoD um dos objectivos deste trabalho é encontrar condições que a estabilizem. Pela técnica de *thermo*fluor, determinar-se-á o tampão ideal para a realização dos ensaios de cristalização. Ensaios de RMN-STD executados também para esta chaperona permitirão investigar e caracterizar a natureza da interacção entre a PaoD e dois líquidos iónicos, seleccionados como estabilizadores da proteína.

3. Procedimento experimental

Os procedimentos descritos nas secções 3.1.1, 3.2.1, 3.3.1 e 3.4.1 resultaram da estreita colaboração com o laboratório da Professora Silke Leimkühler (*Institute of Biochemistry and Biology, University of Potsdam, Germany*), onde foi executada a componente de biologia molecular deste trabalho, desde a: escolha da estirpe bacteriana e plasmídeo, clonagem, composição dos meios e condições de crescimento.

3.1. Estudos com a PaoABC

3.1.1. Sobre-expressão em *Escherichia coli* e purificação

A sobre-expressão aeróbia e purificação do complexo PaoABC foram realizadas de acordo com o protocolo previamente descrito pelos colaboradores deste projecto, Meina Neumman *et al.* [48].

O protocolo de transformação das células de *E. coli* da estirpe TP1000 [76] com o plasmídeo pMN100 (pTrcHis-paoABCD) [48] foi realizado pela Doutora Meina Neumman (*Institute of Biochemistry and Biology, University of Potsdam, Germany*).

Um litro de meio LB com peptona (ver Tabela 7.1 em Anexos), suplementado com 150 µg/mL de ampicilina, 1 mM de Na₂MoO₄ (Sigma-Aldrich) e 10 µM de IPTG (Duchefa), foi inoculado com 2 mL da pré-cultura (crescimento de 16 horas, a 170 rpm e 37 °C) e incubado durante 24 horas, a 22 °C e 100 r.p.m (*Multitron* da Infors HT). O meio de cultura foi centrifugado (9600 xg, 5 minutos, 4 °C) (centrífuga 6K15 da Sigma-Aldrich) e o *pellet* ressuscitado em tampão fosfato (50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0) e 300 mM NaCl – 10 mL/L cultura). Depois deste passo as células foram mantidas a -20 °C para futuras utilizações.

Para proceder-se à purificação da PaoABC, lisaram-se as células através de três passagens no disruptor celular (*TS Series Benchtop* da Constant Systems) a 1350 bar, na presença de 1 µg/mL de DNase I de pâncreas de bovino (Sigma-Aldrich). O produto da lise foi posteriormente centrifugado (1 hora, 15557 xg., 4 °C) e o sobrenadante aplicado em 0,5 mL de resina Ni-NTA (Qiagen) por litro de cultura.

A coluna foi depois lavada com 20 volumes de coluna (cv) de tampão fosfato com 10 mM de imidazol e 20 cv do mesmo tampão com uma concentração superior de imidazol (20 mM).

A proteína foi eluída com 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0), 300 mM NaCl e 250 mM imidazol e as fracções recolhidas analisadas por Electroforese em Gel de Poliacrilamida e Dodecil-Sulfato de Sódio - sigla SDS-PAGE (tina Mini-PROTEAN® Tetra Cell e fonte de alimentação ambas marca BioRad). De seguida, procedeu-se a uma diálise durante 16 horas (4 °C) numa membrana de 10 kDa (Medicell International) contra 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) e 1 mM EDTA.

De forma a aumentar o grau de pureza, a amostra foi aplicada numa coluna Q-Sepharose (GE Healthcare) previamente equilibrada (50 mM Tris-HCl (pH 7,5) e 1 mM EDTA) e eluída através de um gradiente linear de 0 – 500 mM de NaCl. A pureza da proteína foi, mais uma vez, avaliada por SDS-PAGE, procedendo-se de seguida à sua concentração. Para tal, recorreu-se a um tubo *Vivaspin 2*

com uma membrana de 30 kDa (GE Healthcare) até atingir-se uma concentração, aproximada, de 40 mg/mL. Esta foi determinada pela leitura da absorvância (em cubete de quartzo e espectrofotômetro UV2600 da Shimadzu) a 445 nm. Para este comprimento de onda, o coeficiente de extinção molar da proteína determinado experimentalmente é de $23686 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [48].

A proteína foi congelada em azoto líquido e guardada a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para futuras utilizações.

As condições de corridas das SDS-PAGE foram comuns durante todo o processo (80 V, intensidade de corrente variável, 110 minutos), utilizando-se como marcador de peso molecular o *Protein Marker US7* (GeneON).

3.1.2. Ensaios de cristalização

Numa primeira fase, os ensaios foram realizados em caixas de cristalização de 24 poços (modelo *XRL* da Molecular Dimensions), testando várias soluções precipitantes de *screens* comerciais e de um *screen* de 80 condições adaptado de Jancarik *et al.* [77] (ver Tabela 7.2 em Anexos), bem como diferentes concentrações de proteína e proporções da gota. Os ensaios foram realizados a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ pelo método de difusão de vapor - gota suspensa, com $700 \mu\text{L}$ de solução precipitante no reservatório.

Após visualização das gotas de cristalização (em microscópio SZH10 da Olympus) determinaram-se as condições de cristalização mais promissoras. Cristais de PaoABC, com cerca de $0,2 \times 0,1 \times 0,08 \text{ mm}^3$, surgiram ao fim de 2 dias utilizando $0,2 \text{ M}$ Iodeto de amónio e 20% PEG 4K como solução precipitante. Em algumas gotas era possível distinguir, utilizando luz polarizada, a presença de várias placas sobrepostas no mesmo cristal.

Numa segunda fase, foram realizados ensaios utilizando PaoABC a 20 mg/mL , gotas de $2 \mu\text{L}$ ($1 \mu\text{L}$ de proteína e $1 \mu\text{L}$ solução precipitante), $700 \mu\text{L}$ de solução precipitante no reservatório e temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Foram realizados em caixas de 24 poços (modelo *XRL* da Molecular Dimensions) pelo mesmo método. Ao fim de cerca de 4 dias, cristais com $0,2 \times 0,1 \times 0,05 \text{ mm}^3$ surgiram para a mesma solução precipitante que os anteriores.

Os cristais obtidos, quer a 20 quer a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, foram estabilizados com uma solução de *harvesting buffer* (composição semelhante à solução precipitante, onde a concentração do agente precipitante é superior) durante 1-3 minutos e transferidos para uma solução crio-protectora contendo 30 % de glicerol (Sigma-Aldrich). Depois de serem congelados em azoto líquido, os cristais foram posteriormente analisados por radiação de sincrotrão nas linhas ID14-1 (ESRF - Grenoble, França) e PX III (SLS - Villigen, Suíça).

3.1.3. *Small angle X-ray scattering*

Para a realização dos ensaios de *Small angle X-ray scattering* (SAXS) prepararam-se três soluções de PaoABC a 20 , 10 e 2 mg/mL . As diluições foram realizadas sequencialmente, utilizando o tampão 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 250 mM NaCl e 1 mM EDTA para um volume final de $70 \mu\text{L}$. As concentrações foram verificadas recorrendo ao *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific).

As soluções foram homogeneizadas e filtradas por centrifugação, utilizando um filtro com poros de 0,22 µm (*Ultrafree-MC* da Millipore).

A experiência foi realizada recorrendo à radiação de sincrotrão na linha X33 (DESY-Hamburgo, Alemanha) com a colaboração e supervisão do Doutor Dmitri Svergun (*European Molecular Biology Laboratory - EMBL*, Hamburgo, Alemanha).

3.2. Estudos com a PaoD

3.2.1. Sobre-expressão em *Escherichia coli* e purificação da PaoD

A sobre-expressão aeróbia e purificação da chaperona PaoD baseia-se no procedimento publicado recentemente pelos colaboradores deste projecto, Meina Neumman *et al.* [56].

A transformação das células de *E. coli* da estirpe BL21(DE3) (Novagen) com o plasmídeo pMN87 (contendo *paoD*) [56] foi realizado pela Doutora Meina Neumann. Este plasmídeo derivou do comercial pET28a (Novagen), através da clonagem do fragmento de interesse entre os locais de corte das enzimas de restrição NdeI e Sall.

Para a sobre-expressão, 1 litro de meio LB com triptona (ver Tabela 7.1 em Anexos) e 25 µg/mL de canamicina foi inoculado com 10 mL de pré-cultura (crescimento de 16 horas, a 170 rpm e 37°C). Seguidamente foi incubado a 30 °C, com uma agitação de 150 r.p.m. até um valor de absorvância a 600 nm (OD_{600nm}) de 0,5 (em cuvete de poliestireno). A expressão foi então induzida com 100 µM IPTG.

A cultura foi centrifugada após 5 horas (9600 xg, 5 minutos, 4 °C), e o *pellet* ressuspendido em 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0) e 300 mM NaCl - tampão fosfato (10 mL/L cultura). Depois deste passo as células foram mantidas a -20 °C para futuras utilizações.

Para se proceder à purificação, lisaram-se as células com dois ciclos de sonicação de 15 minutos, a amplitude e pulso de 100% (UP100H da Hielscher) na presença de 1 µg/mL DNase I de pâncreas de bovino. Após centrifugação (1 hora, 15557 xg, 4 °C) (5804R da Eppendorf), o sobrenadante foi aplicado em 0,4 mL de resina Protino[®] Ni-TED (Macherey-Nagel) por litro de cultura. Após a lavagem da coluna com 30 cv de tampão fosfato com 10 mM de imidazol e 40 cv de tampão fosfato com 20 mM imidazol, eluiu-se a proteína com tampão fosfato contendo 250 mM imidazol.

Para avaliar a pureza das fracções recolhidas recorreu-se a uma SDS-PAGE, sendo as condições de corrida: 20 mA (tensão eléctrica constante) durante 60 minutos, com marcador de pesos moleculares *NZYColour Protein Marker II* (Nzytech).

A mudança de tampão da proteína ocorreu por diálise durante 16 horas com uma membrana de 10 kDa ou por cromatografia de filtração em gel, utilizando colunas PD-10 pré-empacotadas (GE Healthcare). Dependendo da finalidade da amostra a mudança ocorreu para diferentes tampões (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Composição dos tampões em que se encontrou a proteína em estudo, PaoD. Os tampões descritos foram preparados com água bidestilada contendo 0,02 % de azida de sódio. A escolha de cada tampão recaiu sobre a finalidade da proteína.

Composição das soluções

a	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl e 1 mM EDTA
b	50 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 8,0), 300 mM NaCl e 1 mM EDTA
c	100 mM Bis-Tris (pH 5,5), 150 mM NaCl e 1 mM EDTA

Depois de quantificada, através da medição da absorvância a 280 nm (em cuvete de quartzo e espectrofotômetro *Ultrospec 2100 pro* da Amersham Biosciences) e utilizando o $\epsilon_{280\text{nm}}$ de 33920 M⁻¹.cm⁻¹, a proteína foi congelada em azoto líquido e mantida a – 80 °C para futuras utilizações.

3.2.2. Ensaio de cristalização

Para a realização dos ensaios de cristalização foram utilizadas amostras de PaoD descongeladas em gelo na presença de um de dois líquidos iônicos (IL), [C₄mim]Cl (Sigma-Aldrich) ou [C₂OHmim]PF₆ (Solchemar), com concentrações finais de 0,2 M ou 0,4 M.

A proteína foi de seguida concentrada, por centrifugação, utilizando um tubo *Vivaspin 500* com uma membrana de 10 kDa (GE Healthcare) até 5 mg/mL. A concentração final foi determinada através da leitura de absorvância a 280 nm (em cuvete de quartzo).

Os primeiros ensaios de cristalização foram realizados pelo método de difusão de vapor – gota assente (a 20 °C), com gotas de 0,4 µL (0,2 µL de proteína + 0,2 µL de precipitante), 50 µL de solução precipitante no reservatório e proteína com uma concentração inicial de 5 mg/mL. Recorreu-se ao sistema automático de cristalização de proteínas *Oryx 8* (Douglas Instrument) e a caixas de 96 poços (*SWISSCI 'MRC'* da Douglas Instruments) onde foram testadas, aproximadamente, 350 condições de cristalização comerciais e o *screen* de 80 condições adaptado de Jancarik *et al.* [77] (ver Tabela 7.2 em Anexos).

Numa fase seguinte, procedeu-se ao *scale-up* das condições descritas anteriormente e ao teste de 48 aditivos comerciais a 20 °C (*Additive Screen I e II*, Hampton Research) em placas de cristalização de 24 poços (modelo *XRL* da Molecular Dimensions). Utilizou-se o método de difusão de vapor – gota suspensa (a 20 °C), variando as proporções de proteína e precipitante, mas mantendo o volume de solução precipitante no reservatório de 700 µL.

Aos cristais obtidos adicionou-se uma solução de *harvesting buffer*, procedendo-se, de seguida, à sua transferência para uma solução crio-protectora contendo 30 % de glicerol. Depois de congelados em azoto líquido, os cristais foram analisados por radiação de sincrotrão nas linhas ID 23-1 (ESRF – Grenoble, França) e PX III (SLS – Villigen, Suíça).

3.2.3. Ensaios de *Thermofluor*

De forma a realizar os ensaios de *thermofluor*, utilizou-se a proteína PaoD a 0,5 mg/mL em tampão Tris (ver Tabela 3.1, a). Um conjunto de seis tampões (Fosfato de sódio, MOPS, Bis-Tris, HEPES, MES e Tris), com pH entre 5,5 e 8,5 (ver Tabela 7.3 em Anexos) foram testados. A cada reservatório de uma placa de 96 poços para ensaios de PCR (Bio-Rad) adicionaram-se:

- ✓ 6 µL de fluoróforo *Sypro Orange 25x* (Life technologies)
- ✓ 15 µL de tampão (ver composição detalhada na Tabela 7.3 em Anexos)
- ✓ 9 µL de proteína a 0,5 mg/mL

Foram realizados controlos negativos, substituindo a proteína ou o fluoróforo por água destilada.

A placa foi selada com uma película *Microseal 'B' Film* (Bio-Rad) e centrifugada (5804R da Eppendorf) durante 2 minutos a 2000 xg de forma a eliminar bolhas de ar. Utilizando um sistema de detecção para PCR em tempo real com uma camera de CCD acoplada, foi possível monitorizar em simultâneo as alterações de fluorescência dos 96 poços (Mx3005P da Agilent Technologies Stratagene). As amostras foram aquecidas de 25 a 93 °C com incrementos de 1 °C por minuto e 1 minuto de estabilização em cada ponto.

3.2.4. Ensaios de Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de transferência de saturação

Para as experiências de RMN-STD (Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de Transferência de Saturação) foi utilizada PaoD em tampão Tris (ver composição na Tabela 3.1., a) e os IL [C₂OHmim]PF₆ ou [C₄mim]Cl. As concentrações finais para proteína e ligando foram de 28,2 µM e 3 mM, respectivamente.

Os dados RMN-STD foram adquiridos a 37 °C num espectrómetro *Bruker Avance III* operado a 600 MHz (com crio-sonda). O espectro foi adquirido com 1024 *scans*, numa matriz com 32000 pontos em t₂, para uma janela espectral de 12019,23 Hz (centrada a 2814,60 Hz).

O método de supressão de água DPGSE (ou *excitation sculpting*) foi aplicado de forma a suprimir os sinais dos prótons da água. Os sinais da proteína foram suprimidos com um filtro *spin lock* (T_{1ρ}) com um campo de 2 kHz e duração de 20 ms.

A saturação selectiva da proteína (espectro *on-resonance*) foi realizada por irradiação a -300 Hz. Utilizou-se o programa 40 Eburp2.1000, com pulsos de 90° (50 ms, 1 ms de intervalo entre os pulsos), para um tempo total de saturação de 2,0 s. Para o espectro de referência (*off-resonance*) as amostras foram irradiadas a 20000 Hz.

Foram realizadas experiências de controlo com amostras de referência, a fim de otimizar a frequência de saturação da proteína (- 0,5 ppm) e a irradiação *off-resonance*. Este procedimento foi executado de forma a assegurar que os sinais de ligandos não eram afectados.

O efeito STD foi calculado por $(I_0 - I_{SAT}) / I_0$, em que $(I_0 - I_{SAT})$ é a intensidade do pico no espectro de STD e I_0 é a intensidade do pico no espectro *off-resonance*. A intensidade STD do maior efeito STD foi fixada em 100%, e usada como referência [78–80].

A experiência descrita foi realizada em colaboração do Professor Eurico Cabrita e o Doutor Aldino Viegas – membros do grupo de RMN da REQUIMTE/CQFB, FCT/UNL.

3.2.5. Ensaio de Ressonância Plasmónica de Superfície

Os ensaios de interacção analito-ligando foram realizados num aparelho *Biacore*[™] T200 (tecnologia baseada no fenómeno de SPR), com um sensor *chip* CM5 (GE Healthcare).

As proteínas PaoD, PaoABC e MocA – ligandos – foram imobilizadas na superfície do sensor, através interacção dos grupos amina com a superfície, até 600, 1500 e 600 unidades de ressonância (RU) por célula, respectivamente.

Diferentes soluções de PaoD, PaoABC e MocA – analitos – com concentrações de 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 5, 10, 20 μ M foram injectadas a 25 °C durante 5 min com um fluxo de 30 μ l/min. Seguiram-se 10 minutos de dissociação, utilizando a função *Kinject* e a regeneração da superfície do sensor com 20 mM HCl durante 1 minuto. O tampão de corrida continha 12 mM tampão fosfato (pH 7,4), 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 3,4 μ M EDTA e 0,005% Tween 20.

As proteínas MoaD, MobA e BSA (Albumina de Soro Bovino) foram escolhidas como controlos negativos, seguindo o mesmo protocolo descrito para os analitos PaoD, PaoABC e MocA.

Para a análise cinética dos resultados e cálculo dos parâmetros utilizou-se o *software* BIAevaluation3.0 (GE Healthcare).

3.3. Ensaio para a XdhC de *Rhodobacter capsulatus*

3.3.1. Sobre-expressão heteróloga em *Escherichia coli* e purificação

A sobre-expressão heteróloga aeróbia e purificação da XdhC de *R. capsulatus* foram adaptadas do protocolo desenvolvido pelos colaboradores deste projecto [55], [81].

A protocolo de transformação das células de *E. coli* da estirpe ER2566(DE3) (New England Biolabs) com o plasmídeo pAK20 [55] foi realizado pela Doutora Meina Neumann. Este plasmídeo resultou da inserção do fragmento codificante *xdhC* no pTYB2 (New England Biolabs) entre os locais de corte das enzimas NdeI e KpnI.

A 1 litro de meio LB com Triptona (ver Tabela 7.1 em Anexos) e 150 μ g/mL de ampicilina, adicionou-se 10 mL da pré-cultura (proveniente de crescimento de 16 horas, 37 °C, 170 r.p.m. até OD_{600nm} de 1,0) e incubou-se a 30 °C e 150 r.p.m. Quando a cultura atingiu uma OD_{600nm} de 0,3 (em cubete de poliestireno), induziu-se a expressão da proteína através da adição de 300 μ M de IPTG e incubou-se por mais 16 horas, a 16 °C e 150 r.p.m. O meio de cultura foi depois centrifugado (9600xg, 5 minutos, 4 °C), e o *pellet* ressuspenso em tampão com 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl e 1 mM EDTA (10 mL/L de cultura). Depois deste passo, parte das células foram mantidas a -20 °C para futuras purificações.

Para iniciar-se o processo de purificação, as células foram lisadas através de dois ciclos de sonicação durante 15 minutos e a 100% de amplitude e pulso, na presença de 1 µg/mL DNase I de pâncreas de bovino. Após centrifugação durante 1 hora, a 15557 xg e 4 °C, adicionaram-se 2 mL de resina *Chitin Beads* da New England Biolabs (equilibrada em 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA e 0,1% Triton X-100) ao sobrenadante e agitou-se durante 1 hora a 4 °C. A mistura foi colocada numa coluna, lavada com 20 cv de tampão de equilíbrio e incubada durante 16 horas (a 4 °C) com tampão: 250 mM Tris-HCl (pH 8,5), 500 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,1% Triton-X100 e 50 mM DTT. Após o período de incubação, a proteína foi eluída com 3 cv do tampão anteriormente descrito.

As fracções recolhidas foram analisadas por SDS-PAGE (20 mA, tensão eléctrica constante, 60 minutos) com marcador de pesos moleculares *NZYColour Protein Marker II* (Nzytech).

3.4. Ensaio para a YqeB

3.4.1. Sobre-expressão em *Escherichia coli* e purificação

A protocolo de transformação das células de *E. coli* da estirpe BL21(DE3) (Novagen) com o plasmídeo pMN104 (contendo *yqeB*) [56] foi realizado pela Doutora Meina Neumann. Este plasmídeo derivou do comercial pET28a (Novagen) através da clonagem do fragmento de interesse entre os locais de corte das enzimas de restrição NdeI e SalI.

A sobre-expressão aeróbia seguiu-se o procedimento descrito para a PaoD (ver secção 3.2.1).

Para a purificação da proteína de interesse, lisaram-se as células com dois ciclos de sonicação de 15 minutos, a 100% de amplitude e pulso na presença de 1 µg/mL DNase I de pâncreas de bovino. Após centrifugação (1 hora, 15557 xg., 4 °C), o sobrenadante foi aplicado em 0,4 mL de resina Protino[®] Ni-TED por litro de cultura. A coluna foi lavada com 30 cv de tampão fosfato - 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0) e 300 mM NaCl - com 10 mM de imidazol e 40 cv de tampão fosfato com 20 mM imidazol.

Antes de se proceder à eluição, adicionou-se 1 cv de tampão fosfato com 250 mM de imidazol e aguardou-se 10 minutos a 4 °C. Por fim, recuperou-se a proteína através da sua eluição com 30 cv do tampão anterior.

A pureza das fracções recolhidas foi avaliada por SDS-PAGE, com condições de corrida de 20 mA (tensão eléctrica constante) durante 60 minutos e com marcador de pesos moleculares *NZYColour Protein Marker II* (Nzytech).

A mudança de tampão da proteína ocorreu por diálise durante 16 horas com uma membrana de 10 kDa ou por cromatografia de filtração em gel (utilizando colunas PD-10 pré-empacotadas) para 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl e 1 mM EDTA.

As amostras depois de quantificadas pela leitura da absorvância a 280 nm (em células de quartzo) e utilizando o $\epsilon_{280\text{nm}}$ de 22460 M⁻¹.cm⁻¹, foram congeladas a -80 °C para futuros ensaios.

3.4.2. Ensaio de cristalização

Os ensaios de cristalização foram realizados com YqeB a 5 mg/mL, concentrada por centrifugação utilizando tubo *Vivapin 2* com uma membrana de 10 kDa (GE Healthcare).

Foram testados diferentes *screens* comerciais e o *screen* de 80 condições adaptado de Jancarik *et al.* [77] (ver Tabela 7.3 em Anexos), recorrendo-se ao robô de cristalização *Oryx 8* e a caixas de cristalização de 96 poços (SWISSCI 'MRC' da Douglas Instruments).

O método escolhido foi a difusão de vapor – gota assente (a 20 °C), para gotas de 2 µL (1µL de proteína e 1 µL de solução precipitante) e reservatório contendo 50 µL de solução precipitante. Os cristais obtidos foram transferidos para uma solução crio-protectora com 10% ou 30 % glicerol e analisados por radiação de sincrotrão na linha PX III (SLS – Villigen, Suíça).

4. Resultados e discussão

4.1. Estudos com a PaoABC

Como foi abordado na secção 1.1.2.1, a PaoABC é um complexo proteico pertencente à família XO. Ao contrário de todos os membros desta família, é um heterotrímero e a única proteína conhecida de *E. coli* que liga o cofactor MCD sulfurado [48]. A resolução da sua estrutura tridimensional por cristalografia de raios X constitui um passo importante na compreensão do seu mecanismo de acção e permitirá a comparação estrutural com proteínas da família XO.

4.1.1. Sobre-expressão em *Escherichia coli* e purificação

O presente estudo, teve como principal objectivo a obtenção de cristais de PaoABC. Tratando-se de uma proteína de *E. coli* K-12 [47] foi escolhido um sistema de expressão procarionte.

A sobre-expressão aeróbia foi realizada em células de *E. coli* da estirpe mutante TP1000. Estas derivam da estirpe MC4100 onde foi inserida a cassette de resistência à canamicina na região dos genes *mobAB*, envolvidos na formação do cofactor *bis-molybdopterin guanine dinucleotide* (bis-MGD). A deleção dos genes *mobAB* leva à acumulação de elevadas concentrações de MPT na célula [76]. O MPT em *E. coli* tem como destino a formação de Moco, podendo ser convertido em Bis-MGD (pela proteína MobA), em MCD (pela proteína MocA) ou utilizado directamente como cofactor (pela proteína YedY) [22]. O bloqueio da expressão da proteína MobA e a existência de uma única proteína de *E. coli* capaz de usar o Moco directamente como cofactor, a YedY, aumenta o grau de disponibilidade dos precursores envolvidos na síntese do cofactor da proteína PaoABC, o MCD [25], [48], [82].

Os procedimentos de biologia molecular, para a obtenção dos clones com o operão *paoABCD*, foram realizados pela Doutora Meina Neumann [48]. O plasmídeo desenvolvido, pMN100 (pTrcHis-*paoABCD*), permite a expressão da proteína com uma cauda de seis histidinas (cauda-His₆) no N-terminal da subunidade A.

Estudos anteriores realizados por Meina Neumann *et al.* [48] demonstraram que a ausência da proteína PaoD durante a expressão da PaoABC leva à inactividade do complexo ABC e a uma rápida degradação da subunidade C (subunidade que contém o Moco). Assim, a sua estabilidade e a inserção do cofactor MCD na subunidade C está dependente de chaperona PaoD, fazendo todo o sentido a clonagem do operão contendo os quatro genes, *paoABCD* [48], [51]. A expressão foi induzida através da adição de 100 µM de IPTG, uma vez que operão em causa se encontra sob a regulação do operão *lac*.

O primeiro passo de purificação consistiu numa cromatografia de afinidade, com a passagem do produto de expressão (após lise e centrifugação) numa coluna com resina Ni-NTA. Esta exhibe uma alta afinidade e selectividade para proteínas de fusão com cauda de histidinas. Para confirmar o sucesso da purificação, recorreu-se a uma SDS-PAGE das várias fracções (de 1 mL) recolhidas (Figura 4.1). Pela análise do gel resultante (Figura 4.1) foi possível confirmar a presença da PaoABC pela existência de bandas a 78,1 kDa (subunidade C – MCD), 33,9 kDa (subunidade B – FAD) e 21,0 kDa (subunidade A – FeS). Para além das referidas bandas, verifica-se a presença de outras

proteínas de tamanhos variáveis, indicando que a proteína sobre-expressa não se encontra pura. Considerando que é necessária a obtenção da PaoABC com elevado grau de pureza para a realização dos ensaios de cristalização, realizou-se um segundo passo de purificação. As fracções obtidas do passo anterior foram dialisadas durante 16 horas contra 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) e 1 mM EDTA, não se tendo registado qualquer precipitação.

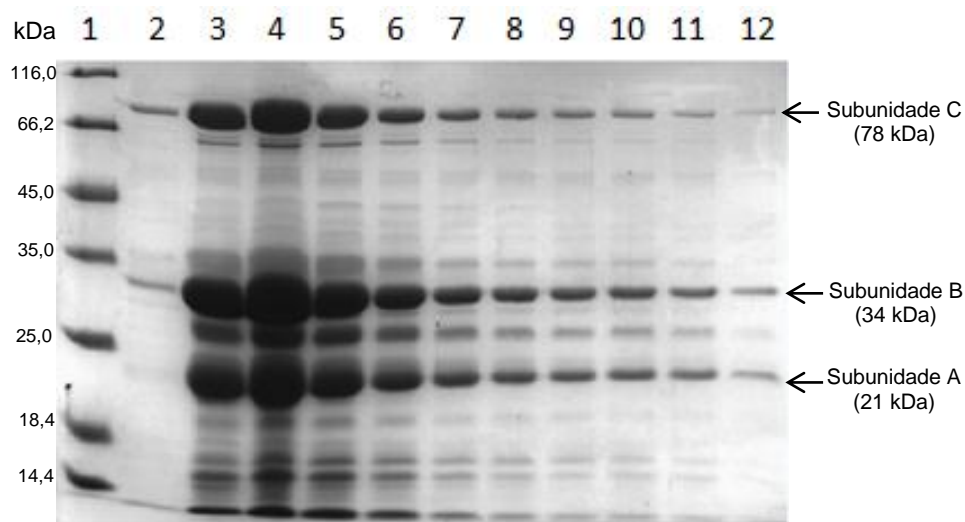


Figura 4.1. SDS-PAGE a 12,5% com as fracções resultantes do primeiro passo de purificação da PaoABC com a coluna de Ni-NTA. 1 - Marcador de pesos moleculares *Protein Marker US7* (GeneON); 2 a 12 - Fracções de 1 mL resultantes da eluição competitiva com 250 mM de imidazol, sendo a ordem no gel (da esquerda para a direita) a ordem de eluição das fracções.

De forma a determinar a melhor estratégia para finalizar o processo de purificação, determinou-se o ponto isoeléctrico teórico da proteína, com recurso à ferramenta bioinformática *Compute pI/Mw* do portal ExPASy [83], sendo este igual a 6,18. Assim, quando a proteína se encontra no tampão 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) e 1 mM EDTA, apresenta-se desprotonada e, conseqüentemente, com carga negativa. Desta forma, optou-se por uma cromatografia de troca aniónica, uma vez que a injeção da amostra numa matriz carregada positivamente (Q-Sepharose), leva à retenção da proteína por interações electrostáticas. Neste sentido, a proteína foi eluída através de um gradiente de força iónica de 0 - 500 mM de NaCl, utilizando o tampão B: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1M NaCl e 1 mM EDTA.

Pela análise do cromatograma apresentado na Figura 4.2 verificou-se a existência de dois picos aos 35 e 40 minutos de eluição (27% e 30% do tampão B), correspondendo a uma concentração de NaCl entre 270 e 300 mM, aproximadamente.

A SDS-PAGE realizada para as fracções correspondentes aos picos observados (fracções 31 a 43 do cromatograma) confirmou a presença da proteína PaoABC. Apesar de ainda ser possível identificar outras proteínas em solução considerámos que a pureza atingida era suficiente para prosseguir os estudos desejados (Figura 4.3), não tendo sido executados novos passos de purificação. Estudos anteriores realizados por Meina Neumann demonstraram que a PaoABC se encontra na sua forma activa para as fracções relativas a ambos os picos.

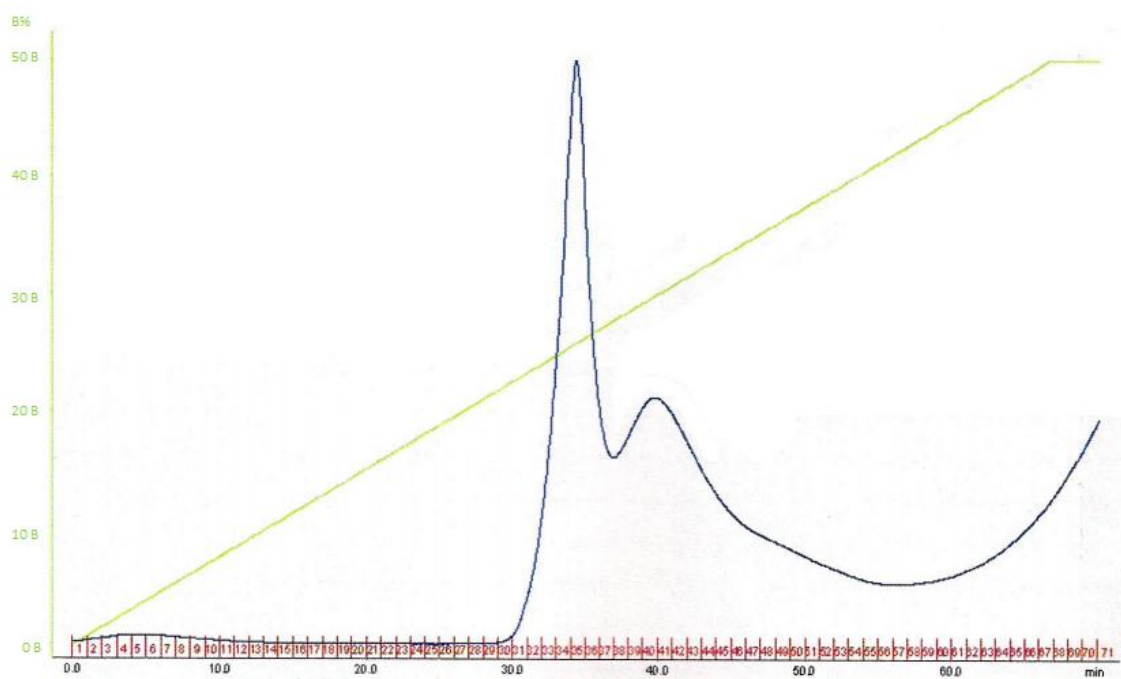


Figura 4.2. Cromatografia de troca iônica correspondente ao segundo passo de purificação da PaoABC utilizando uma coluna Q-Sepharose. No cromatograma são visíveis dois picos que correspondem à proteína de interesse (aproximadamente, a 270 e 300 mM de NaCl). A eluição ocorreu durante o gradiente de força iônica utilizando um tampão B de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 M de NaCl e 1 mM EDTA.

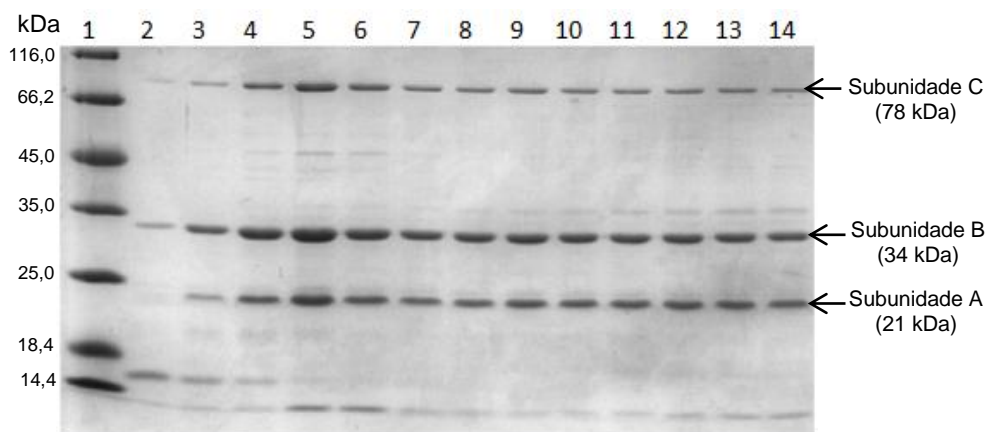


Figura 4.3. SDS-PAGE a 12,5% com as frações resultantes do segundo passo de purificação da PaoABC com cromatografia de troca iônica em coluna Q-Sepharose. 1 - Marcador de pesos moleculares *Protein Marker US7* (GeneON); 2 a 14 - Frações de 3 mL resultantes do aumento da força iônica, sendo a ordem no gel (da esquerda para a direita) a ordem de eluição das frações (de 31 a 43 no cromatograma).

A PaoABC foi então concentrada para 40 mg/mL (num tubo *Vivaspin 2*), tendo sido esta determinada através da Lei Lambert-Beer, com o valor da absorvância (A) a 445 nm, o coeficiente de extinção molar (ϵ_{445}) de $23\,686\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ e percurso óptico (b) de 1 cm. O coeficiente de extinção

molar, ϵ , foi determinado com base no conteúdo de FAD da PaoABC, depois da precipitação com ácido tricloroacético [48], [84].

Em conclusão, os procedimentos aplicados para a sobre-expressão e purificação permitiram a obtenção de proteína PaoABC relativamente pura com elevada concentração, possibilitando a progressão do trabalho experimental para a etapa seguinte – os ensaios de cristalização.

4.1.2. Cristalografia de Raios X

4.1.2.1. Ensaios de cristalização e experiências de difracção

A primeira abordagem consistiu no teste de inúmeras soluções precipitantes, para diferentes concentrações de proteína e proporções da gota (proteína + solução precipitante), em caixas de 24 poços e pelo método de difusão de vapor em gota suspensa. Entre os *screens* comerciais testados encontravam-se o PEG/Ion 4K, PEG/Ion 8K, JBScreen 1 a 10 e o *screen* de 80 condições adaptado de Jancarik *et al.* [77] (ver Tabela 7.2 em Anexos).

A inspeção das gotas após 48 a 72 horas revelou o crescimento de cristais de PaoABC, em forma de placas, para a solução precipitante: 0,2 M iodeto de amónio e 20% PEG 4K (do *screen* PEG/Ion 4K); quando utilizada uma concentração de proteína inicial de 20 mg/mL, gotas de 2 μ L (1 μ L de proteína e 1 μ L de solução precipitante) e temperatura de 20 °C (Figura 4.4). Neste caso, não se coloca a dúvida entre cristais de sal e proteína, uma vez que os últimos apresentam cor castanha, devido à existência de dois centros [2Fe-2S] na subunidade A da PaoABC.

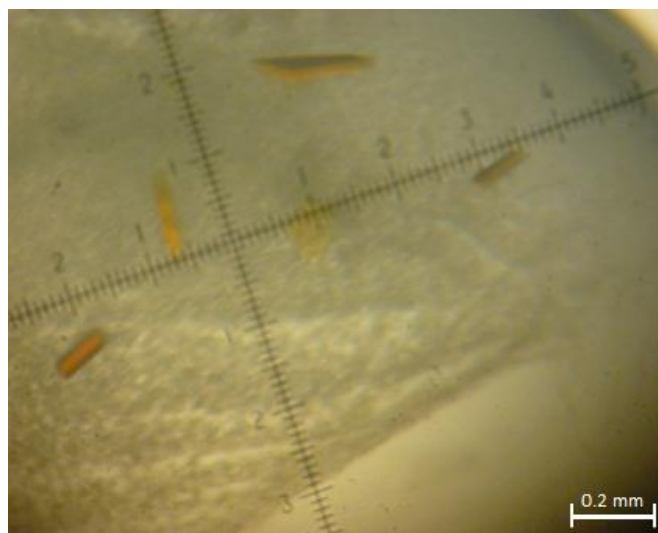


Figura 4.4. Cristais de PaoABC obtidos a 20 °C. Cristais obtidos para ensaios de gota suspensa e solução precipitante 0,2 M iodeto de amónio e 20% PEG 4K.

Note-se que aquando da realização dos ensaios de cristalização para a solução precipitante mencionada, verificou-se a formação de precipitado branco e amorfo (visível na Figura 4.4), surgindo cristais de PaoABC entre 48 a 72 horas depois.

Repetindo as mesmas condições de cristalização em várias gotas foi possível o crescimento de cristais únicos e de maiores dimensões que permitiu a evolução do trabalho experimental. Foram realizados ensaios de optimização variando a concentração de proteína e agente precipitante na gota, mas os resultados não foram os pretendidos. Neste sentido, adicionou-se às gotas com cristais uma solução estabilizante, *harvesting buffer*, e aguardou-se 1-3 minutos. Esta solução possui a mesma composição da solução precipitante, mas com uma maior concentração do agente precipitante (neste caso 22% de PEG 4K), tendo como objectivo evitar que o cristal se dissolva durante a manipulação.

Os cristais, antes de serem congelados em azoto líquido, foram transferidos para uma solução crio-protectora (adição de 30 % de glicerol à solução estabilizante), de forma a prevenir a formação de gelo dentro do cristal. Este procedimento promove uma boa recolha de dados a temperaturas criogénicas, ca 100K, já que evita a formação de anéis de gelo no padrão de difracção.

Para a primeira experiência de difracção, recorreu-se à radiação de sincrotrão na linha ID14-1 (ESRF - Grenoble, França), onde o cristal de PaoABC difractou a 1,67 Å (com comprimento de onda fixo de 0,934 Å) - Figura 4.5.

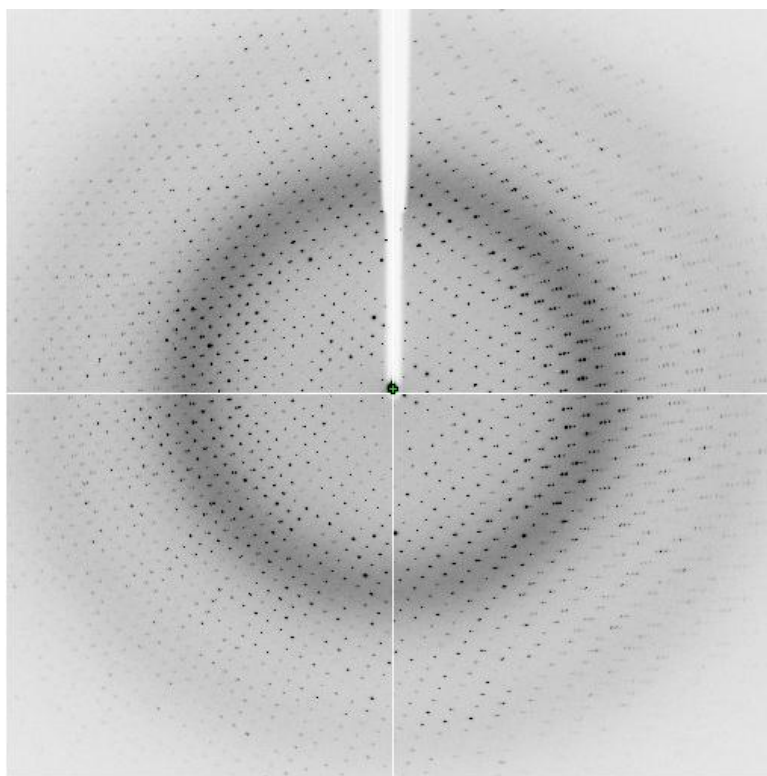


Figura 4.5. Padrão de difracção para o cristal de PaoABC obtido a 20 °C. A experiência de difracção foi efectuada na linha de radiação de sincrotrão ID14-1 (ESRF - Grenoble, França), e o conjunto de dados recolhido tem uma resolução máxima de 1,67 Å.

As imagens obtidas foram indexadas recorrendo-se ao programa *Mosflm* [85], de forma a determinar os índices de Miller hkl , as intensidades (I_{hkl}) e respectivos erros associados (σ_{hkl}). Foi

igualmente possível caracterizar a célula unitária através da determinação das constantes a , b , c e dos ângulos α , β , γ . Assim, as constantes da célula para o cristal medido são: $a=109,47$, $b=78,12$, $c=151,72$ Å e $\alpha=90,0^\circ$, $\beta=100,16^\circ$, $\gamma=90,0^\circ$. Atendendo a que $a \neq b \neq c$ e $\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$, pode afirmar-se que o cristal pertence ao sistema cristalino Monoclínico.

Através da análise das intensidades das reflexões, o programa *Pointless* [86], presente na base de programas cristalográficos CCP4 (*Collaborative Computational Project Number 4* [87]), determina qual o grupo espacial mais provável. Verificou-se assim que o cristal de PaoABC medido pertencia ao grupo espacial C2 (Nº 5 da Tabela Internacional de Cristalografia [88]), com uma probabilidade de 94%.

Durante a experiência de difracção o cristal pode ser danificado, levando a uma variação nas intensidades das reflexões. Desta forma, torna-se necessário escalar os dados, uma vez que não é possível comparar intensidades que não se encontrem na mesma escala. Neste sentido, recorreu-se ao programa *Scala* [89] (presente na base de programas cristalográficos CCP4), utilizando o ficheiro *mtz* proveniente do *iMosfilm*. Este programa fornece uma análise estatística que permitem avaliar a qualidade dos dados recolhidos (ver Tabela 4.2), nomeadamente se estamos na presença de dados *twinned*.

O modelo matemático *L test for twinning* foi desenvolvido por Padilla e Yeates, podendo ser aplicado com recurso à opção *CTruncate* [90–92]. Consiste numa análise alternada de estatísticas de intensidade (I), examinando diferenças locais entre pares de reflexões. A razão entre a diferença de duas intensidades e a soma dessas mesmas intensidades origina um valor adimensional, L , definido pela equação (1), onde h_1 e h_2 são duas reflexões não relacionadas, mas próximas no espaço recíproco.

$$L = \frac{I(h_1) - I(h_2)}{I(h_1) + I(h_2)} \quad \text{Equação (1)}$$

A aplicação deste modelo matemático gera um gráfico que relaciona os valores $|L|$ (valores normalizados) com a distribuição teórica cumulativa, $N(|L|)$ - Figura 4.6. Pela sua análise, é possível observar a sobreposição da curva dos dados experimentais (linha e pontos vermelhos) com a curva teórica com base no modelo para dados *twinned* (linha e pontos verdes). O valor $L_{\text{statistic}}$ de 0,379 para os resultados experimentais encontra-se próximo do valor teórico para *perfect twinned* de 0,375.

O *L test* indica que estamos na presença de dados *twinned* bem como os valores do momento de E para $k=1$, 3 e 4, obtidos pela mesma ferramenta do CCP4 (Tabela 4.1). Verificou-se um claro desvio entre os valores teóricos expectáveis para $\langle |E| \rangle$, $\langle |E|^3 \rangle$ e $\langle |E|^4 \rangle$ e os obtidos para os dados experimentais.

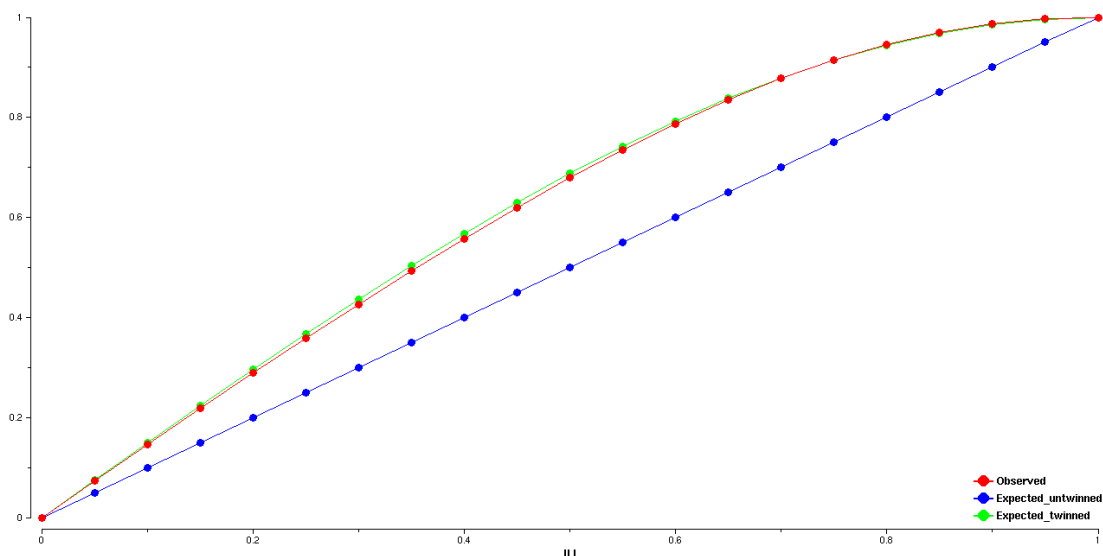


Figura 4.6. Representação gráfica da função de distribuição cumulativa de $|L|$ obtido no programa *Scala* do CCP4 para o cristal de PaoABC crescido a 20 °C. O eixo das ordenadas corresponde aos valores $|L|$ e o eixo das abscissas aos valores de $N(|L|)$ resultantes da aplicação do modelo matemático aos dados experimentais. A vermelha observam-se os valores para os dados experimentais, a azul do modelo teórico para dados *untwinned* e a verde para dados *twinned*.

Tabela 4.1. Valores para o Momento de E para o cristal de PaoABC obtido a 20 °C. Valores teóricos e reais calculados pelo programa *Scala* do CCP4.

Momento de E para $k=1,3,4$ (dados acêntricos)	Valor médio teórico para dados <i>untwinned</i>	Valor médio teórico para dados <i>twinned</i>	Valor médio obtido
$\langle E \rangle$	0,886	0,940	0,936
$\langle E ^3 \rangle$	1,329	1,175	1,195
$\langle E ^4 \rangle$	2	1,5	1,572

Tendo em conta a distribuição teórica cumulativa (*L test*) e os valores para o momento de E, concluímos que estávamos efectivamente na presença de dados *twinned*.

A primeira abordagem para contornar este problema consistiu na realização de novos ensaios de cristalização. Optámos pela alteração da temperatura de cristalização de 20 °C para 4 °C, mantendo as restantes variáveis constantes: PaoABC a 20 mg/mL e gotas de 2 μ L (1 μ L de proteína e 1 μ L da solução 0,2 M iodeto de amónio e 20% PEG 4K). A alteração da temperatura de cristalização influencia a nucleação e o crescimento cristalino, através da manipulação da solubilidade e sobressaturação da proteína [93]. O facto da cinética de crescimento cristalino ser mais lenta, pode promover a ordem e evitar a formação de um cristal *twinned*.

Para as condições descritas, surgiram cristais 96 horas depois, devendo-se o aumento do tempo de crescimento (quando comparado com o crescimento a 20 °C) a uma diminuição da velocidade de evaporação da água da gota para o poço. Estes cristais apresentavam uma morfologia

semelhante à obtida nas condições anteriormente descritas, em forma de placa e rodeados de precipitado branco e amorfo (Figura 4.7). Depois de estabilizados com *harvesting buffer*, os cristais foram congelados em azoto líquido na presença de 30 % glicerol.



Figura 4.7. Cristais de PaoABC obtidos a 4 °C. Cristais obtidos para ensaios de gota suspensa e solução precipitante 0,2 M iodeto de amónio e 20% PEG 4K.

Recorreu-se à radiação de sincrotrão da linha X06DA – PXIII (SLS – Villigen, Suíça), recolhendo-se um conjunto de 720 imagens a 1,87 Å (a comprimento de onda de onda fixo de 0,97642 Å) – Figura 4.8.

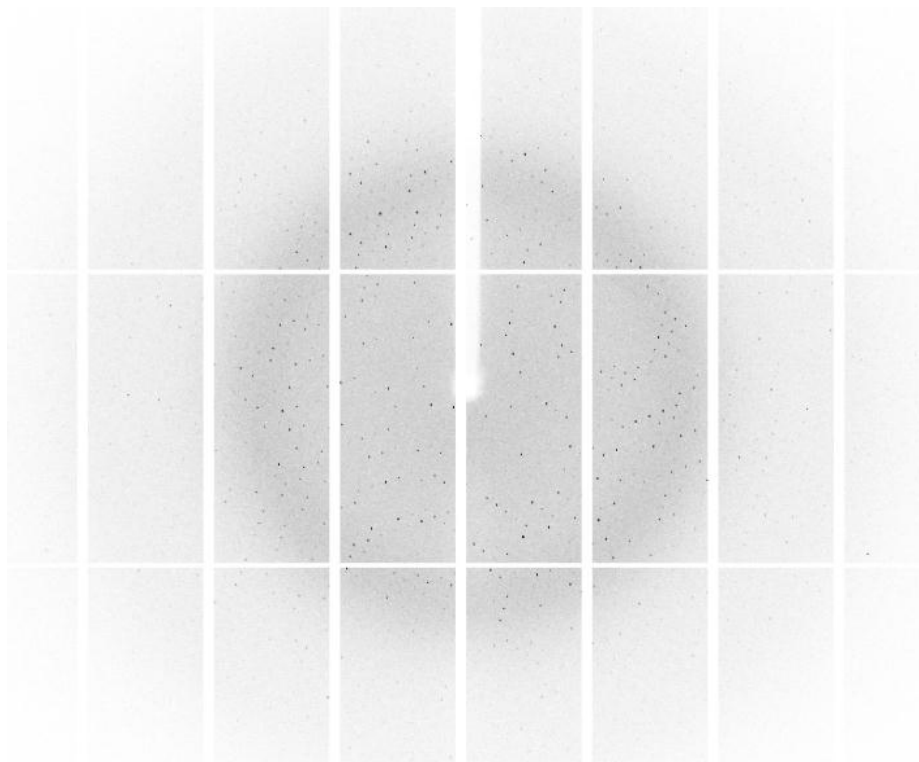


Figura 4.8. Padrão de difracção para o cristal de PaoABC obtido a 4°C. A experiência de difracção foi efectuada na linha de radiação de sincrotrão X06DA – PXIII (SLS – Villigen, Suíça), e o conjunto de dados recolhido tem uma resolução máxima de 1,87 Å.

A primeira dúvida que se colocou era se estaríamos novamente na presença de dados *twinned*. A inspecção visual do padrão de difracção (Figura 4.8) evidenciava que não uma vez que quando comparado com o anterior (ver Figura 4.5), verificava-se uma diminuição do número de reflexões. No entanto esta análise é pouco objectiva e os testes anteriormente descritos foram efectuados.

Assim procedeu-se à indexação das imagens, utilizando o programa *Mosflm*. O cristal medido apresentava umas constantes da célula semelhantes ao anterior, pertencendo ao mesmo grupo espacial, C2: a=109,42, b=78,08, c=151,77 e $\beta=99,77^\circ$. Recorreu-se ao programa *Scala* (do CCP4) de forma a escalar e avaliar a qualidade dos dados. Na Tabela 4.2 encontram-se alguns parâmetros estatísticos úteis para proceder a essa avaliação.

Os dados recolhidos para o cristal de PaoABC obtido a 4 °C eram *untwinned*. Pela análise da Figura 4.9 verifica-se uma aproximação da curva dos dados experimentais à curva teórica para *untwinned*, quando comparados com os obtidos anteriormente (Figura 4.6). Consequentemente, o valor de $L_{\text{statistic}}$ de 0,455 aproximou-se do valor teórico para dados *untwinned* (0,5).

Tabela 4.2. Estatísticas de qualidade dos dados de difracção e coeficiente de Matthews para o cristal de PaoABC obtido a 20 e 4 °C. Os valores entre parênteses correspondem à camada externa de resolução.

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_h \sum_{i=1}^N |I_{(h)i} - \bar{I}_{(h)}|}{\sum_h \sum_{i=1}^N I_{(h)i}} \quad R_{\text{pim}} = \frac{\sum_h \left(\frac{1}{N-1}\right)^{1/2} \sum_{i=1}^N |I_{(h)i} - \bar{I}_{(h)}|}{\sum_h \sum_{i=1}^N I_{(h)i}} \quad V_M = \frac{\text{Volume da célula unitária}}{\text{Massa da célula unitária}}$$

$$\text{Multiplicidade} = \frac{\text{Número total de reflexões}}{\text{Número total de reflexões únicas}} \quad \text{Conteúdo de solvente} = 1 - \frac{1.23}{V_M}$$

Parâmetros	Cristal <i>twinned</i> (20 °C)	Cristal <i>untwinned</i> (4 °C)
Resolução (Å)	30,88-1,67 (1,76-1,67)	41,20-1,87 (1,97-1,87)
<I/σI>	12,8 (5,9)	11,0 (3,3)
R_{merge} (%)	6,1 (16,8)	7,1 (34,9)
R_{pim} (%)	3,9 (11,1)	4,8 (23,9)
Multiplicidade	3,0 (3,0)	2,9 (2,7)
Número total de reflexões	379108 (50315)	293087 (35970)
Número total de reflexões únicas	124566 (16919)	100201 (13106)
<i>Completeness</i>	85,2 (79,7)	96,3 (87,2)
Mosaicidade média	0,79	0,64
Número de moléculas na unidade assimétrica	1	1
Coeficiente de Matthews (Å ³ /Dalton)	2,7	2,73
Conteúdo de solvente (%)	48,05	48,05
Grupo espacial	C2	C2
Constantes da célula (Å)	a=151,72, b=78,12, c=151,72	a=109,42, b=78,08, c=151,77

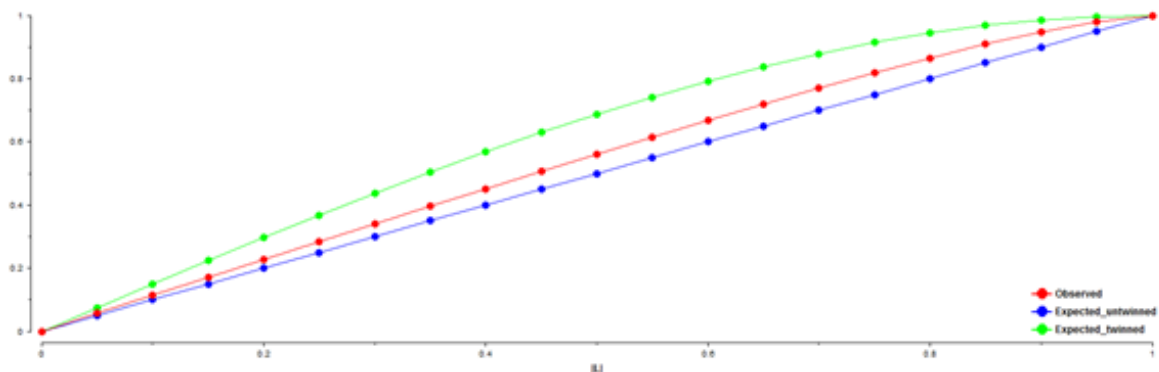


Figura 4.9. Representação gráfica da função de distribuição cumulativa de $|L|$ obtido no programa *Scala* do CCP4 para o cristal de PaoABC obtido a 4 °C. O eixo das ordenadas corresponde aos valores $|L|$ e o eixo das abscissas aos valores de $N(|L|)$ resultantes da aplicação do modelo matemático aos dados experimentais. A vermelho observam-se os valores para os dados experimentais, a azul do modelo teórico para dados *untwinned* e a verde para dados *twinned*.

Para a análise da Tabela 4.2, um dos primeiros parâmetros a ter em consideração é o valor da razão entre as intensidades e o erro (ou ruído) associado, $\langle I/\sigma \rangle$. Neste caso, as intensidades são 11 vezes maiores que o erro ($\langle I/\sigma \rangle$ de 11,0) sendo um bom indicador da qualidade dos dados. Mesmo para a camada externa de resolução (1,97-1,87 Å) este valor continua a ser aceitável, sendo o valor das intensidades 3 vezes superiores ao erro associado, indicando a viabilidade dos dados mesma a alta resolução.

Segundo a análise dos parâmetros, temos o R_{merge} . Este valor é uma medida da concordância entre várias medições das mesmas reflexões, devendo encontrar-se entre os 5 e os 10%. Para o cristal de PaoABC medido esse valor é de 7,1%, encontrando-se dentro do intervalo esperado. Relacionado com o parâmetro anterior está o R_{pim} . Este expressa a precisão da média das intensidades, apresentando um valor de 4,8% para os dados experimentais.

O valor de *completeness* compara a percentagem de reflexões medidas com o número total de reflexões possíveis para uma dada resolução, devendo encontrar-se perto dos 100%. Neste caso, os dados globais apresentam um valor de 96,3%, verificando-se um decréscimo tolerável (87,2 %) para os dados da camada externa de resolução.

A mosaicidade corresponde ao grau de desordem entre várias células unitárias no cristal. Valores baixos indicam cristais ordenados e, conseqüentemente, melhor difracção. Assim, a mosaicidade média do cristal medido foi de 0,64, que aleada aos outros parâmetros referidos, permite ter confiança nos dados de difracção recolhidos.

A determinação o conteúdo de solvente do cristal (a ser útil na fase seguinte), baseia-se no Coeficiente de Matthews ou Volume de Matthews (V_M). Este é definido através do rácio entre o volume e a massa da célula unitária, estando directamente relacionado com o volume de solvente no cristal. Geralmente, apresenta um valor médio de 2,5 Å³/Dalton (com um intervalo entre 1,5 e 6 Å³/Dalton) [65] encontrando-se, por isso, o valor obtido para o conjunto de dados recolhido (2,7 Å³/Dalton) dentro do esperado. Daqui resultou um conteúdo de solvente de 48 %, igualmente dentro dos valores esperados (27 - 78%) e apenas uma molécula na unidade assimétrica.

Em suma, a análise dos parâmetros anteriores permitiu concluir que estamos na presença de um conjunto de dados de elevada qualidade *untwinned*, possibilitando a passagem para a fase seguinte: resolução da estrutura.

4.1.2.2. Resolução e refinamento da estrutura

Com a determinação das intensidades das reflexões e a análise de parâmetros que permitiam avaliar a qualidade dos dados, prosseguiu-se para uma nova etapa – a resolução da estrutura do heterotrímero PaoABC.

Através do quadrado das intensidades medidas foi possível determinar os Factores de Estrutura $|F_{hkl}|$. Contudo, devido à limitação da técnica, não foi possível determinar o ângulo da fase das ondas difractadas, α_{hkl} . Assim, foi necessário definir qual seria a melhor estratégia de contornar o Problema da Fase, de forma a tornar possível o cálculo do mapa de densidade electrónica. Devido à existência de proteínas homólogas cuja estrutura foi resolvida por cristalografia de raios X, optou-se pelo Método de Substituição Molecular. Como este método pode originar *model bias*, uma alternativa seria a utilização da Dispersão Anómala Múltipla, uma vez que esta proteína contém cofactores.

Para a escolha dos modelos recorreu-se à base de dados *online* PDB (*Protein Data Bank*), fazendo a pesquisa com base na sequência de aminoácidos. Como se trata de uma proteína com três subunidades distintas, optou-se por realizar a pesquisa para cada uma isoladamente (subunidade A, subunidade B e subunidade C), baseando-nos na similaridade entre sequências e conservação dos cofactores (centros Ferro-Enxofre, FAD e Moco).

Utilizando a sequência de aminoácidos da subunidade A (com 229 resíduos), verificou-se a existência de três proteínas multiméricas com graus de similaridade entre 20 e 40 %. Para a posterior resolução da estrutura desta subunidade admitiram-se como modelos: a subunidade C da proteína 4-hidroxibenzoil-CoA redutase de *Thauera aromatica* (código 1RM6 do PDB [94]) e as subunidades A da quinolina 2-oxidoreductase de *Pseudomonas Putida 86* (código 1T3Q do PDB [95]) e da monóxido de carbono desidrogenase de *Hydrogenophaga pseudoflava* (código 1FFU do PDB [96]) – ver Tabela 4.3. A escolha de três modelos (ou quatro para a PaoC) para a aplicação do método de Substituição Molecular, prende-se com a ausência de um único modelo com elevada percentagem de similaridade para a PaoABC.

Utilizando a ferramenta *ClustalW2* (do portal EMBL-EBI) realizou-se o alinhamento da sequência da PaoABC com as sequências de aminoácidos das subunidades modelo. Os três alinhamentos resultantes foram utilizados como base para o programa *Chainsaw* (do CCP4). Ao utilizar o ficheiro de alinhamento, esta ferramenta altera o ficheiro pdb dos modelos (sem cofactores), removendo átomos das cadeias laterais dos aminoácidos não-conservados e alterando o nome dos resíduos, de forma a tornar a sequência compatível com a sequência da subunidade fornecida.

Tabela 4.3. Informação relativa aos modelos utilizados para a resolução da estrutura da PaoABC.

Modelos Proteína	Código do PDB	Subunidade de interesse	Número de resíduos	Similaridade (%)
Subunidade A (229 resíduos)	1RM6	C	161	41
	1T3Q	A	168	40
	1FFU	A	163	40
Subunidade B (318 resíduos)	1RM6	B	324	34
	1FFV	C	287	33
	1FFU	C	287	33
Subunidade C (732 resíduos)	1T3Q	B	788	28
	1RM6	A	769	26
	3EUB	C	762	26
	3SR6	C	745	26

Os novos ficheiros pdb originados pelo *Chainsaw* [97] possuem a sequência da PaoABC, com algumas falhas, mas as coordenadas atómicas (x,y,z) originais dos modelos. Assim, utilizando a ferramenta *Secondary-structure matching Superposition* (do programa *COOT - Crystallographic Object-Oriented Toolkit* [98]) procedeu-se à sobreposição dos modelos no espaço tridimensional, originando um ficheiro pdb com novas coordenadas atómicas onde todos os modelos se encontram sobrepostos.

De seguida, recorreremos ao programa *Phaser – Molecular Replacement* (do CCP4) [99] de forma a determinar as fases e resolver a estrutura. Este programa, através de operações de rotação e de translação, orienta e posiciona (respectivamente) a estrutura alvo na unidade assimétrica. Neste caso, utilizaram-se os ficheiros pdb resultantes do *Superimposed* e o ficheiro mtz proveniente do *Scala* para os dados experimentais. Com os dados fornecidos, o *Phaser* encontrou uma solução para a subunidade A, sendo nesta fase importante avaliar algumas estatísticas resultantes das operações de rotação e translação realizadas pelo programa, como o LLG (*Log Likelihood Gain*) e o Z-score.

O LLG indica o número de vezes que a solução encontrada é melhor quando comparada com uma solução aleatória. Deve ser positivo para ambas as operações, caso contrário o modelo obtido não deve ser considerado.

O Z-score é o valor de desvio-padrão da solução encontrada face à média. Para que a solução encontrada seja considerada correcta, o valor de Z-score para a função de rotação deve ser maior que 5 e para a função de translação maior que 8.

A análise dos resultados obtidos para a função de rotação (LLG de 23,3 e o Z-score 5,3) e translação (LLG de 110,0 e o Z-score 14,3), permitiu concluir que a solução encontrada para a

subunidade A era satisfatória. Neste sentido, é possível afirmar que a estrutura da subunidade A do complexo PaoABC foi resolvida.

Através do programa *Phaser* obtivemos um ficheiro *mtz*, contendo as fases e os factores de estrutura, um ficheiro *xxx.pdb* com as coordenadas atómicas da subunidade e um ficheiro *xxx.sol* contendo a solução encontrada.

O procedimento detalhadamente descrito para a resolução da estrutura da subunidade A, foi repetido para as subunidades C e B. Especificamente, para a subunidade C utilizaram-se como modelos: a subunidade A da proteína 4-hidroxibenzoil-CoA redutase de *Thauera aromatica* (código 1RM6 do PDB), a subunidade B da proteína quinolina 2-oxidoreductase de *Pseudomonas Putida 86* (código 1T3Q do PDB) e as subunidades C da xantina oxidase de *Bos taurus* (código 3EUB do PDB [100]) e da xantina oxidase reduzida de *Bos taurus* (código 3SR6 do PDB [101]) – ver Tabela 4.3.

Contudo, aquando da determinação das fases utilizando o *Phaser*, para além dos ficheiros *pdb* gerados pela sobreposição dos 4 modelos descritos, utilizámos também a solução encontrada previamente para a solução.

Através da análise das estatísticas LLG e Z-score para as operações de rotação (LLG de 126,9 e Z-score de 10,7) e translação (LLG de 395,4 e Z-score de 16,1), concluímos que foi encontrada uma solução e assim afirmar que encontrámos a posição da subunidade C do complexo PaoABC).

Por fim, para a subunidade B utilizaram-se como modelos: a subunidade B da proteína 4-hidroxibenzoil-CoA redutase de *Thauera aromatica* (código 1RM6 do PDB) e as subunidades C da monóxido de carbono desidrogenase de *Hydrogenophaga pseudoflava* (código 1FFU e 1FFV [96] do PDB).

Seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente. O programa forneceu uma solução para subunidade B, com os respectivos valores de LLG e Z-score para as operações de rotação (LLG= 378,0 e Z-score= 4,1) e translação (LLG= 573,0 e Z-score= 15,2). Pela análise dos valores verificou-se que a solução encontrada pelo programa estava correcta, tendo-se assim resolvido a estrutura da subunidade B e, conseqüentemente, de todo o complexo. Uma solução de *molecular replacement* só é válida se não existir um número elevado de átomos sobrepostos (*clashes*). O valor final obtido para este parâmetro foi de 12 *clashes*, o que é bastante aceitável tratando-se de uma estrutura com 1279 resíduos. Estes 12 átomos encontram-se em locais errados e muito provavelmente referem-se a zonas em que estrutura da proteína difere da dos modelos. A inspecção visual do modelo e da densidade electrónica, bem como alguns ciclos de refinamento poderão resolver este problema facilmente.

De forma a melhorar as fases da estrutura obtida recorreu-se ao programa *Density Modification – DM* [102] (do CCP4). Para tal necessitamos de fornecer ao programa o ficheiro *mtz* (gerado pelo *Phaser* contendo os dados para a PaoABC) e o conteúdo de solvente do cristal (48,1% - ver Tabela 4.2.). Este programa melhora as actuais fases do modelo através da redução ruído associado às regiões de solventes desordenadas, destacando assim a proteína na célula unitária.

Depois da resolução da estrutura e melhoramento das fases, o passo que se seguiu foi o refinamento. Esta etapa consiste no ajuste do modelo à densidade electrónica, minimizando a

diferença entre as amplitudes observadas (F_{obs}) e as calculadas com base nos modelos escolhidos (F_{cal}).

Efectuaram-se os primeiros 10 ciclos de refinamento com restrições através do programa *Refmac5* do CCP4 [103], utilizando o ficheiro mtz proveniente do *DM* e o ficheiro pdb resultante do último *Phaser*. Daqui resultaram dois novos ficheiros mtz e pdb e uma série de parâmetros cruciais para a avaliação do processo de refinamento (Tabela 4.4).

O ficheiro mtz permite calcular vários tipos de mapas de densidade electrónica, sendo os mais comuns: o mapa $2F_{\text{obs}}-F_{\text{cal}}$ e o mapa $F_{\text{obs}}-F_{\text{cal}}$.

O mapa de densidade electrónica $F_{\text{obs}}-F_{\text{cal}}$ (ρ_{cal}), designado por mapa de diferença, resulta da subtracção dos factores de estruturas resultantes dos dados experimentais e os baseados no modelo. Neste tipo de mapa as regiões presentes na estrutura, mas não incluídas nos modelos, deveriam mostrar densidade positiva (geralmente representada a verde). No reverso, regiões erradamente introduzidas no modelo, mas ausentes na estrutura desconhecida, deveriam mostrar contornos negativos (densidade geralmente representada a vermelho), devendo ser retiradas ou o seu factor de ocupação ajustado. Este mapa é de extrema utilidade de pois permite adicionar ou remover átomos consoante se observa densidade positiva ou negativa, respectivamente.

No mapa $2F_{\text{obs}}-F_{\text{cal}}$, o peso dado ao modelo é menor. A menos que o modelo contenha erros gravíssimos, este mapa é positivo, permitindo que o modelo seja ajustado de acordo com os dados experimentais.

Antes de continuar com o processo de refinamento era importante confirmar a existência de densidade no mapa $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ para os cofactores da PaoABC (dois centros ferro-enxofre, FAD e MCD) uma vez que estes não foram incluídos na resolução da estrutura. Para tal, recorreu-se ao programa *Coot* utilizando o mtz e pdb provenientes do *Refmac5*, sendo o resultado visível na Figura 4.10 – A, B e C. Verifica-se a presença de densidade positiva para ambos os centros ferro-enxofre presentes na subunidade A, com destaque para os átomos de ferro (Figura 4.10 - A). Para o caso do cofactor presente na subunidade B – o FAD – a densidade electrónica possui algumas falhas, o que, nesta fase do refinamento, é aceitável (Figura 4.10 - B). Por fim, existe também densidade positiva para o MCD localizado na subunidade C, sendo evidente a existência de densidade para o átomo de molibdénio e para os seus ligandos (Figura 4.10 – C).

Este facto é um bom indicador do sucesso da resolução da estrutura, uma vez que aos ficheiros pdb dos modelos usados foram removidas as coordenadas atómicas dos cofactores. Assim a densidade positiva observada provém exclusivamente dos dados experimentais e não está afectada por qualquer *model bias*.

Depois da visualização dos mapas referidos procedeu-se a um novo refinamento da estrutura onde se incluíram as coordenadas atómicas dos cofactores. Recorrendo ao programa *Refmac5* do CCP4, executaram-se 10 novos ciclos de refinamento e obtiveram-se dois novos ficheiros (mtz e pdb) e as respectivas estatísticas de refinamento (Tabela 4.4). Comparando os valores obtidos no primeiro refinamento (sem cofactores) e o segundo (já com os cofactores) verifica-se um decréscimo do Factor R (de 0,4785 para 0,4573). Este valor está longe do ideal (menor que 0,2), sendo obviamente necessário prosseguir com o processo de refinamento.

Tabela 4.4. Estatísticas obtidas para o primeiro ciclo de refinamento estrutura da PaoABC.

Parâmetro	Refinamento inicial	Refinamento actual
Factor R	0,4785	0,4573
R_{free}	0,4950	0,4787
RMSD para o ângulo de ligação (°)	2,5951	1,9887
RMSD para o comprimento de ligação (Å)	0,0624	0,0132

No último ciclo de refinamento obteve-se um valor de R_{free} de 0,4787. Este é calculado, considerando apenas 5% das reflexões não contabilizadas para o processo de refinamento. A sua diminuição, quando comparado com o valor inicial (0,4950), é também um bom indicador de um ajuste razoável do modelo aos dados experimentais.

Por fim deve-se avaliar os valores de RMSD. Este parâmetro indica quanto o modelo se afasta dos parâmetros geométricos considerados típicos. Para estruturas resolvidas a média/alta resolução esperam-se valores RMSD para o comprimento de ligação de 0,02 Å (aproximadamente) e para os ângulos de ligação menores que 4° (aproximadamente). Os valores encontrados para a PaoABC não são ainda significativos uma vez que o modelo se encontra no início do refinamento.

Na Figura 4.10 – C, D e E está representado o mapa $2F_{obs}-F_{cal}$ onde é visível um melhoramento da densidade electrónica na região dos cofactores da PaoABC após o segundo refinamento. Contudo, ainda é necessário rever todas as cadeias da proteína e realizar novos ciclos de refinamento. Esta etapa encontra-se ainda em processo de forma a melhorar as estatísticas anteriormente obtidas e obter modelo ‘final’ da PaoABC.

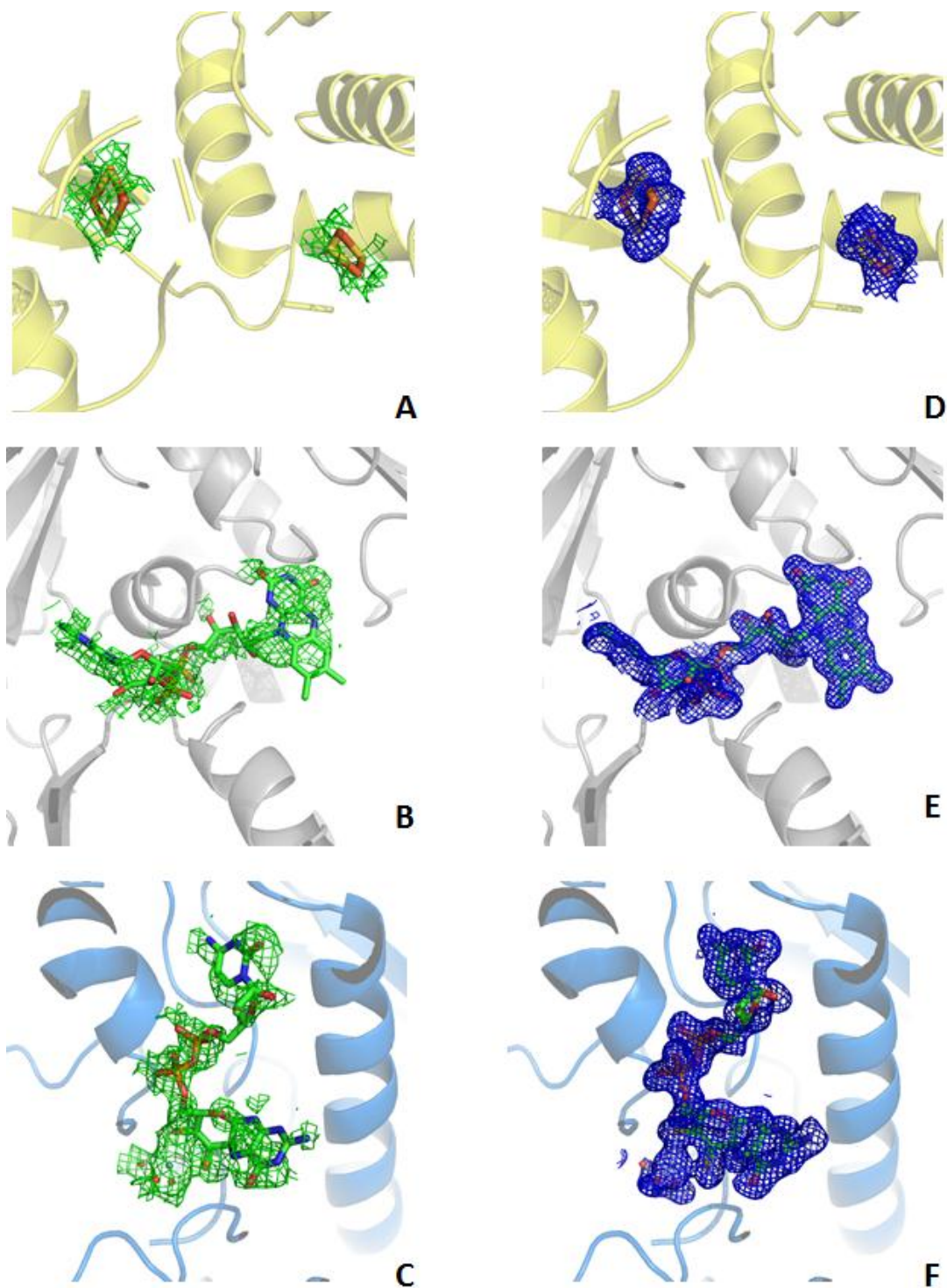


Figura 4.10. Vista dos cofactores com representação da densidade electrónica após o primeiro e o segundo refinamento. A verde encontra-se o mapa $F_{\text{obs}}-F_{\text{cal}}$ calculado depois do primeiro ciclo de refinamento, com contorno de 3σ para os centros de ferro enxofre (A), FAD (B) e MCD (C). Para clareza da imagem, o mapa $2F_{\text{obs}}-F_{\text{cal}}$ não foi incluído. A azul encontra-se o mapa $2F_{\text{obs}}-F_{\text{cal}}$ com contorno de 1σ para os centros de ferro enxofre (D), FAD (E) e MCD (F). Todas as imagens foram preparadas no programa *Pymol*.

4.1.3. *Small angle X-ray scattering*

A concepção, medição e tratamento dos dados apresentados nesta secção resultaram de uma colaboração com o Doutor Dmitri Svergun.

A técnica de SAXS pode ser aplicada a macromoléculas biológicas de diferentes pesos moleculares e naturezas. No caso das proteínas, é uma ferramenta importante na análise conformacional e na avaliação de alterações estruturais em solução. Esta técnica fornece um modelo da estrutura da proteína a baixa resolução, que pode ser utilizado para completar os dados de alta resolução obtidos por cristalografia de raios X, nomeadamente nas regiões mais flexíveis da proteína [104].

Para a realização de SAXS é necessário garantir uma amostra monodispersa (acima dos 90%), de forma a evitar a dispersão da radiação por outras componentes (contaminantes) que não a proteína e o solvente. O último passo de purificação da PaoABC, através de uma cromatografia de filtração em gel, e a filtração das amostras instantes antes da realização da experiência de SAXS, permitem a obtenção de uma amostra monodispersa e minimizam a presença de agregados.

O último parâmetro a ter em consideração antes de iniciar a recolha de dados é a concentração das amostras a ser medidas. Esta deve ser muito precisa, uma vez que os dados obtidos para as diferentes concentrações (20, 10 e 2 mg/mL) são utilizados para normalizar os dados de dispersão.

Foram recolhidos três conjuntos de dados relativos às diferentes concentrações de PaoABC, a um comprimento de onda fixo de 0,15 nm, utilizando radiação de sincrotrão (linha X33 – DESY, Hamburgo). Optou-se por realizar as medições da 10 °C e não à temperatura ambiente de forma a evitar a formação de agregados proteicos durante a experiência. O registo da dispersão dos raios X para as diferentes soluções de PaoABC foram intercalados com a medição da dispersão do tampão em que a proteína se encontrava (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 250 mM NaCl e 1mM EDTA). O tratamento dos dados consistiu na subtração da dispersão registada para a solução de proteína e da dispersão do tampão, de forma a obter a dispersão da proteína isolada. Esta vai permitir a determinação do modelo.

O tratamento matemático foi realizado pelo Doutor Dmitri Svergun (com recurso ao programa DAMMIN [105]), resultando o modelo *ab initio* (representado na Figura 4.11) que permite visualizar a forma da PaoABC em solução. Para comprovar a sua veracidade, efectuou-se a sobreposição dos dados obtidos com os dados de alta resolução de uma proteína homóloga à PaoABC, a 4-hidroxibenzoil-CoA redutase de *Thauera aromática*, cuja estrutura também foi utilizada para a resolução da estrutura da PaoABC por cristalografia de raios X.

O ajuste do modelo de SAXS da PaoABC com o modelo cristalográfico da proteína homóloga é razoável, porém com alguns desvios. O modelo da PaoABC em solução é mais alongado que o modelo cristalográfico da 4-hidroxibenzoil-CoA redutase. Este facto pode estar relacionado com os movimentos das diferentes subunidades em solução, mas também com a estrutura quaternária adoptada pela proteína. É de lembrar que a PaoABC está organizada como um heterotrímero ($\alpha\beta\phi$) e não como um heterodímero ($\alpha_2\beta_2\phi_2$) como os restantes membros da família.

O próximo passo será a sobreposição da estrutura cristalográfica da PaoABC já refinada com o modelo de SAXS. Este passo permitirá comparar a estrutura da enzima no estado cristalino e em solução e analisar em detalhe eventuais diferenças.

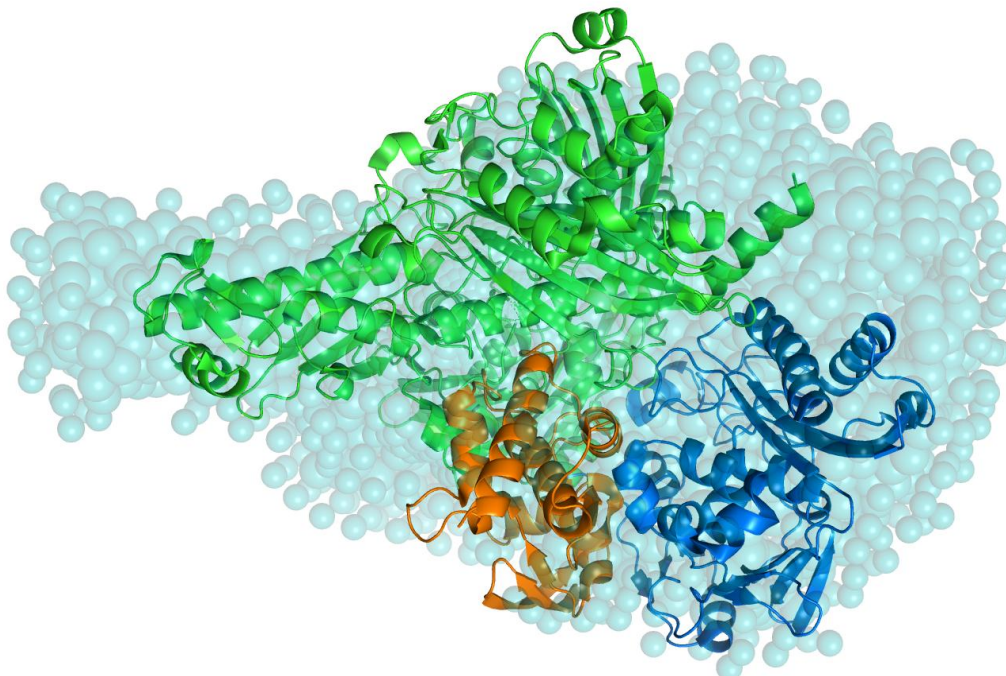


Figura 4.11. Sobreposição do modelo *ab initio* da PaoABC com um modelo de alta resolução da 4-hidroxibenzoil-CoA redutase resolvido por cristalografia de raios X. O modelo da PaoABC encontra-se representado por esferas e o modelo cristalográfico em *cartoon* para três das subunidades. A imagem foi preparada no programa *Pymol*.

4.2. Estudos com PaoD

A PaoD é uma proteína de *E. coli*, responsável pela inserção do MCD sulfurado no complexo PaoABC. A resolução da sua estrutura tridimensional por cristalografia de raios X constitui um passo importante na compreensão do seu mecanismo de acção e representará a primeira estrutura de uma chaperona da família da XdhC.

4.2.1. Sobre-expressão em *Escherichia coli* e purificação da PaoD

O presente estudo, teve como principal objectivo a obtenção de PaoD para a realização de diversos ensaios, nomeadamente de cristalização.

Os procedimentos de biologia molecular, para a obtenção dos clones contendo o gene *paoD*, foram realizados pela Doutora Meina Neumann e Viola Schwuchow (*Institute of Biochemistry and Biology, University of Potsdam, Germany*) [56].

O plasmídeo utilizado na sobre-expressão (pMN87) resultou da inserção do fragmento *paoD* no local de clonagem múltipla (MCS) de pET28a, utilizando as enzimas de restrição NdeI e Sall. A transformação foi realizada em células de *E. coli* da estirpe BL21(DE3), comumente utilizada para elevados níveis de produção da proteína de interesse. Da construção do vector de expressão (pMN87), resulta a fusão de uma cauda-His₆ no N-terminal da proteína de interesse, a PaoD, permitindo a sua purificação por cromatografia de afinidade, com a passagem do produto de expressão (após lise e centrifugação) numa coluna com resina Ni-TED.

A eluição competitiva da proteína ocorreu através da adição de tampão fosfato (50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0) e 300 mM NaCl) contendo 250 mM de imidazol. A determinação da concentração deste agente, necessária para a purificação, resultou de estudos de otimização executados pela Doutora Meina Neumann.

De forma a confirmar o sucesso das purificações realizadas para a PaoD, recorreu-se a uma SDS-PAGE das fracções recolhidas (Figura 4.12.). Através da sua análise foi possível confirmar a presença da PaoD na maioria das fracções, pela existência de uma banda destacada a, aproximadamente, 37 kDa. Este peso molecular corresponde à proteína de fusão, uma vez que o tipo de purificação escolhido não elimina a cauda de histidinas. Assim, ao peso molecular da PaoD, 34,8 kDa, tivemos de somar 2 kDa (aproximadamente) relativo a um pequeno péptido que contém, para além das seis histidinas, a sequência de reconhecimento para a protease trombina.

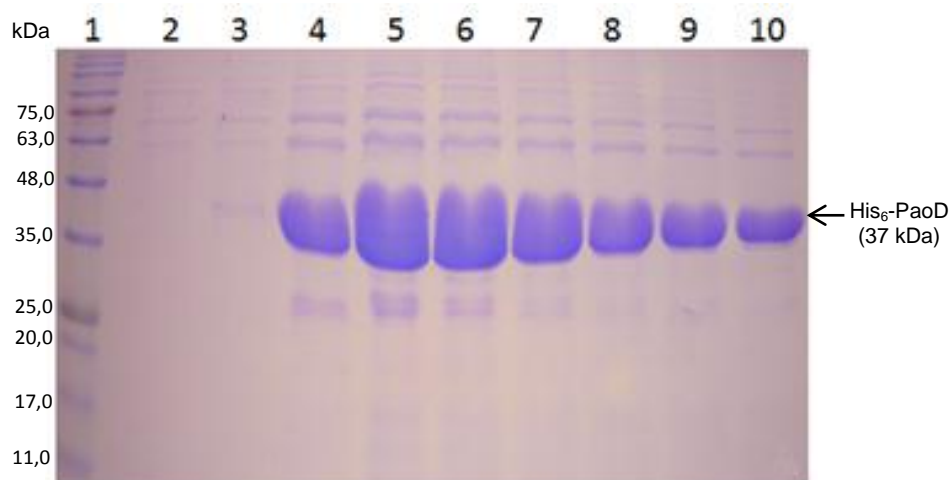


Figura 4.12. SDS-PAGE a 12,5% com as fracções resultantes da purificação da PaoD com a coluna de Ni-TED. 1 - Marcador de pesos moleculares *NZYColour Protein Marker II* (Nzytech); 2 a 12 - Fracções de 1 mL resultantes da eluição competitiva com 250 mM de imidazol, sendo a ordem no gel (da esquerda para a direita) a ordem de eluição das fracções.

Apesar de serem visíveis no gel várias bandas relativas a proteínas contaminantes, não se consideraram necessários novos passos de purificação. As fracções onde a proteína estava mais concentrada foram dialisadas durante 16 horas contra diferentes tampões (ver composição na Tabela 3.1 da secção 3.2.1), tendo-se registado sempre uma precipitação residual da amostra.

Depois da referida alteração do tampão, a concentração das diferentes amostras de PaoD foi determinada através da Lei Lambert-Beer, com o valor da absorvância registado a 280 nm, o

coeficiente de extinção molar (ϵ_{280}) de $33920 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e percurso óptico de 1 cm. O coeficiente de extinção molar foi determinado pela ferramenta bioinformática *ProtParam* do portal ExPASy [106], com base na sequência de aminoácidos da proteína em questão.

As amostras obtidas de várias purificações realizadas foram armazenadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ com concentrações entre os 0,1 e os 2 mg/mL, antes de qualquer passo de concentração. Optou-se por este procedimento, uma vez que, em testes anteriores, se registou a degradação e precipitação de amostras com elevada concentração aquando do seu descongelamento.

Em suma, pelos métodos descritos obteve-se PaoD nativa que possibilitou o desenvolvimento do trabalho.

4.2.2. Ensaio de cristalização e experiências de difracção

Ao longo das experiências realizadas com a PaoD sempre foi notória a sua instabilidade, principalmente durante o seu descongelamento e concentração. Assim, um dos principais objectivos seria estabilizar e, posteriormente, cristalizar a proteína.

A primeira abordagem consistiu na utilização de IL. Estes compostos são sais orgânicos líquidos à temperatura ambiente, com elevada solubilidade e pressão de vapor nula [107]. Publicações recentes reconheceram propriedades estabilizantes a IL que possuem o grupo imidazol na sua composição, nomeadamente ao nível do *fold*ing e na prevenção da agregação de proteínas [108]. A estas somou-se o caso de sucesso na cristalização da proteína NapAB (Nitrato redutase periplasmática) utilizando IL como aditivos na cristalização [109], tal como descrito para outras proteínas [110], [111].

Neste sentido, adicionaram-se diferentes IL ($[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ ou $[\text{C}_2\text{OHmim}]\text{PF}_6$) a concentrações finais de 0,2 ou 0,4 M antes de se iniciar o processo de descongelamento de forma a estabilizar a proteína. Efectivamente, após o descongelamento da amostra com os diferentes IL, verificou-se um decréscimo da precipitação da proteína, tendo sido possível concentrá-la até 5 mg/mL.

Realizaram-se de seguida, os ensaios de cristalização, testando diferentes *screens* (entre outros, *Jena Bioscience Screen Classic* 1 a 10 e o *screen* de 80 condições adaptado de Jancarik *et al.* [77]) para gotas de 0,4 μL (0,2 μL proteína e 0,2 μL de solução precipitante). Note-se que a proteína utilizada encontrava-se em tampão Tris (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl e 1 mM EDTA) e os ensaios foram realizados a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ pelo método difusão de vapor em gota assente.

Após dois meses registou-se o aparecimento de um cristal de PaoD (previamente incubada com 0,4 M $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$) com forma hexagonal para a condição de cristalização 2,2 M de sulfato de amónia (do *screen JBScreen Classic* 6) - Figura 4.13. Depois de estabilizado com *harvesting buffer* (2,4 M sulfato de amónia), o cristal foi congelado em azoto líquido na presença de uma solução crioprotectora contendo 2,4 M de sulfato de amónia e 30 % glicerol.

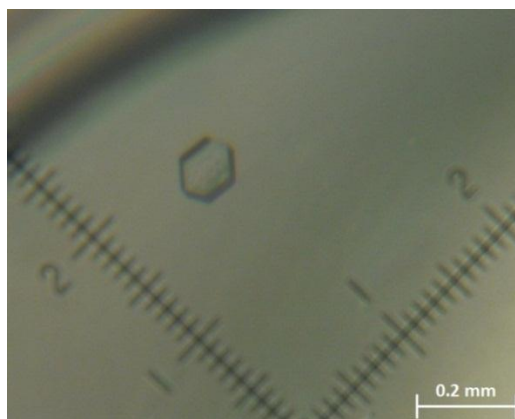


Figura 4.13. Cristal de PaoD previamente incubada com 0,4 M $[C_4mim]Cl$. Cristal obtido em ensaios de gota assente a 20 °C e solução precipitante contendo 2,2 M de sulfato de amónio.

O cristal foi posteriormente analisado com recurso à linha de radiação de sincrotrão ID23-1 (ESRF – Grenoble, França), difractando a 3,39 Å para um comprimento de onda de 0,975 Å.

Seguindo a abordagem descrita anteriormente para os cristais de PaoABC, pretendeu-se determinar os índices de Miller (hkl), as respectivas intensidades (I_{hkl}) e o erro associado (σ_{hkl}) para todas as reflexões (Figura 4.14). Para tal, recorreu-se ao programa *Mosfilm* que, após indexar as imagens recolhidas, determinou os parâmetros característicos da célula unitária (constantes $a=b=144,44$ Å, $c=240,48$ Å e $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$). Tendo em conta que $a=b\neq c$ e $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$, verificou-se que o cristal pertencia ao sistema cristalino hexagonal. Através do programa *Pointless* do CCP4 determinou-se como o grupo espacial mais provável o $P6_122$ (Nº 178 da Tabela Internacional de Cristalografia [88]).

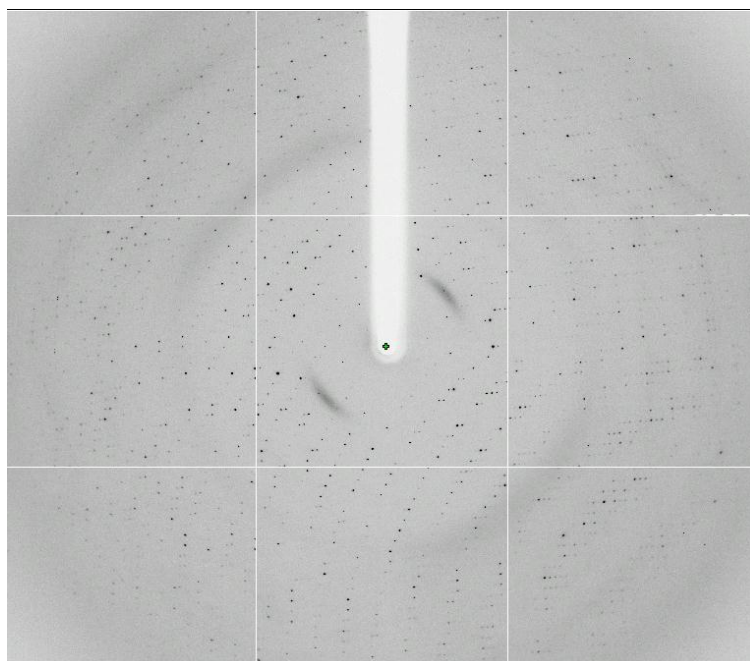


Figura 4.14. Padrão de difracção do cristal de PaoD previamente incubada com 0,4 M $[C_4mim]Cl$. A experiência de difracção foi efectuada na linha de radiação de sincrotrão ID23-1 (ESRF - Grenoble, França), e o conjunto de dados recolhido tem uma resolução máxima de 3,39 Å.

De seguida, recorreu-se ao programa *Scala* (do CCP4), de forma a escalar os dados recolhidos e a avaliar a sua qualidade a partir de uma série de parâmetros estatísticos (Tabela 4.5). Pela análise dos parâmetros presentes na Tabela 4.5, comprovou-se a qualidade dos dados seguindo os critérios definidos anteriormente para os dados da PaoABC (ver secção 4.1.2.1.). É de notar que a presença de 4 moléculas na unidade assimétrica pode indicar que existem dois dímeros de PaoD na célula unitária. Este resultado está de acordo com os dados obtidos por cromatografia de exclusão molecular e *thermofluor*, descritos nas secções 4.2.3, onde se propõe que esta proteína seja um dímero em solução.

Tabela 4.5. Estatísticas de qualidade dos dados de difracção e coeficiente de Matthews para os cristais de PaoD. Os valores entre parênteses correspondem à camada externa de resolução.

$$R_{pim} = \frac{\sum_h (\frac{1}{N-1})^{1/2} \sum_{i=1}^N |I_{(h)i} - \bar{I}_{(h)}|}{\sum_h \sum_{i=1}^N I_{(h)i}} \quad V_M = \frac{\text{Volume da célula unitária}}{\text{Massa da célula unitária}}$$

$$\text{Multiplicidade} = \frac{\text{Número total de reflexões}}{\text{Número total de reflexões únicas}} \quad \text{Conteúdo de solvente} = 1 - \frac{1.23}{V_M}$$

Agente precipitante	2,2 M Sulfato amónia	12% PEG 4K
Líquido iónico (0,4 M)	[C ₄ mim]Cl	[C ₂ OHmim]PF ₆
Resolução (Å)	86,59 – 3,39 (5,57 – 3,39)	79,34 – 2,63 (2,77 – 2,63)
<I/σI>	14,5 (5,6)	12,4 (4,5)
R _{pim} (%)	4,0 (15,7)	3,9 (15,2)
Multiplicidade	13,5 (12,4)	6,1 (5,8)
Número total de reflexões	285511 (36291)	275420 (37536)
Número total de reflexões únicas	21154 (2917)	45242 (6467)
<i>Completeness</i>	99,0 (96,8)	95,4 (94,8)
Mosaicidade média	0,77	1,12
Número de moléculas na unidade assimétrica	4	4
Coeficiente de Matthews (Å ³ /Dalton)	2,59	2,79
Conteúdo de solvente (%)	52,51	55,92
Grupo espacial	P6 ₁ 22	P3 ₁ 21
Constantes da célula (Å)	a=b=144,44, c=240,48	a=b=106,55, c=238,03

Não foi possível prosseguir para a resolução da estrutura, uma vez que não existem estruturas de proteínas homólogas, tornando impossível a resolução do Problema da Fase por Substituição Molecular (MR). Uma possibilidade é a sobre-expressão da PaoD marcada com seleno-L-metioninas, de forma a resolver o Problema da Fase por Dispersão Anómala Simples ou Múltipla (SAD ou MAD).

O efeito anômalo induz uma variação na intensidade de difracção de alguns átomos que possibilita a determinação das fases.

Numa tentativa de otimizar algumas condições promissoras obtidas com outros agentes precipitantes testaram-se 48 aditivos (*Additive Screen 1-2* da Hampton Research). Para isso, realizaram-se novos ensaios de cristalização em gotas de 2 μL (1 μL de proteína, 0,8 μL de solução precipitante e 0,2 μL de aditivo), pelo método de difusão de vapor - gota suspensa e a 20 °C.

Registou-se, após um mês, o aparecimento de um cristal para a condição de cristalização contendo: 12% de PEG 4K, 0,1M de Tris-HCl (pH 8,5) e 10 mM de L-cisteína (do *screen JBScreen Classic2*) - Figura 4.15. A proteína utilizada encontrava-se em tampão Tris (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl e 1 mM EDTA) e tinha sido previamente incubada com 0,4 M $[\text{C}_2\text{OHmim}]\text{PF}_6$. A utilização do agente redutor L-cisteína revelou-se uma escolha acertada, uma vez que na gota controlo (sem aditivo) não foram obtidos cristais.



Figura 4.15. Cristal de PaoD previamente incubada com 0,4 M $[\text{C}_2\text{OHmim}]\text{PF}_6$. O cristal obtido a 20 °C pelo método de gota suspensa. A solução precipitante contém 12% de PEG 4K, 0,1M de Tris-HCl (pH 8,5) e 10 mM de cisteína. A imagem foi captada momentos antes do cristal ser medido na linha de radiação de sincrotrão ID23-1 (ESRF – Grenoble, França).

Depois de estabilizado com *harvesting buffer* (14% de PEG 4K e 0,1M de Tris-HCl a pH 8,5), o cristal foi congelado em azoto líquido na presença de uma solução crio-protectora (adição de 30% de glicerol ao *harvesting buffer*). Foi posteriormente analisado por radiação de sincrotrão a um comprimento de onda de 0,977 Å na linha ID23-1 (ESRF, Grenoble, França), difractando a uma resolução máxima de 2,63 Å (Figura 4.16).

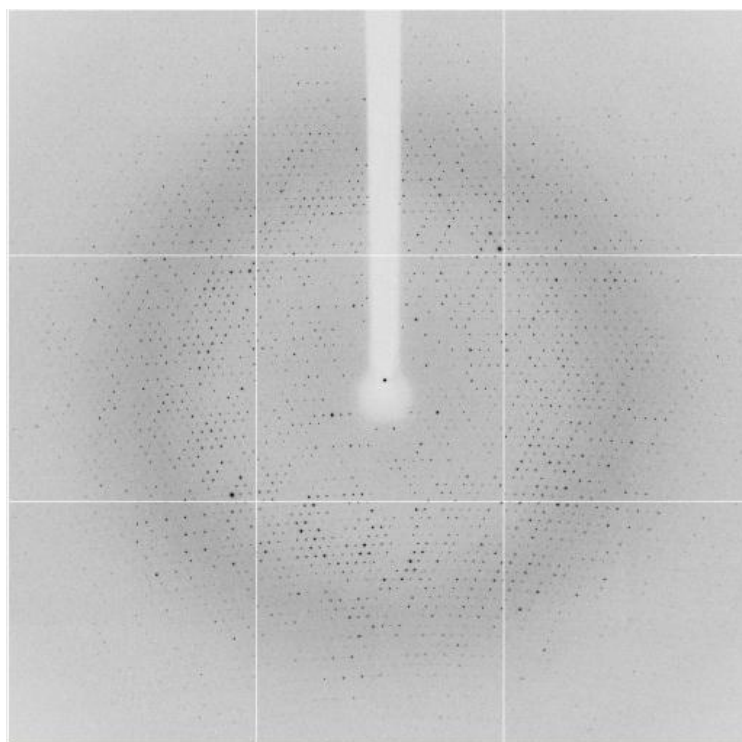


Figura 4.16. Padrão de difracção do cristal de PaoD previamente incubada com 0,4 M $[C_2OHmim]PF_6$. A experiência de difracção foi efectuada na linha de radiação de sincrotrão ID23-1 (ESRF - Grenoble, França), e o conjunto de dados recolhido tem uma resolução máxima de 2,63 Å

Recorrendo, mais uma vez, ao programa *Mosflm* procedeu-se à indexação das imagens recolhidas. Este cristal é diferente do anterior, pertencendo ao sistema cristalino trigonal e ao grupo espacial $P3_121$ (Nº 152 [88]), com os parâmetros da célula unitária: $a=b=106,55$ Å, $c=238,03$ Å e $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$.

Com recurso ao programa *Scala* escalaram-se os dados obtidos, resultando uma série de parâmetros estatísticos úteis para a avaliação da qualidade dos dados (ver Tabela 4.5). Os parâmetros obtidos revelaram bons indicadores para a continuação da resolução da estrutura. Contudo, e como explicado anteriormente, devido à ausência de estratégia para a resolução do Problema da Fase, não foi possível prosseguir para a determinação da estrutura.

Numa tentativa de obter mais cristais de PaoD as condições anteriores foram repetidas e diferentes parâmetros como proporção da gota, temperatura e concentração do agente precipitante foram alterados. No entanto não foi possível reproduzir os cristais obtidos. A baixa reprodutibilidade dos ensaios realizados pode dever-se à existência da cauda-His₆ no N-terminal da PaoD, uma vez que a presença de zonas muito móveis na proteína pode destabilizá-la e impedir a sua cristalização. Um dos trabalhos a realizar será a remoção da cauda e posterior cristalização da PaoD.

Após as experiências de *thermofluor*, a serem apresentadas na secção seguinte, foram realizados novos ensaios de cristalização com PaoD em tampão 100 mM Bis-Tris (pH 5,5), 150 mM NaCl e 1 mM EDTA. As condições anteriormente descritas foram repetidas, em gotas de 2 µL, registando-se o aparecimento de cristais para a condição 12% de PEG 4K, 0,1M de Tris-HCl (pH 8,5) e 10 mM de L-cisteína, após seis dias (Figura 4.17). Conseguiu-se então a reprodutibilidade da

condição de cristalização onde os cristais obtidos se apresentam muito semelhantes aos anteriores (ver Figuras 4.13 e 4.15). Uma vez encontrada uma condição de cristalização reproduzível, poder-se-á produzir um elevado número de cristais, testar diversos átomos pesados e resolver o Problema de Fase por Substituição Isomórfica Múltipla. Desta forma a sobre-expressão de proteína marcada com selénio poderá ser obviada, já que se trata de um método dispendioso e de baixo rendimento.

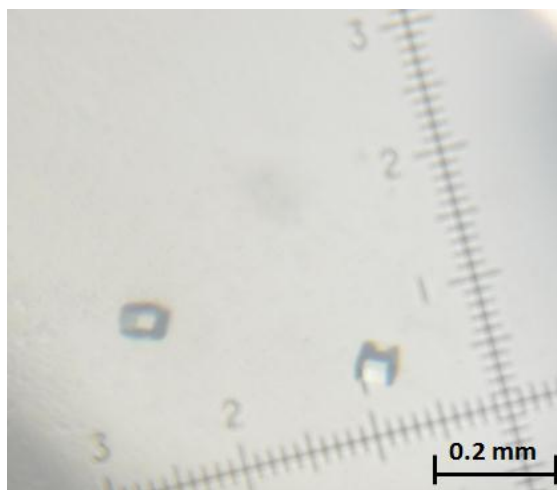


Figura 4.17. Cristal de PaoD obtido a 20 °C. O cristal foi obtido pelo método da gota suspensa, utilizando como solução precipitante 12% de PEG 4K, 0,1M de Tris-HCl (pH 8,5) e 10 mM de cisteína.

Seguido o procedimento descrito anteriormente, os cristais foram analisados por radiação de sincrotrão na linha X06DA – PXIII (SLS – Villigen, Suíça), obtendo-se o padrão de difracção representado na Figura 4.18. A qualidade deste padrão de difracção é muito inferior à dos obtidos anteriormente (Figura 4.16, por exemplo). Tal facto pode dever-se à degradação da amostra antes ou durante o processo de cristalização, a uma desordem muito acentuada das células unitárias ou até à proteólise da amostra após o passo de purificação. Para averiguar esta última hipótese deve-se efectuar um gel de SDS de vários cristais, equivalentes aos utilizados para a experiência de difracção. Este gel também nos dirá se, ao contrário do que se espera, estamos na presença de cristais de sal. A existência de uma rede cristalina desordenada parece a hipótese mais plausível, uma vez que está de acordo com a redução significativa do tempo de cristalização, de 1 mês para 6 dias.

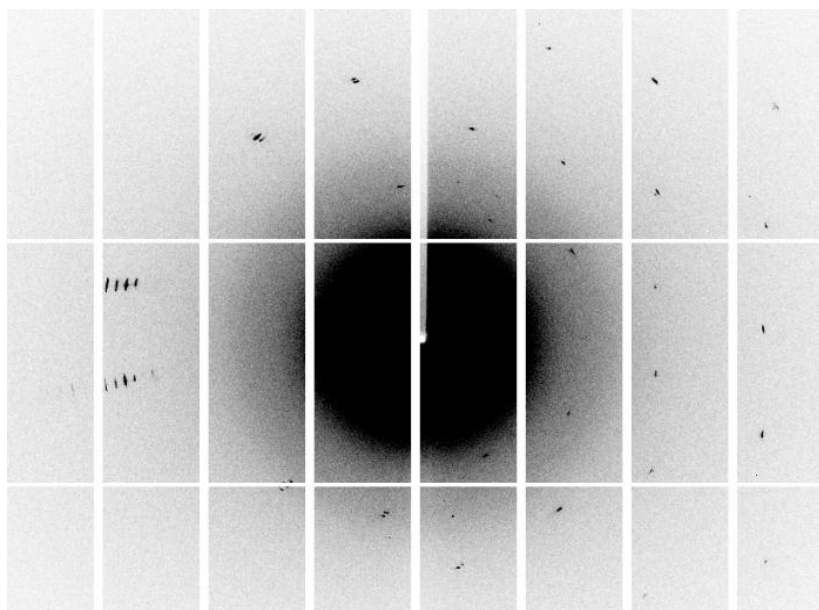


Figura 4.18. Padrão de difracção do cristal de PaoD. A experiência de difracção foi efectuada na linha de radiação de sincrotrão X06DA – PXIII (SLS – Villigen, Suíça), e o conjunto de dados recolhido tem uma resolução máxima de 1,34 Å.

Se, no entanto, a hipótese de degradação de amostra sugerida estiver correcta, são necessários novos estudos de forma a evitar que tal aconteça. A utilização de agentes estabilizadores como o glicerol aquando da purificação/concentração da amostra é uma possibilidade a não descartar.

Em suma, foram recolhidos dois conjuntos de dados promissores para a resolução da estrutura de PaoD. Contudo, devido à ausência de um modelo homólogo ou à presença de átomos pesados não foi possível resolver o Problema da Fase.

4.2.3. Ensaio de *Thermofluor*

A estabilidade é um requisito essencial em qualquer estudo estrutural com proteínas. A PaoD apresenta uma forte tendência para agregar, especialmente depois de um ciclo de congelamento/descongelamento.

Baixos níveis de expressão, aliados à dificuldade em concentrar a proteína têm comprometido os ensaios de cristalização. Com o objectivo de determinar se a instabilidade era devida ao tampão em que se encontrava inicialmente a proteína (Tris – pH 8,0) recorreu-se à técnica de *thermofluor*.

Este método foi desenvolvido por Pantoliano *et al.* (US patent 6,020,141), e consiste na utilização de um fluoróforo que exhibe um elevado sinal de fluorescência quando se encontra num meio apolar. Esta característica revelou-se útil para determinação da temperatura de desnaturação de proteínas, uma vez que quando tal ocorre o corante tem acesso aos domínios hidrofóbicos, resultando num pico no espectro de emissão. A temperatura de desnaturação da proteína (T_m), corresponde ao ponto médio ao qual 50 % da população de proteína em solução se encontra no estado desnaturado [112], [113]. As aplicações deste método são extensas, desde a identificação de

interacção entre uma proteína e um ligando, até à determinação de condições base de estabilidade que levem à cristalização de uma proteína.

Neste sentido, foram realizados ensaios com a proteína PaoD, de forma a definir um tampão onde esta seria mais estável. Testaram-se seis tampões, variando o pH (8,5 a 5,5) e a concentração de sal (0 a 500 mM) – ver *screen* complexo na Tabela 7.3 em Anexos. O tampão ideal seria aquele em que só se regista um pico emissão, relativo à transição da proteína do estado nativo para o desnaturado, acompanhado de um aumento do T_m face ao tampão referência. O facto de o T_m aumentar significa que a proteína se encontra mais estável, sendo necessário fornecer uma maior quantidade de energia para ocorrer desnaturação [114].

Na Figura 4.19 encontram-se os resultados obtidos para duas soluções distintas. A referência (linha a ponteados na referida figura) corresponde ao tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), 300 mM NaCl e 1 mM EDTA, no qual se encontrava a proteína nos primeiros ensaios de cristalização (ver secção 4.2.2). Para esta solução destacam-se dois picos de fluorescência do fluoróforo *Sypro Orange*, correspondentes a um T_m de 44,3 °C e 53,3 °C, para um comprimento de onda de emissão de 575 nm.

O tipo de perfil registado dois ou mais picos é comumente observado em proteínas oligoméricas. Tratando-se a desnaturação de um processo cooperativo, quando esta ocorre numa pequena proporção da proteína, induz a desnaturação total da proteína. Este resultado está de acordo com estudos preliminares, onde se suspeitava que a PaoD era uma proteína dimérica. Assim, pensa-se que os dois picos provêm da desnaturação diferencial de cada uma das duas cadeias polipeptídicas que compõe o dímero. Geralmente, este tipo de perfil em ensaios de *thermofluor* corresponde a uma baixa homogeneidade da solução de proteína, podendo dificultar o processo de cristalização [114].

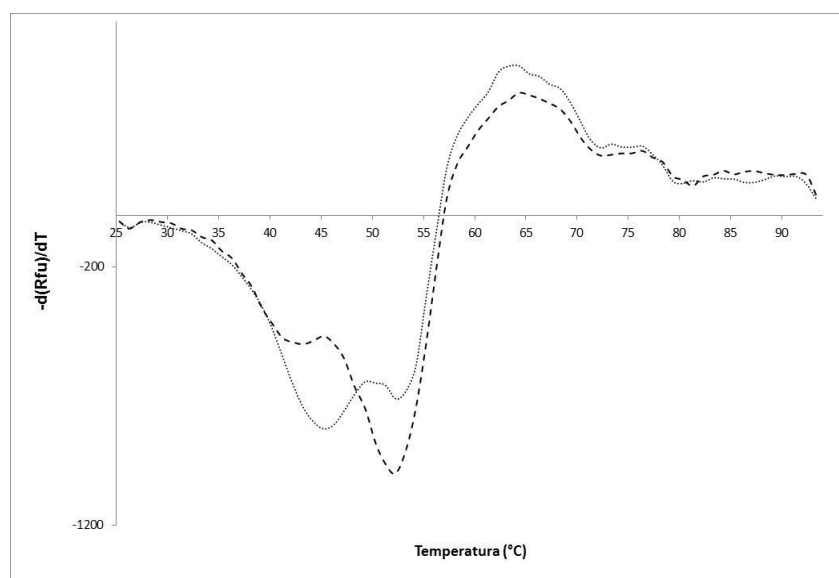


Figura 4.19. Curvas de fluorescência resultantes da experiência de *thermofluor* para a PaoD em duas soluções tampão. O gráfico foi obtido através da aplicação da primeira derivada ($d(Rfu)/dT$) aos dados correspondentes à variação da fluorescência do fluoróforo *Sypro Orange* com a temperatura. A linha a ponteados corresponde ao perfil obtido para a PaoD em tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl e 1mM EDTA, com T_m de 44,3 e 53,3 °C; A linha a tracejado corresponde ao tampão 100 mM Bis-Tris (pH 5,5) e 150 mM NaCl, com T_m de 43,2 e 52,3 °C. O comprimento de onda de emissão utilizado foi de 575 nm.

De forma a averiguar o estado oligomérico da proteína em solução, recorreu-se à cromatografia de exclusão molecular. Segundo os resultados obtidos, a proteína possui uma massa molecular de, aproximadamente, 73 kDa, correspondendo ao dobro do peso da proteína nativa (35 kDa) – ver Figura 7.2 em Anexos.

Para a solução 100 mM Bis-Tris (pH 5,5) e 150 mM NaCl observa-se o mesmo perfil que para as soluções anteriores. Contudo, o pico de fluorescência a 43,2 °C é negligenciável quando comparado com o pico de maior intensidade a 52,3 °C. Este facto pode indicar que as interacções proteína-proteína são mais fortes quando o composto Bis-Tris a pH 5,5 está presente na solução, ocorrendo uma estabilização da estrutura quaternária.

Depois destes ensaios, o tampão da proteína foi alterado para 100 mM Bis-Tris (pH 5,5), 150 mM de NaCl e 1 mM de EDTA, para a realização de ensaios de cristalização.

4.2.4. Ensaios de Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de transferência de saturação

Os ensaios anteriores realizados com os IL revelaram um decréscimo da precipitação da PaoD durante o processo de descongelamento (ver secção 4.2.2). Com o intuito de avaliar a existência de uma possível interacção entre o IL e a proteína, recorreu-se à técnica de RMN-STD.

A técnica de RMN-STD resulta da diferença entre o espectro de transferência de saturação e o espectro de RMN usual. Pode ser aplicada à análise de interacções entre proteínas e ligandos, permitindo identificar quais os compostos que se ligam a uma dada proteína [115]. A uma solução de proteína são adicionados os potenciais ligados e recolhe-se um espectro de protão (¹H RMN), onde a proteína é selectivamente irradiada a uma frequência afastada do sinal mais próximo do ligando (pelo menos 700 Hz) – espectro *on-resonance* [78].

Caso exista algum composto ligado à proteína, ocorre transferência de saturação, dependente do tempo de contacto entre a proteína e o ligando. Este último, quando dissociado, transfere a saturação 'adquirida' para a solução e possibilita a ligação de outras moléculas de ligando, levando à ampliação do sinal.

De seguida, realiza-se uma nova irradiação, para valores de frequência afastados de qualquer sinal (proteína ou ligando) – espectro *off-resonance*. Através da subtracção do espectro *on-resonance* e o espectro *off-resonance* resulta um espectro contendo unicamente os sinais dos protões do composto que efectivamente se ligou à proteína [78], [79]. Este método não pode ser aplicado a interacções muito fortes entre proteína e ligando, pois estas não permitem a dissociação do ligando e a transferência de saturação.

Uma experiência semelhante à descrita foi realizada em colaboração com o Professor Eurico Cabrita e o Doutor Aldino Viegas. Assim, a uma solução de PaoD adicionou-se um dos IL de interesse ([C₂OHmim]PF₆ ou [C₄mim]Cl), irradiando-se de seguida a proteína a -300 Hz, durante 2,0 s – espectro *on-resonance*. O espectro de referência (*off-resonance*) foi obtido irradiando a mesma solução a 20000 Hz.

Através da análise da Figura 4.20 verifica-se a existência de picos no espectro STD na região dos grupos aromáticos do ligando. Quando comparado com o espectro referência para o IL [C₂OHmim]PF₆ confirma-se que os picos observados correspondem aos prótons do anel imidazol deste composto. Devido à ausência de sinais para os restantes prótons da molécula demonstrou-se que existe uma interacção entre a proteína e o IL, mas também que se trata de uma interacção específica com o anel de imidazol. Este facto reforça a hipótese de que o IL estabiliza a proteína durante o seu congelamento/descongelamento.

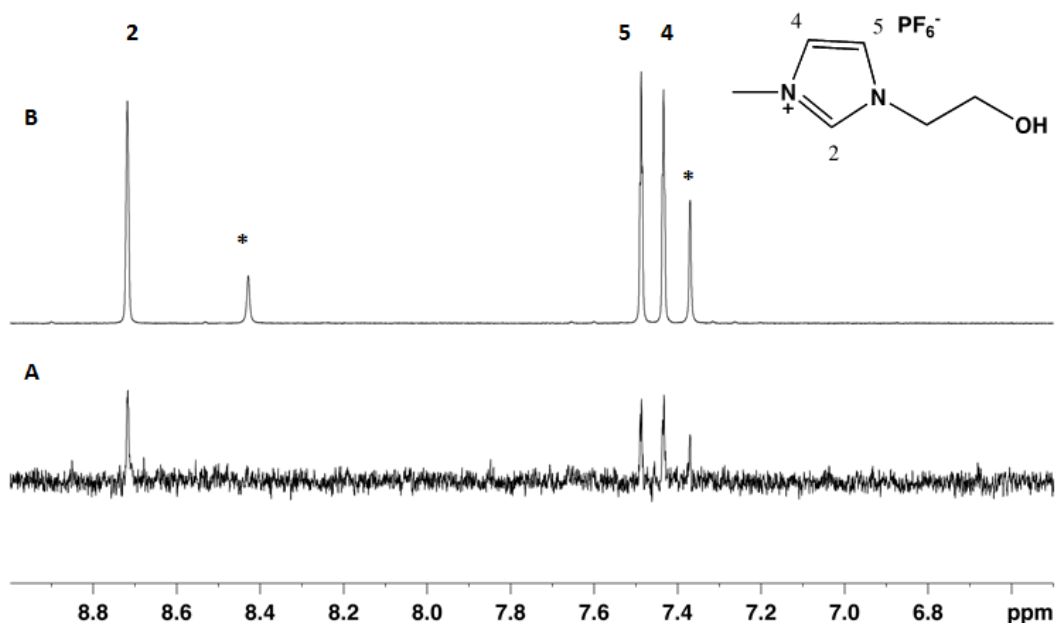


Figura 4.20. Detalhe da região aromática do espectro de RMN-STD da PaoD na presença do líquido iónico [C₂OHmim]PF₆ (A). (B) Espectro de referência ¹H RMN para o líquido iónico, cujo catião se encontra representado no canto superior direito. *Picos relativos ao imidazol presente na amostra de proteína e resultante do passo de purificação.

Os resultados obtidos para o IL [C₄mim]Cl não foram alvo de interpretação, uma vez que a contaminação da amostra com imidazol (proveniente do passo de purificação) impediu a identificação dos sinais característicos deste composto.

4.2.5. Ensaios de Ressonância Plasmónica de Superfície

Como referido anteriormente, a PaoD é essencial para a função da PaoABC, uma vez que é responsável pela inserção do cofactor MCD na subunidade C. A proteína responsável pela formação deste mesmo cofactor é a MocA, igualmente essencial à função do complexo [22]. De forma a caracterizar a interacção entre estas proteínas recorreu-se à técnica de SPR (*Biacore*).

Uma das principais vantagens da utilização de biossensores ópticos é a possibilidade de monitorizar a ligação e dissociação de ligando-analito em tempo real, sem a necessidade de utilizar moléculas marcadas [116]. Estes sensores transduzem a acumulação de massa numa determinada

superfície num sinal óptico. A ligação e dissociação levam a um aumento ou diminuição, respectivamente, da massa molecular na superfície do biossensor, tendo como consequência directa a alteração do índice de refração da interface sensor/solução. O aumento deste índice de refração faz com que o ângulo ao qual ocorre SPR também aumente. Desta forma, a variação do ângulo de SPR pode ser directamente correlacionado com a concentração do analito na superfície do biossensor [117].

Os ligandos, neste caso, foram imobilizados numa matriz de dextrano carboximetilado covalentemente ligada à superfície de ouro, através da interacção dos grupos amina. Os dados obtidos, presentes na Tabela 4.6, mostram uma forte interacção entre PaoD-MocA, como um K_D de 0,608 μM e PaoD-PaoABC, com um K_D 0,336 μM . Este resultado encontra-se dentro do esperado uma vez que a MocA catalisa a formação do MCD e a PaoD é responsável pela sua inserção na subunidade C da PaoABC.

Tabela 4.6. Medições de SPR para a análise de interacções específicas proteína-proteína. Os valores de K_D foram obtidos através do ajuste global para uma ligação com estequiometria de 1:1. O valor de χ^2 permite avaliar o grau de ajuste dos dados ao modelo previsto. [§]Os analitos foram injectados numa gama de concentrações 0,05-20 μM . *Proteínas PaoD, PaoABC e MocA foram imobilizadas por interacções dos grupos amina até 600, 1500 e 600 RU, respectivamente. ND significa nada detectado.

Ligandos Analitos [§]	PaoABC*		PaoD*		MocA*	
	K_D (μM)	χ^2	K_D (μM)	χ^2	K_D (μM)	χ^2
PaoABC	0,320	3,41	0,336	13,7	0,189	15,3
PaoD	0,397	2,66	0,453	0,867	0,329	4,7
MocA	0,216	1,15	0,608	0,079	0,392	0,15
BSA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MoaD	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MobA	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Surpreendentemente, os resultados evidenciam também a interacção entre a PaoABC e a MocA. O valor de K_D obtido foi de 0,216 μM , sugerindo que estas três proteínas formam um grande complexo de, aproximadamente, 192 kDa. Os valores de K_D obtidos para as três proteínas encontram-se dentro da mesma ordem de grandeza indicando que as interacções estabelecidas entre PaoABC, PaoD e MocA são muito semelhantes. A provar-se a existência deste complexo *in vivo*, a sua formação pode estar relacionada com o aumento da eficácia do mecanismo de produção da enzima de molibdénio.

Para os ensaios controlo onde se usaram as proteínas BSA, MobA e MoaD não foram detectados sinais positivos para ligação a PaoD, PaoABC ou MocA. Tal era esperado, uma vez que não se encontram descritas quaisquer interacções entre estas proteínas e as proteínas alvo deste estudo. A proteína MobA está envolvida na formação MGD e a proteína MoaD está envolvida na conversão do precursor Z em MPT durante a biossíntese do Moco [24], [118].

Os resultados apresentados indicam a formação de um novo complexo PaoABC, PaoD e MocA nunca descrito anteriormente, que será futuramente alvo de um estudo mais aprofundado, nomeadamente do ponto de vista estrutural.

4.3. Estudos com a XdhC

A XdhC é uma proteína de *R. capsulatus* envolvida na inserção do Moco na subunidade B da proteína XDH [52]. Dá nome a uma família de chaperonas, onde se incluem a PaoD e YqeB, sendo essencial à actividade do complexo XDH [51]. A resolução da sua estrutura tridimensional por cristalografia de raios X é essencial para a compreensão do seu mecanismo de acção e, tal como para a PaoD, será um marco muito importante.

4.3.1. Sobre-expressão heteróloga em *Escherichia coli* e purificação

O presente estudo, teve como principal objectivo a obtenção de cristais de XdhC. Esta trata-se de uma proteína de *R. capsulatus* tornando-se, por isso, necessário recorrer à sobre-expressão heteróloga em células de *E. coli* da estirpe ER2566(DE3) de forma a obter proteína facilmente e em quantidades razoáveis.

Os procedimentos de biologia molecular, para a obtenção dos clones com o gene *xdhC*, foram realizados pela Doutora Meina Neumann [55].

As células foram transformadas com o plasmídeo pAK20, resultante da inserção do fragmento codificante *xdhC* no MCS do plasmídeo comercial pTYB2 (utilizando as enzimas de restrição NdeI e KpnI). Daqui resultou a proteína XdhC fundida pelo C-terminal com a proteína inteína (55 kDa) que contém o domínio de ligação à quitina (CBD) [119], [120]. Assim, o passo de purificação consistiu na aplicação do sobrenadante (após lise e centrifugação) numa matriz de *Chitin Beads*. Por afinidade, a proteína fundida com a cauda inteína-CBD ficou retida na matriz possibilitando a realização de vários passos de lavagem para a eliminação de contaminantes.

A eluição da proteína foi realizada com tampão 250 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100 e 50 mM de DTT, após 16 horas de incubação com a matriz. A adição do agente redutor DTT induz a clivagem da ligação tioéster entre a proteína alvo e a inteína-CBD, libertando-a para a solução, sem necessidade de utilizar proteases [121].

Para confirmar o sucesso da purificação, recorreu-se a uma SDS-PAGE das 8 fracções (de 2 mL) recolhidas (Figura 4.21). Pela análise do SDS-PAGE não se verifica a presença de qualquer banda nos poços relativos às fracções recolhidas, indicando que o processo de purificação não foi bem-sucedido. Nos poços 10 e 11 relativos ao *flow through* e lisado após centrifugação, respectivamente, observa-se a presença de algumas bandas pouco intensas entre os 40 e os 135 kDa. Contudo, nenhuma das bandas corresponde ao peso molecular da proteína XdhC (33,4 kDa) ou à proteína de fusão (88,4 kDa).

O crescimento e purificação foram repetidos de forma a descartar possíveis erros durante estes processos, contudo o problema persistiu. A não produção de proteína pode estar relacionada com a ausência de integridade do gene alvo no plasmídeo e a sequenciação desta região poderá esclarecer esta questão. No entanto, a fraca indução da produção de proteína também não pode ser excluída e testes de expressão deverão ser efectuados. Caso nenhuma destas abordagens se revele eficaz pode-se ainda fazer nova clonagem seleccionando outros plasmídeos e outras estirpes de células de expressão onde a síntese da chaperona seja mais bem-sucedida.

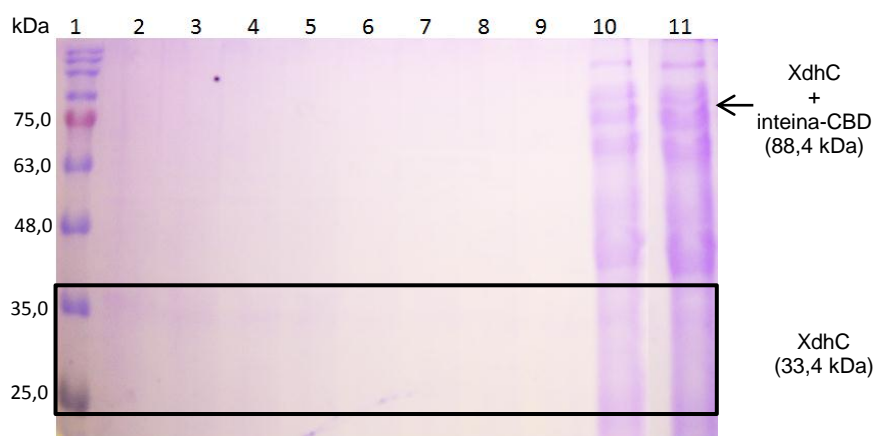


Figura 4.21. SDS-PAGE a 12,5% com as fracções resultantes da purificação com a coluna de *Chitin Beads* da XdhC. 1 - Marcador de pesos moleculares *NZYColour Protein Marker II* (Nzytech); 2 a 9 - Fracções de 2 mL resultantes da clivagem com 50 mM de DTT, sendo a ordem no gel (da esquerda para a direita) a ordem de eluição das fracções; 10 - *flow through*; 11 - Lisado após centrifugação.

4.4. Estudos com a YqeB

A YqeB pertence também à família das chaperonas XdhC. Actualmente, existe muito pouco informação relativa a esta chaperona [51], sendo os estudos cristalográficos essenciais para a compreensão do seu papel biológico.

4.4.1. Sobre-expressão em *Escherichia coli* e purificação

O presente estudo, teve como principal objectivo a obtenção de cristais de YqeB. O sistema de expressão e purificação escolhido foi o mesmo que para a proteína PaoD (ver secção 4.2.1) e os procedimentos de biologia molecular, para a obtenção dos clones com o gene *yqeB*, foram também realizados pela Doutora Meina Neumann.

As células de *E. coli* da estirpe BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo pMN104, resultante da inserção do fragmento codificante *yqeB* no MCS do plasmídeo comercial pET28a (utilizando as enzimas de restrição NdeI e Sall). Esta construção permite a expressão da proteína de fusão YqeB com uma cauda-His₆ no N-terminal. Assim, o passo de purificação consistiu na aplicação do sobrenadante (após lise e centrifugação) numa matriz de Ni-TED.

Após a eluição da proteína através da adição de tampão fosfato com 250 mM, o sucesso da purificação foi avaliado por SDS-PAGE (Figura 4.22). Através da análise do gel obtido confirma-se a presença de YqeB pura devido à existência de uma banda muito pronunciada a, aproximadamente, 59 kDa. Este peso molecular corresponde à proteína de fusão, uma vez que o tipo de purificação escolhido não elimina a cauda de histidinas. Assim, ao peso molecular da YqeB, 57,6 kDa, tivemos de somar 2 kDa (aproximadamente) relativos a um pequeno péptido que contém, para além das seis histidinas, a sequência de reconhecimento para a protease trombina.

É de notar a existência de uma banda para o peso molecular da proteína de interesse no poço relativo ao *flow through* (poço 10 da Figura 4.22). Este facto resultou da saturação da matriz utilizada, devendo a sua quantidade ser otimizada em futuras purificações de forma a não se perder proteína.



Figura 4.22. SDS-PAGE a 12,5% com as fracções resultantes da purificação da YqeB com a coluna de Ni-TED. 1 - Marcador de pesos moleculares *NZYColour Protein Marker II* (Nzytech); 2 a 12 - Fracções de 2 mL resultantes da eluição competitiva com 250 mM de imidazol, sendo a ordem no gel (da esquerda para a direita) a ordem de eluição das fracções.

A proteína foi dialisada durante 16 horas contra o tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl e 1 mM EDTA, registando-se uma elevada formação de precipitado. A amostra foi quantificada através da Lei Lambert-Beer, com o valor da absorvância (A) registado a 280 nm, o coeficiente de extinção molar (ϵ_{280}) de $22460 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e percurso óptico (b) de 1 cm. O coeficiente de extinção molar, ϵ , foi determinado pela ferramenta bioinformática *ProtParam* do portal ExPASy, com base na sequência de aminoácidos da proteína.

Dada a capacidade da resina (5 mg de proteína/mL de matriz), a concentração obtida encontrava-se muito aquém do esperado, 2 mg/mL, dado que a coluna saturou. Esta diminuição deveu-se à precipitação durante a diálise. De forma a contornar este problema serão realizados ensaios de *thermoFluor* para verificar se a instabilidade registada se deve à composição da solução em que a proteína se encontra e se é possível estabilizá-la recorrendo a outros tampões ou aditivos.

Em suma, foi possível obter a proteína YqeB com um grau de pureza e concentração que permitiram a evolução do trabalho para uma nova fase: os ensaios de cristalização.

4.4.2. Ensaios de cristalização e experiência de difracção

A estrutura tridimensional da YqeB, tal como a estrutura das proteínas abordadas anteriormente, é desconhecida. A primeira abordagem para a sua cristalização consistiu no teste de inúmeras soluções precipitantes pelo método de difusão de vapor em gota assente, para uma temperatura de 20 °C e gotas de 2 µL (1 µL proteína e 1 µL de solução precipitante).

Uma vez que se trata de uma proteína incolor e a morfologia dos seus cristais ainda se encontra desconhecida, realizou-se uma gota controlo para cada solução precipitante, substituindo o volume de proteína por água bidestilada.

Após três semanas registou-se o aparecimento de cristais para duas soluções de cristalização distintas: 1 - 0,2 cloreto de magnésio, 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5) e 30% PEG 4K (Figura 4.23 – A); 2 – 0,2 M cloreto de cálcio, 0,1 M acetato de sódio (pH 4,5) e 20 % isopropanol (Figura 4.23 – B), ambas pertencentes a um *screen* de 80 soluções baseado no *screen* de Jancarik *et al.* [77]. Note-se que para as gotas controlo não se detectou crescimento cristalino, podendo indicar que não estaríamos na presença de cristais de sal (CaCl₂ ou MgCl₂), mas sim de proteína.

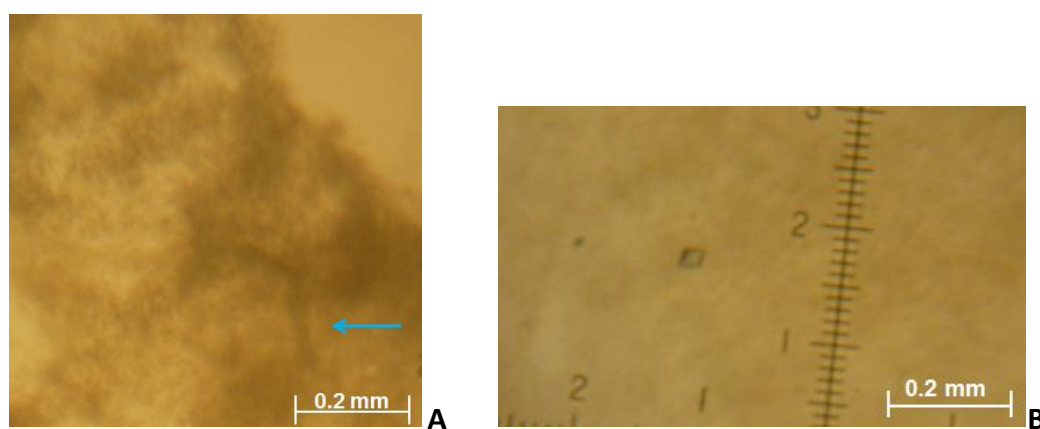


Figura 4.23. Cristais de YqeB obtidos a 20 °C. Cristais obtidos para ensaios de gota assente e diferentes soluções precipitantes: A – 0,2 MgCl₂, 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5) e 30% PEG 4K. A seta azul indica a posição do cristal que, devido à existência de precipitado, é difícil de detectar; B – 0,2 M CaCl₂, 0,1 M Acetato de sódio (pH 4,5) e 20 % isopropanol.

Os cristais obtidos foram congelados em azoto líquido na presença da respectiva solução crioprotectora, contendo 30 % (no caso da condição 1) ou 10% de glicerol (no caso da condição 2), e analisados por radiação de sincrotrão na linha PX III (SLS – Villigen, Suíça).

Durante a experiência de difracção detectou-se a existência gelo nos *loops* onde se encontravam os cristais, realizando-se o *annealing* durante 5 segundos. Este procedimento consiste na remoção do fluxo de azoto líquido do cristal durante algum tempo de forma a derreter o gelo, possibilitando a recolha de dados. Apesar deste procedimento, conhecido também por poder

melhorar a qualidade dos padrões de difracção [122], os cristais não difractaram. A ausência de quaisquer reflexões no padrão de difracção também contribuem para a hipótese de estarmos na presença de cristais de proteína.

Neste sentido, é necessário retomar os ensaios de cristalização de forma a obter novos cristais que possibilitem a resolução da estrutura tridimensional da YqeB. Além de procurar novas condições de cristalização, a optimização das condições já encontradas também deve ser considerada, fazendo variações na concentração de agente precipitante, pH da solução, testar aditivos ou variar a temperatura de crescimento dos cristais.

5. Conclusões e perspectivas futuras

5.1. Conclusões

A família XO engloba um variadíssimo número de enzimas com diferentes características estruturais e funcionais. A molibdoenzima PaoABC de *E. coli* destaca-se dos restantes membros, uma vez que é o único heterotrímico conhecido desta família e foi a primeira enzima de *E. coli* a ser identificada com a forma MCD no seu centro activo. Algumas enzimas da família XO revelaram a dependência de outras proteínas, designadas por chaperonas, para poderem desempenhar a sua função. Assim, pretendeu-se estudar a PaoABC e outras três proteínas: a PaoD, a XdhC e a YqeB, chaperonas das enzimas PaoABC, XDH de *R. capsulatus* e XdhABC/XdhD de *E. coli*, respectivamente. Desta forma, o principal objectivo desta dissertação era resolver as estruturas tridimensionais de cada uma destas proteínas por cristalografia de raios X.

O primeiro passo consistiu na expressão e purificação das quatro proteínas, utilizando os sistemas aconselhados pelos colaboradores responsáveis pela componente de biologia molecular deste trabalho, do laboratório da Prof. Silke Leimkühler (Potsdam, Alemanha). A expressão das proteínas utilizadas neste trabalho foi realizada em duas visitas ao *Institute of Biochemistry and Biology, University of Potsdam (Germany)*, sob a orientação da Professora Silke Leimkühler e com o auxílio da técnica do laboratório Viola Schwuchow.

Após a expressão e purificação da PaoABC, foi possível prosseguir-se para os primeiros ensaios de cristalização. Uma vez que nos proponhamos a resolver a primeira estrutura desta aldeído oxidoreductase, foi necessário determinar as suas condições de cristalização. Entre as várias condições testadas, obtiveram-se cristais de proteína para a solução precipitante com 0,2 M de iodeto de amónio e 20% PEG 4K. Estas condições foram optimizadas e os cristais obtidos foram analisados por radiação de sincrotrão, tendo-se recolhido um conjunto de dados a 1,67 Å. Estes dados, no entanto, revelaram-se *twinned* tendo-se tentado obter mais cristais onde uma única rede cristalina estivesse presente. Entre várias estratégias adoptadas, a diminuição da temperatura de cristalização de 20 °C para 4 °C revelou-se bastante eficaz para contornar este problema, uma vez que possibilitou a recolha de um novo conjunto de dados *untwinned* a 1,87 Å. Estes dados permitiram a resolução da primeira estrutura heterotrimérica da família XO, tendo-se atingido assim um dos objectivos a que nos proponhamos. A determinação das fases de cada reflexão foi efectuada recorrendo à técnica de substituição molecular, tendo sido possível localizar a posição das três subunidades ABC usando proteínas homólogas como modelos. O modelo actual da PaoABC apresenta os valores de R e R_{free} de 0,4573 e 0,4787, respectivamente. A estrutura encontra-se na fase de refinamento sendo necessária a inspecção visual e o ajuste manual de todos os aminoácidos à densidade electrónica.

A técnica de SAXS também foi aplicada a esta proteína e os dados obtidos visam complementar os dados cristalográficos obtidos, principalmente, para as zonas mais flexíveis da proteína. Os dados foram recolhidos presencialmente no DESY (Hamburgo, Alemanha) sob a orientação e colaboração do Doutor Dmitri Svergun (EMBL, Hamburgo). Pelo ajuste do modelo de SAXS da PaoABC com os dados cristalográficos da proteína homóloga, 4-hidroxibenzoil-CoA

Redutase, conclui-se que o modelo obtido é bastante razoável. Contudo, a avaliação final será realizada com a estrutura refinada da PaoABC.

A PaoD constituiu um enorme desafio ao longo desta dissertação, principalmente devido à sua instabilidade. Como tal, optou-se por descongelar a proteína na presença do IL [C₄mim]Cl ou [C₂OHmim]PF₆ antes da realização dos ensaios de cristalização. Este procedimento demonstrou estabilizar a proteína, permitindo a sua concentração até 5 mg/mL. Nestas condições foram obtidos cristais para duas condições de cristalização (1- 2,2 M de sulfato de amónia; 2- 12% de PEG 4K, 0,1M de Tris-HCl (pH 8,5) e 10 mM de L-cisteína), que permitiram a recolha de dois conjuntos de dados a 3,4 e 2,6 Å. Contudo, devido à ausência de estratégia para a resolução do Problema da Fase, não foi possível prosseguir para a resolução da estrutura.

De modo a resolver o problema da estabilidade da proteína recorreu-se à técnica de *thermofluor*. Obteve-se um resultado promissor para o tampão 100 mM Bis-Tris (pH 5,5) e 150 mM NaCl onde, praticamente apenas um pico de fluorescência é observado. Tal não acontece quando a proteína se encontra em tampão Tris-HCl, provavelmente porque o Bis-Tris estabiliza a estrutura quaternária da proteína. A mudança para este novo tampão revelou-se eficaz, uma vez que se registou um decréscimo da precipitação da PaoD aquando da sua cristalização e um aumento da reprodutibilidade de uma das condições de cristalização.

Uma vez que os dois conjuntos de dados recolhidos foram obtidos para a proteína descongelada na presença dos IL [C₄mim]Cl e [C₂OHmim]PF₆, pretendia-se identificar algum tipo de interacção entre proteína e ligando que justificasse este aumento de estabilidade. Por RMN-STD concluiu-se que ocorre, efectivamente, uma interacção específica entre o anel de imidazol do IL [C₂OHmim]PF₆ e a proteína. Este resultado realça a importância do IL durante o congelamento e descongelamento da PaoD.

Outro objectivo deste trabalho consistia em averiguar/comprovar a suposta ligação entre a molibdoenzima PaoABC, a chaperona PaoD e a proteína responsável pela maturação do Moco a MCD, a MocA. A técnica de SPR permitiu concluir que ocorre interacção entre as três proteínas, podendo indiciar a formação de um grande complexo proteico que, *in vivo*, favorece a produção e maturação da enzima.

Tal como as anteriores proteínas, foi possível expressar e purificar a proteína YqeB, de forma a prosseguir-se para os ensaios de cristalização. Foram estabelecidas duas condições de cristalização: 1- 0,2 M cloreto de magnésio, 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5) e 30% PEG 4K; 2- 0,2 M cloreto de cálcio, 0,1 M Acetato de sódio (pH 4,5) e 20 % isopropanol. Contudo a ausência de reflexões nos padrões de difracção obtidos, não permitiram a resolução da estrutura.

Relativamente à XdhC, devido a possíveis problemas durante a expressão e/ou purificação, nenhum dos objectivos a que nos propusemos inicialmente foi atingido.

Durante este ano de trabalho tive oportunidade de fazer duas visitas ao laboratório da Prof^a. Silke Leimkühler (Potsdam, Alemanha) onde pude executar alguns dos passos descritos nesta dissertação, mas também tomar contacto com novas técnicas como o ICP (*Inductively Coupled Plasma Analysis*), o MALDI-TOF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry*) e o Dicroísmo Circular. A somar a estas viagens estão várias idas a sincrotrões

para recolha de dados, como o ESRF (Grenoble, França), o DIAMOND (Oxfordshire, Reino Unido) e o DESY (Hamburgo, Alemanha).

Em conclusão, o trabalho apresentado nesta dissertação forneceu informações muito importantes para a futura caracterização de enzimas dependentes do cofactor molibdénio que permitirão estudar e compreender o papel biológico desempenhado pelas chaperonas nos membros da família XO.

Alguns dos resultados aqui descritos serão publicados brevemente. Em fase final de preparação encontra-se um artigo onde os dados obtidos para a PaoD, desde a cristalização, ensaios de *thermofluor*, RMN-STD e SPR são apresentados. Depois de refinadas e validadas, estruturas de alta e baixa resolução, obtidas para a PaoABC por cristalografia de raios X e SAXS, respectivamente, serão descritas em detalhe noutra publicação.

5.2. Perspectivas futuras

Como um projecto científico dificilmente se considera terminado, é importante reflectir acerca das perspectivas futuras.

Pretende-se finalizar o processo de refinamento da estrutura da PaoABC, para futuramente compará-la com as restantes enzimas da família XO. Tentaremos encontrar na estrutura uma resposta para o facto de esta enzima ser o único heterotrímico da família. Pretendemos também analisar em detalhe o centro activo da enzima, de forma a compreender como se processa o acesso do substrato e o porquê da especificidade catalítica para aldeídos aromáticos.

Tratando-se de uma enzima dependente da chaperona PaoD, é da maior importância estudar esta interacção do ponto de vista estrutural. O primeiro passo neste sentido será executado muito brevemente através da técnica de SAXS, onde se avaliará a interacção entre a PaoABC e a PaoD, em solução. Tempo de sincrotrão já está agendado para Outubro de 2012 na linha BM29 do ESRF. Experiências que incluam a proteína Moco também estão programadas. Idealmente, os resultados obtidos por SAXS para o complexo podem ser complementados com dados cristalográficos onde estruturas de mais alta resolução são alcançadas. Para isso, precisamos de resolver a estrutura cristalográfica da PaoD. Para tal, necessitamos de estabelecer uma ou várias condições de cristalização reprodutíveis para a chaperona, de forma a obter cristais derivatizados e resolver a estrutura por MIR. Devido às limitações experimentais deste método será realizada, paralelamente, e em colaboração com o laboratório da Prof^a. Silke Leimkühler, a expressão e purificação da PaoD marcada com seleno-L-metioninas, de forma a resolver a estrutura por MAD.

Após resolvida a estrutura da PaoD, serão realizados ensaios de co-cristalização da proteína na presença de Moco. Alterações conformacionais podem estar associadas à interacção entre a chaperona e o cofactor e a resolução da estrutura deste complexo fornecerá informações cruciais para a compreensão do papel desempenhado por estas proteínas. Adicionalmente, a interacção chaperona-Moco também será estudada por RMN de forma a explorar a dinâmica molecular da proteína.

Para a proteína XdhC, pretende-se resolver os problemas associados à expressão e purificação, de forma a realizar brevemente os primeiros ensaios de cristalização.

Para a YqeB, pretendemos estabelecer as condições de cristalização que levem à formação de cristais ordenados e que permitam a resolução da estrutura. Note-se que a aplicação do método de MR para a determinação da estrutura das chaperonas aqui abordadas depende da resolução da estrutura de uma delas. Assim, existe a possibilidade de aplicar o procedimento sugerido para a resolução da estrutura da PaoD, utilizando átomos pesados ou metioninas marcadas, para a chaperonas XdhC e YqeB.

A resolução da estrutura de três chaperonas homólogas e o estudo da interação com a respectiva molibdoenzima torna este projecto muito desafiante por isso, termino esta dissertação com o desejo de o poder continuar.

6. Bibliografia

- [1] H. T. Meulen, "Distribution of molybdenum", *Nature*, vol. 130, p. 966, 1932.
- [2] R. R. Mendel, F. Bittner, "Cell biology of molybdenum", *Biochim Biophys Acta*, vol. 1763, n° 7, pp. 621–635, 2006.
- [3] R. Hille, "Molybdenum and tungsten in biology", *Trends Biochem Sci*, vol. 27, n° 7, pp. 360–367, 2002.
- [4] R. Hille, "The Mononuclear Molybdenum Enzymes", *Chem Rev*, vol. 96, n° 7, pp. 2757–2816, 1996.
- [5] G. Schwarz and R. R. Mendel, "Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes", *Annu Rev Plant Biol*, vol. 57, n° 1, pp. 623–647, 2006.
- [6] M. J. Williams, B. D. Kana, V. Mizrahi, "Functional analysis of molybdopterin biosynthesis in mycobacteria identifies a fused molybdopterin synthase in *Mycobacterium tuberculosis*", *J Bacteriol*, vol. 193, n° 1, pp. 98–106, 2011.
- [7] M. J. Romão, "Molybdenum and tungsten enzymes: a crystallographic and mechanistic overview", *Dalton trans*, n° 21, pp. 4053–4068, 2009.
- [8] R. R. Mendel, "Biology of the molybdenum cofactor", *J Exp Bot*, vol. 58, n° 9, pp. 2289–2296, 2007.
- [9] K. V. Rajagopalan, J. L. Johnson, "The Pterin Molybdenum Cofactors", *J Biol Chem*, vol. 267, n° 15, pp. 10199–10202, 1992.
- [10] M. M. Wuebbens, K. V. Rajagopalan, "Structural characterization of a molybdopterin precursor", *J Biol Chem*, vol. 268, n° 18, pp. 13493–8, 1993.
- [11] R. R. Mendel, "Molybdenum : biological activity and metabolism", *Dalton trans*, pp. 3404–3409, 2005.
- [12] S. L. Rivers, E. McNairn, F. Blasco, G. Giordano, D. H. Boxer, "Molecular genetic analysis of the moa operon of *Escherichia coli* K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis", *Mol Microbiol*, vol. 8, n° 6, pp. 1071–1081, 1993.
- [13] L. A. Anderson, E. McNairn, T. Leubke, R. N. Pau, D. H. Boxer, "ModE-dependent molybdate regulation of the molybdenum cofactor operon moa in *Escherichia coli*", *J Bacteriol*, vol. 182, n° 24, pp. 7035–7043, 2000.
- [14] R. R. Mendel, G. Schwarz, "Molybdenum cofactor biosynthesis in plants and humans", *Coordination Chem Rev*, vol. 255, n° 9–10, pp. 1145–1158, 2011.
- [15] P. Hänzelmann, H. Schindelin, "Crystal structure of the S-adenosylmethionine-dependent enzyme MoaA and its implications for molybdenum cofactor deficiency in humans", *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 101, n° 35, pp. 12870–12875, 2004.
- [16] M. M. Wuebbens, M. T. Liu, K. Rajagopalan, H. Schindelin, "Insights into molybdenum cofactor deficiency provided by the crystal structure of the molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaC", *Structure*, vol. 8, pp. 709–718, 2000.
- [17] M. J. Rudolph, M. M. Wuebbens, K. V. Rajagopalan, H. Schindelin, "Crystal structure of molybdopterin synthase and its evolutionary relationship to ubiquitin activation", *Nat Struct Biol*, vol. 8, n° 1, pp. 42–46, 2001.

- [18] G. Gutzke, B. Fischer, R. R. Mendel, G. Schwarz, "Thiocarboxylation of molybdopterin synthase provides evidence for the mechanism of dithiolene formation in metal-binding pterins", *J Biol Chem*, vol. 276, n^o. 39, pp. 36268–36274, 2001.
- [19] S. Leimkühler, M. M. Wuebbens, K. V. Rajagopalan, "Characterization of Escherichia coli MoeB and its involvement in the activation of molybdopterin synthase for the biosynthesis of the molybdenum cofactor", *J Biol Chem*, vol. 276, n^o. 37, pp. 34695–34701, 2001.
- [20] A. Llamas, R. R. Mendel, G. Schwarz, "Synthesis of adenylated molybdopterin: an essential step for molybdenum insertion", *J Biol Chem*, vol. 279, no. 53, pp. 55241–55246, 2004.
- [21] A. Llamas, T. Otte, G. Multhaupt, R. R. Mendel, G. Schwarz, "The Mechanism of nucleotide-assisted molybdenum insertion into molybdopterin. A novel route toward metal cofactor assembly", *J Biol Chem*, vol. 281, n^o. 27, pp. 18343–18350, 2006.
- [22] S. Leimkühler, M. M. Wuebbens, K. V. Rajagopalan, "The history of the discovery of the molybdenum cofactor and novel aspects of its biosynthesis in bacteria", *Coord Chem Rev*, vol. 255, pp. 1129–1144, 2011.
- [23] S. Leimkühler, K. V. Rajagopalan, "In vitro incorporation of nascent molybdenum cofactor into human sulfite oxidase", *J Biol Chem*, vol. 276, n^o. 3, pp. 1837–1844, 2001.
- [24] M. W. Lake, C. a Temple, K. V. Rajagopalan, H. Schindelin, "The crystal structure of the Escherichia coli MobA protein provides insight into molybdopterin guanine dinucleotide biosynthesis", *J Biol Chem*, vol. 275, n^o. 51, pp. 40211–40217, 2000.
- [25] L. Loschi, S. J. Brokx, T. L. Hills, G. Zhang, M. G. Bertero, A. L. Lovering, J. H. Weiner, N. C. J. Strynadka, "Structural and biochemical identification of a novel bacterial oxidoreductase" *J Biol Chem*, vol. 279, n^o. 48, pp. 50391–50400, 2004.
- [26] A. Magalon, J. G. Fedor, A. Walburger, J. H. Weiner, "Molybdenum enzymes in bacteria and their maturation", *Coord Chem Rev*, vol. 255, n^o. 9–10, pp. 1159–1178, 2011.
- [27] C. Feng, G. Tollin, J. H. Enemark, "Sulfite oxidizing enzymes", *Biochim Biophys Acta*, vol. 1774, n^o. 5, pp. 527–539, 2007.
- [28] N. Schrader, K. Fischer, K. Theis, R. R. Mendel, G. Schwarz, C. Kisker, "The crystal structure of plant sulfite oxidase provides insights into sulfite oxidation in plants and animals", *Structure*, vol. 11, pp. 1251–1263, 2003.
- [29] E. Karakas, H. L. Wilson, T. N. Graf, S. Xiang, S. Jaramillo-Busquets, K. V. Rajagopalan, C. Kisker, "Structural insights into sulfite oxidase deficiency", *J Biol Chem*, vol. 280, n^o. 39, pp. 33506–33515, 2005.
- [30] C. Kisker, H. Schindelin, A. Pacheco, W. A. Wehbi, R. M. Garrett, K. V. Rajagopalan, J. H. Enemark, D. C. Rees, "Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase", *Cell*, vol. 91, pp. 973–983, 1997.
- [31] U. Kappler, S. Bailey, "Molecular basis of intramolecular electron transfer in sulfite-oxidizing enzymes is revealed by high resolution structure of a heterodimeric complex of the catalytic molybdopterin subunit and a c-type cytochrome subunit". *J Biol Chem*, vol. 280, pp. 24999–25007, 2005.
- [32] K. Fischer, G. G. Barbier, H. Hecht, R. R. Mendel, W. H. Campbell, G. Schwarz, "Structural Basis of Eukaryotic Nitrate Reduction : Crystal Structures of the Nitrate Reductase Active Site", *Plant Cell*, vol. 17, pp. 1167–1179, 2005.

- [33] C. A. McDevitt, P. Hugenholtz, G. R. Hanson, A. G. McEwan, "Molecular analysis of dimethyl sulphide dehydrogenase from *Rhodovulum sulfidophilum*: its place in the dimethyl sulphoxide reductase family of microbial molybdopterin-containing enzymes", *Mol Microbiol*, vol. 44, n^o. 6, pp. 1575–87, 2002.
- [34] J. J. G. Moura, C. D. Brondino, J. Trincão, M. J. Romão, "Mo and W bis-MGD enzymes: nitrate reductases and formate dehydrogenases", *J Biol Inorg Chem*, vol. 9, n^o. 7, pp. 791–799, 2004.
- [35] F. Schneider, J. Lowe, R. Huber, H. Schindelin, C. Kisker, J. Knablein, "Crystal structure of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter capsulatus* at 1.88 Å resolution", *J Mol Biol*, vol. 263, pp. 53–69, 1996.
- [36] J. M. Dias, M. E. Than, A. Humm, R. Huber, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, S. Bursakov, J. Calvete, J. Caldeira, C. Carneiro, J. J. Moura, I. Moura, M. J. Romão, "Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9 Å by MAD methods", *Structure*, vol. 7, n^o. 1, pp. 65–79, 1999.
- [37] C. D. Brondino, M. J. Romão, I. Moura, J. J. G. Moura, "Molybdenum and tungsten enzymes: the xanthine oxidase family", *Curr Opin Chem Biol*, vol. 10, n^o. 2, pp. 109–14, 2006.
- [38] M. J. Romão, M. Archer, I. Moura, J. J. Moura, J. LeGall, R. Engh, M. Schneider, P. Hof, R. Huber, "Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido-reductase from *D. gigas*", *Science*, vol. 270, n^o. 5239, pp. 1170–1176, 1995.
- [39] J. M. Rebelo, J. M. Dias, R. Huber, J. J. Moura, M. J. Romão, "Structure refinement of the aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas* (MOP) at 1.28 Å", *J Biol Inorg Chem*, vol. 6, n^o. 8, pp. 791–800, 2001.
- [40] E. Garattini, R. Mendel, M. J. Romão, R. Wright, M. Terao, "Mammalian molybdo-flavoenzymes, an expanding family of proteins: structure, genetics, regulation, function and pathophysiology", *Biochem J*, vol. 372, pp. 15–32, 2003.
- [41] T. Nishino, K. Okamoto, Y. Kawaguchi, H. Hori, T. Matsumura, B. T. Eger, E. F. Pai, T. Nishino, "Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant", *J Biol Chem*, vol. 280, n^o. 26, pp. 24888–24894, 2005.
- [42] T. Nishino, "The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury", *J Biochem*, vol. 116, n^o. 1, pp. 1–6, 1994.
- [43] J. J. Truglio, K. Theis, S. Leimkühler, R. Rappa, K. V. Rajagopalan, C. Kisker, "Crystal Structures of the Active and Alloxanthine-Inhibited Forms of Xanthine Dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*", *Structure*, vol. 10, pp. 115–125, 2002.
- [44] S. Leimkühler, M. Kern, P. S. Solomon, A. G. McEwan, G. Schwarz, R. R. Mendel, W. Klipp, "Xanthine dehydrogenase from the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* is more similar to its eukaryotic counterparts than to prokaryotic molybdenum enzymes", *Mol Microbiol*, vol. 27, n^o. 4, pp. 853–69, 1998.
- [45] H. Dobbek, L. Gremer, O. Meyer, R. Huber, "Crystal structure and mechanism of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selenylcysteine", *P Natl Acad Sci USA*, vol. 96, n^o. 16, pp. 8884–8889, 1999.
- [46] H. Dobbek, L. Gremer, R. Kiefersauer, R. Huber, O. Meyer, "Catalysis at a dinuclear [CuSMo(=O)OH] cluster in a CO dehydrogenase resolved at 1.1-Å resolution", *P Natl Acad Sci USA*, vol. 99, no. 25, pp. 15971–15976, 2002.

- [47] F. R. Blattner, G. I. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12", *Science*, vol. 277, n°. 5331, pp. 1453–1462, 1997.
- [48] M. Neumann, G. Mittelstädt, C. Iobbi-Nivol, M. Saggiu, F. Lenzian, P. Hildebrandt, S. Leimkühler, "A periplasmic aldehyde oxidoreductase represents the first molybdopterin cytosine dinucleotide cofactor containing molybdo-flavoenzyme from *Escherichia coli*", *FEBS J*, vol. 276, n°. 10, pp. 2762–74, 2009.
- [49] H.-O. Kim, S.-W. Park, H.-D. Park, "Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot", *Food Microbiol*, vol. 21, n°. 1, pp. 105–110, 2004.
- [50] M. Neumann, G. Mittelstädt, F. Seduk, C. Iobbi-Nivol, S. Leimkühler, "MocA is a specific cytidyltransferase involved in molybdopterin cytosine dinucleotide biosynthesis in *Escherichia coli*", *J Biol Chem*, vol. 284, n°. 33, pp. 21891–21898, 2009.
- [51] M. Neumann, S. Leimkühler, "The role of system-specific molecular chaperones in the maturation of molybdoenzymes in bacteria", *Biochem Res Int*, vol. 2011, pp. 1-13, 2011.
- [52] S. Leimkühler, W. Klipp, "Role of XdhC in Molybdenum cofactor insertion into xanthine dehydrogenase of *Rhodobacter capsulatus*", *J Bacteriol*, vol. 181, n°. 9, pp. 2745–2751, 1999.
- [53] S. Schumann, M. Saggiu, N. Möller, S. D. Anker, F. Lenzian, P. Hildebrandt, S. Leimkühler, "The mechanism of assembly and cofactor insertion into *Rhodobacter capsulatus* xanthine dehydrogenase", *J Biol Chem*, vol. 283, no. 24, pp. 16602–16611, 2008.
- [54] M. Neumann, W. Stöcklein, A. Walburger, A. Magalon, S. Leimkühler, "Identification of a *Rhodobacter capsulatus* L-cysteine desulfurase that sulfurates the molybdenum cofactor when bound to XdhC and before its insertion into xanthine dehydrogenase", *Biochemistry*, vol. 46, n°. 33, pp. 9586–9595, 2007.
- [55] M. Neumann, M. Schulte, N. Jünemann, W. Stöcklein, S. Leimkühler, "*Rhodobacter capsulatus* XdhC is involved in molybdenum cofactor binding and insertion into xanthine dehydrogenase," *J Biol Chem*, vol. 281, n°. 23, pp. 15701–15708, 2006.
- [56] M. Neumann, F. Seduk, C. Iobbi-Nivol, S. Leimkühler, "Molybdopterin dinucleotide biosynthesis in *Escherichia coli*: identification of amino acid residues of molybdopterin dinucleotide transferases that determine specificity for binding of guanine or cytosine nucleotides", *J Biol Chem*, vol. 286, n°. 2, pp. 1400–8, 2011.
- [57] G. Dodson, "Dorothy Mary Crowfoot Hodgkin, O.M. 12 May 1910 - 29 July 1994," *Biogr. Mem. Fell. R. Soc.*, vol. 48, pp. 179–219, 2002.
- [58] <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. (Último acesso a 2/09/2012)
- [59] R. Gale, *Crystallography made crystal clear - A guide for users of macromolecular models*, 3^a ed., Academic Press, 2006
- [60] A. Wlodawer, W. Minor, Z. Dauter, M. Jaskolski, "Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures", *FEBS J*, vol. 275, n°. 1, pp. 1–21, 2008.
- [61] <http://www.esrf.eu/AboutUs/AboutSynchrotron/AboutsynchrotronLight>. (Último acesso a 23/07/2012)
- [62] <http://www.diamond.ac.uk/Home/About/Synchrotrons/Machine.html>. (Último acesso a 23/07/2012)

- [63] N. E. Chayen, E. Saridakis, "Protein crystallization : from purified protein to diffraction-quality crystal", *Nature Methods*, vol. 5, nº. 2, pp. 147–153, 2008.
- [64] M. J. Romão, "Cristalografia de Proteínas: metodologias e aplicações em Bioquímica", *Boletim de Biotecnologia*, vol. 53, pp. 18–36, 1996.
- [65] B. Rupp, *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology*. Nova Iorque: Garland Science, 2010.
- [66] M. Li and W. Chang, "Protein crystallization," *Photosynth Res*, vol. 102, pp. 223–9, 2009.
- [67] <http://www.emeraldbiosystems.com/blog/post/hanging-or-sitting-drops-have-it-both-ways.aspx>. (Último acesso a 25/08/2012)
- [68] P. C. Weber, "Overview of Protein Crystallization Methods", *Method Enzymol*, vol. 276, pp. 13–22, 1997.
- [69] A. L. Carvalho, J. Trincão, M. J. Romão, "X-ray crystallography in drug discovery. Ligand Macromolecular Interactions", *In Drug Discovery*, A. C. A. Roque. Ed. Humana Press, vol. 572, 2009.
- [70] G. Taylor, "The phase problem", *Acta crystallogr D*, vol. 59, nº. 11, pp. 1881–1890, 2003.
- [71] T. C. Terwilliger, "Using prime-and-switch phasing to reduce model bias in molecular replacement", *Acta crystallogr D*, vol. 60, pp. 2144–2149, 2004.
- [72] H. D. T. Mertens, D. I. Svergun, "Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering", *J Struct Biol*, vol. 172, pp. 128–141, 2010.
- [73] A. Geerlof, J. Brown, B. Coutard, M. P. Egloff, F. J. Enguita, M. J. Fogg, R. J. C. Gilbert, M. R. Groves, A. Haouz, J. E. Nettleship, P. Nordlund, R. J. Owens, M. Ruff, S. Sainsbury, D. I. Svergun, M. Wilmanns, "The impact of protein characterization in structural proteomics", *Acta crystallogr D*, vol. 62, pp. 1125–36, 2006.
- [74] R. P. Rambo, J. a Tainer, "Bridging the solution divide: comprehensive structural analyses of dynamic RNA, DNA, and protein assemblies by small-angle X-ray scattering", *Curr Opin Struc Biol*, vol. 20, pp. 128–37, 2010.
- [75] D. I. Svergun, M. H. J. Koch, "Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution", *Curr Opin Struc Biol*, vol. 12, pp. 654–60, 2002.
- [76] T. Palmer, C. L. Santini, C. Iobbi-Nivol, D. J. Eaves, D. H. Boxer, G. Giordano, "Involvement of the narJ and mob gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in Escherichia coli", *Mol Microbiol*, vol. 20, nº. 4, pp. 875–884, 1996.
- [77] J. Jancarik, S. H. Kim, "Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins", *J Appl Crystallogr*, vol. 24, nº. 4, pp. 409–411, 1991.
- [78] B. Meyer, T. Peters, "NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors", *Angew Chem Int Edit*, vol. 42, nº. 8, pp. 864–890, 2003.
- [79] A. Viegas, J. Manso, F. L. Nobrega, E. J. Cabrita, "Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding", *J Chem Educ*, vol. 88, nº. 7, pp. 990–994, 2011.

- [80] Y. Yuan, X. Wen, D. a R. Sanders, B. M. Pinto, "Exploring the mechanism of binding of UDP-galactopyranose to UDP-galactopyranose mutase by STD-NMR spectroscopy and molecular modeling", *Biochemistry*, vol. 44, nº. 43, pp. 14080–14089, 2005.
- [81] S. Leimkuhler, A. Freuer, J. A. S. Araujo, K. V. Rajagopalan, R. R. Mendel, "Mechanistic studies of human molybdopterin synthase reaction and characterization of mutants identified in group B patients of molybdenum cofactor deficiency", *J Biol Chem*, vol. 278, nº. 28, pp. 26127–26134, 2003.
- [82] S. J. Brokx, R. a Rothery, G. Zhang, D. P. Ng, J. H. Weiner, "Characterization of an Escherichia coli sulfite oxidase homologue reveals the role of a conserved active site cysteine in assembly and function", *Biochemistry*, vol. 44, nº. 30, pp. 10339–10348, 2005.
- [83] http://web.expasy.org/compute_pi/. (Último acesso a 16/06/2012)
- [84] K. V. Rajagopalan, P. Handler, "Hepatic aldehyde oxidase", *J Biol Chem*, vol. 239, nº. 6, pp. 2027–2035, 1964.
- [85] A. G. W. Leslie, "Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data", *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography*, nº. 26, 1992.
- [86] P. R. Evans, "Scaling and assessment of data quality", *Acta crystallogr D*, vol. 62, pp. 72–82, 2005.
- [87] Collaborative Computational Project, Number 4 "The CCP4 suite: programs for protein crystallography", *Acta crystallogr D*, vol. 50, pp. 760–763, 1994.
- [88] <http://img.chem.ucl.ac.uk/sgp/large/sgp.htm>. (Último acesso a 18/09/2012)
- [89] W. Kabsch, "Evaluation of single-crystal X-ray diffraction data from a position-sensitive detector", *J App Crystallogr*, vol. 21, pp. 916–24, 1988.
- [90] S. French, K. Wilson, "On the treatment of negative intensity observations," *Acta crystallogr A*, vol. 34, nº. 4, pp. 517–525, 1978.
- [91] J. E. Padilla, O. Todd, "A statistic for local intensity differences : robustness to anisotropy and pseudo-centering and utility for detecting twinning research papers", *Acta crystallogr D*, vol. 59, pp. 1124–1130, 2003.
- [92] T. O. Yeates, "Simple statistics for intensity data from twinned specimens," *Acta crystallogr A*, vol. 44, nº. 2, pp. 142–144, 1988.
- [93] G. K. Christopher, a. G. Phipps, R. J. Gray, "Temperature-dependent solubility of selected proteins," *J Cryst Growth*, vol. 191, nº. 4, pp. 820–826, 1998.
- [94] M. Unciuleac, E. Warkentin, C. C. Page, M. Boll, U. Ermler, "Structure of a xanthine oxidase-related 4-hydroxybenzoyl-CoA reductase with an additional [4Fe-4S] cluster and an inverted electron flow", *Structure*, vol. 12, nº. 12, pp. 2249–56, 2004.
- [95] I. Bonin, B. M. Martins, V. Purvanov, S. Fetzner, R. Huber, H. Dobbek, "Active site geometry and substrate recognition of the molybdenum hydroxylase quinoline 2-oxidoreductase", *Structure*, vol. 12, nº. 8, pp. 1425–1435, 2004.
- [96] P. Hanzelmann, H. Dobbek, L. Gremer, R. Huber, O. Meyer, "The effect of intracellular molybdenum in Hydrogenophaga pseudoflava on the crystallographic structure of the seleno-molybdo-iron-sulfur flavoenzyme carbon monoxide dehydrogenase", *J Mol Biol*, vol. 301, pp. 1221–1235, 2000.

- [97] N. Stein, "CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement", *J App Crystallogr*, vol. 41, pp. 641–643, 2008.
- [98] P. Emsley, K. Cowtan, "Coot: model-building tools for molecular graphics", *Acta crystallogr D*, vol. 60, pp. 2126–2132, 2004.
- [99] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, R. J. Read, "Phaser crystallography software", *J App Crystallogr*, vol. 40, pp. 658–674, 2007.
- [100] J. M. Pauff, H. Cao, R. Hille, "Crystal Structure of Desulfo-Xanthine Oxidase with Xanthine", *To be published*.
- [101] H. Cao, J. Hall, R. Hille, "X-ray crystal structure of arsenite-inhibited xanthine oxidase: δ -sulfido, δ -oxo double bridge between molybdenum and arsenic in the active site", *J A Chem Soc*, vol. 133, pp. 12414–12417, 2011.
- [102] K. D. Cowtan, P. Main, "Phase combination and cross validation in iterated density-modification calculations", *Acta crystallogr D*, vol. 52, pp. 43–48, 1996.
- [103] A. A. Vagin, R. S. Steiner, A. A. Lebedev, L. Potterton, S. McNicholas, F. Long, G. N. Murshudov, "REFMAC5 dictionary: organisation of prior chemical knowledge and guidelines for its use", *Acta crystallogr D*, vol. 60, pp. 2284–2295, 2004.
- [104] P. Bernadó, D. I. Svergun, "Structural analysis of intrinsically disordered proteins by small-angle X-ray scattering", *Mol BioSyst*, vol. 8, pp. 151–167, 2012.
- [105] D. I. Svergun, "Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing", *Biophys J*, pp. 2879–2886, 1999.
- [106] <http://web.expasy.org/protparam/>. (Último acesso a 04/09/2012)
- [107] K. R. Seddon, "Review Ionic Liquids for Clean Technology", *J Chem Technol Biot*, vol. 68, nº. 4, pp. 351–356, 1997.
- [108] C. Lange, G. Patil, and R. Rudolph, "Ionic liquids as refolding additives: N'-alkyl and N'-(ω -hydroxyalkyl) N-methylimidazolium chlorides", *Protein Sci*, vol. 14, pp. 2693–2701, 2005.
- [109] C. Coelho, J. Trincão, M. João Romão, "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", *J Cryst Growth*, vol. 312, nº. 5, pp. 714–719, 2010.
- [110] M. L. Pusey, M. S. Paley, M. B. Turner, and R. D. Rogers, "Protein Crystallization Using Room Temperature Ionic Liquids", *Crystal Growth & Design*, vol. 7, nº. 4, pp. 787–793, 2007.
- [111] D. Hekmat, D. Hebel, S. Joswig, M. Schmidt, D. Weuster-Botz, "Advanced protein crystallization using water-soluble ionic liquids as crystallization additives", *Biotechnol Lett*, vol. 29, pp. 1703–1711, 2007.
- [112] M. W. Pantoliano, E. C. Petrella, J. D. Kwasnoski, V. S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B. a Springer, P. Lane, F. R. Salemme, "High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery", *J Biomol Screen*, vol. 6, nº. 6, pp. 429–440, 2001.
- [113] M. R. Eftink, "The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins", *Biophys J*, vol. 66, pp. 482–501, 1994.

- [114] S. P. Santos, T. M. Bandejas, A. F. Pinto, M. Teixeira, M. Carrondo, C. V. Romão, "Thermofluor-based optimization strategy for the stabilization and crystallization of *Campylobacter jejuni* desulforubrythrin", *Protein Expres Purif*, vol. 81, n°. 2, pp. 193–200, 2012.
- [115] M. Mayer, B. Meyer, "Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy", *Angew Chem Int Edit*, vol. 38, n°. 12, pp. 1784–1788, 1999.
- [116] J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, "Surface plasmon resonance sensors: review," *Sensors and Actuators B*, vol. 54, pp. 3–15, 1999.
- [117] G. Canziani, W. Zhang, D. Cines, A. Rux, S. Willis, G. Cohen, R. Eisenberg, I. Chaiken, "Exploring biomolecular recognition using optical biosensors", *Methods*, vol. 19, n°. 2, pp. 253–269, Oct. 1999.
- [118] J. Schmitz, M. M. Wuebbens, K. V. Rajagopalan, S. Leimkühler, "Role of the C-terminal Gly-Gly motif of *Escherichia coli* Moad, a molybdenum cofactor biosynthesis protein with a ubiquitin fold", *Biochemistry*, vol. 46, n°. 3, pp. 909–916, 2007.
- [119] S. Chong, G. E. Montello, A. Zhang, E. J. Cantor, W. Liao, M. Q. Xu, J. Benner, "Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step", *Nuclei Acids Res*, vol. 26, n°. 22, pp. 5109–5115, 1998.
- [120] S. Chong, F. B. Mersha, D. G. Comb, M. E. Scott, D. Landry, L. M. Vence, F. B. Perler, J. Benner, R. B. Kucera, C. a Hirvonen, J. J. Pelletier, H. Paulus, M. Q. Xu, "Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element", *Gene*, vol. 192, n°. 2, pp. 271–281, 1997.
- [121] C. Cui, W. Zhao, J. Chen, J. Wang, Q. Li, "Elimination of in vivo cleavage between target protein and intein in the intein-mediated protein purification systems", *Protein Expres Purif*, vol. 50, n°. 1, pp. 74–81, 2006.
- [122] C. E. M. Stevenson, S. M. Mayer, L. Delarbre, D. M. Lawson, "Crystal annealing—nothing to lose," *J Cryst Growth*, vol. 232, n°. 1–4, pp. 629–637, 2001.

7. Anexos

Figura 7.1. Representação esquemática dos sete sistemas cristalinos.

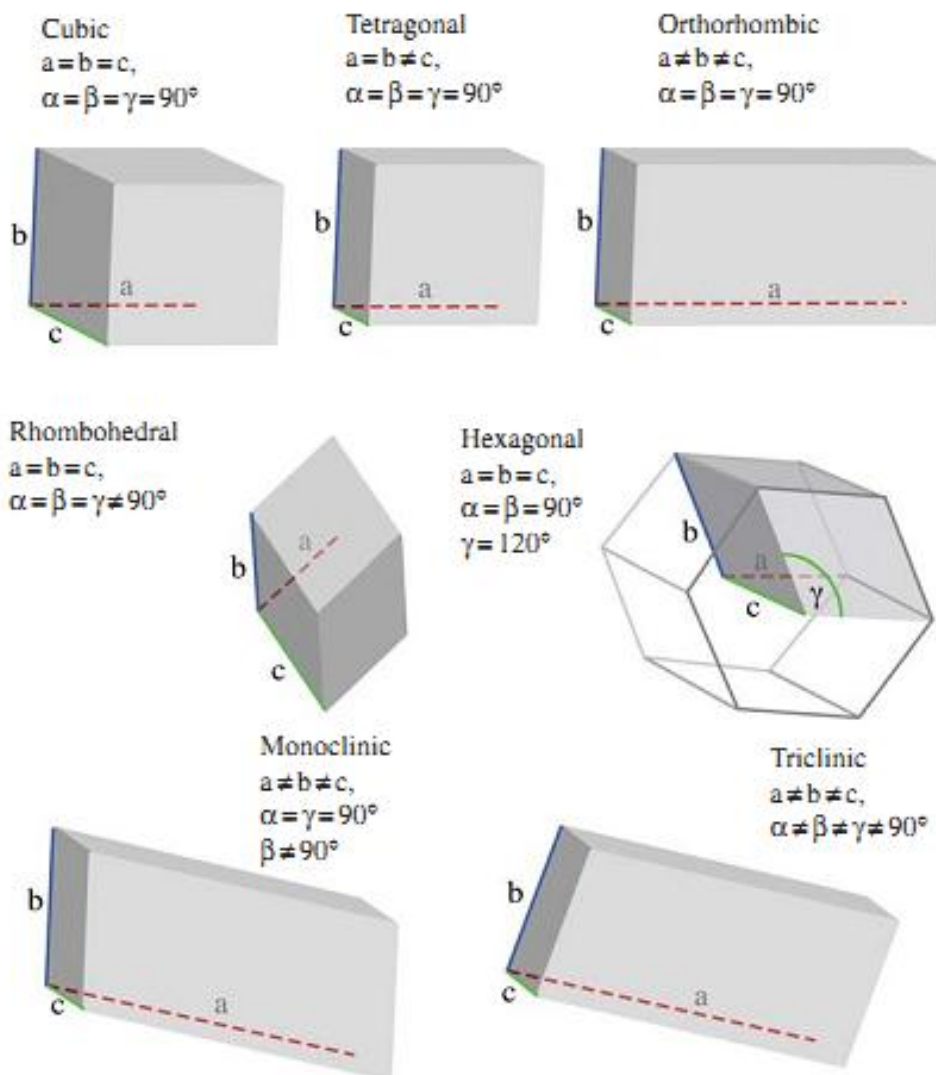


Tabela 7.1. Composição dos meios de cultura utilizados para um litro de crescimento de *E. coli*.^a Os meios foram preparados com água destilada e o pH ajustado para 7,5. Foram de seguida autoclavados a 120 °C durante 20 minutos.

<u>LB com peptona</u>^a	<u>LB com triptona</u>^a
10 g de peptona 5 g de extracto de levedura 5 g NaCl	10 g de triptona 5 g de extracto de levedura 10 g NaCl

Tabela 7.2. Composição das 80 soluções baseadas no *screen* de Jancarik *et al.* [77]

1. 0,1 M Acetato pH=4,5; 0,2 M Cloreto de cálcio; 30% MPD
2. 0,1 M MES pH=6,5; 1 M Tartarato de potássio/sódio;
3. 0,4 M Fosfato de amónio
4. 0,1 M Tris-HCl pH=8,5; 3 M Sulfato de amónio
5. 0,1 M HEPES pH=7,5; 0,2 M Citrato de sódio; 30% MPD
6. 0,1 M Acetato pH=4,5; 0,2 M Cloreto de magnésio; 30% PEG 4K
7. 0,1 M HEPES pH=7,5; 1,2 M Citrato de sódio
8. 0,2 M Citrato de sódio
9. 0,1 M Citrato pH=5,5; 0,2 M Acetato de amónio; 30% PEG 400
10. 0,1 M Acetato pH=4,5; 1,5 M Fosfato de amónio
11. 0,1 M HEPES pH=7,5; 1,5 M Fosfato hidrogénio di-potássio; 1,5 M Fosfato hidrogénio di-sódio; 0,2 M Sulfato de amónio
12. 0,1 M Tris-HCl pH=8,5; 0,2 M Citrato de sódio; 20% PEG 400
13. 0,1 M HEPES pH=7,5; 0,2 M Cloreto de cálcio; 25% PEG 4K
14. 0,1 M MES pH=6,5; 0,1 M Cloreto de magnésio; 30% PEG 8K
15. 0,1 M Citrato pH=5,5; 0,2M Sulfato de lítio; 30% PEG 4K
16. 0,1 M Acetato pH=4,5; 1 M Sulfato de lítio
17. 0,1 M Tris-HCl pH=7,5; 0,2 M Fosfato de amónio; 30% MPD
18. 0,1 M Tris-HCl pH=7,5; 0,2 M Acetato de amónio; 1,5 M Fosfato hidrogénio di-potássio; 1,5 M Fosfato dihidrogénio de sódio
19. 0,1 M Citrato pH=5,5; 0,1 M Sulfato de amónio; 30% PEG 8K
20. 0,1 M MES pH=6,5; 30% MPD
21. 0,1 M HEPES pH=7,5; 0,2 M Cloreto de magnésio; 30% PEG 4K
22. 0,1 M Tris-HCl pH=8,5; 0,2 M Acetato de sódio; 30% PEG 4K
23. 0,1 M Tris-HCl pH=7,5; 1 M Tartarato de potássio/sódio;
24. 0,1 M Tris-HCl pH=8,5; 0,2 M Cloreto de cálcio
25. 0,1 M Citrato pH=5,5; 0,5 M Acetato de amónio; 30% MPD
26. 0,1 M MES pH=6,5; 2 M Acetato de sódio
27. 0,1 M MES pH=6,5; 0,2 M Tartarato de potássio/sódio; 30% PEG 8K
28. 0,1 M HEPES pH=7,5; 1 M Tartarato de potássio/sódio
29. 0,1 M Acetato pH=4,5; 0,2 M Sulfato de amónio; 30% PEG 400
30. 0,1 M HEPES pH=7,5; 0,1 M Sulfato de amónio; 20% PEG 4K
31. 0,1 M MES pH=6,5; 2 M Sulfato de amónio

32. 0,1 M MES pH=6,5; 0,2 M Cloreto de sódio; 30% Etanol
33. 0,1 M HEPES pH=7,5; 0,2 M Cloreto de magnésio; 30% Etanol
34. 0,1 M Tris-HCl pH=8,5; 0,2 M Acetato de amónio; 30% Etanol
35. 0,1 M Acetato pH=4,5; 0,2 M Cloreto de cálcio; 30% Etanol
36. 0,1 M HEPES pH=7,5; 0,2 M Acetato de sódio; 30% Etanol
37. 0,1 M HEPES pH=7,5; 0,2 M Cloreto de magnésio; 30% Isopropanol
38. 0,1 M Cacodilato pH=6,5; 30% MPD
39. 0,1 M Acetato pH=4,5; 2 M Formato de sódio
40. 0,1 M Cacodilato pH=6,5; 0,2 M Citrato de sódio; 40% Isopropanol
41. 0,1 M HEPES pH=7,5; 20% PEG 400; 10% Isopropanol
42. 0,1 M HEPES pH=7,5; 1 M Sulfato de lítio
43. 0,1 M Tris-HCl pH=8,5; 0,2 M Sulfato de lítio; 30% PEG 4K
44. 0,1 M Cacodilato pH=6,5; 0,2 M Sulfato de amónio; 30% PEG 6K
45. 0,1 M Acetato pH=4,5; 1,5 M Acetato de sódio
46. 0,1 M Citrato de sódio; 1 M Fosfato dihidrogénio de amónio
47. 4M Formato de sódio
48. 0,1 M HEPES pH=7,5; 1,2 M Citrato de sódio
49. 0,4 M Tartarato de potássio/sódio
50. 0,1 M Tris-HCl pH=8,5; 0,2 M Cloreto de magnésio; 30% PEG 4K
51. 0,1 M Cacodilato pH=6,5; 1,4 M Acetato de sódio
52. 0,1 M Citrato pH=5,5; 0,2 M Acetato de amónio; 30% PEG 4K
53. 0,1 M Citrato pH=4,5; 0,2 M Acetato de amónio 30% PEG 4K
54. 0,1 M HEPES pH=7,5; 0,2 M Cloreto de cálcio; 28% PEG 400
55. 0,1 M Cacodilato pH=6,5; 0,2 M Sulfato de amónio; 30% PEG 8K
56. 0,1 M Cacodilato pH=6,5; 0,2 M Acetato de magnésio; 30% PEG 8K
57. 0,1 M Tris-HCl pH=8,5; 0,2 M Acetato hidrogénio de amónio; 30% Isopropanol
58. 0,1 M Acetato pH=4,5; 0,2 M Sulfato de amónio; 25% PEG 4K
59. 0,1 M Cacodilato pH=6,5; 0,2 M Acetato de magnésio; 30% MPD
60. 0,1 M Acetato pH=4,5; 0,2 M Cloreto de cálcio; 20 % Isopropanol
61. 0,1 M Imidazol pH=7; 1 M Acetato de sódio;
62. 0,1 M Cacodilato pH=6,5; 0,2 M Citrato de sódio; 20 % Isopropanol
63. 0,1 M Cacodilato pH=6,5; 0,2 M Acetato de sódio; 30% PEG 8K
64. 0,2 M Sulfato de amónio; 30% PEG 8K
65. 0,2 M Sulfato de amónio; 30% PEG 4K

66. 0,1 M HEPES pH=7,5; 1,6 M Fosfato hidrogénio di-potássio; 1,6 M Fosfato dihidrogénio de sódio
67. 0,1 M Tris-HCl pH=8,5; 8% PEG 8K
68. 0,1 M Acetato pH=4,5; 8% PEG 4K
69. 0,1 M HEPES pH=7,5; 1,8 M Fosfato dihidrogénio de amónio; 2% PEG 400
70. 0,1 M Citrato pH=5,5; 20% PEG 4K; 20 % Isopropanol
71. 0,05 M Fosfato hidrogénio di-potássio; 20% PEG 8K
72. 30% PEG 1K
73. 0,2 M Formato de magnésio
74. 0,1 M Cacodilato pH=6,5; 0,2 M Acetato de zinco; 18% PEG 8K
75. 0,1 M Cacodilato pH=6,5; 0,2 M Acetato de cálcio; 18% PEG 8K
76. 0,1 M Acetato pH=4,5; 2 M Sulfato de amónio
77. 0,1 M Tris-HCl pH=8,5; 2 M Sulfato de amónio
78. 1 M Sulfato de lítio; 2% PEG 8K
79. 0,5 M Sulfato de lítio; 18% PEG 8K
80. 0,1 M Citrato pH=5,5; 0,2 M Acetato de amónio; 20 % PEG 4K; 20 % Isopropanol

Tabela 7.3. Composição do *screen* utilizado para os ensaios de *thermofluor*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 mM Fosfato de sódio pH 6,2	100 mM Fosfato de sódio pH 8,0	100 mM MOPS pH 7,0	100 mM Bis-Tris pH 5,5	100 mM Bis-Tris pH 7,0	100 mM HEPES pH 6,5	100 mM HEPES pH 7,5	100 mM HEPES pH 8,5	100 mM MES pH 5,5	100 mM MES pH 6,5	100 mM Tris pH 7,5	100 mM Tris pH 8,5
B	A1 e 150mM NaCl	A2 e 150mM NaCl	A3 e 150mM NaCl	A4 e 150mM NaCl	A5 e 150mM NaCl	A6 e 150mM NaCl	A7 e 150 mM NaCl	A8 e 150 mM NaCl	A9 e 150 mM NaCl	A10 e 150 mM NaCl	A11 e 150 mM NaCl	A12 e 150 mM NaCl
C	A1 e 500 mM NaCl	A2 e 500 mM NaCl	A3 e 500 mM NaCl	A4 e 500 mM NaCl	A5 e 500 mM NaCl	A6 e 500 mM NaCl	A7 e 500 mM NaCl	A8 e 500 mM NaCl	A9 e 500 mM NaCl	A10 e 500 mM NaCl	A11 e 500 mM NaCl	A12 e 500 mM NaCl

Figura 7.2. Cromatografia de exclusão molecular da proteína PaoD. O pico aos 10,62 mL corresponde ao peso molecular de 73 kDa. Utilizou-se uma coluna Superdex 75 (GE Healthcare) e o tampão de equilíbrio com 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl e 1 mM EDTA. A identificação de cada pico foi determinada por comparação com o *standard* de exclusão molecular (Biorad).

