



Joana José Fernandes Gonçalves
Licenciada em Química Tecnológica

Caracterização estrutural e funcional da interação entre inibidores e PtpA: um possível alvo contra a tuberculose

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química
Bioorgânica**

Orientadora: Professora Doutora Teresa Sacadura Santos-Silva,
Professora Auxiliar, FCT/UNL
Co-orientador: Professor Doutor Hernán Terenzi, Universidade Federal
de Santa Catarina



Joana José Fernandes Gonçalves
Licenciada em Química Tecnológica

Caracterização estrutural e funcional da interação entre inibidores e PtpA: um possível alvo contra a tuberculose

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química
Bioorgânica**

Orientadora: Professora Doutora Teresa Sacadura Santos-Silva,
Professora Auxiliar, FCT/UNL
Co-orientador: Professor Doutor Hernán Terenzi, Universidade Federal
de Santa Catarina

Caracterização estrutural e funcional da interação entre inibidores e PtpA: um possível alvo contra a tuberculose.

Copyright © em nome de Joana José Fernandes Gonçalves, da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

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

É quase tortura organizar este espaço de forma a dar a devida importância a todos os que me apoiaram ao longo deste projeto. Todos vocês tiveram (e têm) um papel crucial na minha jornada. Contudo, desde o primeiro momento em que pensei neste espaço houve um nome que eu sabia que tinha de surgir em primeiro lugar.

Bruno Carneiro. Nunca conseguirei expressar devidamente a gratidão que sinto por ter passado este ano a trabalhar a três metros da tua bancada. Festejaste as minhas conquistas como se fossem tuas e viveste as minhas dificuldades comigo, do primeiro ao último dia. Não foram poucas as vezes que dedicaste o teu tempo a ouvir-me falar do meu trabalho e me ajudaste com toda a tua sabedoria e amizade. És uma fonte de inspiração, um exemplo de força de vontade, de saber evoluir com os erros, de querer ser melhor a cada dia. Admiro o teu espírito livre, o teu otimismo inabalável, a tua capacidade de encontrar sempre as soluções, a tua alegria de viver! Sou imensamente sortuda por ter tido esta oportunidade de te conhecer melhor. Espero, do fundo do meu coração, que a nossa amizade perdure o resto das nossas vidas. E só para te fazer rir, vou esticar isto até à décima linha. Obrigado.

Teresa Santos-Silva. Imagino que aceitar ser orientadora de uma aluna cuja formação base é diferente do tema a desenvolver ao longo da tese seja um desafio que poucos aceitariam. Estou-lhe profundamente grata por me ter aceitado e por toda a ajuda e apoio que sempre me deu! Agradeço por todas as oportunidades de crescimento, pelos incentivos à obtenção de melhores resultados e também pelo espaço dado à minha aprendizagem individual. Não só a nível do desenvolvimento da tese, como a nível de desenvolvimento pessoal. Muito obrigado!

Hernán Terenzi. Muito obrigado por toda a ajuda e disponibilidade que me foi prestando ao longo deste ano e pelas respostas sempre rápidas e assertivas! Obrigado.

Francisco Leisico. Acima de tudo agradeço a tua imensa dedicação a este projeto e a tua constante preocupação com a minha aprendizagem. Sei que muito do tempo que dispensaste para ouvir as minhas dúvidas e me ajudar era inventado e sempre o fizeste com alegria e boa vontade. Não tenho como te agradecer. Considero-te um cientista muito completo, sempre em busca da própria aprendizagem, de alargar horizontes, de melhorar resultados. És extraordinariamente incansável. Acredito que o teu espírito destemido te vai levar longe. Ou perto. Ou onde quiseres. Obrigado.

Marino Santos. Redigir-te um agradecimento é uma tarefa deveras complicada. Não só por querer estar à altura do teu espírito crítico, mas também porque dificilmente saberei expressar devidamente a gratidão que sinto por todo o apoio que me deste ao longo deste ano. Principalmente por toda a paciência que sempre tiveste comigo, mesmo quando as minhas dúvidas eram básicas e dignas de um momento de gargalhada. E só para mostrar que li umas coisas da tua tese, em vez de um obrigado, deixo-te com uma vénia.

Márcia Correia. Não é por acaso que o primeiro conselho que me deram, quando cheguei ao laboratório, foi o de te procurar perante adversidades. Não foram poucas as vezes que procurei a tua ajuda e percebi que talvez não fosse a melhor altura porque te encontravas ocupada com mil e uma tarefas. Ainda assim, não me recordo nem de uma única vez que não tivesses acrescentado uns minutos ao teu relógio para me ajudar. Obrigado!

Margarida Marques. A melhor vizinha de trás que poderia ter tido e a minha grande companheira nas aventuras extracurriculares. Devias receber o prémio de melhor ouvinte. Eu sei que o meu humor, principalmente de manhã, nem sempre é fácil e nunca te faltou um sorriso e uma palavra amiga para mim. És daquelas pessoas com quem nos cruzamos na vida e simplesmente sabemos que será eterno. Que assim o seja! Obrigado!

Andreia Marinho. Foste a primeira pessoa que conheci nesta faculdade, a minha grande companhia durante o ano curricular do mestrado, e por pura coincidência ambas escolhemos desenvolver tese com a professora Teresa. Embora geograficamente longe, estiveste sempre presente. Não poderia estar mais grata pelo teu carinho e amizade. E que assim continue a ser! Obrigado!

Sara Brito. Espero ter-te passado um bom exemplo e que o tempo que trabalhaste comigo tenha sido uma experiência positiva para ti. A tua persistência e dedicação são notórias, e não tenho dúvidas em como serão as tuas melhores armas para qualquer que seja o desafio que o futuro te reserva. Para mim esta foi, sem dúvida, uma experiência muito enriquecedora! Crescemos juntas! Obrigado!

Ao João Ferreira, à Filipa Lopes e ao Henrique Amado, pela companhia no laboratório e pela inspiração ao colocarem todo o vosso empenho nos vossos projetos, obrigado!

Filipa Trovão, José Silva, Viviana Correia, Diana Ribeiro, Cristiano Mota, Jayaraman Muthukumaran, Ana Luísa Carvalho, Angelina Palma, Benedita Pinheiro, Cecília Bonifácio, Catarina Coelho. Não é que me falem motivos para escrever um parágrafo para cada um de vós, mas os agradecimentos já vão longos e ainda há o resto da tese para ler. Espero que compreendam. Agradeço a todos por me terem recebido de braços abertos, por todo o apoio,

por todas as conversas de café -que tanta falta fazem à saúde mental de todos nós-, e por serem um grupo harmoniosamente heterogéneo. Tenho muito carinho por todos vós. Obrigado.

Um obrigado especial à professora Maria João Romão, não só por me ter recebido com amizade no grupo de cristalografia, como pelas suas aulas de cristalografia do ano curricular do mestrado. Fascinei-me pela técnica desde que a estudei pela primeira vez, de uma forma elementar, algures na licenciatura, e as suas aulas foram um avivar da minha vontade de querer aprender mais. Obrigado!

José Oliveira. O patrão. Sem si, sem a oportunidade que me deu e sem a confiança que depositou em mim, teria sido impossível voltar a estudar. E sem as nossas conversas de confissão a vida seria mais pesada. E também à Lurdes, ao António, ao André, ao Rafael, à Milene, à Nathália, e ao restante *staff*. O vosso apoio e carinho, principalmente na reta final, foram fundamentais para me manter focada nos meus objetivos. Vocês trazem uma pitada de loucura muito saudável à minha vida. Muito obrigado a todos!

À tia Guida, ao tio João Luís, ao tio Cisaltino, à tia São e à tia Teresa. Aos meus primos. Por me fazerem sentir que a distância é apenas física, por se preocuparem e perguntarem constantemente como estava o mestrado a decorrer. Ao tio Manuel, que viverá sempre em mim.

Firmina Gonçalves. A minha querida mãe. É com muito carinho que me recordo de todas as vezes em que me ouviste falar de cristais e te esforçaste tanto por compreender que até me fizeste perguntas! O teu apoio incondicional durante este percurso foi importantíssimo, mas acima de tudo estou-te muito grata por me teres incentivado a voltar a estudar.

Ricardo Gonçalves. O meu mano. Sabes que todas as vezes que desligaste os comboios para eu poder estudar, foi também por ti?

E por fim, António Gonçalves. O meu pai, no pretérito perfeito. Não poderia deixar de registar aqui o teu nome, uma vez que és algo responsável pelo ano que consta na capa desta dissertação. Se estivesses aqui talvez me dissesses o mesmo de sempre, quando me vias conquistar algo pelo qual tinha dado o meu melhor: “Vês? Custou alguma coisa?”. E rir-nos-íamos, muito provavelmente, até às lágrimas.

A todos, o meu sentido obrigado!

Resumo

A tuberculose (TB) é uma das mais antigas e mortais infecções que afetam a humanidade.¹ A causa desta doença reside no agente patogénico aeróbico *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), que afeta principalmente o sistema respiratório.^{2,3} A sobrevivência da *M. tuberculosis* no seu hospedeiro está diretamente relacionada com a secreção de proteínas tirosinas fosfatases que interferem na sinalização celular dos macrófagos.⁴ A proteína tirosina fosfatase A (PtpA) tem demonstrado ter um papel crucial neste processo, sendo, por isso, um alvo muito promissor ao desenvolvimento de novos fármacos anti-tuberculose.⁵ A estrutura cristalográfica da proteína nativa foi resolvida em 2005.⁶

Entre uma série de compostos testados, a família das chalconas tem sido identificada como potencial inibidora competitiva da PtpA. Estudos preliminares revelaram que o fator inibidor predominante nestes compostos reside na planaridade/hidrofobicidade da molécula, assim como na natureza dos grupos substituintes que estabelecem pontes de hidrogénio entre os resíduos do sítio ativo da PtpA.^{4,7,8}

Neste trabalho estudou-se as propriedades inibitórias de quatro chalconas e duas tiosemicarbazonas por métodos biofísicos, enzimáticos e estruturais. A PtpA foi expressa e purificada com um rendimento médio de 20 mg/L de expressão, e foram resolvidas quatro estruturas da proteína incubada com ligandos, a resoluções máximas de 2,89 Å a 3,60 Å. Foi observada uma densidade eletrónica extra no centro ativo da proteína, que poderá estar relacionada com os ligandos. A experiência de SAXS revelou que a conformação da proteína não se altera na presença dos ligandos. Os ensaios enzimáticos, assim como as experiências de TSA, ITC e MST revelaram-se inconclusivos.

Palavras-chave: Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, proteína tirosina fosfatase A (PtpA), chalconas, tiosemicarbazonas, cristalografia de raios-X, caracterização biofísica

Abstract

Tuberculosis (TB) is one of the oldest and deadly infections affecting mankind.¹ *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), an intracellular aerobic pathogen, is the main causative agent of TB affecting preferentially the pulmonary system.^{2,3} The survival of *M. tuberculosis* in its host is directly related to the release of protein tyrosine phosphatases since these proteins interfere in macrophage cell signalling.⁴ Protein tyrosine phosphatase A (PtpA) has been shown to play a crucial key role in this process being a promising target for the development of anti-tuberculosis drugs.⁵ The crystallographic structure of the native protein has been solved in 2005.⁶

Among several tested compounds, chalcones have been identified as potential competitive inhibitors of PtpA. Preliminary studies have revealed that the inhibitor predominant factor is the molecule planarity/hydrophobicity and the nature of the substituents that establish hydrogen bonds with the residues in the active site of PtpA.^{4,7,8}

In this work, the inhibitory properties of six chalcones were studied by a combined biophysical and structural approach. PtpA was successfully overexpressed and purified with an average yield of 20 mg/L expression. Crystallization trials were conducted by *soaking* and four structures of the protein incubated with ligands were resolved at maximal resolutions of 2.89 Å to 3.60 Å. An extra electron density was observed at the active centre of the protein that can be related to the ligands. The SAXS experiment revealed that the conformation of the protein does not change in the presence of the ligands. Enzymatic assays, as well as the TSA, ITC and MST experiments, were found to be inconclusive.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, protein tyrosine phosphatase A (PtpA), chalcones, thiosemicarbazones, X-ray crystallography, Biophysical and enzymatic methods

Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo	v
Abstract.....	vii
Índice Geral	ix
Índice de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos	xv
1 Introdução.....	1
1.1 Tuberculose	1
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
1.3 PtpA de <i>M. tuberculosis</i>	4
1.4 Inibidores da proteína tirosina fosfatase A (PtpA).....	5
2 Técnicas Utilizadas.....	9
2.1 Cristalografia de proteínas - difração de raios-X.....	9
2.1.1 A radiação X.....	9
2.1.2 Estrutura cristalina.....	11
2.1.3 Resolução da estrutura	12
2.1.4 Refinamento e validação da estrutura	14
2.1.5 Cristalização de proteínas.....	15
2.2 Dispersão de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	18
2.3 Cinética Enzimática	19
2.4 <i>Thermal Shift Assay</i> (TSA).....	20
2.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	21
2.6 Termoforese em Microescala (MST).....	22
3 Objetivos.....	25
4 Procedimento	27
4.1 Expressão e purificação da PtpA	27
4.2 Ensaios de cristalização	28
4.3 Dispersão de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)	30

4.4	Cinética Enzimática	31
4.5	Ensaio de <i>Thermal Shift Assay</i> (TSA)	31
4.6	Ensaio de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	32
4.7	Ensaio de Termoforese em Microescala (MST)	32
5	Resultados e Discussão	33
5.1	Expressão e purificação da PtpA	33
5.2	Ensaio de cristalização e experiência de difração	34
5.2.1	Experiência de difração PtpA-ligandos	37
5.2.2	Resolução das estruturas	42
5.3	Dispersão de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	46
5.4	Ensaio de Cinética Enzimática	48
5.5	<i>Ensaio de Thermal Shift Assay</i> (TSA)	51
5.6	Ensaio de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	53
5.7	Ensaio de Termoforese em Microescala (MST)	54
6	Conclusão.....	57
7	Referências bibliográficas	61
8	Anexos.....	65

Índice de Figuras

Figura 1.1- Número de casos de tuberculose e sua distribuição mundial em 2016.	1
Figura 1.2- Esquema representativo do mecanismo de ação da proteína PtpA.	3
Figura 1.3- Estrutura cristalográfica da PtpA a 1,9 Å de resolução (PDB: 1U2P).	4
Figura 1.4- Mecanismo da reação catalítica das PTPs.	5
Figura 1.5- Estrutura de uma chalcona.	5
Figura 1.6- Previsão da interação entre chalconas e a PtpA.	6
Figura 1.7- Estrutura de uma tiosemicarbazona.	6
Figura 2.1- Espectro eletromagnético.	9
Figura 2.2- Representação esquemática da produção de radiação-X.	10
Figura 2.3- Representação esquemática do sinctrotão do ESRF.	11
Figura 2.4- Célula unitária e rede cristalina.	12
Figura 2.5- Representação da Lei de Bragg.	13
Figura 2.6- Representação de uma onda	13
Figura 2.7- Técnica de cristalização por difusão de vapor	16
Figura 2.8- Diagrama de fases para o processo de cristalização de proteínas.	16
Figura 2.9- Representação da experiência de SAXS e das curvas obtidas.	18
Figura 2.10- Esquema representativo da reação entre a enzima e o substrato.	19
Figura 2.11- Representação de uma curva de fusão obtida pela técnica de TSA.	20
Figura 2.12- Esquema geral de um calorímetro isotérmico de titulação	22
Figura 2.13- Representação geral do funcionamento de uma experiência de MST.	23
Figura 5.1- Cromatograma IMAC e Géis SDS-PAGE resultantes da purificação da PtpA.	34
Figura 5.2- Cristais de PtpA	35
Figura 5.3- Cristais de PtpA	36
Figura 5.4- Estrutura obtida para os quatro conjuntos de dados recolhidos	45
Figura 5.5- Imagens das densidades observadas nos centros ativos das estruturas obtidas. ..	46
Figura 5.6- Curva experimental de SAXS da amostra de PtpA	47
Figura 5.7- Gráfico absorvância vs tempo, resultante das experiências de cinética enzimática.	48
Figura 5.8- Curva de Michaelis-Menten.	49
Figura 5.9- Gráfico absorvância vs tempo, resultante das experiências de cinética enzimática com os ligandos.	50
Figura 5.10- Curvas resultantes da experiência de TSA.	52
Figura 5.11- Gráfico obtido através da experiência de ITC	53
Figura 5.12- Gráfico obtido através da experiência de MST.	54

Lista de Tabelas

Tabela 1- Compostos da família das chalconas.	7
Tabela 2- Condições de cristalização da proteína PtpA descritas na literatura	28
Tabela 3- Condições de cristalização da proteína PtpA testadas	28
Tabela 4- Condições de cristalização da proteína PtpA testadas	29
Tabela 5- <i>Screens</i> de cristalização testados.	29
Tabela 6- Condições testadas durante a otimização da condição de cristalização da proteína PtpA.	30
Tabela 7- Resumo das condições e resultados de difração dos cristais de PtpA	38
Tabela 8 - Estatísticas de qualidade dos dados de difração dos cristais	39
Tabela 9- Estatísticas de qualidade dos dados de difração dos cristais	39
Tabela 10- Estatísticas de qualidade dos dados de difração dos cristais	40
Tabela 11- Estatísticas de qualidade dos dados de difração do cristal	41
Tabela 12- Valores de Z-score e LLG obtidos para os cristais de PtpA-ligandos	43
Tabela 13- Estatísticas de refinamento inicial e final obtidas para as estruturas de PtpA-ligandos.	43
Tabela 14- Valores de RMSD obtidos por comparação das estruturas em estudo e a estrutura de PtpA depositada no PDB (1U2P).	44
Tabela 15- Parâmetros obtidos para os conjuntos de dados recolhidos para a PtpA livre e PtpA-C33.	47
Tabela 16- Velocidades iniciais, e respectivos coeficientes de correlação, r^2 , correspondentes às curvas obtidas para as experiências de cinética enzimática.	49
Tabela 17- Velocidades iniciais, e respectivos coeficientes de correlação, r^2 , correspondentes às curvas obtidas para as experiências de cinética enzimática com os ligandos.	51
Tabela 18- Temperaturas de desnaturação obtidos durante a experiência de TSA	52

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

α – Fase da onda

ϵ – Coeficiente de extinção molar

λ – Comprimento de onda

$\rho(x,y,z)$ – Densidade eletrônica

I_{hkl} - Intensidade da reflexão

σ_{hkl} - Erro associado a cada intensidade

$|F_{\text{calc}}|$ ou $|F_c|$ – Amplitude do Fator de Estrutura calculada

$|F_{hkl}|$ – Amplitude do Fator de Estrutura

$|F_{\text{obs}}|$ ou $|F_o|$ – Amplitude do Fator de Estrutura observada

Å – Angstrom

Abs – Absorvância

CCP4 – Collaborative Computacional Project Number 4

Coot – *Crystallographic Object-Oriented Toolkit*

Crio-EM- Microscopia Eletrônica a Temperatura Criogénica (do inglês *Cryo-Electron Microscopy*)

d_{hkl} - Espaçamento Interplanar

DMSO – Dimetilsulfóxido

DTT- Ditiotreitól

E. coli - *Escherichia coli*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ESRF – *European Synchrotron Radiation Facility*

F – Amplitude da onda

F_{calc} ou F_c – Fator de estrutura calculado

F_{hkl} – Fator de estrutura

F_{obs} – Fator de estrutura observado

FT – Transformada de Fourier

FT^{-1} – Transformada de Fourier inversa

GSK3 α - *Glycogen Synthase Kinase 3*

h,k,l – Índices de Miller

HEPES - (4-(2-hidroxietil) - ácido 1-piperazinoetanosulfónico)

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*)

HPLC- Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

IC_{50} - *Half Maximal Inhibitory Concentration*

IMAC – Cromatografia de afinidade por iões metálicos imobilizados (do inglês *Immobilized- Metal Affinity Chromatography*)

IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactósido

ITC- Calorimetria de titulação isotérmica (do inglês *Isothermal Titration Calorimetry*)

IUPAC- *International Union of Pure and Applied Chemistry*

kDa – kiloDalton
K_i- Constante de Inibição
K_M- Constante de Michaelis
LB - *Luria-Bertani*
LINAC- Acelerador de partículas linear (do inglês *Linear Particle Accelerator*)
LMW-PTPs - *Lower Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatases*
MAD - Dispersão Anômala Múltipla (do inglês *Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*)
MR – Substituição Molecular (do inglês *Molecular Replacement*)
MST - Termoforese em Microescala (do inglês *Microscale Thermophoresis*)
PDB – *Protein Data Bank*
PEG – Polietilenoglicol
pNPP - p-nitrofenilfosfato
PtpA – Proteína tirosina fosfatase A
PTPs – Proteína tirosina fosfatases
RMN- Ressonância Magnética Nuclear
RMSD – *Root Mean Square Deviation*
rpm – Rotações por Minuto
SAXS - Dispersão de raios-X a baixo ângulo (do inglês *Small-angle X-ray scattering*)
SDS-PAGE - Electroforese em Gel de Poliacrilamida e Dodecil-Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)
STD-NMR - *Saturation Transfer Difference Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*
TB – Tuberculose
T_m - Temperatura de fusão da proteína (do inglês *Melting Temperature*)
Tris - Tris(hidroximetil)aminometano
TSA – *Thermofluor Shift Assay*
V-ATPase – ATPase macrófago-vacuolar-H⁺
V_M - Coeficiente de *Matthews*
VPS33B - *Human Class C Vacuolar Protein Sorting*
WHO- Organização Mundial de Saúde (do inglês *World Health Organization*)

1 Introdução

1.1 Tuberculose

Estima-se que a tuberculose (TB) seja uma das infecções mais antigas e mortais que afetam o homem. No século XVIII, a TB atingiu proporções epidémicas na Europa e América do Norte chegando a ser conhecida como a “peste cinzenta”.^{1,9} Caracteriza-se por ser uma doença altamente infecciosa, transmissível e polissintomática, com função necrosante nos tecidos e que, embora afete principalmente o sistema respiratório, se pode propagar por todos os outros sistemas do corpo humano. A TB pulmonar, para além de ser a forma mais comum da doença, é também a que apresenta maiores riscos para a saúde pública uma vez que a sua transmissão ocorre através da inalação de bactérias previamente expulsas pelas vias aéreas de indivíduos infetados.^{9,10} Após a inalação das bactérias, a probabilidade de se desenvolver esta infeção ronda os 10 %, existindo maior risco para pessoas com o sistema imunitário enfraquecido como, por exemplo, as infetadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*).^{11,12} De acordo com as estimativas apresentadas no Relatório Global da Tuberculose de 2017 da Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), a TB foi, em 2016, a nona maior causa de mortes a nível mundial provocando cerca de 1,3 milhões de vítimas mortais entre cerca de 10,4 milhões casos de infetados, como se observa na Figura 1.1.¹¹

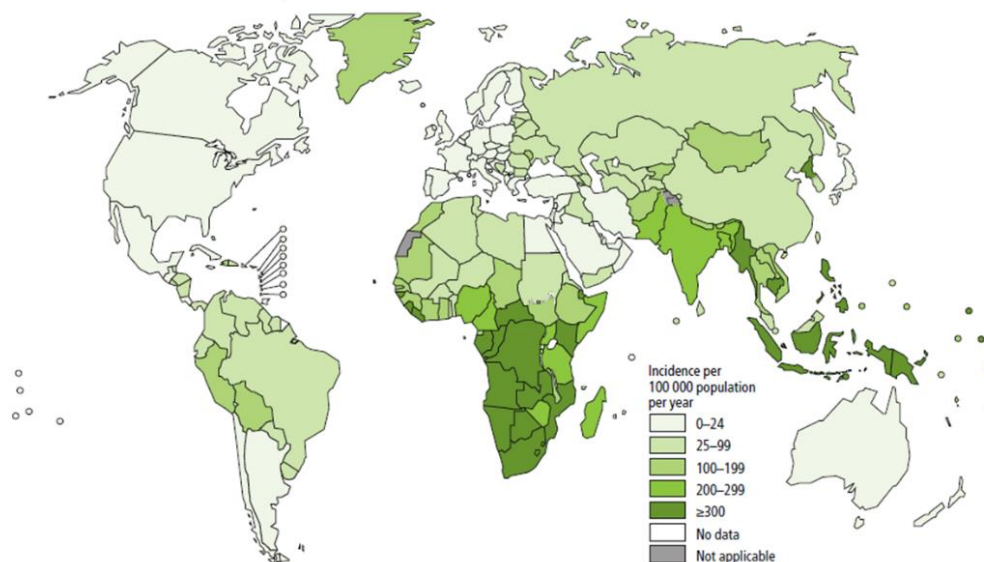


Figura 1.1- Número de casos de tuberculose e sua distribuição mundial em 2016. Imagem adaptada.¹¹

Segundo a Direção-Geral de Saúde, em Portugal houve um decréscimo de 40 % da taxa de incidência de tuberculose, de 2010 a 2017, afetando atualmente 18 em cada 100 mil habitantes. Apesar da evolução favorável, esta ainda não está bem consolidada, pelo que é urgente identificar estratégias de combate e prevenção da TB.¹²

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

A TB é provocada pelo microrganismo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) descoberto em 1882 pelo médico alemão Robert Koch. Trata-se de uma bactéria em forma de bacilo, sem cápsula e sem flagelos, que não forma esporos nem produz toxinas. Esta micobactéria é classificada como Gram-positiva embora a estrutura em multi-camadas da sua parede celular seja mais semelhante à das bactérias Gram-negativas. É um agente patogénico intracelular aeróbio que infeta predominantemente o sistema pulmonar. O *M. tuberculosis* pertence ao complexo *M. tuberculosis* juntamente com outras quatro espécies que podem causar TB: *M. bovis*, infeta uma grande variedade de mamíferos, inclusivamente humanos; *M. africanum*, infeta essencialmente humanos na África subsariana; *M. microti*, infeta algumas espécies de roedores; e *M. canetti*, uma espécie muito rara, encontrada em poucos casos de TB.^{13–16}

A descoberta de Koch permitiu o desenvolvimento de tratamentos para a TB que progrediu positivamente até aos anos 80, altura em que reemergiu devido à sua associação com o vírus do HIV. Atualmente, o maior obstáculo à cura da TB deve-se à resistência de *M. tuberculosis* a antibióticos devido ao fato da sua parede celular ser maioritariamente constituída por lípidos (que formam uma barreira impermeável e resistente à introdução de antibióticos na parede) assim como à sua estratégia de impedir a maturação do fagossoma.^{3,13,17}

Aquando da inalação da micobactéria, esta é fagocitada pelos macrófagos alveolares. A sobrevivência da bactéria no seu interior está diretamente relacionada com a secreção de proteínas tirosina fosfatase (PTPs) no citosol do macrófago, uma vez que estas proteínas interferem na sinalização celular mediada por fosforilação/desfosforilação de resíduos de tirosinas. Após a formação do fagossoma, o complexo ATPase macrófago-vacuolar-H⁺ (V-ATPase) é recrutado para proceder à acidificação do interior do fagossoma tornando o meio propício à ação das enzimas digestivas. É, assim, necessária a fusão da membrana do fagossoma com a do lisossoma onde o complexo V-ATPase se encontra previamente incorporado.^{2,5,18–20}

A proteína tirosina fosfatase A (PtpA) é uma das PTPs secretadas por *M. tuberculosis* que mais contribui para a sua sobrevivência. Após a formação do fagossoma, a bactéria secreta a referida proteína para o citosol do macrófago onde interage com uma subunidade do complexo V-ATPase de forma a conseguir localizar o seu substrato fisiológico: a proteína VPS33B (*Human Class C Vacuolar Protein Sorting*). A VPS33B tem como função a promoção da ancoragem e fusão de vesículas com membranas alvo e a sua desfosforilação impede a fusão entre o fagossoma e o lisossoma não possibilitando a maturação do primeiro e, conseqüentemente, a eliminação da bactéria pelos macrófagos. O mecanismo de ação da proteína PtpA encontra-se esquematizado na Figura 1.2.^{3,5,21}

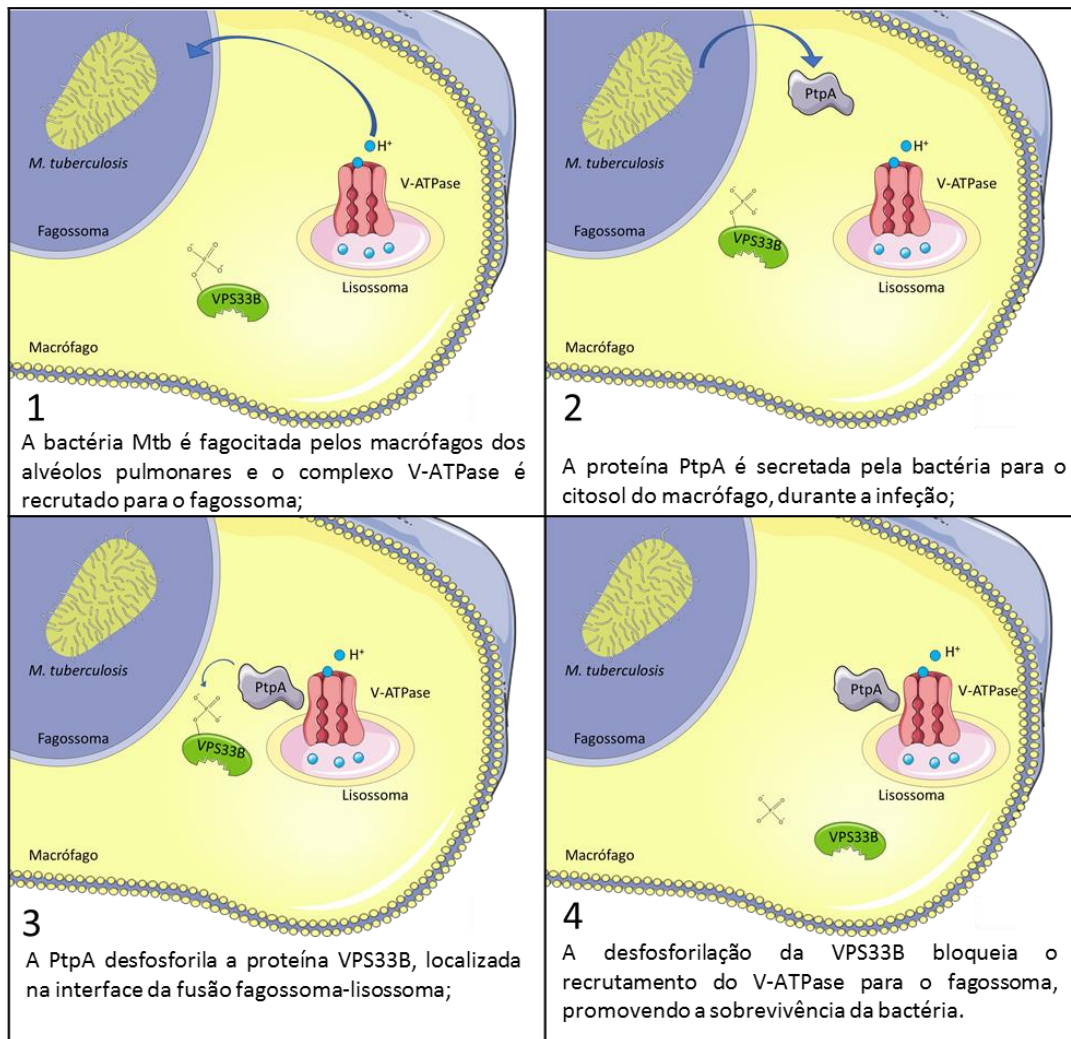


Figura 1.2- Esquema representativo do mecanismo de ação da proteína PtpA. Imagem elaborada pela autora.

Uma vez que a compreensão dos mecanismos de sobrevivência de *M. tuberculosis* é essencial para compreender a patogênese da tuberculose, têm sido desenvolvidos estudos no sentido de se identificar outros substratos da proteína PtpA. Estudos preliminares recentemente publicados sugerem que a proteína PtpA evita a apoptose dos macrófagos nos estágios iniciais da infecção devido à desfosforilação da proteína GSK3 α (*Glycogen Synthase Kinase 3*). A morte da célula hospedeira teria como consequência a morte de *M. tuberculosis* antes da propagação da infecção por outras células.^{20,22}

Visto que a ação da PtpA é considerada essencial à sobrevivência de *M. tuberculosis*, esta é considerada um alvo bastante promissor para o desenvolvimento de novos fármacos anti-tuberculose. Por outro lado, sendo a PtpA secretada para o citosol do macrófago, a ação dos fármacos não implica que estes atravessem a parede da micobactéria, mas apenas a do macrófago, contornando o obstáculo da impermeabilidade da parede celular da *M. tuberculosis*. A ação dos fármacos permitiria a reativação das vias de sinalização das células de defesa afetadas, possibilitando que estas combatessem a micobactéria englobada.^{2,18}

1.3 PtpA de *M. tuberculosis*

A PtpA pertence à família das proteínas tirosina fosfatases de baixa massa molecular (LMW-PTPs, do inglês *Lower Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatases*) apresentando uma massa molecular de 20 kDa. A sua estrutura cristalográfica apresenta apenas um domínio, típico das LMW-PTPs, constituído por quatro folhas β paralelas centrais, rodeadas por hélices α de ambos os lados (Figura 1.3). O centro ativo localiza-se entre a região C-terminal da primeira folha β e a região N-terminal da primeira hélice α .^{2,6}

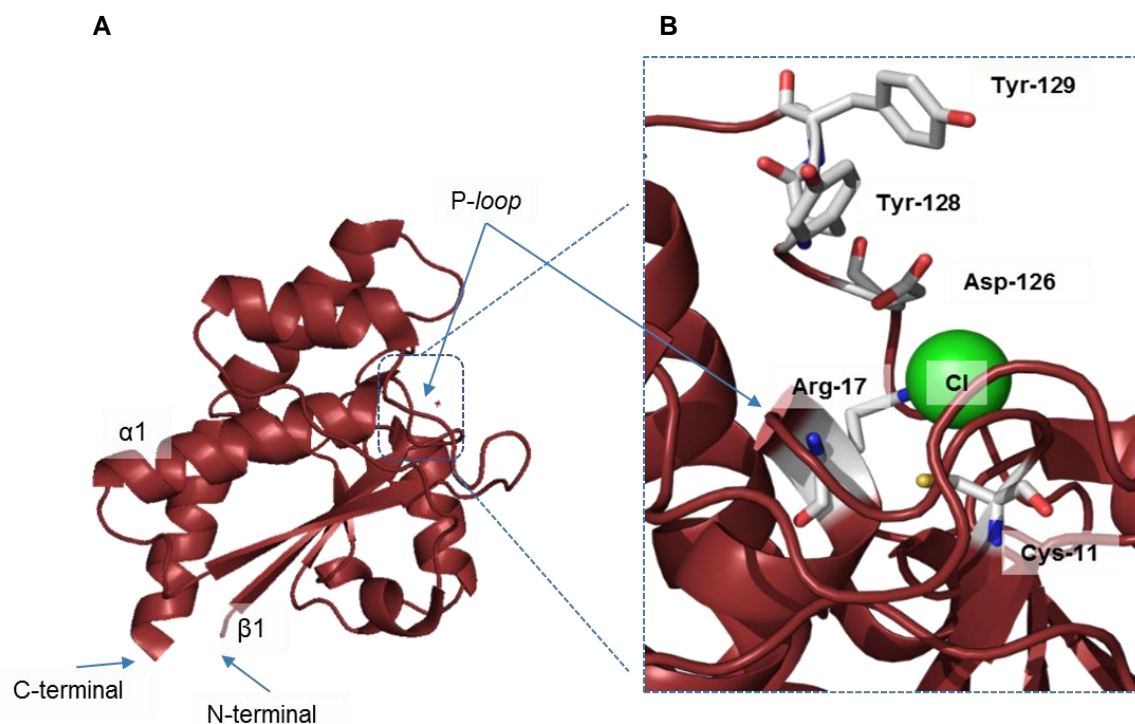


Figura 1.3- A - Estrutura cristalográfica da PtpA a 1,9 Å de resolução (PDB: 1U2P). B - Centro ativo da PtpA, com os aminoácidos envolvidos na reação enzimática representados em "ball & stick". Imagem elaborada pela autora, com recurso ao Pymol.⁶

O centro ativo desta proteína, que compreende o *loop* típico das LMW-PTPs (resíduos 11 a 18), localiza-se numa cavidade central da proteína, rodeado principalmente por resíduos aromáticos e hidrofóbicos, tais como Trp48, His49, Tyr128 e Tyr129. O resíduo Arg17 está envolvido no reconhecimento e ligação de substratos fosforilados sendo que o resíduo Cys11, localizado no centro ativo, atua como nucleófilo. Segundo o mecanismo atualmente aceite, o átomo de enxofre da Cys11 ataca o grupo fosfato ligado a uma tirosina da proteína substrato (fosfotirosina, pTyr), enquanto que, simultaneamente, o aspartato Asp126 doa um próton à proteína que acaba de ser desfosforilada, (restabelecendo a forma protonada da tirosina). O ciclo catalítico completa-se quando o Asp126 abstrai um próton de uma molécula de água, produzindo um ião hidróxido que por sua vez ataca o grupo fosfato e induz a libertação de fosfato inorgânico, restaurando a cisteína catalítica. O mecanismo reacional encontra-se esquematizado na Figura 1.4.^{5,23}

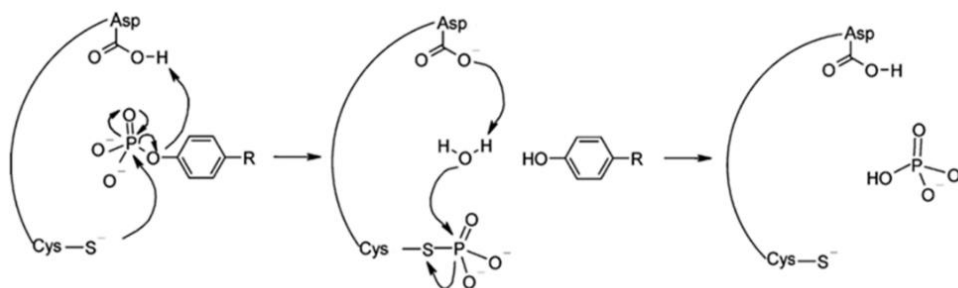


Figura 1.4- Mecanismo da reação catalítica das PTPs. Imagem adaptada⁵

A cisteína e a arginina catalíticas localizam-se num *loop*, denominado *P-loop*, que orienta o grupo fosfato para o local de ataque nucleofílico. Além disso, o aspartato catalítico encontra-se num *loop* flexível que se dobra sobre o sítio ativo durante a interação com o substrato. Este mesmo *loop* contém também resíduos de tirosina, Tyr128 e Tyr129, que contribuem para o reconhecimento do substrato ao estabelecer ligações π com o anel aromático da fosfotirosina.^{5,23}

1.4 Inibidores da proteína tirosina fosfatase A (PtpA)

O grande desafio quanto à inibição de fosfatases produzidas por microrganismos patogênicos trata-se da seletividade da inibição uma vez que os seus potenciais inibidores poderão interferir com fosfatases essenciais ao funcionamento do organismo humano. Relativamente à proteína PtpA, as chalconas (Figura 1.5), cetonas aromáticas α,β -insaturadas pertencentes à família dos flavonoides, têm sido descritas como moléculas promissoras para o desenvolvimento de inibidores seletivos.^{7,8,14}

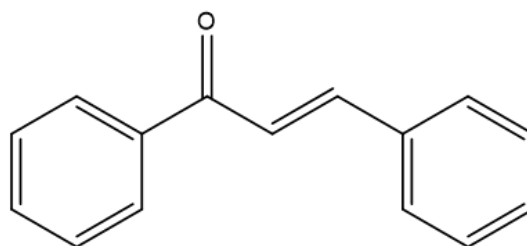


Figura 1.5- Estrutura de uma chalcona. Imagem elaborada pela autora com recurso ao ChemDraw.

Em particular, as naftilchalconas, têm demonstrado significativa atividade inibitória do crescimento de *M. tuberculosis* em macrófagos infetados. Os grupos metoxil e naftil parecem ter contribuições específicas no mecanismo de inibição. Os grupos metoxil contribuem para uma inibição efetiva da PtpA por interações de hidrogénio com os resíduos catalíticos. Por sua vez, os grupos naftil estabelecem interações hidrofóbicas com resíduos próximos do centro ativo, promovendo a orientação dos inibidores no interior da cavidade catalítica, como observado na Figura 1.6.^{5,7,24}

Porém, até à data não existem dados estruturais que mostrem a interação desta classe de compostos com PtpA, apenas dados de *docking* molecular (Figura 1.6) onde se procedeu a uma previsão da interação da PtpA de *M. tuberculosis* com moléculas da família das chalconas.⁷

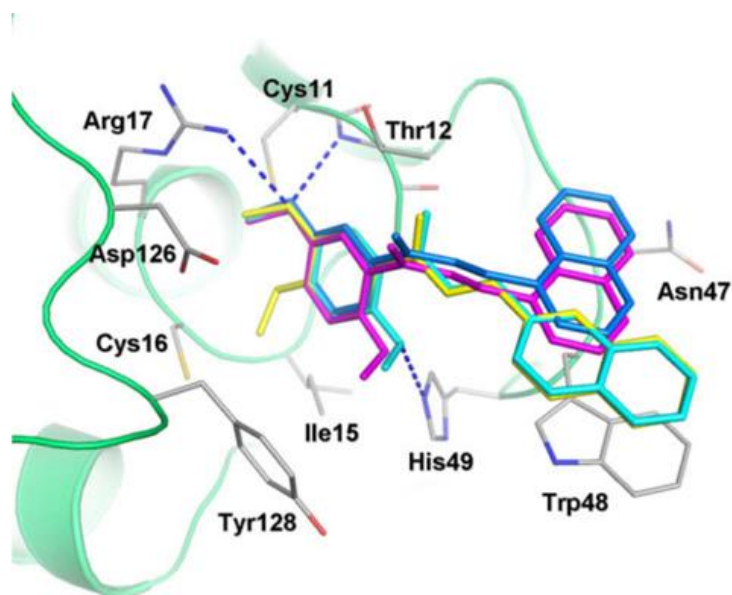


Figura 1.6- Previsão da interação entre chalconas e a PtpA, por *docking* molecular, onde se observa a interação dos grupos metoxil no centro ativo da proteína. Imagem adaptada⁷

No presente trabalho, propõe-se o estudo da interação entre a proteína PtpA e quatro ligandos da família das chalconas e dois da família das tiosemicarbazonas (Figura 1.7) sintetizados e fornecidos pelo laboratório do professor Hérnan Terenzi e colaboradores da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil (Tabela 1.1).

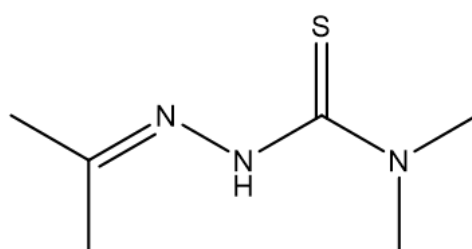
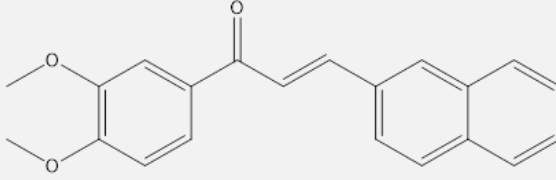
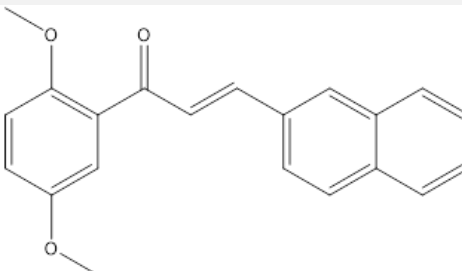
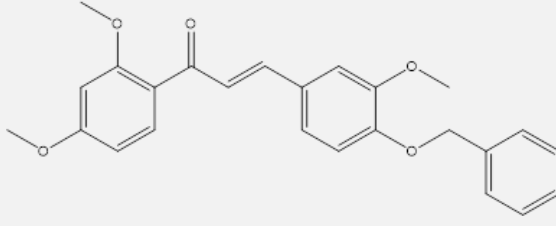
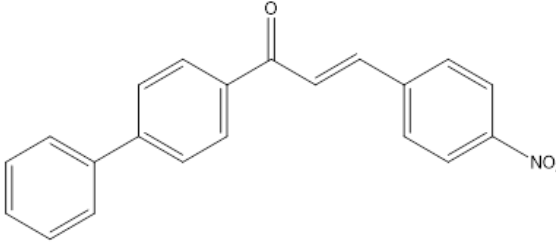
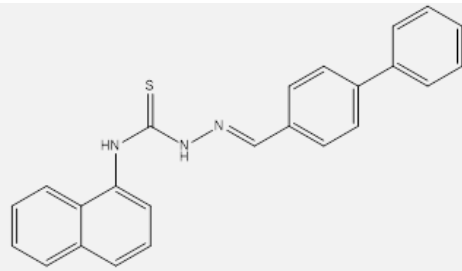
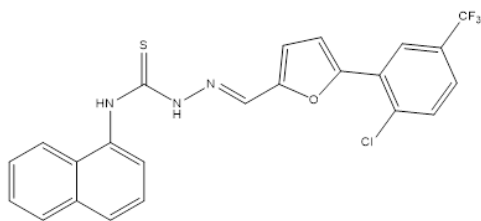


Figura 1.7- Estrutura de uma tiosemicarbazona. Imagem elaborada pela autora com recurso ao ChemDraw.

Tabela 1- Compostos da família das chalconas (C33, C37, R6, Je02) e das tiosemicarbazonas (Lap04, Lap11) e o seu efeito inibitório. A tabela contém dados publicados e não publicados.

Código	Estrutura e nome IUPAC	Massa Molecular (g/mol)	IC ₅₀ na PtpA (μM)	Ki (μM)
C33	 <p>(E)-1-(3,4-dimetoxilfenil)-3-(naftalen-2-il)prop-2-en-1-ona</p>	381,13	23,1±1,6 ⁸	4,9±1,0
C37	 <p>(E)-1-(2,5-dimetoxilfenil)-3-(naftalen-2-il)prop-2-en-1-ona</p>	318,13	8,4±0,9 ⁸	5,4±1,4
R6	 <p>(E)-3-(4-(benziloxy)-3-metoxilfenil)-1-(2,4-dimetoxilfenil)prop-2-en-1-ona</p>	404,16	15,1±4,2 ⁴	12±1,0 ⁴
JE02	 <p>(E)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona</p>	329,11	3,05±0,06	nd
Lap4	 <p>(E)-2-([1,1'-bifenil]-4-il-metileno)-N-(naftaleno-1-il)hidrazina-1-carbotoamida</p>	381,13	7,4±2,8	nd

Lap11



473,06

2,9±1,7

nd

(E)-2-((5-chloro-2-(trifluoromethyl)phenyl)furan-2-yl)methylene)-
N-(naphthalen-1-yl)hydrazine-1-carboxamide

Os estudos de interação entre estes compostos e a proteína PtpA focaram-se na utilização das técnicas estruturais de cristalografia de proteínas e dispersão de raios-X a baixo ângulo (SAXS, do inglês *Small Angle X-Ray Scattering*), em estudos de cinética enzimática e na utilização das técnicas biofísicas de *Thermal Shift Assay* (TSA), calorimetria de titulação isotérmica (ITC, do inglês *Isothermal Titration Calorimetry*) e termoforese em microescala (MST, do inglês *Microscale Thermophoresis*).

2 Técnicas Utilizadas

2.1 Cristalografia de proteínas - difração de raios-X

Com o avançar da ciência e tecnologia, foram desenvolvidas diversas técnicas de resolução estrutural de proteínas, como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Microscopia Eletrônica a Temperatura Criogénica (Crio-EM, do inglês *Cryo-Electron Microscopy*). Porém, a cristalografia de raios-X é a técnica com maior sucesso e aplicabilidade na geração de informações necessárias à criação de modelos tridimensionais de estruturas de proteínas, assim como de outras macromoléculas.²⁵ Em 2017, foram depositadas 11121 estruturas proteicas no PDB sendo que 10121 foram conseguidas através da técnica de cristalografia de raios-X.²⁶

2.1.1 A radiação X

Pelas mãos de Wilhelm Röntgen a descoberta dos raios-X, em 1895, provocou uma revolução na física e na medicina. O físico alemão estudava o fenómeno da luminescência produzida por raios catódicos, utilizando um tubo de *Crookes* que se encontrava envolvido por uma caixa com um filme negro no seu interior e guardada numa câmara escura para assim conseguir visualizar o fenómeno. Röntgen percebeu a ocorrência de emissão de luminosidade numa película coberta de platinocianeto de bário, próxima da caixa. Ao colocar a sua mão sobre o tubo, o físico alemão observou a projeção dos seus ossos na tela fluorescente concluindo que se tratava de uma nova forma de radiação que, por ignorar a sua natureza, denominou de “raios X”.²⁷⁻²⁹ Wilhelm Röntgen foi premiado com o primeiro prémio Nobel da Física, em 1901, por esta mesma descoberta.³⁰

A radiação X é de natureza eletromagnética (Figura 2.1) pelo que, devido às suas características ondulatórias, pode sofrer efeitos de interferência, polarização, refração, difração e reflexão, entre outros. De comprimento de onda de 0,1 a 100 Å, é da mesma ordem de grandeza que as distâncias interatómicas.²⁸

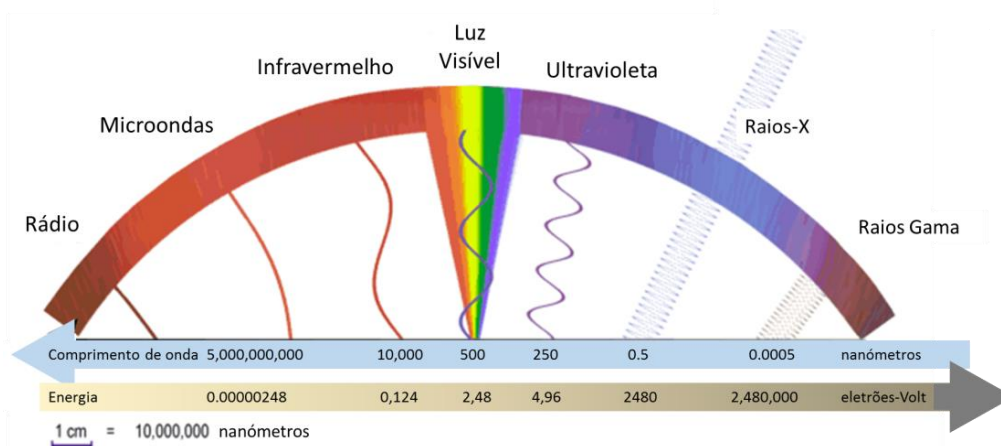


Figura 2.1- Espectro eletromagnético. Imagem adaptada.³¹

A radiação X é comumente produzida recorrendo ao tubo de *Coolidge* ou ao tubo de ânodo rotativo. Um filamento, no cátodo, é aquecido e gera um feixe de elétrons que é acelerado e colide com o ânodo - um alvo metálico como o cobre (Cu) ou o molibdênio (Mo). Esta colisão pode expulsar elétrons das orbitais internas do metal para orbitais externas (Figura 2.2 A). Quando os elétrons ejetados transitam novamente da orbital externa para uma orbital interna, ocorre libertação de energia, sob a forma de radiação X (Figura 2.2 B) cujo comprimento de onda depende do material do ânodo. Esta radiação é emitida em todas as direções e é menos intensa que a radiação produzida por um sincrotrão.³²

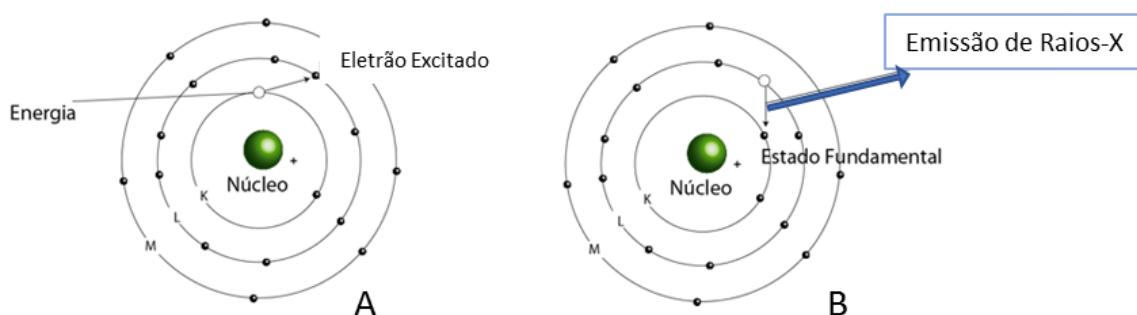


Figura 2.2- Representação esquemática da produção de radiação-X. A- Após a colisão de elétrons contra o alvo metálico, ocorre a expulsão de um elétron para um nível de energia superior. B- Quando o elétron transita novamente para o estado fundamental, ocorre libertação de energia sob a forma de radiação X. Imagem adaptada.³³

No sincrotrão (Figura 2.3), a produção do feixe de elétrons ocorre de forma semelhante ao funcionamento do tubo de raios catódicos. Após a sua produção, os elétrons são disparados para um acelerador de partículas linear (LINAC do inglês *Linear Particle Accelerator*) sendo depois impulsionados para um pequeno anel onde percorrem uma trajetória circular. O feixe de elétrons adquire, desta forma, aceleração centrípeta e é ejetado do pequeno anel para o anel principal, onde é cercado por ímanes. Os elétrons são acelerados em seções retas, por campos magnéticos e, ao alcançar os ímanes, o feixe é forçado a dobrar, emitindo radiação X que é direcionada para utilização nas linhas de trabalho.³⁴

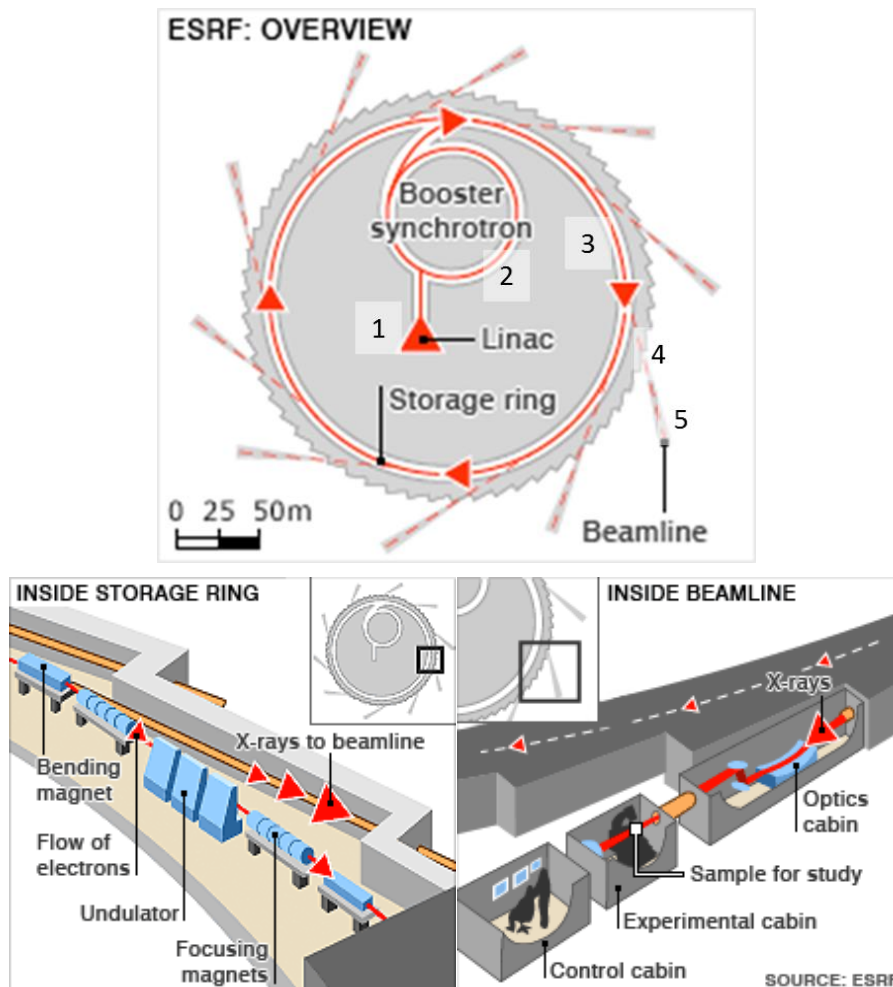


Figura 2.3- Representação esquemática do sincrotrão do ESRF: 1- LINAC, 2- pequeno anel, 3- anel principal, 4- saída da radiação, 5- linha de trabalho. Imagem adaptada.³⁵

2.1.2 Estrutura cristalina

Em 1912, o físico alemão Max von Laue demonstrou que os cristais de sal inorgânicos têm a capacidade de difratar raios-X. Este fenômeno é possível uma vez que o comprimento de onda, λ , dos raios-X é da mesma ordem de grandeza que as distâncias interatômicas presentes no cristal. Um cristal consiste numa estrutura sólida, internamente ordenada e periódica no espaço tridimensional, constituída por unidades idênticas que se repetem infinitamente em toda a sua estrutura – as células unitárias (Figura 2.4 B). A célula unitária é caracterizada por três vetores (a , b , c) e três ângulos (α , β , γ) representados na Figura 2.4 A.^{28,36}

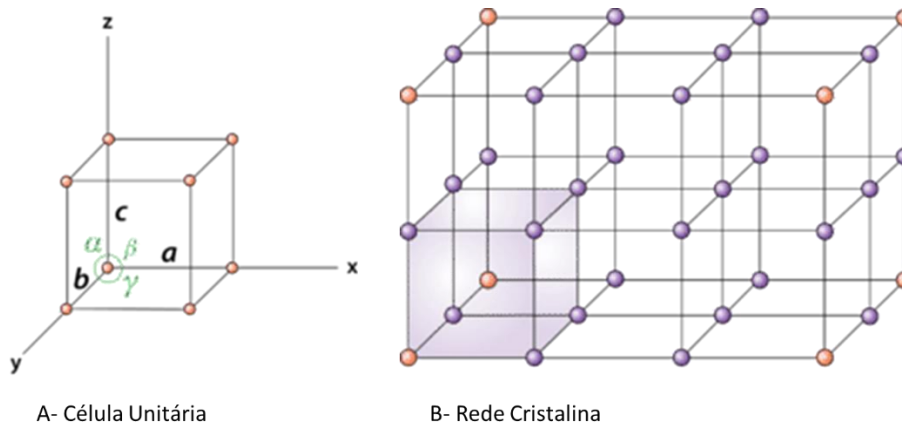


Figura 2.4- Célula unitária e rede cristalina. A- Representação da célula unitária que compõe a rede cristalina de um cristal. B- A rede cristalina resulta de operações de translação da célula unitária. Imagem adaptada.³⁷

A célula unitária pode conter uma ou mais unidades assimétricas. A unidade assimétrica trata-se da menor parte da estrutura cristalina a partir da qual, por aplicação de operações de simetria, se obtém a célula unitária. A este conjunto de operações de simetria, que possibilita a conversão da unidade assimétrica num padrão infinito de repetição regular, dá-se o nome de grupo espacial. Existem 230 modos distintos de empacotar moléculas tridimensionalmente, por forma a construir uma rede cristalina, e, por isso, existem 230 grupos espaciais diferentes. No caso de proteínas, este número reduz-se a 65 uma vez que a quiralidade dos aminoácidos não permite a sobreposição da sua imagem do espelho à original (operações de reflexão e inversão) reduzindo as possibilidades de simetria.^{38,39}

Os grupos espaciais podem ser agrupados em sete sistemas cristalinos, nos quais se pode identificar catorze tipos diferentes de células unitárias – redes de Bravais. A orientação dos planos cristalográficos definidos numa rede de Bravais é dada pelos Índices de Miller, h , k e l .

2.1.3 Resolução da estrutura

Após Laue ter providenciado a explicação física para o fenómeno de difração observado quando a radiação X incide numa estrutura cristalina, foi o trabalho dos físicos William Henry Bragg e William Lawrence Bragg que permitiu o desenvolvimento da equação, denominada lei de Bragg, que permite extrair informação estrutural do padrão de difração resultante da difração dos raios-X.^{30,40}

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta$$

Esta equação indica que quando um feixe de radiação de comprimento de onda λ , incide sob um conjunto de planos atômicos paralelos, de índices hkl , e de espaçamento interplanar d_{hkl} , ocorre interferência construtiva quando o ângulo de difração relativamente ao plano considerado,

θ , é de igual valor ao ângulo do feixe de radiação incidente, e a diferença no percurso percorrido pelas ondas difratadas é um múltiplo inteiro do comprimento de onda (Figura 2.5).^{28,39}

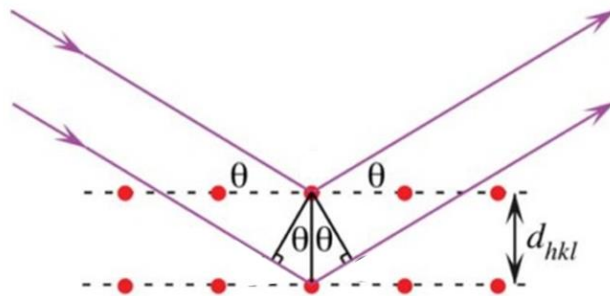


Figura 2.5- Representação da Lei de Bragg, onde se encontra esquematizado os ângulos incidentes e de difração, e a distância interplanar. Imagem adaptada.⁴¹

Segundo a lei de Bragg, o padrão de difração formado no detetor resulta das interferências construtivas das ondas difratadas pelos átomos do cristal, designadas de reflexões, produzindo um padrão característico da estrutura interna do mesmo. As reflexões são caracterizadas por três grandezas: amplitude, F , comprimento de onda, λ , e fase, α (Figura 2.6).

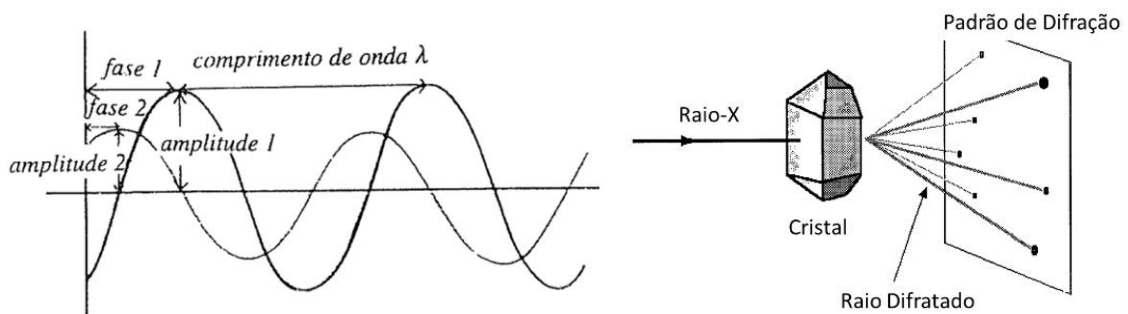


Figura 2.6- Representação de uma onda, e da difração da mesma ao incidir sobre um cristal. Imagem adaptada.³⁶

As reflexões podem ser descritas matematicamente como uma série de Fourier, através da equação dos fatores de estrutura, F_{hkl} (onde V representa o volume da célula unitária). O espaçamento entre as células unitárias do cristal, a rede real, é inversamente proporcional ao espaçamento das reflexões no detetor, a rede recíproca, e aplicando uma transformada de Fourier (FT) torna-se possível, a partir dos fatores de estrutura, calcular o mapa de densidade eletrônica, $\rho(x,y,z)$.^{36,38,39}

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

Experimentalmente, obtém-se a amplitude de cada reflexão a partir da intensidade medida, I_{hkl} , juntamente com os respetivos erros associados, σ_{hkl} . Contudo, a experiência não permite a determinação das fases das ondas que atingem o detetor, impossibilitando a obtenção do mapa de densidade eletrónica. Torna-se necessário resolver o chamado Problema da Fase estimando matematicamente os ângulos da fase de cada reflexão medida. No caso de proteínas, os métodos mais convencionais são o de Dispersão Anómala Simples (SAD, do inglês *Single Wavelength Anomalous Dispersion*) ou Dispersão Anómala Múltipla (MAD, do inglês *Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*) onde se recolhe conjuntos de dados a um único comprimento de onda (SAD) ou a diferentes comprimentos de onda (MAD) tendo por base a difração anómala de elementos presentes na proteína (átomos pesados, S e Se são os mais comuns); Substituição Isomórfica Múltipla (MIR, do inglês *Multiple Isomorphous Replacement*) em que se inserem átomos pesados na estrutura cristalina; ou, por fim, o método de Substituição Molecular (MR, do inglês *Molecular Replacement*), que se aplica quando se conhece previamente uma estrutura semelhante à de interesse.^{36,42}

O método de MR, como referido, consiste em utilizar a estrutura de uma molécula homóloga, ou com uma estrutura similar à de interesse, para se obter informações sobre as fases da estrutura desconhecida. Este método é particularmente vantajoso para a resolução de estruturas de proteínas incubadas com ligandos quando se conhece a estrutura da proteína nativa uma vez que esta poderá servir de modelo para o complexo proteína-ligando. Primeiramente emprega-se uma função de rotação para se encontrar a orientação relativa da estrutura modelo na célula unitária da nova estrutura. Em seguida, procura-se colocar ambos os modelos na mesma orientação translacional de modo a se conseguir o posicionamento correto da estrutura conhecida na célula unitária da de interesse. Uma vez obtida a posição do modelo podem calcular-se as fases das ondas difratadas e o primeiro mapa de densidade eletrónica, $\rho(x,y,z)$, que geralmente se encontra incompleto e contém erros. Torna-se assim necessário proceder-se ao refinamento da estrutura.^{36,42,43}

2.1.4 Refinamento e validação da estrutura

O refinamento de uma estrutura é um processo iterativo que tem como objetivos a minimização da diferença entre as amplitudes observadas (F_{obs}) e as calculadas com base no

modelo (F_{calc}), assim como a criação de um modelo, o mais correto possível, que permita a interpretação do mapa de densidade eletrônica.⁴⁴

A qualidade do refinamento quanto aos erros gerais do modelo pode ser avaliada pelo fator R, parâmetro que traduz a concordância entre o modelo construído e os dados experimentais obtidos, de acordo com a seguinte fórmula:

$$R = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$$

Quanto menor for o valor de R, maior a proximidade entre os valores de F_{obs} e F_{calc} .

Outro parâmetro que descreve os erros globais do modelo, e igualmente importante, é o R_{free} , determinado analogamente ao fator R, mas utilizando uma fração das reflexões, entre 5-10 %, não contabilizadas para o processo de refinamento. A comparação entre o fator R e o R_{free} permite identificar problemas de interpretação do modelo. Se a diferença entre estes dois parâmetros exceder os 5 %, pode indicar erros de interpretação do mapa.

Para uma análise local do modelo construído, é necessário considerar-se o fator de temperatura, ou fator B, que traduz a oscilação de um átomo relativamente à sua posição. Este parâmetro permite identificar as zonas mais desordenadas do modelo (como muitas vezes *loops* à superfície da proteína, C e N-terminal) mas também possibilita a deteção de erros locais no modelo, uma vez que, quando um átomo se encontra mal posicionado, o seu fator B assume valores muito superiores quando comparado com os átomos que o rodeiam.

Uma vez concluído o processo de refinamento, procede-se à validação, onde se recorrem a diversos critérios, como a geometria do modelo, que permitem avaliar os resultados de análise estrutura para que o modelo final possa então ser depositado na base de dados *Protein Data Bank* (PDB).

2.1.5 *Cristalização de proteínas*

A aplicação da técnica de cristalografia de raios-X ao estudo estrutural de macromoléculas biológicas tornou-se possível cerca de 30 anos depois dos físicos W. H. e W. L. Bragg serem premiados com o prémio Nobel da Física pelo contributo para o desenvolvimento da análise estrutural de cristais por raios-X, em 1915.⁴⁵

Em 1946, o químico americano James Batcheller Sumner ganhou o prémio Nobel da Química pela descoberta de que as enzimas podem ser cristalizadas. As primeiras estruturas proteicas a serem resolvidas por cristalografia de raios-X foram a da hemoglobina e mioglobina, em 1956, pelo biólogo molecular austríaco Max Perutz e pelo químico britânico John Kendrew, respetivamente. Ambos ganharam o prémio Nobel da Química de 1962 pelos estudos estruturais de proteínas globulares.⁴⁶

Para a determinação da estrutura tridimensional de uma proteína através da técnica de cristalografia de raios-X, é crucial que se obtenham cristais da mesma. A elevada pureza da

macromolécula, assim como a sua homogeneidade, são alguns dos pré-requisitos a ter em consideração aquando da preparação da amostra que se pretende cristalizar.^{36,47,48}

A estratégia para a cristalização de uma macromolécula consiste em produzir lentamente uma solução sobressaturada da proteína favorecendo-se as condições necessárias ao ordenamento das moléculas numa rede cristalina. A técnica mais comumente usada para o efeito designa-se por difusão de vapor. No caso do método de gota suspensa (Figura 2.7), consiste em misturar uma gota de solução de proteína e uma de solução precipitante numa lamela e incubar num reservatório contendo a solução precipitante. Desta forma, é provocada a transferência de água da gota de proteína para o reservatório. Tratando-se de um sistema fechado, uma vez atingido o equilíbrio, ou seja, à medida que a concentração de precipitante no reservatório iguala a da gota, ocorre a concentração da proteína e poderá verificar-se a formação de material cristalino.^{36,44,48}

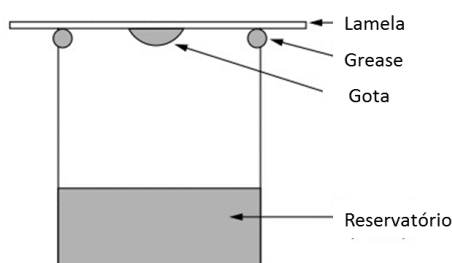


Figura 2.7- Técnica de cristalização por difusão de vapor, método da gota suspensa, normalmente utilizadas para os ensaios de cristalização realizados manualmente. Imagem adaptada.⁴⁸

O processo pode ser ilustrado por um diagrama de fases (Figura 2.8), onde é possível distinguir quatro regiões principais: zona metaestável, nucleação, precipitação e separação de fases. A cristalização da proteína ocorre entre a zona metaestável e a região de nucleação.

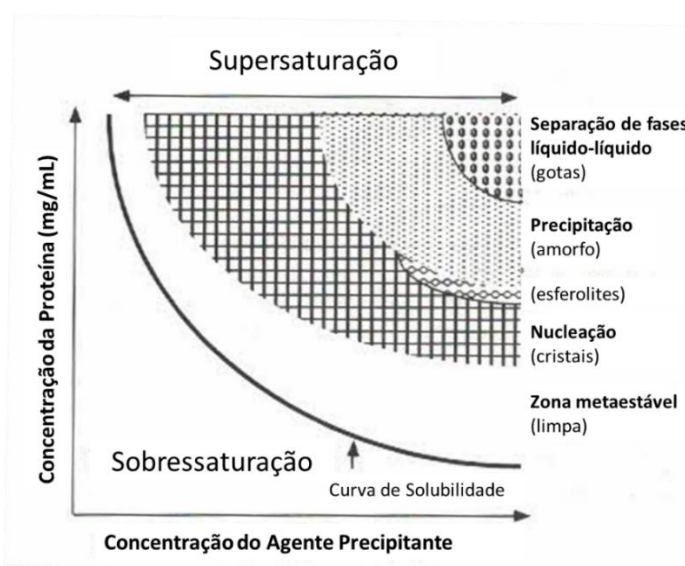


Figura 2.8- Diagrama de fases para o processo de cristalização de proteínas. O processo inicia-se na região não-saturada, evoluindo para a região de nucleação devido à evaporação de água da gota que provoca um aumento na concentração de proteína. Imagem adaptada.³²

Encontrar condições de cristalização é um processo único para cada proteína podendo ser um procedimento extremamente complexo e demorado. Devido à sua flexibilidade conformacional e versatilidade química, as proteínas detêm uma grande sensibilidade às condições de cristalização. As pontes de hidrogénio entre os átomos à superfície da molécula são as principais forças que mantêm a integridade dos cristais de proteína. Estas ligações são mediadas por moléculas de água, originando estruturas pouco compactas com cavidades e canais preenchidos com solvente, que chegam a ocupar 40 a 60 % do volume do cristal, causando a sua extrema fragilidade.^{36,48}

Para determinar as condições de cristalização de uma proteína geralmente começa-se por se recorrer a ensaios de varrimento (*screening*) onde se testam diferentes soluções de cristalização e diferentes concentrações de proteína. Nestes ensaios empregam-se uma série de concentrações de aditivos e agentes precipitantes – tipicamente sais, álcoois de baixo peso molecular e polietilenoglicóis (PEG) – além da variação dos valores de pH das soluções e de temperatura, vulgarmente entre 4º e 20 °C. Após a determinação das condições de cristalização de uma proteína, é normalmente necessário a sua otimização para a obtenção de cristais de boa qualidade de difração.^{36,44}

2.1.5.1 *Co-cristalização e soaking*

A técnica de cristalografia de raios-X, para além de informações estruturais da proteína de interesse, pode ser também aplicada para o esclarecimento, a nível atómico, da interação entre a proteína e um determinado ligando sendo uma técnica crucial para o desenvolvimento de novos fármacos. Para tal, é necessária a obtenção de cristais do complexo proteína-ligando, podendo-se recorrer a dois métodos alternativos: co-cristalização e *soaking*.⁴⁹⁻⁵¹

No método de co-cristalização, o ligando é incubado com a proteína e ambos são cristalizados em conjunto. Geralmente, este é o procedimento escolhido quando os ligandos são pouco solúveis ou quando a proteína apresenta fraca estabilidade. É também o método com maior sucesso na produção de cristais de proteína incubada com outras macromoléculas por se tratar de ligandos volumosos. A incubação da proteína com o ligando pode alterar as condições de cristalização da proteína nativa, nomeadamente por alterar a homogeneidade da solução, pelo que é frequentemente necessário recorrer a novos ensaios de *screening* para se encontrar novas soluções de cristalização. Após a descoberta das novas condições, é necessário proceder à otimização das mesmas. Por estes motivos, a co-cristalização requer mais recursos, quer de tempo quer de material, do que o método de *soaking*.^{39,42,49,50}

O método de *soaking* consiste em adicionar uma determinada quantidade de ligando ao cristal, previamente formado, da proteína. Após a cristalização da proteína, esta mantém a sua atividade assim como a sua função catalítica pelo que o ligando, através dos canais de solvente, poderá aceder à proteína e ligar-se à mesma. Para que a técnica seja bem-sucedida, o ligando deve-se encontrar num solvente que provoque o mínimo de danos no cristal uma vez que, em casos extremos, este pode levar à dissolução do cristal. Devido à fragilidade dos cristais de

proteína, é necessário utilizar uma solução protetora, *harvesting buffer*, aquando da experiência de *soaking*, para prevenir a sua dissolução. O tempo de incubação do ligando com a proteína, assim como a concentração de ligando a utilizar, depende de uma série de fatores tais como a taxa de difusão do ligando, a temperatura e ambiente químico da experiência e o solvente utilizado para a dissolução do ligando, entre outros. O *soaking* tem como vantagem a redução de ensaios de cristalização.^{39,42,49,50}

2.2 Dispersão de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

A técnica de *small angle X-ray scattering* (SAXS) providencia informações, a baixa resolução (10-20 Å), sobre o tamanho, forma e conformação de macromoléculas assim como de complexos macromoleculares.⁵² À semelhança de outras técnicas, a amostra de proteína deve estar pura, homogénea e solúvel, sendo que a grande vantagem desta técnica comparativamente às demais, é a rapidez da experiência, desde a recolha ao processo do tratamento de dados, quando utilizada radiação de sincrotrão.^{52,53}

A experiência consiste em expor a amostra de proteína a um feixe de radiação X monocromático. A intensidade da radiação que é dispersada pelas partículas constituintes da amostra é gravada num detetor, e, por se tratar de um método de contrastes, mede-se também a intensidade da radiação dispersa pelo tampão em que a proteína se encontra. A subtração de ambos resulta no padrão de dispersão da proteína de interesse, representado sob a forma de uma curva.⁵²⁻⁵⁵ A análise da curva obtida permite determinar o tamanho da macromolécula assim como obter informações acerca da sua forma geral (Figura 2.9).

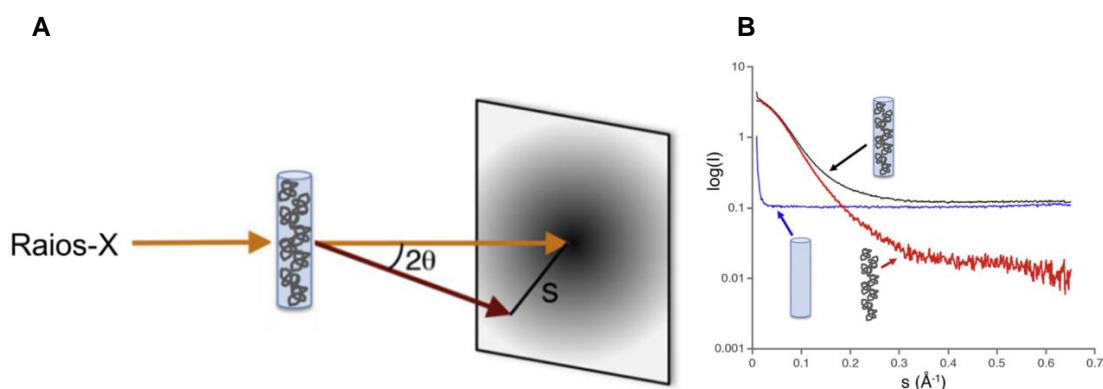


Figura 2.9- Representação da experiência de SAXS e das curvas obtidas. A – esquema da experiência de SAXS, onde se encontra representado a incidência da radiação sobre a amostra; B – representação de dados recolhidos para uma solução de proteína (a roxo), o respetivo tampão (a azul) e a diferença que contém somente a contribuição da proteína (a vermelho).⁵⁴ Imagem adaptada.

Embora a cristalografia de raios-X seja a técnica mais utilizada para a obtenção de estruturas tridimensionais de macromoléculas, a informação obtida através da técnica de SAXS é muito relevante como forma de complementar os dados estruturais. As regiões mais flexíveis da proteína podem contribuir para a obtenção de um modelo incompleto, em cristalografia, no

entanto, em SAXS, estas regiões provocam um aumento da dispersão dos raios-X, podendo-se utilizar estes dados para complementar e aprimorar o modelo tridimensional.⁵⁶

2.3 Cinética Enzimática

A cinética enzimática trata-se do estudo da velocidade das reações catalisadas por enzimas, tendo o objetivo de compreender o mecanismo de ação das mesmas.

No caso das enzimas que obedecem à equação de Michaelis-Menten, para concentrações muito baixas de substrato, a velocidade inicial da reação, V_0 , aumenta de forma linear (Figura 2.10), sendo o seu valor igual à derivada da curva formada. O aumento da concentração de substrato, leva ao aumento da V_0 , até que é atingida a saturação, muito próxima à velocidade máxima da reação. Logo, a formação de produto leva a um aumento da sua concentração em função do tempo fornecendo informações acerca da velocidade máxima da reação (V_{max}) e a constante de Michaelis (K_M) - concentração para a qual a velocidade da reação enzimática é metade da V_{max} .⁵⁷⁻⁵⁹

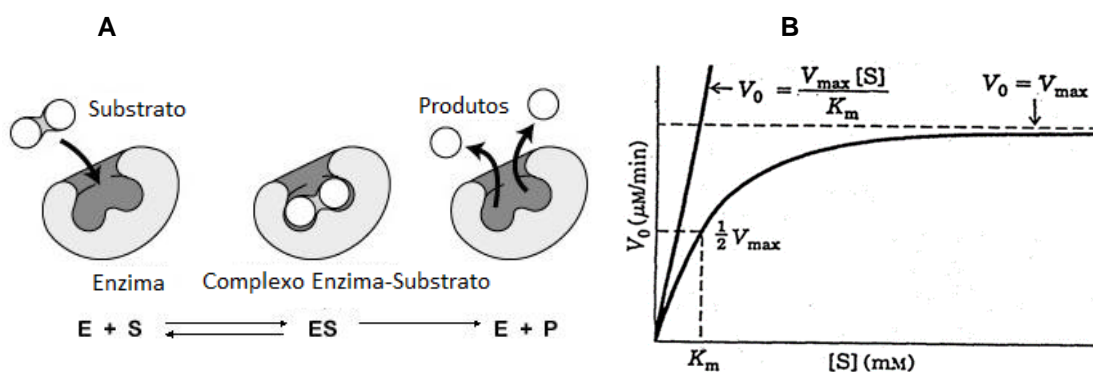


Figura 2.10- A- Esquema representativo da reação entre a enzima e o substrato. O substrato interage com o centro ativo da enzima, e ocorre a formação de produto. B- Curva de saturação para uma enzima, onde se encontra representadas a velocidade inicial, V_0 , a velocidade máxima, V_{max} e a constante de Michaelis, K_M . Imagem adaptada.⁵⁹

Quando se adicionam ligandos a este estudo, as alterações aos parâmetros acima descritos, V_{max} e K_M , permitem caracterizar uma eventual inibição, sendo os casos mais simples os da inibição do tipo competitiva e não competitiva. No caso da interação entre a proteína e os ligandos em estudo ser do tipo competitiva, os inibidores competem diretamente com o substrato pelo sítio ativo da proteína. Como consequência, o efeito desta ligação diminui o valor de K_M mas a velocidade máxima da reação mantém-se. Se a inibição ocorrer devido a uma ligação num lugar da enzima diferente do centro ativo, ou seja, se a reação for não-competitiva ou alostérica, a enzima não consegue catalisar sua reação para produzir um produto, pelo que o valor de V_{max} diminui, mas o valor de K_M não sofre alterações.⁵⁹

2.4 Thermal Shift Assay (TSA)

A técnica de TSA permite identificar as condições de maior estabilidade de uma proteína. A importância desta informação prende-se com a necessidade de prevenção da desnaturação da proteína aquando do seu armazenamento e da sua aplicação em técnicas biofísicas ou ensaios de cristalização. A estabilidade da proteína é afetada pelo solvente em que esta se encontra – devido ao tampão utilizado, o pH do meio e a força iónica – a temperatura, e também pela presença de pequenas moléculas que se podem ligar à proteína de forma específica ou inespecífica, os ligandos. Uma vez que os ligandos podem estabilizar a proteína, a técnica de TSA pode ser utilizada para estudar as interações entre ligandos e proteínas, complementando as informações obtidas por outros métodos.^{60,61}

A técnica de TSA consiste em incubar a proteína com um fluoróforo de natureza hidrofóbica, pelo que não exibe efeito de fluorescência quando se encontra em soluções aquosas, e induzir o aumento da temperatura. O aumento da temperatura promove a desnaturação da proteína, levando à exposição do seu núcleo hidrofóbico ao qual o fluoróforo se liga emitindo fluorescência. Na Figura 2.11 pode-se observar um exemplo da curva de fusão obtida por TSA. O ponto de inflexão da curva corresponde à temperatura de desnaturação – T_m , (do inglês *melting temperature*) – temperatura a que 50% da proteína se encontra desnaturada.

60,62

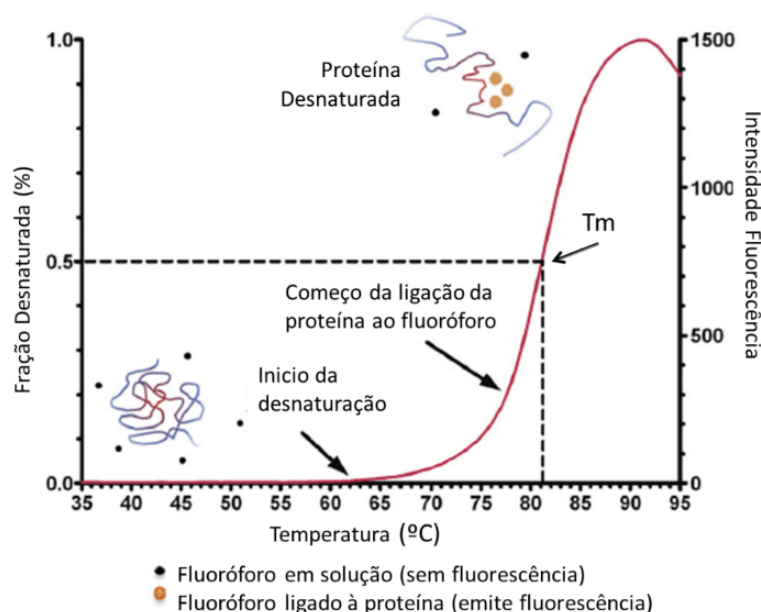


Figura 2.11- Representação de uma curva de fusão obtida pela técnica de TSA. O aumento da temperatura leva à desnaturação da proteína, e consequente ligação do fluoróforo à mesma. Imagem adaptada.⁶¹

Esta técnica é amplamente utilizada para a otimização de tampões e aditivos a usar como solventes da proteína, porém, como mencionado anteriormente, a estabilização térmica da proteína devido à sua afinidade com ligandos pode ser também avaliada através do TSA. Na presença de ligandos, a estabilidade da proteína deverá aumentar de acordo com a afinidade do

ligando para a proteína, levando a um aumento da temperatura necessária para desnaturar a proteína. Quanto maior for a afinidade do ligando para a proteína, maior será o aumento da T_m relativamente aos valores para a proteína nativa.^{60,61}

Comparativamente a outras técnicas de estudo de interações proteína-ligando, como a técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC do inglês *Isothermal Titration Calorimetry*) ou de *Saturation Transfer Difference Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (STD-NMR), o TSA demonstra ser uma técnica de menor sensibilidade. A sua vantagem relativamente às demais técnicas prende-se com o facto de requerer menor volume e concentração de proteína e de ligandos e de ter tempos de preparação e execução inferiores.

2.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A técnica de ITC é utilizada na medição da energia calorífica libertada ou absorvida durante a interação entre um determinado ligando e a enzima de interesse. Esta experiência permite a determinação da entalpia e entropia da reação, assim como a estequiometria da mesma e a constante de afinidade do ligando para a proteína.^{63,64}

Numa experiência típica de ITC, a solução de ligando, que se encontra numa seringa de injeção, é adicionada a uma solução de proteína, que se encontra numa célula reacional, durante uma experiência de titulação, e a libertação ou absorção de calor provocada pela reação é medida por termosensores (Figura 2.12). Em casos onde os ligandos/solventes destabilizam a proteína, pode ser vantajoso inverter-se a localização da proteína e do ligando, passando este último para a célula, e fazendo-se a titulação com adição de proteína.⁶³

A amostra de proteína deve-se encontrar pura, uma vez que o aparelho é extremamente sensível a flutuações de temperatura provocados por qualquer impureza presente nas amostras. A medição do calor libertado ou absorvido durante a interação entre a proteína e o ligando permite a construção de uma curva onde o ponto de inflexão corresponde à constante de afinidade. Em suma: quanto maior a diferença de calor provocada pela reação, maior a afinidade entre ambos.^{63,65}

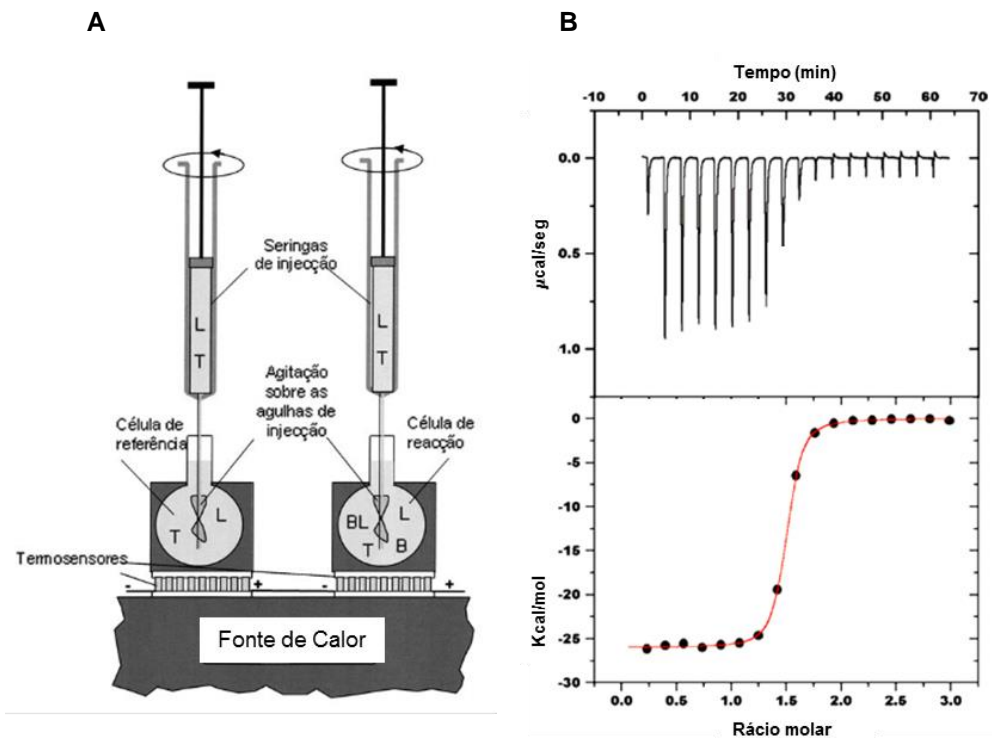


Figura 2.12- A- Esquema geral de um calorímetro isotérmico de titulação onde L, T e B representam respetivamente molécula de ligando, de tampão e de biomolécula; B- representação dos dados recolhidos durante a experiência e sua integração. Imagem adaptada.^{63,65}

2.6 Termoforese em Microescala (MST)

A técnica de termoforese em microescala (MST, do inglês *Microscale Thermophoresis*) é utilizada para medir a interação entre a proteína de interesse e ligandos, assim como a interações entre proteínas. A amostra de proteína-ligando é colocada no interior de capilares, onde a concentração de proteína se mantém constante, e a concentração de ligando diminui para cada capilar (Figura 2.13). As amostras são sujeitas a um aumento de temperatura, provocada por um laser de radiação infra-vermelha. A curva obtida é resultante da deteção do aumento de temperatura induzido em cada amostra, que será maior para as amostras em que ocorre interação entre a proteína e o ligando. É esperado que para os capilares de maior concentração de ligando se detete maior interação entre este a proteína. O resultado consiste num gráfico composto por todas as linhas obtidas para cada capilar de forma individual.^{66,67}

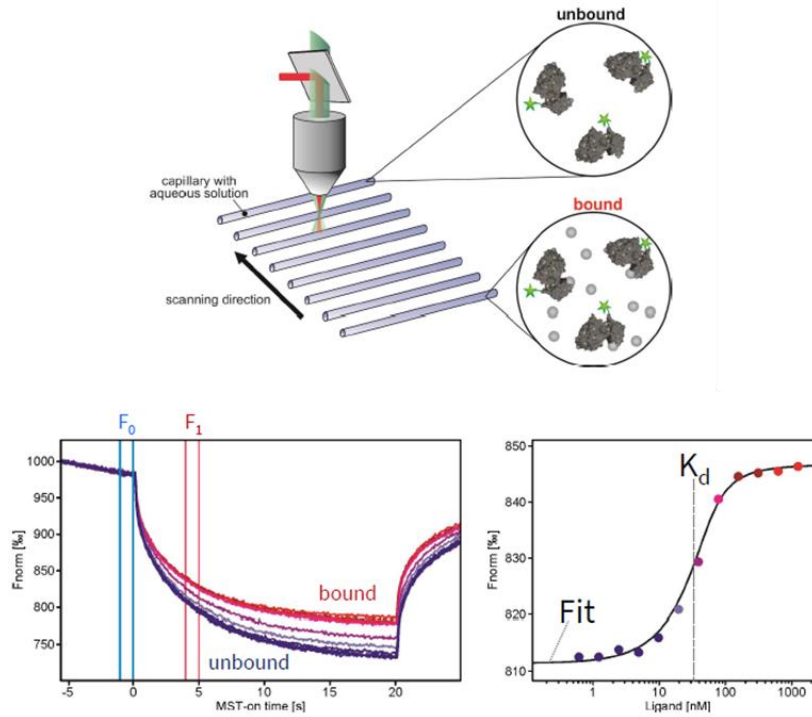


Figura 2.13- Em cima- Representação geral do funcionamento de uma experiência de MST. Em baixo - Gráfico obtido, onde o aumento da fluorescência origina diferentes linhas indicando a ocorrência de interações entre uma proteína e o ligando. Imagem adaptada.⁶⁷

3 Objetivos

A presente dissertação tem como principal objetivo contribuir para a caracterização estrutural da interação entre a proteína tirosina fosfatase A, PtpA, e um conjunto de inibidores que se presumem seletivos e específicos para esta proteína, pertencentes à família das chalconas e das tiosemicarbazonas.

Para tal é necessário sobre-expressar a proteína PtpA em *E. coli*, seguindo-se a sua purificação, por cromatografia de afinidade.

Pretende-se aplicar a técnica de cristalografia de raios-X para resolver as estruturas tridimensionais dos complexos PtpA-ligandos, utilizando seis ligandos sintetizados pelos colaboradores da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. Para esse fim, vão ser realizados ensaios de cristalização da PtpA e uma vez obtidos cristais os ligandos serão incubados, recorrendo-se à técnica de *soaking*. Os cristais serão expostos a radiação X para a recolha dos dados de difração.

Através da técnica de SAXS pretende-se complementar a informação obtida por cristalografia de raios-X acerca da conformação adquirida pela proteína na presença dos ligandos em estudo.

A aplicação de ensaios de cinética enzimática tem como objetivo a compreensão do poder inibitório dos compostos em estudo. As técnicas de TSA, ITC e MST pretendem complementar as informações obtidas pela caracterização estrutural e enzimática, ao fornecer maior conhecimento a nível bio e termofísico acerca da possível inibição da proteína PtpA.

4 Procedimento

Os procedimentos experimentais de expressão e purificação da PtpA, descritos nas seções 4.1 e 4.2, foram adaptados e otimizados a partir dos protocolos fornecidos pelo Professor Hérnan Terenzi da Universidade Federal de Santa Catarina, colaborador deste projeto, onde foi realizada a componente de biologia molecular deste trabalho, nomeadamente a escolha da estirpe bacteriana e plasmídeo, clonagem, composição dos meios e condições de crescimento.

4.1 Expressão e purificação da PtpA

Incuba-se uma colónia, previamente transformada com o plasmídeo pET28a, em 20 mL de meio de cultura LB suplementado com canamicina a 50 $\mu\text{g/mL}$, a 37 °C, com agitação a 200 rpm, durante 12 a 16 h (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Grant.bio).

Findo o tempo de incubação, transfere-se 15 mL de pré-inóculo para 500 mL de meio de cultura LB (em *erlenmeyers* de 2 L) suplementado com canamicina a 50 $\mu\text{g/mL}$. Segue-se a incubação a 37 °C, com agitação a 180 rpm, até à obtenção de uma densidade ótica, medida a 600 nm, entre 0,6 e 0,8. Induz-se com 50 μM de Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) e incuba-se a uma temperatura de 30 °C e agitação de 160 rpm durante 4 h (Shaker Weiss Gallenkamp). Terminado o período de indução, centrifugam-se as culturas durante 20 min, a uma temperatura de 6 °C e a 10000 xg (Rotor JA- 10, Avanti J-26 XPI, Beckman Coulter). Descarta-se o sobrenadante e o *pellet* obtido pode ser reservado a -80 °C para posterior purificação.

Para a purificação da proteína, primeiramente procede-se à ressuspensão do *pellet* em tampão de ligação (20 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM Imidazole, 500 mM NaCl, 10 % glicerol, 5 mM β -mercaptoetanol e 40 $\mu\text{g/mL}$ de PMSF). Lisam-se as células por sonicação (UP100H/Tip MS7, Hielscher Ultrasonics), em 10 ciclos de 1 min (ciclo de 0,5 e amplitude de 80 %), com 1 min de homogeneização entre cada ciclo. Centrifuga-se a solução obtida durante 30 min (*Centrifuge 5804 R, Eppendorf*), a 6 °C e a 16000 xg e recolhe-se o sobrenadante, sendo este posteriormente mantido em gelo.

Devido à presença da cauda de seis histidinas no N-terminal da sequência de aminoácidos da proteína, esta purifica-se por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC) utilizando um sistema de FPLC (Akta Start, GE Healthcare Life Sciences). A coluna é carregada com uma solução de níquel (HisTrap™ HP, GE Healthcare Life Sciences) e equilibra-se a mesma com o tampão A (20 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM Imidazole, 500 mM NaCl, 10 % glicerol, 5 mM β -mercaptoetanol). A proteína liga-se à coluna, devido à afinidade das histidinas para os iões de níquel, sendo seguidamente eluída através de gradiente de imidazole de 12 a 100 %, utilizando o tampão B (20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM Imidazole, 500 mM NaCl, 10 % glicerol, 5 mM β -mercaptoetanol). A eluição da proteína ocorre devido à competição do imidazole com as histidinas pela ligação ao níquel. Recolhe-se, então, a proteína em frações de 1 mL, a um fluxo de 3 mL/min, e reservam-se as frações para avaliação da sua pureza por gel SDS-PAGE, a 10 %, corado com azul de Coomassie.

Juntam-se as frações correspondentes à proteína pura, e procede-se à dessalinização para a permuta da proteína para o tampão H – 100 mM HEPES pH 7, 150 mM NaCl, 10 % glicerol, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, recorrendo a colunas de HisTrap *Dessalting*. Reserva-se a proteína a 4 °C durante a noite.

Concentra-se a proteína (Centricons Vivaspin® Turbo 15 de 10 kDa, Sartorius), em ciclos de 10 min, a 3500 xg e a 4 °C. Por último, a proteína concentrada é centrifugada durante 10 min, a uma temperatura de 4 °C e 3500 rpm (MiniSpin® Plus, Eppendorf).

4.2 Ensaio de cristalização

Primeiramente reproduziu-se as condições de cristalização obtidas previamente para a resolução da estrutura da proteína nativa, descritas na Tabela 2.⁶

Tabela 2- Condições de cristalização da proteína PtpA descritas na literatura

Código PDB	Condição de Cristalização	
1U2P ⁶	A	22 % etilenoglicol
1U2Q ⁶	B	30% PEG 4000, 200 mM acetato de amónio, 100 mM citrato trissódico dihidratado

Como forma de otimizar estas mesmas condições fez-se variar a concentração de proteína, assim como as concentrações de agentes precipitantes para ambas as condições, de acordo com o descrito nas Tabelas 3 e 4. Todos os ensaios descritos nas referidas tabelas foram realizados com a proteína em tampão H, (100 mM HEPES pH7, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM DTT, 5 mM EDTA) e no tampão utilizado aquando a cristalização da proteína da literatura (10 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM β-mercaptoetanol, 5 mM EDTA, 0,02 mM PMSF).

Tabela 3- Condições de cristalização da proteína PtpA testadas, tendo como referência a condição de cristalização A.

Condição de Cristalização A	
Concentração de proteína (mg/mL)	Concentração de etilenoglicol (%)
5	15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40
6	15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40
8	15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40
10	15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40
11	15, 18, 20, 22, 30, 40
12,4	20, 22, 24

Tabela 4- Condições de cristalização da proteína PtpA testadas, tendo como referência a condição de cristalização B.

Condição de Cristalização B			
Concentração de proteína (mg/mL)	Concentração de PEG 4000 (%)	Concentração de Acetato de amônio (mM)	Concentração de citrato trisódico dihidratado (mM)
5	25	150	50
8	30	200	100
10	35	250	150
12,4			

Os ensaios de cristalização foram realizados a 4 °C, em caixas de cristalização de 24 poços (modelo XRL da *Molecular Dimensions*), através do método de difusão da vapor em gota suspensa, onde se utilizou uma proporção de gota de 2 µL de proteína e 2 µL de solução precipitante, e um volume de 750 µL de solução precipitante no reservatório, tal como descrito na literatura.⁶ A visualização das gotas foi efetuada com recurso a uma lupa (modelo SZH10, Olympus).

Face ao não crescimento de cristais na experiência anteriormente descrita, realizaram-se ensaios de *screening*, testando-se o *screen* JCSG, JBS 1234 e o Structure 1, 2 (anexos - tabelas 1, 2 e 3), utilizando o robot de cristalização Oryx8 (Douglas Instruments). A proteína encontrava-se no tampão H a pH 8. Testou-se diferentes concentrações e temperaturas, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5- Screens de cristalização, e respetivas variações de concentração de proteína e temperatura, testados.

Screen	Concentração de proteína (mg/mL)	Temperatura (°C)
JBS 1,2,3,4	9,3	20
JCSG+	10,1	4
	16,7	
Structure 1, 2	11,08	4
	15,51	

Após a visualização das gotas identificaram-se cristais de PtpA com a forma de agulhas que surgiram ao fim de cerca de 30 dias, para a condição 10 % PEG 6K e 0,1 M HEPES pH 7 do *screen* JCSG a 4 °C.

Para o *scale-up* dos cristais e sua otimização testaram-se diferentes concentrações de proteína, assim como diferentes concentrações de agentes precipitantes, diferentes valores de pH e diferentes proporções de proteína e solução precipitante na gota de acordo com a Tabela 6. Todos os ensaios descritos na tabela foram realizados com a proteína em tampão H a pH 7 e

a pH 8, e no tampão utilizado aquando a cristalização da proteína na literatura (10 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM β -mercaptoetanol, 5 mM EDTA, 0,02 mM PMSF).

Tabela 6- Condições testadas durante a otimização da condição de cristalização da proteína PtpA.

Concentração de proteína (mg/mL)	Concentração de PEG 6K (%)	Concentração de HEPES (M)	pH	Temperatura (°C)	Proporção da gota (proteína:solução precipitante)
	2				
15	4				
16	6		6	4	2:2
17	8	0,1	6,5	20	3:1
17,5	10		7		1:3
	12				

Identificou-se a condição que origina cristais de maiores dimensões e, com o objetivo da sua otimização, procedeu-se ao teste de aditivos comerciais a 4 °C (*Additive Screen Additives, Voláteis e Salts, Jena Bioscience* – anexos, tabelas 4 a 6) em placas de cristalização de 24 poços (modelo XRL da *Molecular Dimensions*). Utilizou-se o método de difusão de vapor – gota suspensa, variando as proporções de proteína e precipitante, mas mantendo o volume de solução precipitante no reservatório de 700 μ L.

Após congelação em azoto líquido, os cristais foram analisados por radiação de sincrotrão nas linhas ID23-2 e ID30-B (ESRF - Grenoble, França).

4.3 Dispersão de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

Para a realização da experiência de SAXS preparou-se uma solução de PtpA nativa a uma concentração final de 10 mg/mL. Esta amostra foi sujeita a um passo extra de purificação, de cromatografia de exclusão molecular, com vista à eliminação de quaisquer impurezas que pudessem comprometer os resultados da experiência, devido à sua sensibilidade. Acoplou-se uma coluna superdex-75 10/300 (GE Healthcare Life Sciences) a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Prominence, Shimadzu) e equilibrou-se a coluna com tampão H (100 mM HEPES pH 7, 150 mM NaCl, 10 % glicerol, 5 mM DTT, 5 mM EDTA). Injetou-se uma amostra de proteína a uma concentração de 10 mg/mL, e utilizou-se um fluxo de 0,5 mL/min. Recolheram-se frações de 0,5 mL, e juntou-se aquelas cujo peso molecular corresponde ao da proteína PtpA (20 kDa).

As diluições para a experiência de SAXS realizaram-se sequencialmente utilizando o tampão H para um volume final de 100 μ L.

Preparou-se também uma solução de proteína incubada com o ligando C33, por forma a se estudar potenciais diferenças conformacionais entre a proteína livre e a proteína a interagir com o ligando. A incubação procedeu-se à temperatura ambiente durante 10 min, numa proporção de 1:2. A concentração de dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado para a dissolução do

ligando, na solução final foi de 10 %. O excesso de ligando foi retirado por diálise, que decorreu durante 1 hora à temperatura de 4 °C, segundo as sugestões do fabricante (*xpress Micro Dialyzer* MD100, 6-8 kDa, Scienova GmbH).

A experiência foi realizada recorrendo à radiação de sincrotrão na linha P12 (PETRA III-Hamburg, Germany).

4.4 Cinética Enzimática

Realizaram-se ensaios de cinética enzimática para a avaliação da atividade da proteína PtpA, e também para testar a sua atividade na presença dos ligandos em estudo. Utilizou-se como substrato o p-nitrofenilfosfato – pNPP, que é degradado pela ação da enzima e liberta o produto p-nitrofenol, de coloração amarela, detetável espectrofotometricamente a 410 nm. A reação foi seguida a 37 °C, num leitor de placas de 96 poços (*Molecular Devices Spectra Max 190*) e utilizando o software SoftMax Pro 6.4. O volume final de solução em cada poço foi de 200 μ L, sendo a reação iniciada pela adição de pNPP.

Primeiramente realizaram-se vários ensaios onde se utilizou uma concentração de proteína de 0,5 μ M e testou-se diversas concentrações de substrato, variáveis entre 0,005 mM e 1,2 mM, por forma a determinar as melhores condições de realização dos ensaios. Para as experiências com os ligandos, a concentração de proteína foi de 0,5 μ M, encontrando-se esta no tampão H e a concentração do substrato foi de 0,4 mM. A concentração de ligandos foi de 100 μ M, em 10 % de DMSO. Todas as experiências foram realizadas em triplicado.

4.5 Ensaios de *Thermal Shift Assay* (TSA)

Foram realizadas duas experiências de TSA, usando um *screen* de tampões (anexos, Tabela 5) e um *screen* de aditivos (anexos, Tabela 6). Os resultados obtidos permitiram a identificação das condições de maior estabilidade da proteína PtpA e possibilitaram a seleção das soluções tampão que foram aplicadas durante a purificação da proteína, estudos estruturais e ensaios biofísicos e enzimáticos.

Para este efeito, utilizaram-se placas de 96 poços (*Applied Biosystems*TM, *ThermoFisher Scientific*) e um volume total de solução em cada poço de 20 μ L. A concentração final de proteína foi de 2 μ M, numa proporção de 1:1 com a condição de tampão ou aditivo.

O TSA foi também utilizado para uma maior compreensão da afinidade da ligação entre a proteína e os ligandos em estudo (Tabela 1). Estas experiências foram realizadas em triplicado, e segundo o procedimento descrito acima, sendo que a concentração final de DMSO utilizada para a dissolução dos ligandos foi ajustada para 5 %.

4.6 Ensaios de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

As experiências foram realizadas na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, recorrendo a um calorímetro de titulação isotérmica VP-ITC calorimeter (MicroCal Inc., Malvern), sob a orientação da Dr. Márcia Correia (FCT-NOVA).

As titulações foram realizadas à temperatura ambiente, com 26 injeções de 5 μ L (durante 4 seg cada), com intervalo de 240 seg entre cada injeção.

Foi colocado ligando C33 na seringa de injeção a uma concentração de 500 μ M. Para a dissolução do ligando utilizado usou-se o DMSO, sendo que a concentração final foi de 20 %. Na célula colocou-se uma amostra de proteína previamente dialisada (xpress Micro Dialyzer MD100, 6-8kDa, Scienova GmbH) na concentração de 66 μ M. Adicionou-se DMSO à solução de proteína, por forma a se obter uma concentração final de 20 %, para se excluir libertações de calor originadas pela diferença deste composto nas soluções.

4.7 Ensaios de Termoforese em Microescala (MST)

A experiência de MST foi realizada no âmbito do workshop *Measure Binding Affinities with NanoTemper Technologies*, realizado na Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa.

À semelhança das experiências de SAXS e ITC foi utilizado o ligando C33 pra testar a sua afinidade à proteína.

Foi preparada uma solução com o tampão onde a proteína se encontrava (o tampão H, previamente descrito) com 20 % DMSO. Esta foi colocada em 14 capilares. Preparou-se uma solução de proteína a 200 nM incubada com o ligando C33, a uma concentração de 1 mM. A solução de proteína-ligando foi colocada no primeiro capilar, e metade do seu conteúdo foi colocado no segundo capilar, resultando numa diluição de 1:2. Nos capilares seguintes repetiu-se o processo, até ao último, por forma a se obter as diferentes concentrações de solução necessárias à obtenção da curva dose-resposta.

5 Resultados e Discussão

5.1 Expressão e purificação da PtpA

A proteína PtpA foi expressa em *E. coli* BL21 a partir do vetor de expressão pET28a-Mt_PtpA. Para a indução da expressão proteica adicionou-se IPTG. Após a lise celular e centrifugação do extrato obtido, recolheu-se a fração solúvel e procedeu-se à purificação da proteína.

A primeira etapa da purificação tem como objetivo a separação inicial da PtpA do restante material proteico presente no extrato celular, utilizando uma solução tampão com 10 mM de imidazole (tampão A). Em seguida, de forma a se promover a eluição de proteínas que não apresentem afinidade de ligação para os íons de níquel presentes na coluna, induz-se o aumento da força iônica através do aumento da concentração de imidazole para 16 mM. Ao aplicar um gradiente de 16 a 500 mM de imidazole, ou seja, de 12 a 100 %, ocorre a eluição da proteína de interesse, que é recolhida em frações de cerca de 1 mL. Observando a Figura 5.1 correspondem às frações 5 a 11. A análise do gel SDS-PAGE permite observar bandas correspondentes ao peso molecular da proteína de interesse nas frações recolhidas durante a eluição da proteína.

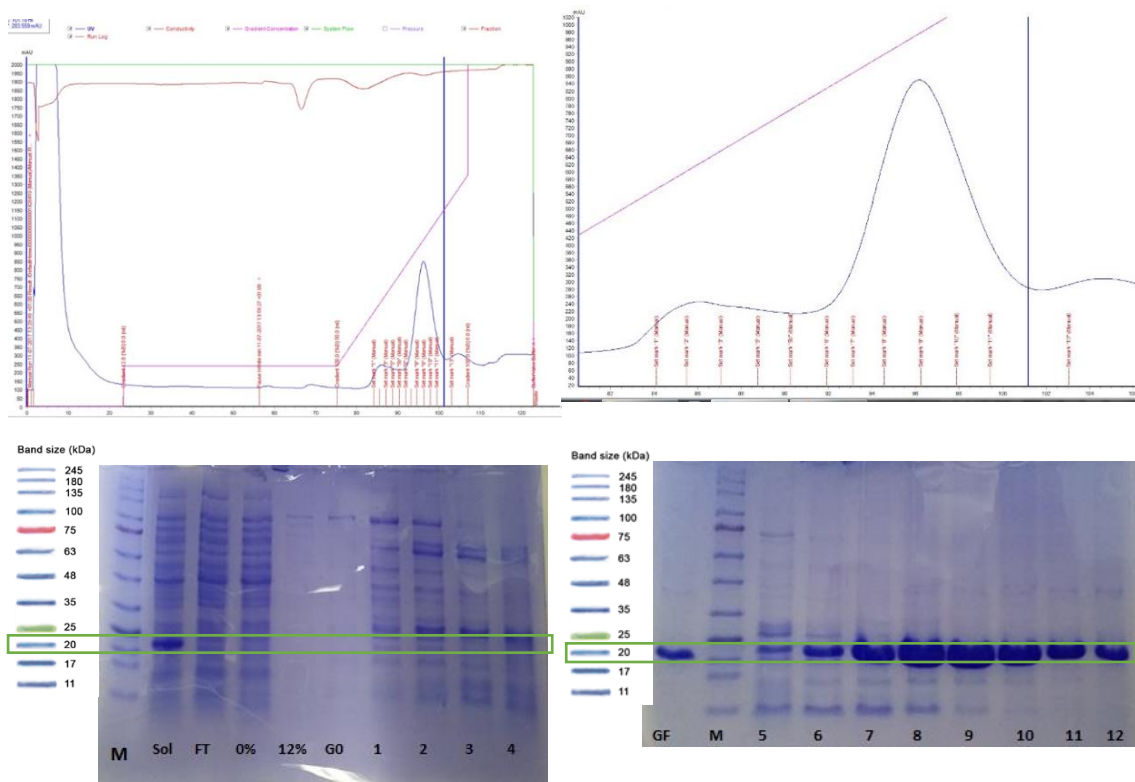


Figura 5.1- Cromatograma IMAC e Géis SDS-PAGE resultantes da purificação da PtpA. Em cima: cromatograma obtido na purificação por IMAC, onde se observa um pico correspondente à eluição da proteína de interesse, a cerca de 95 mL. A eluição ocorreu durante o gradiente de força iônica utilizando o tampão B. Em baixo: Gel SDS-PAGE (10 %) com as frações provenientes da etapa de expressão e da purificação da proteína PtpA. M- Marcador de pesos moleculares; Sol- extrato solúvel, FT- fração Flow-through (IMAC); 0 %- fração eluída a 10 mM de Imidazole; 12 %- fração eluída a 16 mM de Imidazole; G0- fração eluída durante o gradiente de eluição, antes do aumento da densidade óptica correspondente à eluição da proteína de interesse; 1 a 12- frações de 1 mL provenientes da purificação por IMAC, sendo a ordem no gel (da esquerda para a direita) a ordem de eluição; GF – fração eluída após a estabilização da densidade óptica.

Após a purificação da proteína, procede-se à dessalinização e permuta para o tampão H. Uma vez que o grau de pureza da proteína era bastante elevado não se incluíram mais passos de purificação. O rendimento final da purificação foi de aproximadamente 21 mg de proteína por litro de cultura.

5.2 Ensaios de cristalização e experiência de difração

A primeira abordagem consistiu na reprodução das condições de cristalização identificadas anteriormente, e já descritas na literatura: A- 22 % etilenoglicol; B- 30 % PEG 4000, 200 mM acetato de amônio, 100 mM citrato trissódico dihidratado. Utilizou-se uma proporção de gota de 2 μ L de proteína e 2 μ L de solução precipitante, para um volume de 750 μ L de solução precipitante no reservatório, tal como descrito na literatura.⁶

De forma a otimizar as condições descritas, e uma vez que não se obtiveram cristais adequados a uma experiência de difração, fez-se variar as concentrações de agentes

precipitantes/tamponizantes para ambas as condições. Para a primeira condição de cristalização - A - fez-se variar a concentração de etilenoglicol de 15 a 35 %. Para a condição B, fez-se variar a concentração de PEG 4000 de 25 a 35 %, a concentração de acetato de amônio de 150 a 250 mM e a concentração de citrato trisódico dihidratado de 50 a 150 mM.

Todos os ensaios descritos anteriormente foram realizados a 4 °C, em caixas de 24 poços, pelo método de difusão de vapor em gota suspensa. Todos os ensaios foram repetidos utilizando a proteína em tampão H (100 mM HEPES pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol, 5 mM DTT, 5 mM EDTA) assim como no tampão utilizado aquando a cristalização da proteína (10 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 10 % glicerol, 1 mM β -mercaptoetanol, 5 mM EDTA, 0,02 mM PMSF). Os ensaios foram repetidos para diferentes concentrações de proteína, que variaram de 5 a 12,4 mg/mL. No total foram testadas 192 condições variantes das descritas na literatura, sem que nenhum cristal de PtpA fosse obtido.

Realizaram-se, então, ensaios de *screening* em placas de 96 poços, testando-se os *screens* comerciais JCSG, JBS 1234 e o Structure 1, pelo método de difusão de vapor em gota assente. A proteína encontrava-se no tampão H, e fez-se variar a sua concentração de 9 a 16 mg/mL. Os ensaios foram realizados às temperaturas de 20 e 4 °C. Após cerca de 30 dias a visualização das gotas revelou o aparecimento de frágeis cristais em formato de finas agulhas (Figura 5.2), de dimensões aproximadas de 0,01 mm de largura e 10 mm de comprimento para a condição 10 % PEG 6K e 0,1 M HEPES pH 7 do *screen* JCSG a 4 °C.



Figura 5.2- Cristais de PtpA obtidos a 4 °C, para ensaios de gota assente em solução precipitante 10% PEG 6K e 0,1 M HEPES pH 7.

Para o *scale-up* dos cristais e sua otimização testaram-se diferentes concentrações de proteína, que variaram de 15 a 17,5 mg/mL. Testou-se concentrações de PEG 6K de 2 a 12 %, e o pH da solução variou entre 6 a 7, sendo que o volume de solução precipitante no poço foi de 700 μ L. Testou-se alterar a proporção de proteína na gota de 2:2, 3:1 e 1:3, e também se testou variar a concentração de PEG 6K na gota relativamente ao poço, ao adicionar solução 2 % mais concentrada na gota relativamente ao poço, e também solução 2 % menos concentrada. Estes ensaios foram realizados a 4 °C e repetidos a 20 °C.

Todos os ensaios foram concretizados com a proteína em tampão H a pH 7 e a pH 8, (100 mM HEPES pH 7 ou pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol, 5 mM DTT, 5 mM EDTA) e repetidos para a proteína no tampão utilizado aquando a cristalização da proteína descrita na literatura (10 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 10 % glicerol, 1 mM β -mercaptoetanol, 5 mM EDTA, 0,02 mM PMSF).

Após identificação da condição que origina cristais de maiores dimensões, tentou-se otimizar os mesmos através da técnica de *microseeding*. Nesta técnica utilizou-se cristais previamente obtidos de PtpA, aos quais se adicionou uma solução que possui a mesma composição da solução precipitante utilizada no ensaio de cristalização, mas com uma concentração superior de agente precipitante (em 4 %). Os cristais foram comprimidos até formar uma solução homogênea, e esta solução foi diluída numa proporção de 1:50 e de 1:100 utilizando a solução de cristalização original. Adicionaram-se 1 μ L destas soluções a novas gotas de PtpA, com vista à obtenção de cristais de maiores dimensões, porém, a experiência decorreu sem sucesso, uma vez que não se obtiveram cristais. Recorreu-se também a *screens* de aditivos comerciais, com o intuito de obter cristais de PtpA mais adequados à experiência de difração, porém, sem sucesso. Para esta experiência, assim como para a de *microseeding*, utilizou-se o método de difusão de vapor em gota suspensa, variando as proporções de proteína e precipitante, mas mantendo o volume de solução precipitante no reservatório de 700 μ L.

Após as diversas experiências de cristalização, conclui-se que o crescimento de cristais de PtpA ocorre para a condição 6 % PEG 6K e 0,1 M HEPES pH 6,5, ao fim de cerca de 15 dias, para uma concentração de proteína de 17,5 mg/mL, gotas de 4 μ L (3 μ L de proteína e 1 μ L de solução precipitante), 700 μ L de solução precipitante no reservatório e à temperatura de 4 °C. Os cristais de PtpA revelam elevada fragilidade, e apresentam o formato de finas agulhas (Figura 5.3).

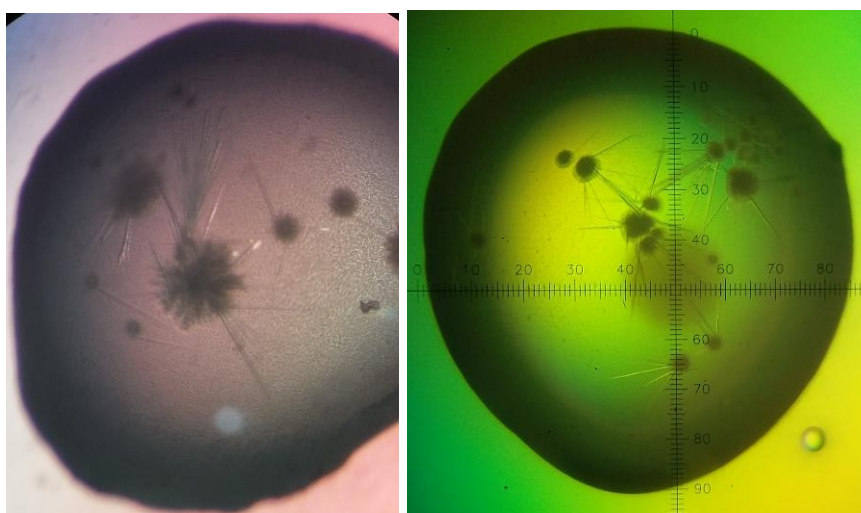


Figura 5.3- Cristais de PtpA obtidos nos ensaios de difusão de vapor em gota suspensa.

Para as experiências de difração, de forma a evitar a dissolução do cristal durante a sua manipulação, começou-se por adicionar às gotas uma solução estabilizante, *harvesting buffer*, que possui a mesma composição da solução precipitante utilizada no ensaio de cristalização,

mas com uma concentração superior de agente precipitante (ca 2-4 %). Estes cristais foram utilizados numa experiência de *soaking*, com os ligandos em estudo C33, Je06, Lap04 e Lap11. Concluído o tempo de incubação, os cristais foram estabilizados numa solução crio protetora, conseguida pela adição de 30 % de glicerol ao *harvesting buffer*, que tem como objetivo a prevenção da formação de gelo no interior da rede cristalina, uma vez que este interfere no padrão de difração. Por fim, os cristais foram congelados em azoto líquido, de forma a minimizar a sua degradação aquando da experiência de difração, e analisados por radiação de sincrotrão no ESRF (França).

Após a recolha dos dados de difração, as imagens obtidas foram indexadas recorrendo-se ao programa XDS (Kabsch, 2010), para assim se obter os parâmetros que caracterizam a célula unitária (constantes a, b, c e ângulos α , β , γ) os índices de Miller (hkl), as intensidades (I_{hkl}) e o respetivo erro associado (σ_{hkl}). Recorreu-se ao programa Aimless, pertencente ao conjunto de programas CCP4 (Dodson, 1997; Evans, 2004), para a análise das intensidades das reflexões obtidas, e para o escalamento dos dados, por forma a se tornar as intensidades comparáveis. Este programa fornece a análise estatística da qualidade dos dados de difração obtidos.

5.2.1 Experiência de difração PtpA-ligandos

Como referido anteriormente, os cristais de PtpA foram sujeitos a experiências de *soaking* com os ligandos C33, Lap11, Lap04 e Je06, sendo que as condições e resultados de difração dos cristais de PtpA analisados por radiação de Sincrotrão (ESRF) se encontram esquematizados na Tabela 7. O cristal A foi analisado na linha ID30B e todos os restantes na linha ID23-2.

Em todas as condições, a concentração de proteína é igual a 16,7 mg/ml (em tampão 100 mM Hepes pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 10% Glicerol) e a concentração dos compostos é de 20 mM. O volume de ligando adicionado foi de 0,5 μ L no cristal A, resultando numa concentração final de 2,2 mM, e de 2 μ L nos cristais B a L, o que resulta numa concentração final de 6,7 mM. Os ligandos adicionados encontravam-se em DMSO 100%, pelo que a sua concentração no cristal A foi de 11 %, e nos restantes cristais, onde se adicionou 2 μ L de ligando, a concentração final de DMSO foi de 33 %.

Tabela 7- Resumo das condições e resultados de difração dos cristais de PtpA analisados por radiação de Sincrotrão (ESRF).

Cristal	Ligando	Tempo de incubação	Condições de cristalização	Limite máximo de difração (Å)	Grupo cristalino
A	C33	4 h	10% PEG 6K 0,1 M HEPES pH 7,5	2,89	P6
B		30 min	4% PEG 6K 0,1 M HEPES pH 7	3,3	P61
C		60 min	4% PEG 6K 0,1 M HEPES pH 7	3,3	P61
D		60 min	4% PEG 6K 0,1 M HEPES pH 7	3,25	P61
E	Lap11	30 min	8% PEG 6K 0,1 M HEPES pH 6,5	3,45	P63
F		3 h	6% PEG 6K 0,1 M HEPES pH 7	3,65	P61
G		3 h	6% PEG 6K 0,1 M HEPES pH 7	3,1	P63
H	Lap04	15 min	8% PEG 6K 0,1 M HEPES pH 6	3,4	P61
I		24 h	8% PEG 6K 0,1 M HEPES pH 6	3,4	P61
J		24 h	8% PEG 6K 0,1 M HEPES pH 6	3,75	P61
L	Je06	24 h	2% PEG 6K 0,1 M HEPES pH 6	3,6	P61

Após a análise no programa XDS (Kabsch, 2010), foi possível a obtenção dos parâmetros que caracterizam a célula unitária (constantes a, b, c e ângulos α , β , γ), que se apresentam nas Tabelas 8, 9 10 e 11.

Seguidamente, a utilização do programa Aimless permitiu o escalonamento dos dados, e fazer uma análise estatística de forma a avaliar a qualidade dos dados de difração medidos, apresentados na Tabela 8, referente ao *soaking* com o composto C33; 9, referente ao *soaking* com o composto Lap11; 10 referente ao *soaking* com o composto Lap04; e 11, referente *soaking* com o composto Je06.

Tabela 8 - Estatísticas de qualidade dos dados de difração dos cristais A a D, que correspondem a cristais de PtpA incubada com o ligando C33. Os valores entre parênteses correspondem à camada externa de resolução.

$$R_{pim} = \frac{\sum_h \left(\frac{1}{N-1}\right)^{\frac{1}{2}} \sum_{i=1}^N |I_{(h)i} - \bar{I}_{(h)}|}{\sum_h \sum_{i=1}^N I_{(h)i}} \quad \text{Multiplicidade} = \frac{\text{número total de reflexões}}{\text{número total de reflexões únicas}}$$

$$V_M = \frac{\text{Volume da célula unitária}}{\text{Massa da célula unitária}} \quad \text{Conteúdo de solvente} = 1 - \frac{1.23}{V_M}$$

Parâmetros	Cristal A	Cristal B	Cristal C	Cristal D
Constantes da Célula Unitária (Å, °)	163,5;163,5;53,7 90;90;120	162,3;162,3;53,5 90;90;120	161,6;161,6;53,5 90;90;120	161,5;161,5;53,4 90;90;120
Grupo Espacial	P6	P61	P61	P61
Resolução (Å)	47,19-2,89 (3,07-2,89)	44,67-3,30 (3,56-3,30)	44,60 – 3,30 (3,56 - 3,30)	44,54-3,25 (3,51-3,25)
<I/Σ(I)>	13,6 (2,5)	14,0 (2,4)	9,2 (2,2)	11,1 (2,3)
Cc_{1/2}	0,998 (0,856)	0,998 (0,863)	0,996 (0,900)	0,998 (0,831)
Número de Reflexões Totais	375448 (62720)	137555 (28736)	133373 (28445)	140270 (29667)
Número de Reflexões Únicas	18714 (3006)	12362 (2530)	12283 (2511)	12837 (2620)
R_{pim} (%)	4,7 (37,7)	4,1 (37,1)	8,1 (52,2)	6,0 (51,2)
Mosaicidade (°)	0,07	0,07	0,05	0,08
Multiplicidade	20,1 (20,9)	11,1 (11,4)	10,9 (11,3)	10,9 (11,3)
Completeness (%)	100 (99,9)	99,8 (99,8)	99,9 (99,8)	100 (100)
Número de Moléculas por Unidade Assimétrica	4	4	4	4
Coefficiente de Matthews, V_m (Å³ / Dalton)	2,59	2,54	2,52	2,51
Conteúdo em Solvente (%)	52,47	51,59	51,18	51,03

Tabela 9- Estatísticas de qualidade dos dados de difração dos cristais E a G, que correspondem a cristais de PtpA incubada com o ligando Lap11. Os valores entre parênteses correspondem à camada externa de resolução.

Parâmetros	Cristal E	Cristal F	Cristal G
Constantes da Célula Unitária (Å, °)	161,7;161,7;53,6 90;90;120	161,7;161,7;53,5 90;90;120	161,7;161,7;53,5 90;90;120

Grupo Espacial	P63	P61	P63
Resolução (Å)	46,75-3,45 (3,78-3,45)	46,69 – 3,65 (4,00 - 3,65)	49,57-3,10 (3,31-3,10)
<I/Σ(I)>	7,8 (2,1)	6,7 (1,6)	9,8 (2,1)
C_{c1/2}	0,995 (0,769)	0,995 (0,726)	0,996 (0,731)
Número de Reflexões Totais	111502 (25505)	99924 (24266)	126128 (22597)
Número de Reflexões Únicas	10859 (2563)	9145 (2164)	14567 (2610)
R_{pim} (%)	8,5 (46,1)	11,3 (62,7)	7,1 (52,2)
Mosaicidade (°)	0,34	0,16	0,25
Multiplicidade	10,3 (10,0)	10,9 (11,2)	8,7 (8,7)
Completeness (%)	99,9 (100)	99,9 (100)	99,5 (99,1)
Número de Moléculas por Unidade Assimétrica	4	4	4
Coeficiente de Matthews, V_m (Å³ / Dalton)	2,53	2,52	2,89
Conteúdo em Solvente (%)	51,49	51,24	57,50

Tabela 10- Estatísticas de qualidade dos dados de difração dos cristais H a J, que correspondem a cristais de PtpA incubada com o ligando Lap04. Os valores entre parênteses correspondem à camada externa de resolução.

Parâmetros	Cristal H	Cristal I	Cristal J
Constantes da Célula Unitária (Å, °)	162,6;162,6;53,7	162,1;162,1;53,5	161,9;161,9;53,5
Grupo Espacial	P61	P61	P61
Resolução (Å)	44,83-3,40 (3,67-3,40)	44,64 – 3,40 (3,67 - 3,40)	49,99-3,75 (4,19-3,75)
<I/Σ(I)>	10,9 (1,9)	9,5 (2,3)	6,0 (2,1)
C_{c1/2}	0,995 (0,769)	0,996 (0,781)	0,986 (0,827)
Número de Reflexões Totais	152571 (31735)	123334 (25601)	98177 (24160)
Número de Reflexões Únicas	11463 (2340)	11325 (2301)	8460 (2371)
R_{pim} (%)	6,0 (48,8)	9,5 (50,5)	14,7 (74,9)
Mosaicidade (°)	0,06	0,10	0,51
Multiplicidade	13,3 (13,6)	10,9 (11,1)	11,6 (10,2)
Completeness (%)	100 (100)	99,9 (100)	99,9 (100)
Número de Moléculas por Unidade Assimétrica	4	4	4
Coeficiente de Matthews, V_m (Å³ / Dalton)	2,56	2,53	2,53
Conteúdo em Solvente (%)	51,99	51,49	51,38

Tabela 11- Estatísticas de qualidade dos dados de difração do cristal L, que corresponde a cristais de PtpA incubada com o ligando Je06. Os valores entre parênteses correspondem à camada externa de resolução.

Parâmetros	Cristal L
Constantes da Célula Unitária (Å, °)	162;162;53,5 90;90;120
Grupo Espacial	P61
Resolução (Å)	46,76 – 3,60 (3,94 - 3,60)
<I/Σ(I)>	6,0 (2,5)
CC_{1/2}	0,979 (0,661)
Número de Reflexões Totais	99378 (22624)
Número de Reflexões Únicas	9530 (2237)
R_{pim} (%)	25,3 (97,6)
Mosaicidade (°)	0,38
Multiplicidade	10,4 (10,1)
Completeness (%)	99,9 (100)
Número de Moléculas por Unidade Assimétrica	4
Coeficiente de Matthews, V_m (Å³ / Dalton)	2,53
Conteúdo em Solvente (%)	51,39

Inicialmente analisou-se a razão entre a intensidade média das reflexões e o erro associado ($\langle I/\sigma(I) \rangle$). Em relação ao cristal A, por exemplo, – que corresponde ao *soak* com o ligando C33 - o valor das intensidades é de 9,2 a 13,6 vezes superior ao ruído associado, sendo que na camada externa é de 2,2 a 2,5. Este parâmetro indica quantas vezes a intensidade das reflexões são superiores ao ruído e auxiliam na decisão de quais os dados a incluir para o cálculo de mapas de densidade eletrónica e resolução de estrutura, principalmente nas camadas de mais alta resolução. No caso dos restantes conjuntos de dados, valores semelhantes de ($\langle I/\sigma(I) \rangle$) são obtidos quando se cortam os dados a valores de resolução mais baixa.

O coeficiente de correlação (CC_{1/2}) fornece igualmente informações acerca da relação sinal/ruído. Este parâmetro tem em consideração apenas metade dos dados de cada reflexão única que são medidos, divididos de uma forma aleatória, sendo calculado entre as intensidades médias de cada subconjunto de dados. Este parâmetro deve-se encontrar acima dos 0,500, o que se observa em todos os conjuntos de dados recolhidos, para os intervalos de resolução selecionados.

O R_{pim} indica a precisão média das intensidades. O seu valor deve ser inferior a 10 % para o conjunto de dados completo, e inferior a 50 % na camada de mais alta resolução, o que

se observa na maioria dos conjuntos de dados (exceto para o cristal F, indicando que este cristal pode ter maior desordem interna).

A mosaicidade corresponde ao grau de desordem entre as várias células unitárias no cristal. Quanto menores os valores mais ordenados são os cristais e, conseqüentemente, melhor difratam. Assim sendo, os cristais de proteína incubada com o ligando C33 são os que apresentam melhor mosaicidade, estando os valores entre 0,05 e 0,08.

O valor de multiplicidade expressa a quantidade de vezes que uma certa reflexão foi medida, portanto quanto mais elevado for o seu valor, mais precisa será a estimativa das intensidades das reflexões. Para estes conjuntos de dados, o valor mais baixo é de 8,7 e o mais elevado é de 20,1.

O valor de *completeness* compara a percentagem de reflexões medidas com o número total de reflexões possíveis para uma dada resolução, e deve encontrar-se perto dos 100 %. No caso dos conjuntos de dados obtidos, o valor varia entre 99,5 e 100 %, como desejável.

O coeficiente de Matthews, V_M , tem como objetivo a determinação do conteúdo de solvente no cristal, sendo definido como a razão entre o volume e a massa da célula unitária. Os conteúdos em solvente encontram-se de 51,03 % a 57,50 %. Na unidade assimétrica de todos os cristais encontram-se quatro moléculas.

Embora as resoluções obtidas para todos os cristais tenham sido inferiores ao ideal para se confirmar a presença de ligando no centro ativo da proteína, decidiu-se prosseguir para o refinamento dos dados.

Concluindo, a análise das estatísticas apresentadas para os conjuntos de dados recolhidos para os quatro cristais de PtpA incubada com o ligando C33, pelo método de *soaking*, são indicativas de boa qualidade de difração. Selecionou-se o cristal A para avançar para a resolução da sua estrutura tridimensional, uma vez que apresentava a resolução mais alta e as melhores estatísticas. No caso dos cristais de proteína incubada com o ligando Lap11, selecionou-se o cristal G para prosseguir para resolução, uma vez que apresenta a resolução mais elevada. Para os cristais de proteína incubada com o ligando Lap04, foi selecionado o cristal H para prosseguir para resolução, uma vez que o seu valor de multiplicidade é o mais elevado para os conjuntos de dados recolhidos para este ligando, assim como o valor de $\langle I/\sigma(I) \rangle$ e o valor de mosaicidade inferior.

Conclui-se também que o tempo de incubação dos ligandos não aparenta ter efeito direto na qualidade dos dados. Apesar da elevada percentagem de DMSO presente nos cristais B a L (33 %), estes demonstraram resistência ao composto.

5.2.2 Resolução das estruturas

Utilizou-se o método de substituição molecular (MR, do inglês *Molecular Replacement*) uma vez que a estrutura da proteína PtpA é já conhecida, de código PDB 1U2P. Utilizou-se o programa *Phaser* (McCoy et al. 2007), para estimar os ângulos da fase (α_{hkl}) das reflexões medidas, necessários para o cálculo dos fatores de estrutura. Os parâmetros LLG (do inglês *Log Likelihood Gain*) e *Z-score* permitem avaliar a qualidade da solução obtida, e quanto maior o seu valor, melhor. O LLG avalia o quão melhor os dados experimentais podem ser previstos utilizando

o modelo em causa comparativamente a uma distribuição aleatória dos mesmos átomos, sendo que quanto maior for o seu valor, melhor. O Z-score indica quantos desvios padrão a solução encontrada está acima da média e é utilizado para determinar se a estrutura foi ou não resolvida. Para os quatro conjuntos de dados os valores, que podem ser consultados na Tabela 12, encontram-se dentro do esperado. Conclui-se então que o método permitiu resolver o problema da fase para os vários cristais e o posterior cálculo de mapas de densidade eletrónica.

Tabela 12- Valores de Z-score e LLG obtidos para os cristais de PtpA-ligandos em estudo, a partir do programa Phaser.

	Cristal A	Cristal G	Cristal H	Cristal I
Limite Máximo de Difração (Å)	2,89	3,10	3,40	3,60
	C33	Lap11	Lap04	Je06
Z-SCORE	7,2	7,1	6,5	6,3
LLG	614	487	470	369

O refinamento consiste no ajuste do modelo à sua densidade eletrónica, onde se minimiza as diferenças entre os fatores de estrutura observados (Fo) e os fatores de estrutura calculados (Fc). Para o refinamento das estruturas recorreu-se ao programa REFMAC5 (Murshudov et al. 2011) do CCP4, e as estatísticas obtidas encontram-se na Tabela 13. Utilizando o programa Coot (Emsley & Cowtan 2004), foi possível alterar o modelo, por forma a melhorar o seu ajuste à densidade eletrónica.

Tabela 13- Estatísticas de refinamento inicial e final obtidas para as estruturas de PtpA-ligandos.

	Cristal A		Cristal G		Cristal H		Cristal I	
	C33		Lap11		Lap04		Je06	
Limite Máximo de Difração (Å)	2,89		3,10		3,40		3,60	
	Refinamento Inicial		Refinamento Final		Refinamento Inicial		Refinamento Final	

Fator R (%)	25,50	20,99	32,20	22,04	30,77	20,47	31,20	21,91
R_{free} (%)	30,04	26,73	33,72	27,05	32,59	27,59	30,95	27,81
RMSD para o Ângulo de Ligação (°)	0,0158	0,0181	0,0049	0,0132	0,0049	0,0113	0,0049	0,0104
RMSD para o Comprimento de Ligação (Å)	1,9504	2,1172	1,1922	1,8162	1,1907	1,6294	1,1910	1,5750

Analisando as estatísticas obtidas, os valores de fator R e de R_{free} obtidos são razoáveis para o refinamento dos modelos a estes valores de resolução.

Apesar de não estarem totalmente refinados, os modelos foram analisados de forma a comparar com a estrutura da PtpA depositada no PDB, e para verificar a eventual presença de ligandos no centro ativo ou outro local de interesse da proteína.

O valor de RMSD (*root-mean-square deviation*) foi calculado tendo como modelo de comparação a estrutura previamente conhecida da proteína PtpA, e quanto mais baixo o seu valor, menor será a disparidade entre as estruturas calculadas e a estrutura previamente conhecida. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14- Valores de RMSD obtidos por comparação das estruturas em estudo e a estrutura de PtpA depositada no PDB (1U2P).

	Cristal A	Cristal G	Cristal H	Cristal I
	C33	Lap11	Lap04	Je06
RMSD (Å)	0,4641	0,3972	0,3026	0,3074

Os valores obtidos, por serem baixos, demonstram que as diferenças estruturais entre as estruturas obtidas e a depositada no PDB não são significativas. As diferenças podem estar relacionadas com as distintas condições de cristalização, por exemplo, ou com o tampão onde a proteína se encontrava.

Através do mapa de densidade eletrônica, foi possível observar que o modelo estrutural compreende os resíduos 4 a 159, onde se observa a formação de um dímero cristalográfico, ligado covalentemente por uma ponte entre a cisteínas 53 de ambas as cadeias, como observado na Figura 5.4. A origem da formação do dímero é desconhecida, uma vez que no tampão da proteína foi utilizado o agente redutor DTT. Esta ponte de cisteínas nunca tinha sido reportada para esta proteína, pelo que seria necessário mais estudos para se compreender a sua origem e se terá algum papel fisiológico.

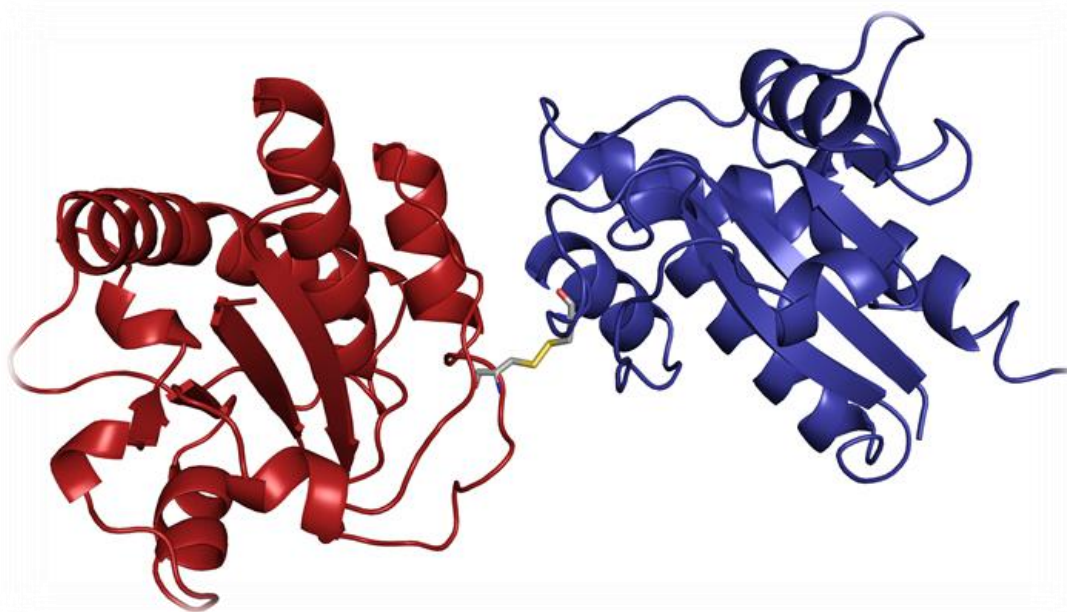
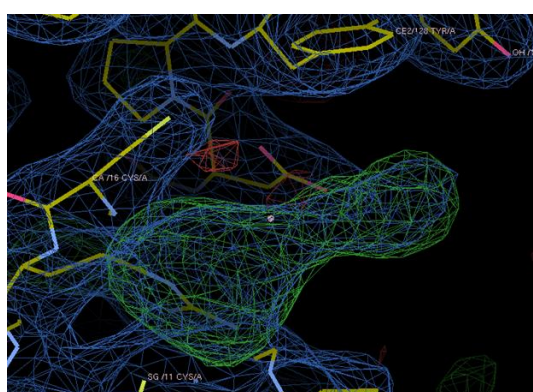


Figura 5.4- Estrutura obtida para os quatro conjuntos de dados recolhidos, de proteína PtpA e os ligandos C33, Lap11, Lap04 e Je06.

Cada cadeia apresenta uma estrutura semelhante à depositada no PDB (Figura 1.3), onde se observam quatro folhas β paralelas centrais, rodeadas por hélices α de ambos os lados. É possível identificar-se o centro ativo entre a região C-terminal da primeira folha β e a região N-terminal da primeira hélice α . Neste local foi possível observar uma densidade extra, próxima dos resíduos catalíticos, nas quatro estruturas analisadas. Atendendo ao tamanho e forma destes *blobs*, não é possível ter a certeza que esta densidade eletrónica advém da interação com os ligandos incubados em cada cristal, uma vez que, ao tentar modelar as respetivas moléculas uma parte dos compostos encontrava-se fora da densidade eletrónica e sobreposta com a densidade da proteína (Figura 5.5).



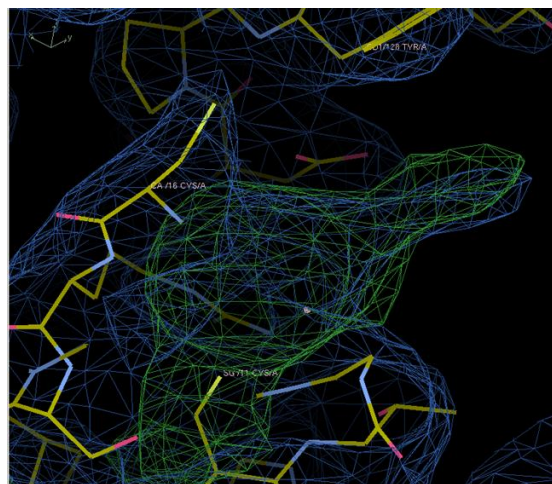
C33



Lap11



Lap04



Je06

Figura 5.5- Imagens das densidades observadas nos centros ativos das estruturas obtidas, recorrendo ao programa Coot.

A hipótese de que as densidades poderiam corresponder a componentes presentes no tampão da proteína, ou na solução de cristalização foi testada, porém nenhuma das moléculas utilizadas se modelou corretamente na densidade eletrônica extra observada. Também se testou fazer a relação entre as densidades e fragmentos dos ligandos, mas sem sucesso. Considerando que as resoluções conseguidas poderão não permitir uma observação clara da natureza dos *blobs*, por serem baixas, o trabalho futuro deverá passar pela otimização das condições de cristalização, ou descoberta de novas condições, assim como por testar outros métodos de purificação, por exemplo cromatografia de exclusão molecular (SEC, do inglês *Size-Exclusion Chromatography*) para eliminar a hipótese da existência de impurezas no centro ativo da proteína, que possam, até, impedir a interação do mesmo com os ligandos.

5.3 Dispersão de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

A técnica de SAXS foi aplicada no estudo da conformação da proteína PtpA livre assim como incubada com o ligando C33.

Os conjuntos de dados recolhidos foram processados recorrendo ao programa ATSAS88, começando-se por subtrair a contribuição do tampão em que a proteína se encontra a cada concentração de proteína medida. As curvas de dispersão obtidas (Figura 5.6 - A), principalmente na região de ângulo baixo, sugerem que as amostras de proteína analisadas não sofrem de interações intramoleculares (repulsão ou atração) significativas, podendo ser usadas para determinar o valor do raio de giração (R_g) da amostra, assim como o diâmetro máximo (D_{max}) e o volume de Porod (V_p), apresentados na Tabela 15.

C33. Tabela 15- Parâmetros obtidos para os conjuntos de dados recolhidos para a PtpA livre e PtpA-

	PtpA	PtpA-C33
Rg (nm)	1,99	2,01
D _{max} (nm)	6,27	6,50
Volume Porod - Vp (nm ³)	33,05	34,75
Massa Molecular Teórica (kDa)	20,00	
Massa Molecular Calculada a Partir de Vp (kDa)*	20,66	21,72
* Vp/1,6		

Segundo os valores obtidos para os parâmetros Rg e D_{max}, aquando da incubação da proteína com o ligando em estudo, não há alterações significativas no tamanho global da proteína. O cálculo da massa molecular a partir de Vp sugere que a proteína se apresenta em forma de monómero para ambos os casos.

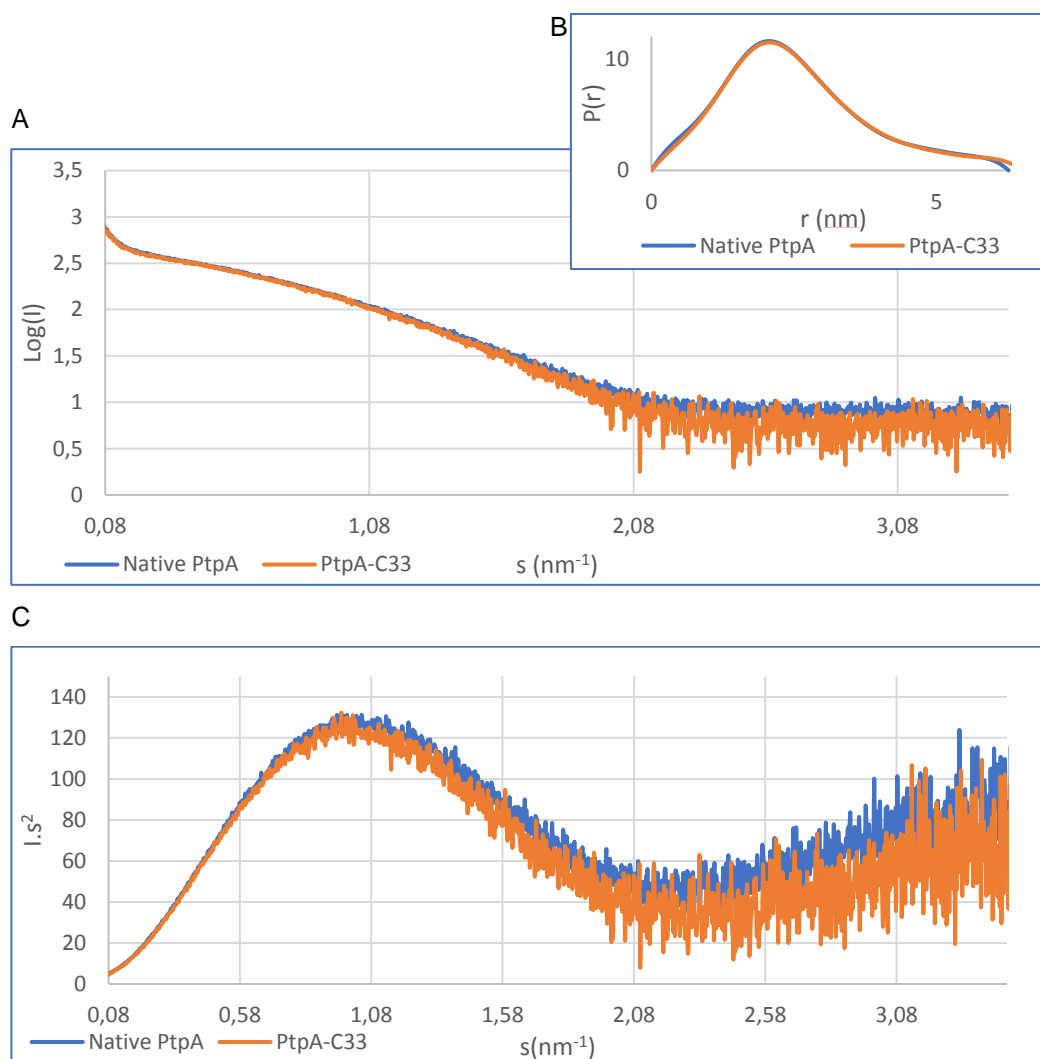


Figura 5.6- A: Curva experimental de SAXS da amostra de PtpA livre (a azul) e da amostra de PtpA incubada com o ligando C33 (a laranja); B: Curva de distribuição de distâncias P(r) para os dados obtidos em A; C: gráfico de Kratky

Observando a curva da função de distribuição ($P(r)$), que mostra as distâncias intermoleculares (Figura 5.6- B), esta apresenta um único pico e ausência de ombros, sugerindo que a proteína tem uma natureza globular em ambas as amostras. O tamanho máximo das moléculas, D_{max} , determina-se quando a função de distribuição atinge o zero. Pode-se observar que para a proteína livre o valor é de 6,27 e para a proteína com o ligando é de 6,50. Esta pequena diferença não sugere por si só alterações significativas da conformação da proteína na presença do ligando.

O gráfico de Krakty (Figura 5.6- C) pode ser usado para identificar desnaturação da amostra quando a curva aumenta a ângulos altos. No caso em estudo, ambas as curvas obtidas apresentam uma forma bem definida, pelo que não ocorreu desnaturação das proteínas nas amostras analisadas.

Em suma, as diferenças entre os dados obtidos para a proteína livre e para a proteína incubada com o ligando com base nesta análise preliminar não são muito notórias, pelo que se pode inferir que, no caso de haver interação entre o ligando e a proteína, esta não destabiliza a proteína, assim como, esta presumível interação também não altera drasticamente a conformação geral da proteína, o que é expectável tendo em conta a profundidade do centro ativo da proteína, e as previsões de que a molécula se encaixa no mesmo.

5.4 Ensaios de Cinética Enzimática

Nas experiências de cinética enzimática começou por testar-se de forma preliminar a atividade da proteína PtpA, utilizando o substrato pNPP em diferentes concentrações. Para uma concentração de proteína de $0,5 \mu\text{M}$, fez-se variar a concentração de substrato entre 0,005 mM e 1,2 mM, como se observa na Figura 5.7. Testou-se concentrações superiores de substrato, porém, ocorria a saturação do sinal de absorvância, impedido a realização da experiência para concentrações superiores de substrato.

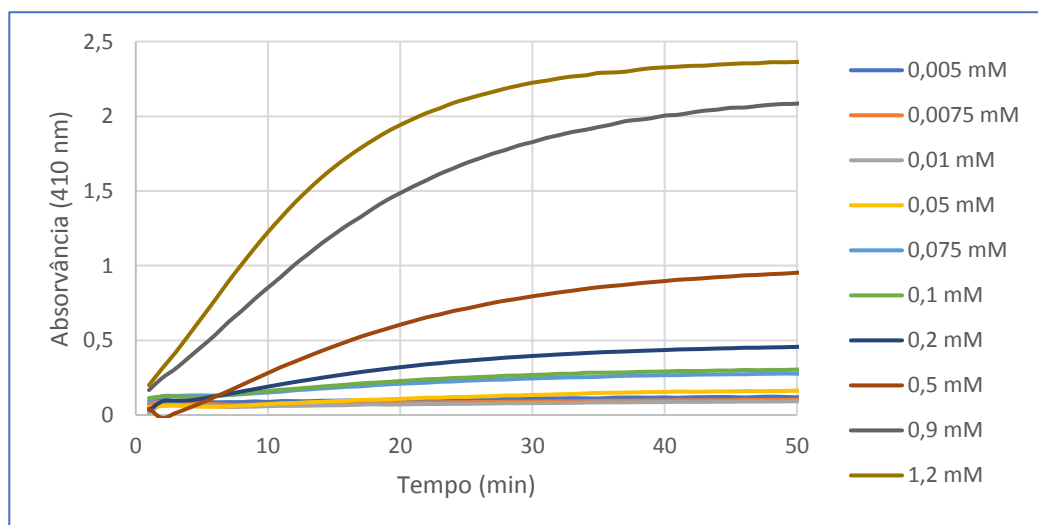


Figura 5.7- Gráfico absorvância vs tempo, resultante das experiências de cinética enzimática.

Uma vez que para todas as concentrações se consegue observar a estabilização da absorvância ao fim de um determinado tempo, podemos concluir que as reações decorreram na totalidade, e assim prosseguir com o tratamento dos resultados.

Selecionou-se a área das curvas dos 5 aos 10 min, por apresentar linearidade, e calculou-se os declives das retas, sendo que o valor do declive corresponde à velocidade inicial de cada reação. Os resultados apresentam-se na Tabela 16.

Tabela 16- Velocidades iniciais, e respetivos coeficientes de correlação, r^2 , correspondentes às curvas obtidas para as experiências de cinética enzimática.

CpNPP (mM)	0,005	0,0075	0,01	0,05	0,075	0,1	0,2	0,5	0,9	1,2
V_0 (mM/min)	0,0014	0,0001	0,0010	0,0048	0,0054	0,0084	0,0161	0,0400	0,0780	0,1106
r^2	0,6944	0,0188	0,3834	0,9908	0,9957	0,9988	0,9998	0,9999	0,9994	0,9998

Decidiu-se desprezar os valores de velocidade inicial para as concentrações de pNPP de 0,005 a 0,01 mM, uma vez que nestas curvas a região de interesse não é linear, tal como indicam os valores muito baixos do coeficiente de correlação.

Os valores de velocidade inicial obtidos foram utilizados na construção do gráfico velocidade inicial vs concentração de substrato, ou seja, o gráfico de Michaelis-Menten, para posterior cálculo da velocidade máxima e da constante de Michaelis (Figura 5.8).

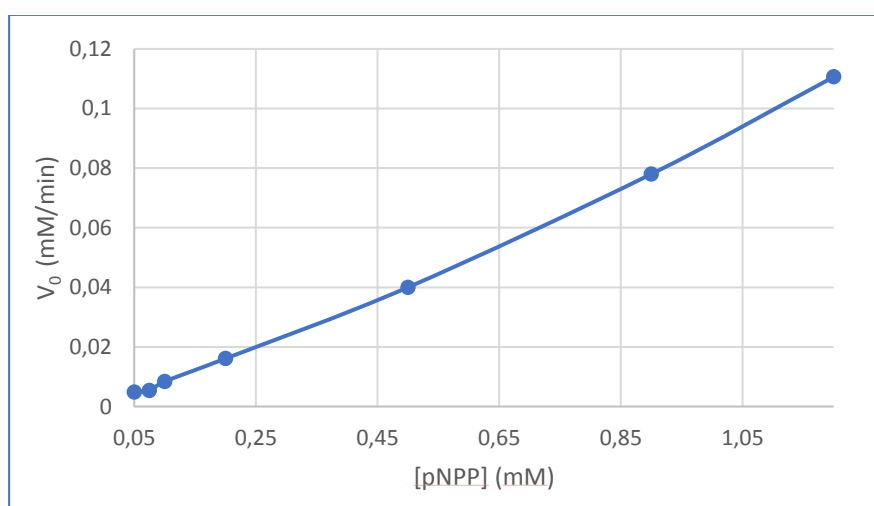


Figura 5.8- Curva de Michaelis-Menten obtida em função da concentração de substrato.

A curva obtida mostra a relação entre V_0 e a concentração de substrato mas, para a gama de substrato utilizada, a curva não apresenta um perfil hiperbólico. Para extrair os valores cinéticos de velocidade máxima (V_{max}) e constante de Michaelis-Menten (K_M), que mede a afinidade entre o substrato e a enzima, seria necessário fazer mais ensaios usando concentrações mais elevadas de substrato. Como previamente referido, para concentrações

superiores às presentes, ocorreu saturação dos valores de absorvância, não sendo possível obter mais informação acerca da reação entre a proteína PtpA e o substrato pNPP. Uma forma de obviar este problema seria repetir os ensaios usando menor quantidade de enzima, aumentando assim a estequiometria entre enzima e substrato, mas mantendo a gama de absorvância lida.

Prosseguindo-se para as experiências com os ligandos, o objetivo deste estudo passa por averiguar se existe uma diminuição da velocidade inicial da reação quando a proteína se encontra na presença dos ligandos em estudo. Esta diminuição estaria relacionada com a capacidade de inibição dos ligandos, que impediriam/dificultariam a reação entre a proteína e o substrato.

Utilizou-se uma concentração de proteína de $0,5 \mu\text{M}$, e de substrato de $0,4 \text{ mM}$. A concentração final de ligandos foi de $50 \mu\text{M}$, sendo a percentagem final de DMSO de 10% . Adicionou-se DMSO, com concentração final de 10% , à solução de controlo (proteína livre) para se poder comparar estes resultados entre si. Pode-se observar as curvas reacionais na Figura 5.9.

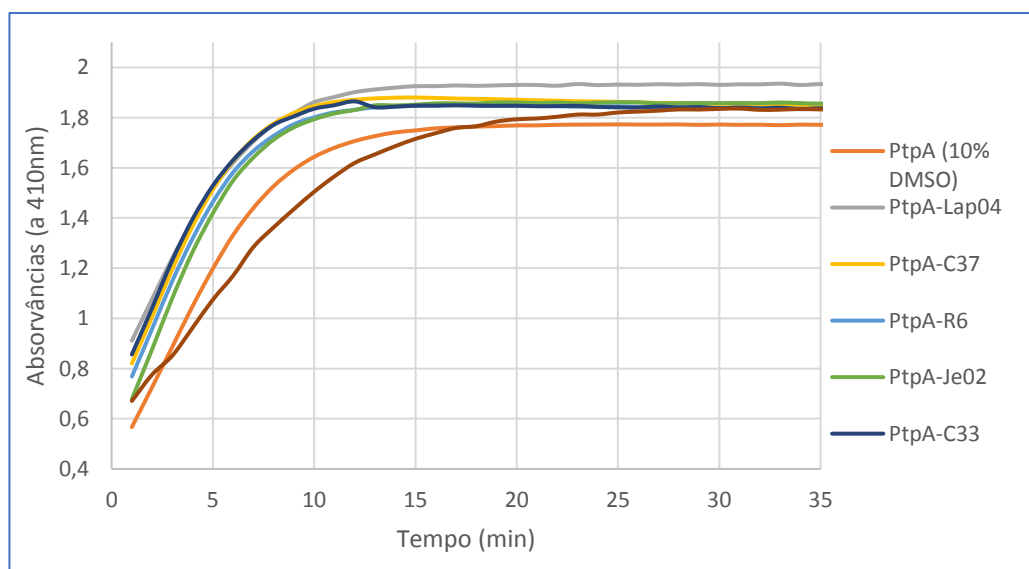


Figura 5.9- Gráfico absorvância vs tempo, resultante das experiências de cinética enzimática com os ligandos.

Tal como para o caso anterior, para todas as amostras de proteína com os diferentes ligandos, é possível observar-se a estabilização da absorvância ao fim de um determinado tempo, o que indica que as reações decorreram na totalidade, prosseguindo-se com o cálculo das velocidades iniciais.

Selecionou-se a área do gráfico entre os minutos 2 a 8, por apresentar linearidade, e calculou-se a linha de tendência. Os seus declives correspondem às velocidades iniciais de cada reação, e apresentam-se na Tabela 17, juntamente com o respetivo coeficiente de correlação.

Tabela 17- Velocidades iniciais, e respectivos coeficientes de correlação, r^2 , correspondentes às curvas obtidas para as experiências de cinética enzimática com os ligandos.

	PtpA (10% DMSO)	PtpA-C33	PtpA-C37	PtpA- R6	PtpA- Je02	PtpA- Lap04	PtpA- Lap11
V_0 (mM/min)	0,1354	0,1207	0,1288	0,1288	0,1396	0,1159	0,1012
r^2	0,9892	0,9637	0,9680	0,9683	0,9708	0,9778	0,9977

Analisando os coeficientes de correlação, os valores destes encontram-se próximos da unidade, pelo que se consideraram os dados exequíveis de ser analisados.

Comparando o valor de controlo com os resultados anteriores (Tabela 16), a velocidade inicial aumenta com a adição de DMSO à amostra de proteína livre (V_0 da PtpA com 10 % de DMSO é de 0,1354 mM/min e na ausência de DMSO estima-se que seja inferior a 0,04 mM/min). Este resultado sugere que este composto, usado como solvente de ligandos hidrofóbicos como os usados neste estudo, influencia a velocidade da reação.

Quando a proteína se encontra em solução com os ligandos, há uma ligeira diminuição da velocidade inicial da reação com o substrato. Contudo, este decréscimo não é significativo o suficiente para se poder afirmar que a sua origem está na interação da proteína com os ligandos. Para o ligando Je02 o valor da velocidade inicial da reação é superior ao valor da proteína livre. Este aumento não é significativo o suficiente para se poder afirmar que este ligando destabiliza a proteína. Esta experiência não demonstrou haver inibição da proteína PtpA pelos ligandos, o que não seria de esperar uma vez que os dados da literatura sugerem o contrário (Tabela 1).

Colocou-se a hipótese de se aumentar o excesso de concentração de ligandos relativamente à proteína, para uma melhor garantia de que existe ligando suficiente em solução para interagir com a mesma. Contudo, devido à fraca solubilidade dos ligandos, não foi possível realizar as experiências para maiores concentrações de ligando, uma vez que uma concentração de DMSO superior a 10% na solução final poderia comprometer os resultados obtidos.

5.5 Ensaios de Thermal Shift Assay (TSA)

Foram realizadas duas experiências de TSA, de forma a se identificar as condições de maior estabilidade da proteína PtpA e selecionar as soluções tampão que foram posteriormente aplicadas durante a purificação da proteína, estudos estruturais, ensaios biofísicos e enzimáticos (ver anexos, Tabela 7 e 8). A PtpA demonstrou ser mais estável em tampões com pH básico, acima de 8, e concentrações de sal na ordem dos 150 mM, havendo um aumento de T_m de 7 °C para o tampão 100 mM HEPES pH8 e 150 mM de NaCl. A experiência realizada com o *screening* de aditivos revelou aumentos de T_m na ordem dos 8 °C para os agentes redutores, sendo o melhor o TCEP. A presença de glicerol aumenta a estabilidade térmica em cerca de 6 °C. Definiu-se então que o tampão que levava a uma maior estabilidade da proteína seria o tampão 100 mM

HEPES pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol, 5 mM EDTA e 5 mM DTT. Para algumas experiências substituiu-se o DTT por TCEP, por ser menos volátil e mais estável. No tampão descrito a T_m da proteína nativa observado foi de 47 °C.

Para as experiências realizadas com os ligandos, devido à sua fraca solubilidade, foi necessário adicionar DMSO às soluções. Para a solução de controlo realizou-se a experiência com a proteína em tampão que continha 5 % de DMSO, para se estudar a influencia deste solvente orgânico na estabilidade térmica da proteína. Nas restantes soluções, para se conseguir soluções com uma percentagem de DMSO de 5 %, a concentração final dos ligandos foi de 100 μ M. As temperaturas de desnaturação, assim como as diferenças entre a temperatura obtida para cada ligando relativamente à temperatura da proteína nativa, encontram-se esquematizadas na Tabela 18. As curvas obtidas encontram-se representadas na Figura 5.10.

Tabela 18- Temperaturas de desnaturação obtidos durante a experiência de TSA realizada com a proteína PtpA incubada com os ligandos em estudo.

	T_M	ΔT_M
PtpA (5% DMSO)	46,56	
PtpA-C33	47,07	0,52
PtpA-C37	47,19	0,63
PtpA-R6	47,65	1,09
PtpA-Je02	48,00	1,44
PtpA-Lap04	47,88	1,33
PtpA- Lap11	47,31	0,75

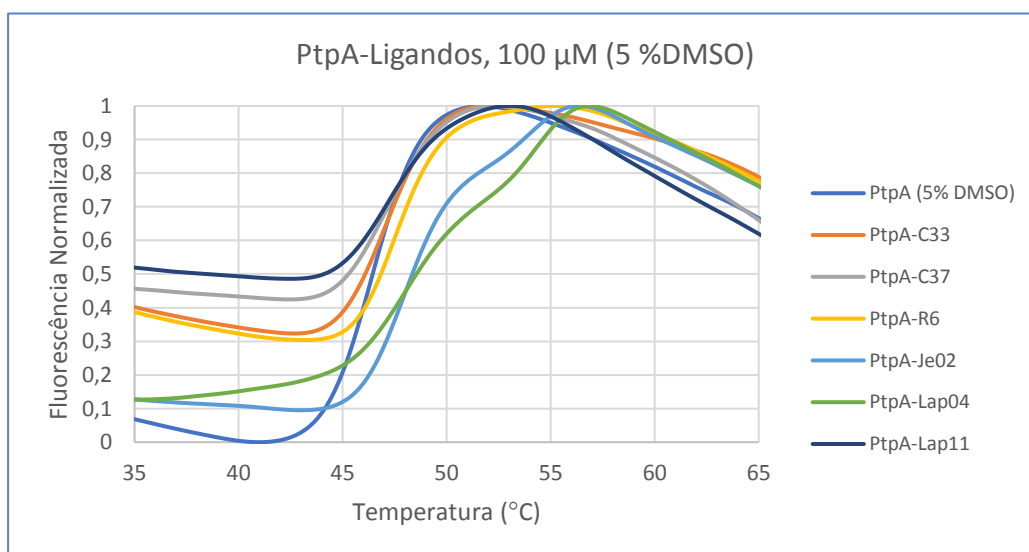


Figura 5.10- Curvas resultantes da experiência de TSA realizada com a proteína PtpA incubada com os ligandos em estudo.

Para a curva de controle (PtpA com 5 % de DMSO, a azul intermédio) a fluorescência inicial encontra-se próxima de zero e o ponto de inflexão da curva encontra-se bem definido, demonstrando a viabilidade do valor de T_m obtido. As restantes curvas, que correspondem a amostras de proteína com os ligandos, apresentam-se de acordo com o esperado, mostrando um ponto de inflexão bem definido, com exceção da curva PtpA-Je02 e PtpA-Lap04. Ainda assim, considerou-se que os valores seriam exequíveis de ser analisados.

Para todas as amostras com ligandos, houve um aumento da T_m relativamente à amostra de proteína livre, de 0,52 a 1,44. Este aumento, porém, não é suficientemente relevante para se poder concluir que o ligando está a interagir com a proteína.

Foram realizados ensaios para maiores concentrações de ligandos, porém, devido à fraca solubilidade dos mesmos, a concentração de DMSO teve também de ser aumentada, o que comprometeu os resultados obtidos. Em suma, por não ser possível realizar as experiências para maiores concentrações de ligando em que a percentagem de DMSO fosse inferior a 10 %, não foi possível uma melhor análise da eventual interação dos compostos com a proteína por esta técnica.

5.6 Ensaios de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Na experiência de ITC foi utilizado uma amostra de proteína em solução com o ligando C33. Utilizou-se inicialmente uma concentração de ligando de 250 μM , sendo a concentração final de DMSO em solução de 10 %. Uma vez que o gráfico obtido não demonstrava a existência de qualquer interação entre a proteína e o ligando, aumentou-se a concentração de ligando para 500 μM , a uma concentração de DMSO de 20 %. Devido à fraca solubilidade do ligando na concentração utilizada, não foi possível reduzir a concentração de DMSO, para eliminar a eventual destabilização da proteína por parte do mesmo.

Da medição do calor libertado pela reação resultou o gráfico apresentado na Figura 5.11.

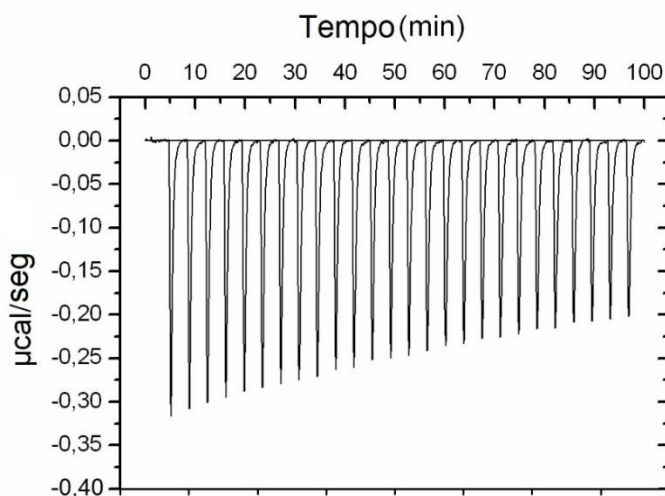


Figura 5.11- Gráfico obtido através da experiência de ITC que relaciona o tempo da experiência (em min) com o calor libertado ($\mu\text{cal/seg}$).

A análise do gráfico indica que a afinidade do ligando para a proteína é extremamente baixa, ou até mesmo inexistente, uma vez que a variação do calor libertado ao longo do tempo não é acentuada. Pelos dados obtidos, não foi possível sequer determinar o ponto de inflexão da curva.

Testou-se o aumento da concentração do ligando, para garantir a ocorrência de ligação entre este e a proteína, mas a fraca capacidade de dissolução do mesmo não permitiu a obtenção de dados experimentais com qualidade.

5.7 Ensaios de Termoforese em Microescala (MST)

Como referido anteriormente, a experiência de MST foi realizada no âmbito do workshop *Measure Binding Affinities with NanoTemper Technologies*, realizado na Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa. Optou-se por utilizar esta técnica já que é bastante mais sensível que o TSA e que o ITC, usando menos quantidade de proteína e de ligando.

Decidiu-se testar uma amostra do ligando C33, para melhor comparação entre os resultados obtidos através desta técnica e os resultados de ITC. A curva obtida pode ser observada na Figura 5.12.

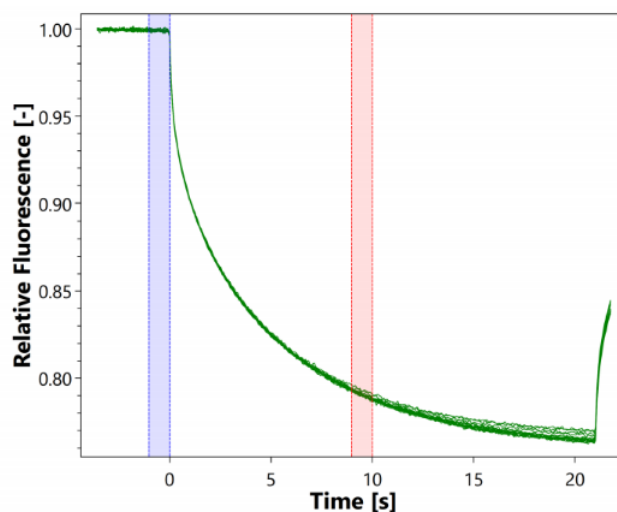


Figura 5.12- Gráfico obtido através da experiência de MST.

A análise preliminar do gráfico sugere que a proteína não se encontra agregada ou desnaturada, o que permite que seja analisada quanto à possível interação com o ligando. O resultado das emissões de fluorescência por cada capilar aparenta não ter discrepâncias significativas entre si. O fato de cada capilar conter soluções de proteína-ligando em diferentes concentrações deveria resultar num gráfico composto por várias curvas que demonstrassem diferentes emissões de fluorescência, resultantes da interação entre a proteína e o ligando, o que não se observa.

Estes resultados sugerem, de acordo com o que foi observado pelas outras técnicas, que, no caso de haver interação entre a proteína PtpA e o ligando C33, esta é muito fraca, ou então não foi utilizada concentração de ligando suficiente para se garantir a existência de interação entre ambos.

6 Conclusão

A premissa da presente dissertação, como referido anteriormente, passa por contribuir para a caracterização da interação entre a proteína tirosina fosfatase A, PtpA, e um conjunto de inibidores que se supõem seletivos e específicos para esta proteína, pertencentes à família das chalconas e das tiosemicarbazonas. Quanto às naftilchalconas presume-se que os seus grupos substituintes metoxil interagem por ligações de hidrogénio com os resíduos catalíticos, enquanto que os grupos naftil estabelecem interações hidrofóbicas com resíduos próximos do centro ativo, que orientam os inibidores no interior da cavidade catalítica. As tiosemicarbazonas poderão ser compostos candidatos à inibição da proteína em estudo devido à similaridade estrutural com as chalconas. A substituição do grupo naftil por outro heterociclo rico em eletrões, a alteração das posições dos substituintes do primeiro anel ou até mesmo a introdução de heteroátomos na estrutura do inibidor poderão promover uma maior seletividade destes compostos para a proteína PtpA. No sentido de se caracterizar a potencial interação entre a proteína PtpA e este conjunto de inibidores, procedeu-se a experiências de caracterização estrutural, enzimática e biofísica.

Primeiramente procedeu-se à expressão e purificação da proteína de interesse. Este passo decorreu com sucesso, uma vez que o grau de pureza da proteína obtido era bastante elevado apenas utilizando cromatografia de afinidade. O rendimento final da purificação foi de aproximadamente 21 mg de proteína por litro de cultura, o que também foi considerado bastante satisfatório.

Após este passo, foi possível proceder-se a ensaios de cristalização. Entre as várias condições testadas, obtiveram-se cristais de proteína utilizando a solução de cristalização 6 % PEG 6K e 0,1 M HEPES pH 6,5. Os cristais são observados ao fim de cerca de 15 dias, para uma concentração de proteína de 17,5 mg/mL, gotas de 4 μ L (3 μ L de proteína e 1 μ L de solução precipitante), 700 μ L de solução precipitante no reservatório e à temperatura de 4 °C. O sucesso desta cristalização representa a descoberta de uma nova condição de cristalização para a proteína PtpA. Depois da obtenção dos cristais, procedeu-se a experiências de *soaking* com os ligandos C33, Lap11, Lap04 e Je06. Esta experiência envolveu a adição de DMSO aos cristais, por ser o solvente de dissolução dos ligandos, que se encontrava numa concentração final máxima de 33 %, o que poderia ter resultado na degradação dos cristais. Porém, os cristais demonstraram resistência a este composto e foram analisados por radiação de sincrotrão. Recolheram-se vários conjuntos de dados com valores de resolução máxima entre 2,89 Å a 3,75 Å. Após a análise estatística dos resultados obtidos, decidiu-se prosseguir com a resolução de quatro estruturas, uma para cada um dos ligandos testados. O objetivo foi verificar a eventual presença de ligandos no centro ativo da proteína, ou mesmo noutra localização da mesma. A determinação das fases de cada reflexão para os conjuntos de dados recolhidos foi efetuada recorrendo à técnica de substituição molecular. Foi possível observar, para as quatro estruturas, a formação de um dímero cristalográfico, não observado anteriormente para estruturas desta proteína. Este dímero é formado por uma ligação dissulfureto entre duas cisteínas presentes em cada uma das cadeias da enzima. Observou-se também a existência de uma densidade extra

no centro ativo das estruturas, que não parece corresponder aos ligandos incubados com a proteína, nem com nenhum dos componentes presentes nos tampões utilizados. As resoluções obtidas, por serem baixas, não permitem uma análise mais precisa da origem dessa densidade extra, pelo que o trabalho futuro deverá passar pela otimização das condições de cristalização, ou descoberta de novas condições, com o objetivo de se obter cristais com melhor poder de difração. Outra possibilidade a considerar será testar outros ligandos, com maior afinidade e que possam competir pelo centro ativo de forma a remover a molécula que o ocupa.

A técnica de SAXS foi aplicada a esta proteína no estado livre, e em solução com o ligando C33. Os dados obtidos permitem concluir que a proteína não apresenta agregados e que se encontra na forma globular, assim como quando se encontra em solução com o ligando. As diferenças observadas para as duas amostras são pouco significativas, pelo que se pode concluir que no caso de haver interação entre o ligando e a proteína, esta não altera drasticamente a conformação geral da proteína.

A fraca solubilidade dos ligandos em estudo representou um desafio ao longo da presente dissertação, mas sobretudo na utilização dos ligandos durante os ensaios cinéticos e biofísicos. Para a dissolução dos ligandos considerou-se apenas a utilização de DMSO porque este é o solvente mais comum para estudos biológicos, o que condicionou as experiências descritas em seguida. No futuro deverá estender-se o mesmo tipo de estudos recorrendo a outros solventes como polietilenoglicol ou algumas famílias de líquidos iónicos.

Foram realizadas experiências de cinética enzimática, com o fim de melhor se compreender a atividade da proteína na presença do substrato pNPP, e também com a adição dos ligandos. Não foi possível realizar a experiência para concentrações de substrato suficientemente altas para a obtenção da curva de Michaelis-Menten. Para concentrações superiores às apresentadas, ocorreu saturação do sinal de absorvância, não sendo possível obter informação suficiente para a construção do gráfico. No entanto verificou-se que a amostra de proteína produzida é ativa, hidrolisando o substrato. Quando adicionados os ligandos em estudo, era de esperar que as velocidades iniciais das reações diminuíssem, devido a inibição da proteína por parte dos ligandos, porém, a diminuição observada não foi significativa. A adição de DMSO às soluções testadas indicou que este composto influencia a velocidade reacional.

A técnica de *thermal shift assay* foi testada para o estudo da estabilidade térmica da proteína PtpA na presença dos ligandos em estudo. Começou-se por realizar as experiências para uma concentração de ligandos de 100 μM , correspondendo a uma concentração de DMSO de 5%. Seria esperado um aumento do valor da temperatura de desnaturação para as amostras de proteína em solução com os ligandos, derivada de uma interação entre ambos que favorecesse a estabilidade térmica da proteína. O aumento observado não foi significativo nem conclusivo relativamente à existência de interações entre a PtpA e os ligandos em estudo.

As experiências de calorimetria de titulação isotérmica e de termoforese em microescala sugerem que na existência de interação entre o ligando C33 e a proteína, esta será de baixa afinidade. Porém, os resultados pouco conclusivos podem ter origem na utilização de menor concentração de ligando do que a necessária para que a sua diferença comparativamente à

concentração de proteína garante que há suficiente ligando em solução para interagir com a proteína, assumindo que a sua afinidade é baixa. A utilização de percentagens de DMSO na ordem dos 20 % também poderá contribuir para os resultados pouco conclusivos.

Apesar dos vários resultados inconclusivos, estes irão contribuir para os estudos futuros, principalmente por terem sido realizadas experiências recorrendo a técnicas distintas que permitem abrir novos horizontes acerca da direção que este estudo deve tomar. Em suma, este trabalho, de cariz desafiante, contribuiu para o avanço dos conhecimentos acerca da interação entre a proteína PtpA e da família das chalconas e das tiosemicarbazonas. Como consequência, talvez tenha encurtado o caminho para o combate à problemática da tuberculose, que ainda afeta milhares de pessoas em todo o planeta.

7 Referências bibliográficas

1. Daniel, T. M. The history of tuberculosis. *Respir. Med.* **100**, 1862–1870 (2006).
2. Silva, A. P. G. & Taberner, L. New strategies in fighting TB: targeting Mycobacterium tuberculosis-secreted phosphatases MptpA & MptpB. *Future Med. Chem.* **2**, 1325–37 (2010).
3. Guirado, E., Schlesinger, L. S. & Kaplan, G. Macrophages in tuberculosis: Friend or foe. *Semin. Immunopathol.* **35**, 563–583 (2013).
4. Chiaradia, L. D. *et al.* Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). *J. Med. Chem.* **55**, 390–402 (2012).
5. MacCari, R. & Ottanà, R. Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatases as emerging targets for the design of novel therapeutic agents. *J. Med. Chem.* **55**, 2–22 (2012).
6. Madhurantakam, C. *et al.* Crystal Structure of Low-Molecular-Weight Protein Tyrosine Phosphatase from Mycobacterium tuberculosis at 1.9 Å Resolution Crystal Structure of Low-Molecular-Weight Protein Tyrosine Phosphatase from Mycobacterium tuberculosis at 1.9 Å resolution. *J. Bacteriol.* **187**, 2175–2181 (2005).
7. Mascarello, A. *et al.* Inhibition of Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: Kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. *Bioorganic Med. Chem.* **18**, 3783–3789 (2010).
8. Chiaradia, L. D. *et al.* Synthetic chalcones as efficient inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **18**, 6227–6230 (2008).
9. Hayman, J. Mycobacterium Ulcerans: an Infection From Jurassic Time? *Lancet* **324**, 1015–1016 (1984).
10. Thomas M., D. *Pioneers of Medicine and Their Impact on Tuberculosis, Part 184.* (University of Rochester Press, 2000).
11. Organization, W. H. *Global tuberculosis report 2017.* (2017).
12. Tuberculose, P. N. para a. Tuberculose em Portugal. Desafios e Estratégias. *Port. Ministério da Saúde. Direção-Geral da Saúde* (2018).
13. Ducati, R. G., Ruffino-Netto, A., Basso, L. A. & Santos, D. S. The resumption of consumption - A review on tuberculosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**, 697–714 (2006).
14. Wong, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z. & Av-Gay, Y. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 19371–19376 (2011).
15. Forrellad, M. A. *et al.* Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence* **4**, 3–66 (2013).
16. Scherr, N. & Nguyen, L. Mycobacterium versus Streptomyces—we are different, we are the same. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 699–707 (2009).
17. Cambau, E. & Drancourt, M. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis

- by Robert Koch, 1882. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 196–201 (2014).
18. Wong, D., Chao, J. D. & Av-Gay, Y. Mycobacterium tuberculosis-secreted phosphatases: From pathogenesis to targets for TB drug development. *Trends Microbiol.* **21**, 100–109 (2013).
 19. Zhou, P., Li, W., Wong, D., Xie, J. & Av-Gay, Y. Phosphorylation control of protein tyrosine phosphatase A activity in Mycobacterium tuberculosis. *FEBS Lett.* **589**, 326–331 (2015).
 20. Margenat, M. *et al.* New potential eukaryotic substrates of the mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: hints of a bacterial modulation of macrophage bioenergetics state. *Sci. Rep.* **5**, 8819 (2015).
 21. Manger, M. *et al.* Discovery of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase A (MptpA) inhibitors based on natural products and a fragment-based approach. *ChemBioChem* **6**, 1749–1753 (2005).
 22. Poirier, V., Bach, H. & Av-Gay, Y. Mycobacterium tuberculosis promotes anti-apoptotic activity of the macrophage by PtpA protein-dependent dephosphorylation of host GSK3 α . *J. Biol. Chem.* **289**, 29376–29385 (2014).
 23. Caselli, A. *et al.* Low molecular weight protein tyrosine phosphatase: Multifaceted functions of an evolutionarily conserved enzyme. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1864**, 1339–1355 (2016).
 24. Matiollo, C. *et al.* S-nitrosylation of Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase A (PtpA) induces its structural instability. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1834**, 191–196 (2013).
 25. Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z. & Jaskolski, M. Protein crystallography for non-crystallographers , or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06178.x
 26. PDB Statistics. Available at: <http://www.rcsb.org/stats/>. (Accessed: 2nd April 2018)
 27. Eisberg, R. M. & Resnick, R. *Quantum physics of atoms, molecules, solids, nuclei, and particles*. (Wiley, 1985).
 28. Jaskolski, M., Dauter, Z. & Wlodawer, A. A brief history of macromolecular crystallography, illustrated by a family tree and its Nobel fruits. *FEBS J.* **281**, 3985–4009 (2014).
 29. The Nobel Prize in Physics 1901 - Speed Read. Available at: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1901/speedread.html. (Accessed: 15th February 2018)
 30. Eckert, M. Max von Laue and the discovery of X-ray diffraction in 1912. *Ann. Phys.* **524**, 83–85 (2012).
 31. Espectro Electromagnético. Available at: <http://cfq.absolutamente.net/espectro.html>. (Accessed: 16th September 2018)
 32. Abramson, J. *et al.* *Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips*. (1999).
 33. Interação da radiação ionizante com a matéria. Available at: <http://rle.dainf.ct.utfpr.edu.br/hipermidia/index.php/radiologia-convencional/principios-fisicosrx/interacao-da-radiacao-ionizante-com-a-materia>. (Accessed: 16th September 2018)

34. Chua, D. M. & Toh, H. F. *Synchrotron : design, properties, and applications*. (Nova Science Publishers, 2012).
35. BBC NEWS | Science/Nature | Secret 'dino bugs' revealed. Available at: <http://news.bbc.co.uk/2/hi/science/nature/7324564.stm>. (Accessed: 16th September 2018)
36. Romão, M. J. Cristalografia de Proteínas: metodologias e aplicações em Bioquímica. *Boletim de Biotecnologia* **53**, 18–36 (1996).
37. Unit Cells | Chemistry. Available at: <https://www.ck12.org/chemistry/unit-cells/lesson/Unit-Cells-CHEM/>. (Accessed: 16th September 2018)
38. Smyth, M. S. & Martin, J. H. X Ray Crystallography. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.* **53**, 8–14 (2000).
39. Rhodes, G. *Crystallography Made Crystal Clear, a Guide for users of macromolecular models, Third Edition*. (Elsevier Inc, 2006).
40. Shi, Y. A glimpse of structural biology through X-ray crystallography. *Cell* **159**, 995–1014 (2014).
41. Yonath, A. X-ray crystallography at the heart of life science. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 622–626 (2011).
42. Lewandowski, C. M., Co-investigator, N. & Lewandowski, C. M. *Ligand-Macromolecular interaction in Drug Discovery. The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference* **1**, (2015).
43. Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z. & Jaskolski, M. Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. **280**, 5705–5736 (2013).
44. Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z. & Jaskolski, M. Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS J.* **275**, 1–21 (2008).
45. All Nobel Prizes in Physics. Available at: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/. (Accessed: 15th February 2018)
46. The Nobel Prize in Chemistry 1962. Available at: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1962/. (Accessed: 15th February 2018)
47. Derewenda, Z. S. & Vekilov, P. G. Entropy and surface engineering in protein crystallization. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **62**, 116–124 (2006).
48. McPherson, A. & Gavira, J. A. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr. Sect. F Structural Biol. Commun.* **70**, 2–20 (2014).
49. Hassell, A. M. *et al.* Crystallization of protein – ligand complexes research papers. **4449**, 72–79 (2007).
50. Mu, I. Guidelines for the successful generation of protein – ligand complex crystals research papers. 79–92 (2017). doi:10.1107/S2059798316020271
51. Danley, D. E. Crystallization to obtain protein – ligand complexes for structure-aided drug design. 569–575 (2006). doi:10.1107/S0907444906012601

52. Kikhney, A. G. & Svergun, D. I. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS Lett.* **589**, 2570–2577 (2015).
53. Mertens, H. D. T. & Svergun, D. I. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J. Struct. Biol.* **172**, 128–141 (2010).
54. Pillon, M. C. & Guarné, A. Complementary uses of Small Angle X-ray Scattering and X-ray Crystallography. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 0–1 (2017). doi:10.1016/j.bbapap.2017.07.013
55. Putnam, C. D., Hammel, M., Hura, G. L. & Tainer, J. A. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q. Rev. Biophys.* **40**, 191–285 (2007).
56. Hura, G. L. *et al.* Robust, high-throughput solution structural analyses by small angle X-ray scattering (SAXS). *Nat. Methods* **6**, 606–612 (2009).
57. Goudar, C. T., Sonnad, J. R. & Duggleby, R. G. Parameter estimation using a direct solution of the integrated Michaelis-Menten equation. *Biochim. Biophys. Acta* **1429**, 377–383 (1999).
58. Bar-Even, A. *et al.* The moderately efficient enzyme: Evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters. *Biochemistry* **50**, 4402–4410 (2011).
59. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed. Book* (W.H.Freeman and Company, 2013). doi:10.1016/j.jse.2011.03.016
60. Niesen, F. H., Berglund, H. & Vedadi, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* **2**, 2212–2221 (2007).
61. Boivin, S., Kozak, S. & Meijers, R. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Expr. Purif.* **91**, 192–206 (2013).
62. Huynh, K. & Partch, C. L. Current Protocols in Protein Science: Analysis of Protein Stability and Ligand Interactions by Thermal Shift Assay. in *Current Protocols in Protein Science* **42**, 28.9.1-28.9.14 (John Wiley & Sons, Inc., 2015).
63. Draczkowski, P., Matosiuk, D. & Jozwiak, K. Isothermal titration calorimetry in membrane protein research. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87**, 313–325 (2014).
64. Matulis, D., Kranz, J. K., Salemme, F. R. & Todd, M. J. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: Measurements of binding affinity and stoichiometry using thermofluor. *Biochemistry* **44**, 5258–5266 (2005).
65. Casimiro, M. H., Leal, J. P., Gil, M. H. & Nieto de Castro, C. A. Análise Calorimétrica aplicada a Polímeros Biológicos - Parte I: Fundamentos Teóricos. *Química* **100**, 29–36 (2005).
66. Groftehaug, M. K., Hajizadeh, N. R., Swann, M. J. & Pohl, E. Protein-ligand interactions investigated by thermal shift assays (TSA) and dual polarization interferometry (DPI). *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **71**, 36–44 (2015).
67. Seidel, S. A. I. *et al.* Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods* **59**, 301–315 (2013).

8 Anexos

Tabela 1- *Screen* de cristalização JCSG

[] M		[]M		pH	% V/V	Glycerol
0,2	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	Sodium HEPES	7,5	30	PEG 400
0,2	Sodium chloride	0,1	Sodium/potassium phosphate	6,2	50	PEG 200
0,2	Lithium sulfate	0,1	Sodium acetate	4,5	30	PEG 8000
	None	0,1	HEPES	7,5	70	MPD
0,2	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	Tris	8,5	20	PEG 8000
0,2	Lithium sulfate	0,1	Tris	8,5	40	PEG 400
	None	0,1	Tris	8,0	40	MPD
0,17	Ammonium sulfate		None	-	25,5	PEG 4000
					15	Glycerol
0,2	Calcium acetate hydrate	0,1	Sodium cacodylate	6,5	40	PEG 300
0,14	Calcium chloride dihydrate	0,07	Sodium acetate	4,6	14	2-Propanol
					30	Glycerol
0,04	Potassium phosphate monobasic		None	-	16	PEG 8000
					20	Glycerol
1,0	Sodium citrate tribasic dihydrate	0,1	Sodium cacodylate	6,5		None
2,0	Ammonium sulfate	0,1	Sodium cacodylate	6,5		None
0,2	Sodium chloride					
0,2	Sodium chloride	0,1	HEPES	7,5	10	2-Propanol
1,26	Ammonium sulfate	0,1	Tris	8,5		None
0,2	Lithium sulfate					
	None	0,1	CAPS	10,5	40	MPD
0,2	Zinc acetate dihydrate	0,1	Imidazole	8,0	20	PEG 3000
0,2	Zinc acetate dihydrate	0,1	Sodium cacodylate	6,5	10	2-Propanol

1,0	Ammonium phosphate dibasic	0,1	Sodium acetate	4,5		None
1,6	Magnesium sulfate heptahydrate	0,1	MES	6,5		None
	None	0,1	BICINE	9,0	10	PEG 6000
0,16	Calcium acetate hydrate	0,08	Sodium cacodylate	6,5	14,4	PEG 8000
					20	Glycerol
	None	0,1	Imidazole	8,0	10	PEG 8000
0,05	Cesium chloride	0,1	MES	6,5	30	Jeffamine® M-600
3,2	Ammonium sulfate	0,1	Citrate	5,0		None
	None	0,1	Tris	8,0	20	MPD
	None	0,1	HEPES	7,5	20	Jeffamine® M-600
0,2	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	Tris	8,5	50	Ethylene glycol
	None	0,1	BICINE	9,0	10	MPD
0,8	Succinic acid		None	7,0		None
2,1	DL-Malic acid		None	7,0		None
2,4	Sodium malonate dibasic monohydrate		None	7,0		None
1,1	Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1	HEPES	7,0	0,5	Jeffamine® ED-2003
1,0	Succinic acid	0,1	HEPES	7,0	1	PEG 2000 MME
	None	0,1	HEPES	7,0	30	Jeffamine® M-600
	None	0,1	HEPES	7,0	30	Jeffamine® ED-2003
0,02	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	HEPES	7,5	22	Poly(acrylic acid sodium salt) 5100
0,01	Cobalt(II) chloride hexahydrate	0,1	Tris	8,5	20	Polyvinylpyrrolidone
0,2	TMAO	0,1	Tris	8,5	20	PEG 2000 MME
0,005	Cobalt(II) chloride hexahydrate	0,1	HEPES	7,5	12	PEG 3350
0,005	Cadmium chloride hemi(pentahydrate)					
0,005	Magnesium chloride hexahydrate					

0,005	Nickel(II) chloride hexahydrate					
0,2	Sodium malonate dibasic monohydrate		None	-	20	PEG 3350
0,1	Succinic acid		None	-	15	PEG 3350
0,15	DL-Malic acid		None	-	20	PEG 3350
0,1	Potassium thiocyanate		None	-	30	PEG 2000 MME
0,15	Potassium bromide		None	-	30	PEG 2000 MME
2,0	Ammonium sulfate	0,1	Bis-Tris	5,5		None
3,0	Sodium chloride	0,1	Bis-Tris	5,5		None
0,3	Magnesium formate dihydrate	0,1	Bis-Tris	5,5		None
1,0	Ammonium sulfate	0,1	Bis-Tris	5,5	1	PEG 3350
	None	0,1	Bis-Tris	5,5	25	PEG 3350
0,2	Calcium chloride dihydrate	0,1	Bis-Tris	5,5	45	MPD
0,2	Ammonium acetate	0,1	Bis-Tris	5,5	45	MPD
0,1	Ammonium acetate	0,1	Bis-Tris	5,5	17	PEG 10,000
0,2	Ammonium sulfate	0,1	Bis-Tris	5,5	25	PEG 3350
0,2	Sodium chloride	0,1	Bis-Tris	5,5	25	PEG 3350
0,2	Lithium sulfate	0,1	Bis-Tris	5,5	25	PEG 3350
0,2	Ammonium acetate	0,1	Bis-Tris	5,5	25	PEG 3350
0,2	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	Bis-Tris	5,5	25	PEG 3350
0,2	Ammonium acetate	0,1	HEPES	7,5	45	MPD

Tabela 2- Screen de cristalização JBS 1, 2,3 & 4

CS-101L	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	Additive 1
1/A1	15.00 % w/v Polyethylene glycol 400	None	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	100 mM Calcium chloride
1/A2	15.00 % w/v Polyethylene glycol 400	None	100 mM MES; pH 6.5	None

1/A3	15.00 % w/v Polyethylene glycol 400	None	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM Magnesium chloride
1/A4	15.00 % w/v Polyethylene glycol 400	None	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM tri-Sodium citrate
1/A5	25.00 % w/v Polyethylene glycol 400	None	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	100 mM Magnesium chloride
1/A6	25.00 % w/v Polyethylene glycol 400	None	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Lithium sulfate
1/B1	28.00 % w/v Polyethylene glycol 400	None	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM Calcium chloride
1/B2	30.00 % w/v Polyethylene glycol 400	None	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	100 mM Calcium chloride
1/B3	30.00 % w/v Polyethylene glycol 400	None	100 mM MES; pH 6.5	100 mM Sodium acetate
1/B4	30.00 % w/v Polyethylene glycol 400	None	100 mM MES; pH 6.5	100 mM Magnesium chloride
1/B5	30.00 % w/v Polyethylene glycol 400	None	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM Magnesium chloride
1/B6	30.00 % w/v Polyethylene glycol 400	None	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM tri-Sodium citrate
1/C1	30.00 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550	None	100 mM BICINE; pH 9.0	100 mM Sodium chloride
1/C2	25.00 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550	None	100 mM MES; pH 6.5	10.00 mM Zinc sulfate
1/C3	25.00 % w/v Polyethylene glycol 1,000	None	100 mM HEPES; pH 7.5	None

1/C4	30.00 % w/v Polyethylene glycol 1,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	None
1/C5	15.00 % w/v Polyethylene glycol 1,500	None	None	None
1/C6	20.00 % w/v Polyethylene glycol 1,500	None	100 mM HEPES; pH 7.5	None
1/D1	30.00 % w/v Polyethylene glycol 1,500	None	None	None
1/D2	20.00 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	10.00 mM Nickel (II) chloride
1/D3	25.00 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	None	None	None
1/D4	30.00 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	None	100 mM MES; pH 6.5	100 mM Sodium acetate
1/D5	20.00 % w/v Polyethylene glycol 3,000	None	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM Sodium acetate
1/D6	30.00 % w/v Polyethylene glycol 3,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Lithium sulfate
CS-102L	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	Additive 1
2/A1	4.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	None
2/A2	8.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	None	None
2/A3	8.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	None
2/A4	10.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM MES; pH 6.5	200 mM Magnesium chloride
2/A5	12.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM HEPES; pH 7.5	100 mM Sodium acetate

2/A6	12.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	None
2/B1	16.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Lithium sulfate
2/B2	16.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Sodium acetate
2/B3	16.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Magnesium chloride
2/B4	18.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	None
2/B5	20.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Lithium sulfate
2/B6	20.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Calcium chloride
2/C1	22.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM HEPES; pH 7.5	100 mM Sodium acetate
2/C2	25.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	None
2/C3	25.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM MES; pH 6.5	200 mM Magnesium chloride
2/C4	25.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Calcium chloride
2/C5	30.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	None	None
2/C6	30.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	100 mM Magnesium chloride

2/D1	30.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM MES; pH 6.5	None	
2/D2	30.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM Calcium chloride	
2/D3	30.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Lithium sulfate	
2/D4	30.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Sodium acetate	
2/D5	30.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Magnesium chloride	
2/D6	35.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	None	None	
CS-103L	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	Additive 1	Additive 2
3/A1	8.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	800 mM Lithium chloride	100 mM TRIS; pH 8.5	None	None
3/A2	10.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	20.00 % w/v 2-Propanol	None	None	None
3/A3	10.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	10.00 % w/v 2-Propanol	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	None	None
3/A4	10.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	5.00 % w/v 2-Propanol	100 mM HEPES; pH 7.5	None	None
3/A5	10.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	20.00 % w/v 2-Propanol	100 mM HEPES; pH 7.5	None	None
3/A6	12.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	200 mM Ammonium sulfate	None

3/B1	15.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	None	200 mM Ammonium sulfate	None
3/B2	15.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	200 mM Ammonium sulfate	None
3/B3	16.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	10.00 % w/v 2-Propanol	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM Ammonium sulfate	None
3/B4	20.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	None	200 mM Ammonium sulfate	None
3/B5	20.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	10.00 % w/v Glycerol	None	200 mM Magnesium sulfate	None
3/B6	20.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	5.00 % w/v 2-Propanol	None	100 mM tri-Sodium citrate	None
3/C1	20.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	20.00 % w/v 2-Propanol	None	100 mM tri-Sodium citrate	None
3/C2	20.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM MES; pH 6.5	600 mM Sodium chloride	None
3/C3	20.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	10.00 % w/v 2-Propanol	100 mM HEPES; pH 7.5	None	None
3/C4	22.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	None	100 mM Sodium acetate	200 mM Ammonium sulfate
3/C5	25.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	200 mM Ammonium sulfate	None
3/C6	25.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	200 mM Ammonium sulfate	None
3/D1	25.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	200 mM Lithium sulfate	100 mM HEPES; pH 7.5	100 mM Sodium acetate	None

3/D2	25.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	8.00 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Sodium acetate	None
3/D3	30.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	None	200 mM Ammonium sulfate	None
3/D4	30.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	200 mM Ammonium sulfate	None
3/D5	30.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	100 mM Ammonium sulfate	None
3/D6	32.00 % w/v Polyethylene glycol 4,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	800 mM Lithium chloride	None
CS-104L	<i>Precipitant 1</i>	<i>Precipitant 2</i>	<i>Buffer</i>	<i>Additive 1</i>	<i>Additive 2</i>
4/A1	25.00 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Lithium sulfate	None
4/A2	30.00 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000	None	100 mM MES; pH 6.5	200 mM Ammonium sulfate	None
4/A3	3.00 % w/v Polyethylene glycol 6,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	100 mM Potassium chloride	None
4/A4	10.00 % w/v Polyethylene glycol 6,000	None	None	10.00 mM Magnesium chloride	None
4/A5	12.00 % w/v Polyethylene glycol 6,000	2.00 M Sodium chloride	None	None	None
4/A6	15.00 % w/v Polyethylene glycol 6,000	5.00 % w/v Glycerol	None	None	None

4/B1	15.00 % w/v Polyethylene glycol 6,000	50.00 mM Potassium chloride	None	10.00 mM Magnesium chloride	None
4/B2	16.00 % w/v Polyethylene glycol 6,000	None	None	10.00 mM tri-Sodium citrate	None
4/B3	20.00 % w/v Polyethylene glycol 6,000	None	50.00 mM Imidazole; pH 8.0	None	None
4/B4	25.00 % w/v Polyethylene glycol 6,000	None	100 mM HEPES; pH 7.5	100 mM Lithium chloride	None
4/B5	28.00 % w/v Polyethylene glycol 6,000	500 mM Lithium chloride	100 mM TRIS; pH 8.5	None	None
4/B6	30.00 % w/v Polyethylene glycol 6,000	1.00 M Lithium chloride	None	100 mM Sodium acetate	None
4/C1	33.00 % w/v Polyethylene glycol 6,000	None	None	10.00 mM tri-Sodium citrate	None
4/C2	2.00 % w/v Polyethylene glycol 8,000	500 mM Lithium sulfate	None	None	None
4/C3	2.00 % w/v Polyethylene glycol 8,000	1.00 M Lithium sulfate	None	None	None
4/C4	4.00 % w/v Polyethylene glycol 8,000	None	None	None	None
4/C5	8.00 % w/v Polyethylene glycol 8,000	200 mM Lithium chloride	None	50.00 mM Magnesium sulfate	None
4/C6	8.00 % w/v Polyethylene glycol 8,000	None	100 mM TRIS; pH 8.5	None	None
4/D1	10.00 % w/v Polyethylene glycol 8,000	None	100 mM MES; pH 6.5	200 mM Zinc acetate	None

4/D2	10.00 % w/v Polyethylene glycol 8,000	None	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM Calcium acetate	None
4/D3	10.00 % w/v Polyethylene glycol 8,000	None	None	100 mM Sodium acetate	50.00 mM Magnesium acetate
4/D4	10.00 % w/v Polyethylene glycol 8,000	None	None	200 mM Magnesium acetate	None
4/D5	10.00 % w/v Polyethylene glycol 8,000	10.00 % w/v Ethylene glycol	100 mM HEPES; pH 7.5	None	None
4/D6	10.00 % w/v Polyethylene glycol 8,000	10.00 % w/v Polyethylene glycol 1,000	None	None	None

Tabela 3 – *Screen* de cristalização Structure 1 & 2

	<i>Salt</i>	<i>Buffer</i>	<i>pH</i>	<i>Precipitant</i>
A1	0.02 M calcium chloride	0.1 M Na acetate	4.6	30 % v/v MPD
A2	0.2 M ammonium acetate	0.1 M Na acetate	4.6	30 % w/v PEG 4000
A3	0.2 M ammonium sulfate	0.1 M Na acetate	4.6	25 % w/v PEG 4000
A4	None	0.1 M Na acetate	4.6	2.0 M sodium formate
A5	None	0.1 M Na acetate	4.6	2.0 M ammonium sulfate
A6	None	0.1 M Na acetate	4.6	8 % w/v PEG 4000
A7	0.2 M ammonium acetate	0.1 M Na citrate	5.6	30 % w/v PEG 4000
A8	0.2 M ammonium acetate	0.1 M Na citrate	5.6	30 % v/v MPD
A9	None	0.1 M Na citrate	5.6	20 % v/v 2-propanol, 20 % w/v PEG 4000

A10	None	0.1 M Na citrate	5.6	1.0 M ammonium dihydrogen phosphate
A11	0.2 M calcium chloride	0.1 M Na acetate	4.6	20 % v/v 2-propanol
A12	None	0.1 M Na cacodylate	6.5	1.4 M sodium acetate
B1	0.2 M sodium citrate	0.1 M Na cacodylate	6.5	30 % v/v 2-propanol
B2	0.2 M ammonium sulfate	0.1 M Na cacodylate	6.5	30 % w/v PEG 8000
B3	0.2 M magnesium acetate	0.1 M Na cacodylate	6.5	20 % w/v PEG 8000
B4	0.2 M magnesium acetate	0.1 M Na cacodylate	6.5	30 % v/v MPD
B5	None	0.1 M imidazole	6.5	1.0 M sodium acetate
B6	0.2 M sodium acetate	0.1 M Na cacodylate	6.5	30 % w/v PEG 8000
B7	0.2 M zinc acetate	0.1 M Na cacodylate	6.5	18 % w/v PEG 8000
B8	0.2 M calcium acetate	0.1 M Na cacodylate	6.5	18 % w/v PEG 8000
B9	0.2 M sodium citrate	0.1 M Na HEPES	7.5	30 % v/v MPD
B10	0.2 M magnesium chloride	0.1 M Na HEPES	7.5	30 % v/v 2-propanol
B11	0.2 M calcium chloride	0.1 M Na HEPES	7.5	28 % v/v PEG 400
B12	0.2 M magnesium chloride	0.1 M Na HEPES	7.5	30 % v/v PEG 400
C1	0.2 M sodium citrate	0.1 M Na HEPES	7.5	20 % v/v 2-propanol
C2	None	0.1 M Na HEPES	7.5	0.8 M K/Na tartrate
C3	None	0.1 M Na HEPES	7.5	1.5 M lithium sulfate
C4	None	0.1 M Na HEPES	7.5	0.8 M sodium dihydrogen phosphate 0.8 M potassium dihydrogen phosphate

C5	None	0.1 M Na HEPES	7.5	1.4 M tri-sodium citrate
C6	None	0.1 M Na HEPES	7.5	2 % v/v PEG 400, 2.0 M ammonium sulfate
C7	None	0.1 M Na HEPES	7.5	10 % v/v 2-propanol, 20 % w/v PEG 4000
C8	None	0.1 M Tris	8.5	2.0 M ammonium sulfate
C9	0.2 M magnesium chloride	0.1 M Tris	8.5	30 % w/v PEG 4000
C10	0.2 M sodium citrate	0.1 M Tris	8.5	30 % v/v PEG 400
C11	0.2 M lithium sulfate	0.1 M Tris	8.5	30 % w/v PEG 4000
C12	0.2 M ammonium acetate	0.1 M Tris	8.5	30 % v/v 2-propanol
D1	0.2 M sodium acetate	0.1 M Tris	8.5	30 % w/v PEG 4000
D2	None	0.1 M Tris	8.5	8 % w/v PEG 8000
D3	None	0.1 M Tris	8.5	2.0 M ammonium dihydrogen phosphate
D4	None	None	None	0.4 M K/Na tartrate
D5	None	None	None	0.4 M ammonium dihydrogen phosphate
D6	0.2 M ammonium sulfate	None	None	30 % w/v PEG 8000
D7	0.2 M ammonium sulfate	None	None	30 % w/v PEG 4000
D8	None	None	None	2.0 M ammonium sulfate
D9	None	None	None	4.0 M sodium formate
D10	0.05 M potassium dihydrogen phosphate	None	None	20 % w/v PEG 8000
D11	None	None	None	30 % w/v PEG 1500
D12	None	None	None	0.2 M magnesium formate
E1	0.1 M sodium chloride	0.1 M Bicine	9.0	30 % v/v PEG 550 MME
E2	None	0.1 M Bicine	9.0	2.0 M magnesium chloride
E3	2 % v/v dioxane	0.1 M Bicine	9.0	10 % w/v PEG 20,000
E4	0.2 M magnesium chloride	0.1 M Tris	8.5	3.4 M 1,6-hexanediol
E5	None	0.1 M Tris	8.5	25 % v/v tert-Butanol
E6	0.01 M nickel chloride	0.1 M Tris	8.5	1.0 M lithium sulfate
E7	1.5 M ammonium sulfate	0.1 M Tris	8.5	12 % v/v glycerol
E8	0.2 M ammonium phosphate monobasic	0.1 M Tris	8.5	50 % v/v MPD
E9	None	0.1 M Tris	8.5	20 % v/v ethanol
E10	0.01 M nickel chloride	0.1 M Tris	8.5	20 % w/v PEG 2000 MME
E11	0.5 M ammonium sulfate	0.1 M Na HEPES	7.5	30 % v/v MPD

E12	None	0.1 M Na HEPES	7.5	10 % w/v PEG 6000, 5% v/v MPD
F1	None	0.1 M Na HEPES	7.5	20 % v/v Jeffamine M-600
F2	0.1 M sodium chloride	0.1 M Na HEPES	7.5	1.6 M ammonium sulfate
F3	None	0.1 M Na HEPES	7.5	2.0 M ammonium formate
F4	0.05 M cadmium sulfate	0.1 M Na HEPES	7.5	1.0 M sodium acetate
F5	None	0.1 M Na HEPES	7.5	70 % v/v MPD
F6	None	0.1 M Na HEPES	7.5	4.3 M sodium chloride
F7	None	0.1 M Na HEPES	7.5	10 % w/v PEG 8000, 8 % v/v ethylene glycol
F8	None	0.1 M MES	6.5	1.6 M magnesium sulfate
F9	0.1 M sodium dihydrogen phosphate 0.1 M potassium dihydrogen phosphate	0.1 M MES	6.5	2.0 M sodium chloride
F10	None	0.1 M MES	6.5	12 % w/v PEG 20,000
F11	1.6 M ammonium sulfate	0.1 M MES	6.5	10 % v/v dioxane
F12	0.05 M caesium chloride	0.1 M MES	6.5	30 % v/v Jeffamine M-600
G1	0.01 M cobalt chloride	0.1 M MES	6.5	1.8 M ammonium sulfate
G2	0.2 M ammonium sulfate	0.1 M MES	6.5	30 % w/v PEG 5000 MME
G3	0.01 M zinc sulfate	0.1 M MES	6.5	25 % v/v PEG 550 MME
G4	None	0.1 M Na HEPES	7.5	20 % w/v PEG 10,000
G5	0.2 M K/Na Tartrate	0.1 M Na citrate	5.6	2.0 M ammonium sulfate
G6	0.5 M ammonium sulfate	0.1 M Na citrate	5.6	1.0 M lithium sulfate
G7	0.5 M sodium chloride	0.1 M Na citrate	5.6	4% v/v polyethyleneimine
G8	None	0.1 M Na citrate	5.6	35 % v/v tert-Butanol
G9	0.01 M ferric chloride	0.1 M Na citrate	5.6	10 % v/v Jeffamine M-600

G10	0.01 M manganese chloride	0.1 M Na citrate	5.6	2.5 M 1,6-hexanediol
G11	None	0.1 M Na acetate	4.6	2.0 M sodium chloride
G12	0.2 M sodium chloride	0.1 M Na acetate	4.6	30 % v/v MPD
H1	0.01 M cobalt chloride	0.1 M Na acetate	4.6	1.0 M 1,6-hexanediol
H2	0.1 M cadmium chloride	0.1 M Na acetate	4.6	30 % v/v PEG 400
H3	0.2 M ammonium sulfate	0.1 M Na acetate	4.6	30 % w/v PEG 2000 MME
H4	2.0 M sodium chloride	None	None	10 % w/v PEG 6000
H5	0.01 M CTAB	None	None	0.5 M sodium chloride 0.1 M magnesium chloride
H6	None	None	None	25 % v/v ethylene glycol
H7	None	None	None	35 % v/v dioxane
H8	2.0 M ammonium sulfate	None	None	5 % v/v 2-propanol
H9	None	None	7.0	1.0 M imidazole
H10	None	None	None	10 % w/v PEG 1000, 10% w/v PEG 8000
H11	1.5 M sodium chloride	None	None	10 % v/v ethanol
H12	None	None	6.5	1.6 M sodium citrate

Tabela 4 - Screen de cristalização Additives

NO.	ADDITIVE	TYPE	CAS#
A1	2.00 M 6-Aminohexanoic acid	Linker Molecule	60-32-2
A2	2.00 M Ethanolamine	Linker Molecule	141-43-5
A3	2.00 M 1,6-Diaminohexane	Linker Molecule	124-09-4
A4	2.00 M 1,8-Diaminooctane	Linker Molecule	373-44-4
A5	1.00 M 1,2,3-hexanetriol	Polyalcohol	25323-24-4
A6	0.10 M Spermidine trihydrochloride	Polyamine	334-50-9
1	0.50 M Polypropylene glycol 400	Organic Hydrophilic Polymer	25322-69-4
2	1.00 M Polyethylene glycol 200	Organic Hydrophilic Polymer	25322-68-3
B3	0.50 M Polyethylene glycol 600	Organic Hydrophilic Polymer	25322-68-3
B4	0.02 M Dextran sulfate sodium salt 5,000	Organic Hydrophilic Polymer	9011-18-1
B5	1.00 %w/v Polyvinyl alcohol Type II	Organic Hydrophilic Polymer	9002-89-5

B6	5.00 %w/v Polyvinylpyrrolidone K15	Organic Hydrophilic Polymer	9003-39-8
C1	1.00 M D-(-)-Fructose	Carbohydrate	57-48-7
C2	1.00 M D-(+)-Glucose	Carbohydrate	14431-43-7
C3	1.00 M D-(+)-Mannose	Carbohydrate	3458-28-4
C4	0.50 M Lactose	Carbohydrate	63-42-3
C5	1.00 M D-(+)-Sucrose	Carbohydrate	57-50-1
C6	1.00 M D-(+)-Trehalose	Carbohydrate	6138-23-4
D1	0.10 M Dithiothreitol	Reducing Agent	3483-12-3
D2	0.10 M L-Cysteine	Reducing Agent	52-90-4
D3	0.10 M Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt	Chelator	6381-92-6
D4	0.10 M Adenosine-5'-triphosphate disodium salt	Co-Factor	987-65-5
D5	1.00 M Benzamidine hydrochloride	Amphiphilic Molecule	206752-36-5
D6	0.30 M Glycyl-glycyl-glycine	Amphiphilic Molecule	556-33-2

Tabela 5 - *Screen* de cristalização Volatiles

NO.	ADDITIVE	TYPE	CAS#
A1	25.30 %v/v Methanol	Small Alcohol	67-56-1
A2	18.20 %v/v Ethanol	Small Alcohol	64-17-5
A3	23.60 %v/v 2-Propanol	Small Alcohol	67-63-0
A4	24.20 %v/v 1-Propanol	Small Alcohol	71-23-8
A5	6.00 %v/v 1-Butanol	Small Alcohol	71-36-3
A6	28.70 %v/v 2-Methyl-2-propanol	Small Alcohol	75-65-0
B1	34.50 %v/v Ethylene glycol	Small Alcohol	107-21-1
B2	40.10 %v/v 1,3-Propanediol	Small Alcohol	504-63-2
B3	36.70 %v/v 1,4-Butanediol	Small Alcohol	110-63-4
B4	36.30 %v/v 1,2-Butanediol	Small Alcohol	584-03-2
B5	54.90 %v/v 2,2,2-Trifluoroethanol	Small Alcohol	75-89-8
B6	53.60 %v/v 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol	Small Alcohol	920-66-1
C1	38.60 %v/v 4-Butyrolactone	Non ionic Chaotrope	96-48-0
C2	32.30 %v/v Acetonitrile	Non ionic Chaotrope	75-05-8
C3	6.40 %v/v Propionitrile	Non ionic Chaotrope	107-12-0
C4	2.60 %v/v Methyl tert-butyl ether	Non ionic Chaotrope	1634-04-4
C5	36.40 %v/v 1,4-Dioxane	Non ionic Chaotrope	123-91-1
C6	25.60 %v/v Tetrahydrofuran	Non ionic Chaotrope	109-99-9

D1	23.00 %v/v Acetone	Organic Volatile	67-64-1
D2	14.50 %v/v Butanone	Organic Volatile	78-93-3
D3	7.00 %v/v 3-Pentanone	Organic Volatile	96-22-0
D4	3.50 %v/v Methyl acetate	Organic Volatile	79-20-9
D5	2.40 %v/v Ethyl acetate	Organic Volatile	141-78-6
D6	0.60 %v/v Dichloromethane	Organic Volatile	75-09-2

Tabela 6 - *Screen* de cristalização Salts

NO.	ADDITIVE	TYPE	CAS#
A1	1.00 M tri-Lithium citrate	Lithium Salt	313222-91-2
A2	2.00 M Lithium acetate	Lithium Salt	6108-17-4
A3	2.00 M Lithium bromide	Lithium Salt	85017-82-9
A4	2.00 M Lithium salicylate	Lithium Salt	552-38-5
A5	2.00 M Lithium nitrate	Lithium Salt	7790-69-4
A6	2.00 M Lithium perchlorate	Lithium Salt	7791-03-9
B1	2.00 M Ammonium fluoride	Ammonium Salt	12125-01-8
B2	2.00 M Ammonium chloride	Ammonium Salt	12125-02-9
B3	2.00 M Ammonium bromide	Ammonium Salt	12124-97-9
B4	2.00 M Ammonium nitrate	Ammonium Salt	6484-52-2
B5	2.00 M Ammonium thiocyanate	Ammonium Salt	1762-95-4
B6	2.00 M Ammonium trifluoroacetate	Ammonium Salt	3336-58-1
C1	2.00 M di-Ammonium tartrate	Ammonium Salt	3164-29-2
C2	0.60 M Potassium sulfate	Sulfate	7778-80-5
C3	2.00 M Sodium sulfate	Sulfate	7727-73-3
C4	2.00 M Lithium sulfate	Sulfate	10377-48-7
C5	2.00 M Magnesium sulfate	Sulfate	10034-99-8
C6	1.00 M Beryllium sulfate	Sulfate	13510-49-1
D1	0.10 M Barium chloride	Multivalent Cation	10326-27-9

D2	0.10 M Strontium chloride	Multivalent Cation	10025-70-4
D3	0.10 M Cadmium chloride	Multivalent Cation	10108-64-2
D4	0.10 M Cobalt (II) chloride	Multivalent Cation	7791-13-1
D5	0.10 M Copper (II) chloride	Multivalent Cation	10125-13-0
D6	0.10 M Yttrium (III) chloride	Multivalent Cation	10025-94-2

Tabela 7 - Lista de soluções do *screen* de tampões utilizado para a PtpA, durante a experiência de TSA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Citric acid pH 4.0	Sodium acetate pH 4.5	Sodium citrate pH 4.7	Sodium acetate pH 5.0	Potassium phosphate pH 5.0	Sodium phosphate pH 5.5	Sodium citrate pH 5.5	MES pH 5.8	Potassium phosphate pH 6.0	MES pH 6.2	Sodium phosphate pH 6.5	Sodium cacodylate pH 6.5
B	MES pH 6.5	PIPES pH 6.7	MOPS pH 7.0	HEPES pH 7.0	Ammonium acetate pH 7.3	Sodium phosphate pH 7.5	Tris pH 7.5	Imidazole pH 8.0	Hepes pH 8.0	Tris pH 8.0	Bicine pH 8.5	Tris pH 8.5
C	Bicine pH 9.0	CAPS pH 9.0	Glycine-HCl pH 9.5	Glycine-HCl pH 10	CAPS pH 10.5	CAPS pH 11	Citric acid pH 4.0 + 300 mM NaCl	Sodium acetate pH 4.5 + 300 mM NaCl	Sodium citrate pH 4.7 + 300 mM NaCl	Sodium acetate pH 5.0 + 300 mM NaCl	Potassium phosphate pH 5.0 + 300 mM NaCl	Sodium phosphate pH 5.5 + 300 mM NaCl
D	Sodium citrate pH 5.5 + 300 mM NaCl	MES pH 5.8 + 300 mM NaCl	Potassium phosphate pH 6.0 + 300 mM NaCl	MES pH 6.2 + 300 mM NaCl	Sodium phosphate pH 6.5 + 300 mM NaCl	Sodium cacodylate pH 6.5 + 300 mM NaCl	MES pH 6.5 + 300 mM NaCl	PIPES pH 6.7 + 300 mM NaCl	MOPS pH 7.0 + 300 mM NaCl	HEPES pH 7.0 + 300 mM NaCl	Ammonium acetate pH 7.3 + 300 mM NaCl	Sodium phosphate pH 7.5 + 300 mM NaCl
E	Tris pH 7.5 + 300 mM NaCl	Imidazole pH 8.0 + 300 mM NaCl	Hepes pH 8.0 + 300 mM NaCl	Tris pH 8.0 + 300 mM NaCl	Bicine pH 8.5 + 300 mM NaCl	Tris pH 8.5 + 300 mM NaCl	Bicine pH 9.0 + 300 mM NaCl	CAPS pH 9.0 + 300 mM NaCl	Glycine.HCl pH 9.5 + 300 mM NaCl	Glycine.HCl pH 10 + 300 mM NaCl	CAPS pH 10.5 + 300 mM NaCl	CAPS pH 11 + 300 mM NaCl
F	Citric acid pH 4.0 + 1 M NaCl	Sodium acetate pH 4.5 + 1 M NaCl	Sodium citrate pH 4.7 + 1 M NaCl	Sodium acetate pH 5.0 + 1 M NaCl	Potassium phosphate pH 5.0 + 1 M NaCl	Sodium phosphate pH 5.5 + 1 M NaCl	Sodium citrate pH 5.5 + 1 M NaCl	MES pH 5.8 + 1 M NaCl	Potassium phosphate pH 6.0 + 1 M NaCl	MES pH 6.2 + 1 M NaCl	Sodium phosphate pH 6.5 + 1 M NaCl	Sodium cacodylate pH 6.5 + 1 M NaCl
G	MES pH 6.5 + 1 M NaCl	PIPES pH 6.7 + 1 M NaCl	MOPS pH 7.0 + 1 M NaCl	HEPES pH 7.0 + 1 M NaCl	Ammonium acetate pH 7.3 + 1 M NaCl	Sodium phosphate pH 7.5 + 1 M NaCl	Tris pH 7.5 + 1 M NaCl	Imidazole pH 8.0 + 1 M NaCl	Hepes pH 8.0 + 1 M NaCl	Tris pH 8.0 + 1 M NaCl	Bicine pH 8.5 + 1 M NaCl	Tris pH 8.5 + 1 M NaCl
H	Bicine pH 9.0 + 1 M NaCl	CAPS pH 9.0 + 1 M NaCl	Glycine-HCl pH 9.5 + 1 M NaCl	Glycine-HCl pH 10 + 1 M NaCl	CAPS pH 10.5 + 1 M NaCl	CAPS pH 11 + 1 M NaCl	CONTROLO 1	CONTROLO 2	CONTROLO 3			

Todos os tampões a 200 mM

Tabela 8 - Lista de soluções do *screen* de aditivos utilizado para a PtpA, durante a experiência de TSA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 mM β mercaptoEtOH	20 mM β mercaptoEtOH	10 mM DTT	20 mM DTT	10 mM TCEP	20 mM TCEP	5% (v/v) Glicerol	10% (v/v) Glicerol	20% (v/v) Glicerol	30% (v/v) Glicerol	10% (v/v) PEG-400	10% (w/v) PEG-1K
B	10% (w/v) PEG 3350	10% (w/v) PEG 8K	10% Ethylene glycol	50 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl	400 mM NaCl	600 mM NaCl	800 mM NaCl	1 M NaCl	1.5 M NaCl	20 mM Imidazole pH 7.6
C	100 mM Imidazole pH 7.6	300 mM Imidazole pH 7.6	500 mM Imidazole pH 7.6	20 mM MgCl ₂	20 mM CaCl ₂	20 mM NiCl ₂	20 mM MnCl ₂	20 mM ZnCl ₂	20 mM Sodium Acetate	20 mM Lithium Acetate	20 mM Zinc Acetate	20 mM Ammonium Acetate
D	0.2M Urea	300 mM GdnHCl	5% (v/v) DMSO	10% (v/v) propan-2-ol	10% (v/v) ethanol	10% (w/v) Octyl glucoside	10 mM CHAPS	1% Triton X-100	10 mM EDTA	3% D-glucose	3% Sucrose	3% Maltose
E	10% (v/v) acetaldehyde	10 mM ADP	10 mM ATP	10 mM Arginine	10 mM Glutamate	10 mM Glutamine	10 mM Cysteine	10 mM Lysine	0.04% azide	0.2M Ionic liquid [1]	0.4M Ionic liquid [1]	0.2M Ionic liquid [2]
F	0.4M Ionic liquid [2]	0.2M Ionic liquid [3]	0.4M Ionic liquid [3]	0.2M Ionic liquid [4]	0.4M Ionic liquid [4]	0.2M Ionic liquid [5]	0.4M Ionic liquid [5]	CONTROLO 1	CONTROLO 2	CONTROLO 3		
G												
H												

Ionic Liquids (0.05, 0.1, 0.2, 0.4 M)

- [1] 1-Butyl-3-methyl-imidazolium chloride
 [2] 1-Ethanol-3-methyl-imidazolium hexafluorophosphate
 [3] 1-Octyl-3-methyl-imidazolium hexafluorophosphate
 [4] 1-Butyl-3-methyl-imidazolium hexafluorophosphate
 [5] 1,3-Dimethyl-imidazolium dimethylphosphate

Tabela 9 – Resultados dos valores de Tm obtidos aquando a experiência de TSA com o *screen* de tampões. Algumas condições não permitiram a obtenção da Tm correspondente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		47	46	51	51	52	51	51	52	51	53	52
B	52	53	53	54	52	53	51	51	53	51	53	52
C	53	51	53							51		50
D	51	50	51	51	53	52		53	53	52		
E			54	51	53	52	53		54	52		
F							47					
G												51
H	52	51	52	52	52	52	47					

Tabela 10 – Resultados dos valores de Tm obtidos aquando a experiência de TSA com o *screen* de aditivos. Algumas condições não permitiram a obtenção da Tm correspondente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	52	53	58	58	57	56	52	52	51	47	48	49
B			50	51	51	51	51	51	50	49	50	43
C	51	49	50	50	50	48			51	50		50
D		49	50	51	51				51		49	
E					50	50	54	51	51			