### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Mariana Araújo Ajalla Aleixo

# Mapeamento das bases estruturais e suas correlações com patogenias humanas associadas à mutações na fumarase humana

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física Biológica

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Cristina Nonato

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 19/10/18. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

> Aleixo, Mariana Araújo Ajalla Mapeamento das bases estruturais e suas correlações com patogenias humanas associadas à mutações na fumarase humana. Ribeirão Preto, 2018. 112 p. : il. ; 30cm. Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química e Física Biológica. Orientador: Nonato, Maria Cristina. 1. Fumarate Hidratase 2. Doenças Raras 3. Cristalografia 4. Cinética Enzimática

### FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Araújo Ajalla Aleixo

Mapeamento das bases estruturais e suas correlações com patogenias humanas associadas à mutações na fumarase humana.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física Biológica

Aprovado em:	
	Banca Examinadora
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:

Dedico esta tese à minha mãe, Mabé, sem todo o seu apoio e amor ela não seria possível. Te amo!

### AGRADECIMENTOS

A minha mãe, meu exemplo, obrigada por tudo, sem você e seu incentivo eu não teria me aventurado pelo doutorado

A minha orientadora Profa. Maria Cristina Nonato pela oportunidade de realizar o doutorado sob sua supervisão e por me ensinar a amar a cristalografia

As amigas Joane, Renata, Iara e Marília, que foram tão importantes para o meu crescimento como cientista e como pessoa. Obrigada pelas discussões sobre ciência e sobre a vida. Re e Jo, amizade gravada na pele.

Aos meus amigos de Campo Grande, que sempre me apoiaram e entenderam a minha ausência. Obrigada por sempre se esforçarem para me ver quando eu ia para casa

Aos amigos do LCP, em especial ao Victor, e do laboratório de Glicoproteínas pelos momentos de trabalho e conversas.

Aos professores Renata Fonseca, Marcelo Baruffi e Antonio José Costa por possibilitarem a utilização de equipamentos em seus laboratórios.

Ao professor Flavio Emery por fornecer os compostos para os experimentos de fragment screening

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar o doutorado

Ao síncrotron de SOLEIL e a pesquisadora Beatriz Guimarães da FIOCRUZ

A CAPES pelo apoio financeiro

"Knowing is not enough; We must apply. Willing is not enough; We must do." - Goethe

"A maior gula da natureza racional é o desejo de saber" - Padre Antônio Vieira

#### RESUMO

ALEIXO, M. A. A. **Mapeamento das bases estruturais e suas correlações com patogenias humanas associadas à mutações na fumarase humana**. 2018. 112f.Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Fumarato hidratases ou fumarases (FH) catalisam a reação estereoespecífica reversível de hidratação do fumarato em L-malato. Essas enzimas se apresentam em todas as classes de organismos, desde procariotos a eucariotos, e podem ser encontradas nas formas mitocondrial e citosólica. A enzima tem papel importante na produção de energia pois participa do ciclo do ácido cítrico, na resposta ao dano do DNA e como supressor tumoral. A fumarase humana (*Hs*FH), que pertence à classe II, é codificada pelo gene 1q42.1, possui 467 aminoácidos em cada monômero com peso molecular de 50,2 kDa cada. Estudos associaram mutações no gene da FH com diversas doenças humanas como acidúria fumárica, leiomiomatoses de útero e pele (MCUL), que quando associadas com um agressivo carcinoma múltiplo de células é conhecido como leiomiomatose hereditária e câncer renal (HLRCC). Apesar da grande importância da fumarase humana no metabolismo energético. ainda há pouca informação em relação ao mecanismo catalítico adotado pela enzima e o efeito estrutural e cinético causado pelas mutações envolvidas com essas doenças. Diante disso, nosso trabalho utilizou uma abordagem híbrida que envolve a caracterização biofísica, bioquímica e estrutural da enzima HsFH, e seus N107T*H*sFH. H180R*Hs*FH. Q185R*H*sFH. mutantes: K230R*H*sFH. G282VHsFH, E362QHsFH, S365GHsFH e N373DHsFH, identificados em pacientes. Estudos cinéticos foram realizados em sete diferentes pHs e, pela primeira vez para fumarases, o ensaio foi realizado com os dois substratos presentes na mesma mistura reacional, confirmando a contribuição da reação reversa para a velocidade global da enzima. De acordo com os estudos de termoflúor a proteína é estabilizada em pHs alcalinos e através da ligação de compostos no sítio ativo. A estrutura da enzima HsFH nativa foi resolvida a 1,8 Å e identificou a presença de moléculas de HEPES complexadas na região C-terminal da enzima. Os estudos cinéticos demonstraram um aumento da eficiência catalítica na presença do HEPES, sugerindo um possível papel alostérico de seu sítio de ligação para a atividade catalítica. Foram determinadas as estruturas para os mutantes N107THsFH, H180RHsFH, Q185RHsFH, K230RHsFH, E362QHsFH, S365GHsFH e N373DHsFH. As mutações Q185R, E362Q, S365G e N373D foram identificadas no sítio ativo afetando diretamente a capacidade da proteína em ligar os substratos, enquanto que a mutação H180R foi localizada no sítio B, que conduz os substratos e produtos para dentro e fora do sítio ativo. Já a mutação K230R está localizada no domínio central, mas os resultados de termoflúor demonstram um efeito direto na capacidade da enzima em acomodar o substrato. A mutação N107T, localizada longe do sítio ativo foi a única que permaneceu ativa e teve seus parâmetros cinéticos residuais determinados. O presente trabalho contribui para o entendimento das bases estruturais que correlacionam mutações na HsFH, deficiência enzimática e patologia.

Palavras-chave: fumarato hidratase, doenças raras, cristalografia, cinética enzimática, termoflúor

### ABSTRACT

ALEIXO, M. A. A. **Mapping the structural basis and its correlation with human pathogenesis associated with human fumarase mutations**. 2018. 112f. Thesis of Doctoral. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Fumarate hydratases or fumarases (FH) catalyze the reversible stereospecific hydration of fumarate to L-malate. They are present in all classes of organisms, from prokaryotes to eukaryotes, and can be found in the mitochondrial and cytosolic forms. The enzyme has an important role in energy production as part of the wellknown Citric Acid Cycle, in DNA damage response and as tumor suppressor. Human fumarase (HsFH) belongs to class II and is encoded by 1q42.1 gene. HsFH is tetrameric and has 467 amino acids per monomer, with predicted molecular weight of 50.2 kDa. Several studies associated FH gene mutations with some human diseases such as fumaric aciduria, multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis (MCUL), which when associated with an aggressive form of multiple cell carcinoma is known as hereditary leiomyomatosis and renal cancer (HLRCC) syndrome. Although the major role of HsFH in energetic metabolism, there are still little structural and kinetic information about the mutants involved in these diseases. Thus, this study aims, through a hybrid approach, composed by biophysics, biochemical and structural characterization of mutants N107THsFH, H180RHsFH, Q185RHsFH, K230RHsFH, G282VHsFH, E362QHsFH, S365GHsFH and N373DHsFH identified from patients. Steady-state kinetics studies were performed in seven different pHs and, for the first time, the contribution of both substrates was analyzed simultaneously in a single kinetic assay and allowed to quantify the contribution of the reverse reaction for kinetics. According to thermofluor studies, structural stability can be achieved at alkaline pHs and suggests that ligand binding can modulate the protein stability. HsFH crystal structure was solved at 1.8 Å resolution and identified HEPES molecules complexed with the enzyme C-terminal region. Kinetics studies with HEPES showed an increase of the catalytic efficiency and suggests that HEPES binding site might have an allosteric role. Crystal structures for the mutants N107THsFH, H180RHsFH, Q185RHsFH, K230RHsFH, E362QHsFH, S365GHsFH and N373DHsFH were determined. The mutations Q185R, E362Q, S365G and N373D were identified in the active site and affect the substrate binding capacity directly, while mutation H180R was localized in the B site, which conducts the substrates and products in and out the active site. The mutation K230R is localized in the central domain, but thermofluor results demonstrate a direct effect on the ability of the enzyme to accommodate the substrate. The N107T mutation located far from the active site was the only one that remained active and had its residual kinetic parameters determined. The present work contributes to the understanding of the structural bases that correlate mutations in HsFH, enzymatic deficiency and pathology.

Keywords: fumarate hydratase, rare diseases, crystallography, enzymatic kinetics, thermofluor

### LISTA DE FIGURAS

Figura 5. Representação da proposta de mecanismo catalítico para as enzimas Aspartase, Fumarase, Argininosuccinato liase e Adenilosuccinato liase. Figura modificada de Veetil *et al.* [36]......23

Figura 7. Representação em cartoon do monômero da *Hs*FH. Em rosa estão destacadas as localizações dos mutantes escolhidos para esse trabalho......27

### Figura 9. Fragmentos utilizados para *soaking* dos cristais da proteína *Hs*FH.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 10. Perfil de purificação da enzima *Hs*FH em coluna de níquel. 1) Pellet 2) Sobrenadante 3) Efluente 1 4) Eflente 2 5) Marcador de peso molecular (kDa) 6) Lavagem com o tampão 10 mM de imidazol 7) Lavagem com o tampão 25 mM de imidazol 8) Segunda lavagem com o tampão 10 mM de imidazol 9) *Hs*FH eluída após a clivagem com tampão 10 mM de imidazol 10) Lavagem com tampão 500 mM de imidazol.....**Error! Bookmark not defined.** 

Figura 11. Análise do perfil de polidispersividade encontrado para a *Hs*FH obtido através da utilização de técnicas de espalhamento dinâmico de luz. Gráfico representando o perfil de distribuição do tamanho (nm) em função do volume. **Error! Bookmark not defined.** 

Figura 13. Caracterização cinética no estado estacionário da *Hs*FH. Os dados foram ajustados à equação de Michaelis-Menten (Equação 1). A) Fumarato foi usado como substrato em diferentes concentrações (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 μM). B) L-malato foi usado como substrato em diferentes concentrações (0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 18, 25, 30, 40 e 50 mM)**Error! Bookmark not defined.** 

Figura 14. Caracterização cinética no estado estacionário da *Hs*FH. Gráfico de superfície da cinética completa. Os dados foram ajustados à equação 2...... **Error!** Bookmark not defined.

Figura 15. Gráfico da variação da temperatura de desenovelamento  $\Delta T_m$  para a enzima *Hs*FH em diferentes pHs e concentrações de NaCl. R é a referência em água; os tampões presentes nos pHs 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 são acetato de sódio, Citrato de sódio, ácido succínico, MES monoidratado, BIS-TRIS, Imidazol, HEPES, Tris, BIS-TRIS Propano, AMPD eglicina, respectivamente, todos na concentração de 50 mM.**Error! Bookmark not defined.** 

Figura 16. Cristal de *Hs*FH obtido na condição0,1 M HEPES pH 7,5, 4% m/v polietilenoglicol 10000 e 1% v/v 2-metil-pentanodiol (MPD).**Error! Bookmark not defined.** 

Figura 17. Representação em *cartoon* para a *Hs*FH. A) Monômero da *Hs*FH com o domínio 1 (D1) colorido em azul, domínio 2 (D2) colorido em rosa e domínio 3 (D3) colorido em amarelo. B) Estrutura do tetrâmero funcional da *Hs*FH. Os painéis mostram a visão ortogonal da estrutura com os sítios ativos indicados pelas setas. Error! Bookmark not defined.

Figura 18. Representação em cartoon do sítio ativo da *Hs*FH. A) Em destaque a His 235 e a água 778 com as distâncias interatômicas em preto. Em roxo está destacado o SS-loop. B) Região no tetrâmero onde as figuras A e C se localizam. C) Alinhamento das estruturas *Hs*FH (5UPP) em cinza com FumC de *E. coli* (1YFE) em verde, destacando as His 235 (5UPP) e His 188 (1YFE) com as moléculas de água W 778 (1YFE) e W 26 (1YFE). Distâncias para 5UPP. *Error!* Bookmark not defined.

Figura 19. Representação do sítio de ligação do HEPES. As distâncias entre os átomos estão representadas na figura em Å. A) Os círculos pretos representam a localização das moléculas de HEPES entre dois tetrâmeros de unidades assimétricas distintas. B) Resíduos de D3/A estão representados em amarelo e D3/A em azul. Interações polares indicadas por linhas verdes pontilhadas. C) Representação da interface entre os tetrâmeros. ...... **Error! Bookmark not defined.** 

Figura 21. Análise do fator de temperatura em *cartoon putty*. A região C-terminal de 3E04 é mostrada em roxo. A região C-terminal de 5UPP com a molécula de HEPES é mostrada em azul cian. Átomos de C, N, O e S estão representados em branco, azul, vermelho e amarelo, respectivamente...... **Error! Bookmark not defined.** 

Figura 22. Gel de poliacrilamida dos mutantes da *Hs*FH. Em vermelho estão destacadas as frações contendo a proteína pura. Nos géis A, B, C e G estão representadas as frações referentes à purificação por cromatorgrafia de afinidade. Nos géis D, E e F estão representadas a proteína após a purificação por afinidade e as frações da gel filtração. A) Mutante N107T*Hs*FH B) Mutante H180R*Hs*FH C) Mutante K230R*Hs*FH D) Mutante E362Q*Hs*FH E) Mutante

### S365G*Hs*FH F) Mutante N373D*Hs*FH, G) Mutante Q185R*Hs*FH.**Error! Bookmark not defined.**

Figura 23. Análise do perfil de polidispersividade encontrado para os mutantes da enzima *Hs*FH obtido através da utilização de técnicas de espalhamento dinâmico de luz. Gráfico representando o perfil de distribuição do tamanho (nm) em função do volume. A) Mutante N107T*Hs*FH B) Mutante H180R*Hs*FH C) Mutante Q185R*Hs*FH D) Mutante K230R*Hs*FH E) Mutante E362Q*Hs*FH F) Mutante S365G*Hs*FH G) Mutante N373D*Hs*FH.....**Error! Bookmark not defined.** 

Figura 24. Caracterização cinética no estado estacionário do mutante N107T*Hs*FH. Gráfico de superfície da cinética completa. Os dados foram ajustados à equação 2. **Error! Bookmark not defined.** 

Figura 25. Resultados dos experimentos de termoflúor dos mutantes da enzima *Hs*FH com os valores de diferença na temperatura de desenovelamento ( $\Delta$ Tm em °C) em relação à referência em água. Cada coluna representa um pH diferente e cada linha uma concentração de NaCl (mM). Os experimentos foram realizados usando o kit *Solubility and Stability 2* (Hampton Research). Em azul está a referência em água, verde  $\Delta$ Tm > 2.0 °C, amarelo -2.0°C <  $\Delta$ Tm < 2.0 °C e vermelho  $\Delta$ Tm < -2.0 °C.

Figura 26. Exemplos de cristais dos mutantes da *Hs*FH. A) Cristais do mutante H180R*Hs*FH na condição 0,2M tartarato de amônio dibásico, 14% (m/v) PEG 3350. Proteína a 6 mg/mL. B) Cristal do mutante E362Q*Hs*FH na condição 0,1 M MES pH 6,5, 12% (m/v) PEG 20k. Proteína a 4 mg/mL. C) Cristal do mutante S365G*Hs*FH na condição 0,1 M BIS-TRIS pH 6,5, 20% (m/v) PEG 3350, 2% Tacsimato pH 6,0. Proteína a 4 mg/mL. D) Cristal do mutante N373D*Hs*FH na condição 0,1 M MES pH 6,5, 12% (m/v) PEG 20 K. Proteína a 4 mg/mL. ......... **Error! Bookmark not defined.** 

Figura 28. RMSD por resíduo entre o mutante N107T*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.

 Figura 30. RMSD por resíduo entre o mutante H180R*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.
B) Valores da cadeia B do mutante em relaç

Figura 33. Representação em *cartoon* da *Hs*FH e do mutante Q185R*Hs*FH. Em cinza a estrutura 5UPP com a molécula de HEPES, em roxo 3E04 e em rosa o mutante Q185R*Hs*FH. Átomos de C, N, O e S estão representados em branco, azul, vermelho e amarelo, respectivamente...... **Error! Bookmark not defined.** 

Figura 34. RMSD por resíduo entre o mutante Q185R*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. **Error! Bookmark not defined.** 

Figura 35. Alinhamento das estruturas das enzimas *Hs*FH (5UPP) representada em cinza e Q185R*Hs*FH, representada em rosa. Estão destacados o resíduo catalítico His 235, e os resíduos 185. A superfície da proteína nativa está representada em cinza escuro...... **Error! Bookmark not defined.** 

Figura 36. Representação em cartoon da estrutura do mutante K230R*Hs*FH. Em azul claro estão representados os monômeros que compõe a unidade assimétrica e em escura estão as moléculas geradas por um eixo de rotação de ordem 2 e que formam os tetrâmeros funcionais..... **Error! Bookmark not defined.** 

Figura 37. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com  $\sigma$  (nível de contorno) igual a 1,0 para cadeia A (superior esquerda), 1,6 para cadeia B (superior direita) e 1,1 para as cadeias C e D (inferior esquerda e direita, respectivamente); representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo arginina 230. ..... Error! Bookmark not defined.

Figura 38. Representação em *cartoon* da estrutura da proteína K230R*Hs*FH. A) Sobreposição da estrutura da enzima *Hs*FH nativa em cinza e do mutante K230R*Hs*FH em verde escuro. Em destaque em vermelho o resíduo Arg 230 e os resíduos GIn 185 e His 235. B) Sobreposição das estruturas das proteínas *Hs*FH nativa em cinza, do mutante K230R*Hs*FH em verde escuro e do mutante Q185R*Hs*FH em rosa. Estão destacados os resíduos 185, em vermelho para Q185R*Hs*FH, em verde escuro para K230R*Hs*FH e em cinza para *Hs*FH nativa. **Error! Bookmark not defined.** Figura 39. RMSD por resíduo entre o mutante K230R*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A da proteína nativa em relação às cadeias A, B, C e D do mutante. **B**, C e D do mutante. **Error! Bookmark not defined.** 

Figura 40. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com  $\sigma$  (nível de contorno) igual a 1,0; representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo glutamina 362 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita).....**Error! Bookmark not defined.** 

Figura 41. Sobreposição das estruturas das proteínas *Hs*FH nativa, em cinza, e E362Q*Hs*FH, em azul. Estão destacados os resíduos 362 da *Hs*FH nativa em cinza e E362Q*Hs*FH em vermelho. Em amarelo está a região do SS-loop....**Error!** Bookmark not defined.

Figura 42. RMSD por resíduo entre o mutante E362Q*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. Error! Bookmark not defined.

Figura 44. Sobreposição das estruturas das proteínas S365G*Hs*FH e *Hs*FH nativa (5UPP e 3E04). Em cinza está representada a cadeia B de 5UPP, em verde cadeia C do mutante S365G*Hs*FH e em roxo cadeia C da 3E04. Representação em *cartoon putty.* Átomos de C, N, O e S estão representados em branco, azul, vermelho e amarelo, respectivamente...... **Error! Bookmark not defined.** 

Figura 45. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com  $\sigma$  (nível de contorno) igual a 2,0; representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo ácido aspártico 373 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita)......**Error! Bookmark not defined.** 

Figura 46. RMSD por resíduo entre o mutante N373D*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de

5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP ..... Error! Bookmark not defined.

Figura 47. Alinhamento das estruturas das enzimas *Hs*FH nativa (5UPP) representada em cinza e N373D*Hs*FH, representada em azul escuro. O SS-loop está destacado em amarelo. O resíduo Asp 373 está em vermelho. .....**Error!** Bookmark not defined.

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas mutações sítio-dirigidas N107T*Hs*FH, H180R*Hs*FH, K230R*Hs*FH e G282V*Hs*FH......**Error! Bookmark not defined.** 

Tabela 2. Composição dos tampões utilizados para o experimento de determinação do pH de atividade ótimo para a enzima *Hs*FH nativa. **Error! Bookmark not defined.** 

 Tabela 3. Composição do PEG Smear utilizado nos experimentos de cristalização.

 Error! Bookmark not defined.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos para HsFH. ..... Error! Bookmark not defined.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos da *Hs*FH para os dois substratos.....**Error!** Bookmark not defined.

Tabela 6. Resultados de  $\Delta T_m$  para *Hs*FH..... Error! Bookmark not defined.

Tabela 7. Resultados de  $\Delta T_m$  da enzima *Hs*FH para a comparação entre NaCl e KCl. Error! Bookmark not defined.

Tabela 8. Dados cristalográficos e estatísticos para HsFH. Os valores relativos à<br/>última camada de resolução estão mostrados entre parênteses.Bookmarknot defined.Bookmark

Tabela 9. Parâmetros cinéticos para HsFH..... Error! Bookmark not defined.

Tabela 10. Rendimento de cada mutante de *Hs*FH, em mg de proteína por litro de cultura de bactérias, após a purificação por afinidade e por cromatografia de exclusão de tamanho...... **Error! Bookmark not defined.** 

Tabela 11. Valores obtidos para os picos da distribuição de tamanho das partículas em solução no DLS. ..... **Error! Bookmark not defined.** 

 Tabela 12. Parâmetros cinéticos do mutante N107T*Hs*FH para os dois substratos.

 Error! Bookmark not defined.

Tabela 13. Comparação dos valores das temperaturas de desenovelamento para a enzima *Hs*FH e seus mutantes estudados utilizando termoflúor. ..... **Error!** Bookmark not defined.

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
DLS	Dynamic Light Scattering
DMSO	Dimetilsulfóxido
EU	União Europeia
FDA	Food and Drug Administration
FH	Fumarato hidratase ou fumarase
FUM	Fumarato
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2 hidoxietil peperazina
HLRCC	Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer
Hs	Homo sapiens
<i>H</i> sFH	Fumarase humana
IPTG	Isopropiltio-β-D-galactosídeo
Kcat	<i>Turnover</i> da enzima
kDa	quiloDalton
K <sub>eq</sub>	Constante de equilíbrio
Km	Constante de Michaelis-Menten
LB	Luria-Bertani
Lm	Leishmania major
MAL	L-malato

MCUL	Multiple Cutaneous and Uterine Leiomyomatosis
MES	Ácido 2-etanosulfônico
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SUS	Sistema Único de Saúde

TCA Ciclo do Ácido Tricarboxílico

ESUMO
BSTRACT
ISTA DE FIGURASI
ISTA DE TABELASI
ISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS
. INTRODUÇÃO1
.1 Doenças Raras1
.2 Fumarases1
.2.1 Fumarases classe I
.2.2 Fumarases de classe II2
.2.2.1 Mutações da enzima fumarase humana2
. OBJETIVOS ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED
. MATERIAIS E MÉTODOS ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED
.1 Mutagênese sítio-dirigida para produção dos mutantes G282V <i>Hs</i> FH, I180R <i>Hs</i> FH, K230R <i>Hs</i> FH e N107T <i>Hs</i> FH <b>Error! Bookmark not defined</b>
.2 Produção heteróloga da enzima <i>Hs</i> FH nativa e seus mutantes Error Sookmark not defined.
.2.2 Purificação por cromatografia de afinidade Error! Bookmark not defined
.2.3 Purificação por cromatografia de exclusão por tamanhoError! Bookmar ot defined.
.3 Caracterização biofísica: Termoflúor e DLS Error! Bookmark not defined
.4 Ensaios de atividade para a proteína <i>Hs</i> FH nativa Error! Bookmark no lefined.
.4.1 Determinação do pH ótimo Error! Bookmark not defined
.4.2 Ensaios cinética enzimática Error! Bookmark not defined

### SUMÁRIO

3.5 Estudos estruturais	Error! Bookmark not defined.
3.5.1 Cristalização	Error! Bookmark not defined.
3.5.2 Fragment screening	Error! Bookmark not defined.
3.5.3 Coleta de dados e processamento	Error! Bookmark not defined.
3.5.4 Resolução da estrutura	Error! Bookmark not defined.
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO ERI	ROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.1 <i>Hs</i> FH nativa	Error! Bookmark not defined.
4.1.1 Expressão e purificação	Error! Bookmark not defined.
4.1.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	Error! Bookmark not defined.
4.1.3 Atividade enzimática	Error! Bookmark not defined.
4.1.3.1 Determinação do pH ótimo para HsFH	Error! Bookmark not defined.
4.1.3.2 Cinética enzimática	Error! Bookmark not defined.
4.1.4 Ensaios de Termoflúor	Error! Bookmark not defined.
4.1.5 Estrutura da <i>Hs</i> FH nativa	Error! Bookmark not defined.
4.1.6 Estudo de busca de fragmentos por cristal <b>defined.</b>	ografia Error! Bookmark not
4.2 Estudo dos mutantes da enzima fumarase h defined.	umana Error! Bookmark not

4.2.5 Estudos estruturais dos mutantes ..... Error! Bookmark not defined.

4.2.5.1 N107T <i>H</i> sFH	Error! Bookmark not defined.
4.2.5.2 H180R <i>H</i> sFH	Error! Bookmark not defined.
4.2.5.3 Q185R <i>Hs</i> FH	Error! Bookmark not defined.
4.2.5.4 K230R <i>H</i> sFH	Error! Bookmark not defined.
4.2.5.5 E362Q <i>H</i> sFH	Error! Bookmark not defined.
4.2.5.6 S365G <i>H</i> sFH	Error! Bookmark not defined.
4.2.5.7 N373D <i>H</i> sFH	Error! Bookmark not defined.
5. CONCLUSÕES	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
7. APÊNDICES	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

# INTRODUÇÃO

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 Doenças Raras

O grupo de doenças consideradas raras é formado por 5000 a 7000 condições clínicas anormais, que não ocorrem com frequência em determinada região, que podem afetar qualquer sistema do corpo humano, serem crônicas e de difícil diagnóstico e tratamento [1]. Portanto, a definição de doença rara incorpora doenças de diferentes etiologias, como de origem genética, autoimune, cânceres raros e doenças infecciosas [2]. Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS para uma doença para ser considerada, ela deve afetar menos de 65 pessoas a cada 100.000 habitantes [3], porém, cada país ou bloco regional utiliza uma definição que pode ser baseada em números absolutos de doentes ou prevalência dessas doenças [4]. Estima-se que existam 400 milhões de pacientes no mundo afetados por doenças raras [2], destes, 30 milhões estão na União Europeia e outros 30 milhões nos Estados Unidos [1, 2].

Entre as doenças consideradas raras mais conhecidas estão fibrose cística, hemofilia, fenilcetonúria e a síndrome respiratória aguda grave (SARS). No entanto, devido a distribuições geográficas desiguais uma doença pode ser considerada rara em uma região ou determinada população, mas perder essa denominação por ser frequente em outra, como é o caso da talassemia, considerada rara no norte europeu, mas frequente no Mediterrâneo [5]. Esse cenário pode ser modificado, uma vez que a migração de pessoas vem aumentando, introduzindo doenças inexistentes em determinada região ou novos casos de doenças antes consideradas raras.

Em todo o mundo legislações específicas para doenças raras vem sendo estabelecidas. Apesar de negligenciadas no passado, nas últimas décadas novos investimentos em pesquisa voltada para as doenças raras vêm sendo realizados. Em 1983 os Estados Unidos lançaram o *Orphan Drug Act*, que estimulou a pesquisa de novos medicamentos para as doenças raras, concedendo financiamento para pesquisa acadêmica, créditos fiscais para despesas de ensaios clínicos e exclusividade de mercado por sete anos, durante os quais nenhum outro medicamento para a mesma doença seria aprovado [4]. Entre 1984 e 2015 o *Food and Drug Administration* (FDA), órgão que regulamenta a produção e venda de

medicamentos nos Estados Unidos, concedeu 3.647 designações de medicamento órfão e aprovou para venda 554 medicamentos [4].

Na União Europeia, a primeira legislação voltada para o desenvolvimento de medicamentos órfãos e pesquisa nas doenças raras foi a *EU Regulation No 141/2000*, que assim como nos Estados Unidos, além da redução de taxas e incentivos para a pesquisa de novos medicamentos, garante exclusividade de mercado para os medicamentos órfãos aprovados, nesse caso de dez anos [2].

Para se enquadrar na designação de órfão, tanto nos Estados Unidos quanto na União Europeia (EU), o produto tem que estar relacionado com diagnóstico ou tratamento de uma doença que afete até 5 pessoas em 10.000 habitantes (critério de prevalência) ou que o retorno do investimento após comercialização não seja o suficiente para o investimento no produto (critério do retorno do investimento). Na EU existem ainda mais dois critérios: A) de gravidade, ou seja, o produto tem que estar relacionado com o diagnóstico, tratamento ou prevenção de uma condição que oferece risco de morte ou que seja crônica e B) de significância, em que não exista outro produto de diagnóstico, tratamento ou prevenção para a mesma doença ou, se existir, que o candidato traga mais benefícios [2].

O Brasil, que utiliza a mesma definição de doença rara que a OMS, nos últimos anos vem desenvolvendo políticas públicas que englobam o diagnóstico e o tratamento dessas doenças [6]. Em 2014 foi aprovada a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras que estabeleceu diretrizes sobre o diagnóstico, tratamento e acompanhamento em longo prazo de pacientes com doenças raras pelo Sistema Único de Saúde (SUS) [6]. No entanto, embora em vigor há quatro anos, pouco foi realizado. Em 2018, o Senado Federal aprovou um projeto que institui a Política Nacional para Doenças Raras no Sistema Único de Saúde (SUS), do qual a partir da sua implementação é esperado que novos medicamentos e métodos diagnósticos sejam incorporados ao SUS e auxiliem a detecção e tratamento precoces.

Dentre as mais de 5.000 doenças classificadas como raras existe a leiomiomatose cutânea e uterina múltipla (*Multiple Cutaneous and Uterine Leiomyomatosis* – MCUL, OMIM 150800), a síndrome de leiomiomatose hereditária e carcinoma de células renais (*Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer* –

HLRCC, OMIM 605839) e doenças metabólicas como a acidúria fumárica ou deficiência de fumarase (OMIM 606812), todas essas relacionadas com alterações na atividade da enzima fumarato hidratase (fumarase – FH) [7].

A MCUL é caracterizada pela presença de tumores de músculo liso benignos, localizados na pele e em mulheres também no útero. Esses tumores podem formar nódulos, esparsos ou agregados com alta concentração de fibras de colágeno ao seu redor [8]. Leiomiomas cutâneos são tipicamente sensíveis às temperaturas mais baixas e à abrasão, mais comuns em mulheres do que em homens, e se desenvolvem entre 20 e 40 anos de idade como pápulas intradermais [9]. Mulheres que desenvolveram leiomiomatose uterina podem manifestar sangramento intenso durante o período menstrual, dor pélvica, aumento do volume abdominal e infertilidade, que provocam graves impactos negativos na qualidade de vida dessas pacientes [10, 11]. Quando associada ao desenvolvimento de tumores nas células renais, é conhecida como HLRCC. Embora existam apenas 200 casos de HLRCC reportados no mundo, essa síndrome apresenta tumores extremamente agressivos, que podem produzir metástases mesmo quando o tumor original é pequeno (< 1 cm) [8, 12]. Os pacientes relatados com MCUL e HLRCC apresentaram mutações heterozigotas no gene que codifica a enzima FH e por consequência, alterações na sua atividade [7, 11].

A acidúria fumárica, é um transtorno metabólico caracterizado por mínima ou nenhuma atividade da enzima FH e presença de concentrações elevadas de ácido fumárico na urina dos pacientes; está relacionada com mutações homozigotas no gene que codifica a enzima. Possui um início rápido e diversas manifestações clínicas como hipotonia, convulsões, problemas respiratórios e malformações cerebrais [13, 14]. A expectativa de vida desses pacientes é baixa, ou seja, levando a morte nos primeiros anos de vida [15]. No Brasil o primeiro caso foi reportado em 2010, em uma criança, filha de primos consanguíneos, que apresentou um quadro clínico complicado desde o nascimento, levando a morte no quarto mês [16].

#### 1.2 Fumarases

Fumarase foi o termo cunhado por Batelli e Stern, em 1911, para a enzima isolada de tecido animal capaz de converter ácido fumárico em ácido málico. Em 1922, Dakin mostrou que todo o ácido málico formado era na forma do isômero L [17]. Assim, as fumarato hidratases ou fumarases (FH) catalisam a reação estereoespecífica e reversível de hidratação de fumarato a L-malato (Figura 1). Essas enzimas estão presentees em uma grande variedade de organismos, como bactérias, leveduras, plantas, invertebrados e mamíferos, e podem ser encontradas nas formas mitocondrial e citosólica. Na década de 1950, dois conjuntos de estudos sobre fumarase foram publicados, um em Cambridge por Masey [18-20] e o outro nos Estados Unidos por Alberty [21-26].



Figura 1. Reação enzimática catalisada pela enzima fumarase (FH).

A enzima fumarase mitocondrial participa do Ciclo do ácido cítrico (Ciclo do ácido tricarboxílico – TCA ou Ciclo de Krebs) convertendo fumarato em L-malato na sétima etapa do ciclo (Figura 2). Estudos recentes demonstraram que a forma citosólica está envolvida no ciclo da ureia, no metabolismo de aminoácidos e também atua como supressor tumoral [11, 27-29].

Fumarases são comumente divididas em duas classes distintas (I e II) de acordo com seu estado oligomérico, dependência de metais e sensibilidade ao oxigênio [30].



**Figura 2.**Ciclo do ácido cítrico (Ciclo do ácido tricarboxílico – TCA ou Ciclo de Krebs). Estruturas das enzimas participantes do ciclo, ou parte dos complexos, retiradas do *Protein Data Bank* (PDB). Citrato-sintase (código PDB: 2CTS), Aconitase (código PDB: 2B3Y), Isocitrato-desidrogenase (código PDB: 5YFN), Complexo α-cetoglutarato-desidrogenase (código PDB: 2JGD), Succinil-CoA sintetase (código PDB: 2FP4), Succinato-desidrogenase (códigos PDB: 1NEK), Fumarase (código PDB: 3E04), Malato-desidrogenase (código PDB: 1MLD).

### 1.2.1 Fumarases classe I

Fumarases de classe I são homodiméricas, de peso molecular em torno de 120 kDa, contendo um complexo de ferro-enxofre (4Fe-4S) no centro catalítico, são sensíveis ao oxigênio e consideradas termolábeis [31]. Fumarases de classe I são expressas em bactérias (fumarase A e B de *E. coli*) e alguns eucariotos unicelulares [31, 32].

Tripanossomatídeos, como o *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*, possuem somente fumarases de classe I, localizadas na mitocôndria e no citosol, e que são codificadas por dois genes distintos. O complexo de 4Fe-4S está associado à fumarase através da interação de três de suas moléculas de ferro com os enxofres de três resíduos de cisteína. Sua participação na atividade enzimática se dá pelo

único ferro livre, que atua como um ácido de Lewis interagindo com oxigênios carboxílicos dos substratos fumarato e L-malato [33].

Embora estejam presentes em diversos organismos de importância para a saúde da população, poucos dados estruturais sobre essas enzimas estão disponíveis. A busca no banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank – PDB*) revelou apenas uma estrutura de fumarase de classe I descrita, a fumarase citosólica de *Leishmania major* (*Lm*FH-2), depositada com o código PDB: 5L2R (Figura 3) [34].



**Figura 3.** Representação da estrutura tridimensional da enzima LmFH-2. A) Representação do dímero da fumarase de L. major. Em azul estão as hélices  $\alpha$  e em rosa as fitas  $\beta$ . Em amarelo e laranja, representado em *stick*, está o cluster [4Fe-4S]. B) Cluster [4Fe-4S] em destaque. Em verde estão representados os resíduos de cisteína que participam da ligação e em rosa o substrato L-malato. Átomos de enxofre estão em amarelo, ferro em laranja, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e carbonos em rosa ou verde. (PDB ID: 5L2R)

Estudos envolvendo as fumarases de classe I abordam principalmente a possibilidade de uso dessas enzimas como alvo terapêutico contra, especialmente, doenças parasitárias, uma vez que entre classe I e classe II de fumarases observase uma baixa similaridade, de aproximadamente 20% [35] e humanos apresentam apenas fumarase de classe II. Ou seja, devido ao papel fundamental que a FH

exerce no metabolismo desses parasitas e a diferença com relação à enzima humana, o desenvolvimento de fármacos seletivos e específicos se torna possível.

### 1.2.2 Fumarases classe II

As fumarases de classe II fazem parte da superfamília aspartase/fumarase, um grupo de enzimas que compartilham características de arranjo terciário e quaternário, assim como a arquitetura do sítio ativo (Figura 4) [36]. Uma característica da superfamília é que as enzimas que a compõe catalisam reações envolvendo substratos que possuem o grupo succinil e fornecem fumarato como produto final [36]. Algumas das enzimas que fazem parte da superfamília aspartase/fumarase e que foram mais bem estudadas são: fumarase classe II, aspartase, argininosuccinato liase, adenilosuccinato liase [36].



**Figura 4.** Superfamília da Aspartase/Fumarase. Representação em cartoon do monômero de algumas enzimas da superfamília. A) Fumarase humana (Código PDB: 5D6B, artigo não publicado), B) Aspartase de *Bacillus sp.* cepa YM55-1 (Código PDB: 3R6V [37]), C) Adenilosuccinato liase de *Escherichia coli* (Código PDB: 2PTR [38]) D) Tetrâmero de FumC de *E. coli* representando a estrutura quaternária das fumarases de classe II (Código PDB: 1YFE [39]). O círculo preto indica a região de um dos quatro sítios ativos da enzima.

As enzimas pertencentes a essa superfamília possuem um mecanismo de catálise ácido-base comum [36, 40-43], em que um próton do C-3 do substrato é retirado por uma base da enzima. O carbânion resultante é estabilizado com um intermediário *aci*-carboxilado, com duas cargas negativas. Por fim, a ligação C-N é quebrada (C-O para fumarases) e a saída do subproduto pode ser facilitada pela presença de um ácido da enzima que doa um próton (Figura 5) [36]. Acredita-se que os resíduos envolvidos na catálise sejam Ser 186, Ser 187, Arg 188, His 235, Glu 362, Lys 371, Ans 373 e Glu 378.



**Figura 5.** Representação da proposta de mecanismo catalítico para as enzimas Aspartase, Fumarase, Argininosuccinato liase e Adenilosuccinato liase. Figura modificada de Veetil *et al.* [36].

Fumarases de classe II são homotetraméricas, de peso molecular em torno de 200 kDa e independentes de metais [31]. São expressas em bactérias (fumarase C de *E. coli*) e eucariotos superiores como mamíferos [44, 45]. Estruturalmente, essa classe de fumarases é caracterizada como proteínas predominantemente compostas de hélices  $\alpha$  divididas em três domínios (D1, D2 e D3), sendo D2 o principal responsável pelas interações que estabilizam o tetrâmero. A fumarase humana

(*Hs*FH), que pertence a classe II, é codificada pelo gene 1q42.1, possui 467 aminoácidos em cada monômero, peso molecular de 50,2 kDa e ponto isoelétrico teórico de 6,91 [46].

A primeira estrutura descrita para fumarases de classe II foi para FumC de *E. coli* em 1995 por Weaver *et al.*, que confirmou a forma tetramérica da proteína e subdividiu cada monômero em subdomínios [47]. A partir dos estudos estruturais com a FumC foram determinados os resíduos considerados catalíticos, que cada sítio era formado por regiões de três dos quatro monômeros e a presença de um segundo sítio de ligação para os substratos denominado sítio B [30, 47, 48]. Atualmente existem 25 estruturas de fumarases de classe II determinadas no PDB. Na figura 6 está representado o alinhamento da sequência dos resíduos de aminoácidos de algumas fumarases de classe II.

A localização citosólica e mitocondrial das fumarases de classe II se deve a diferentes mecanismos nos diferentes organismos. No caso de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, que possuem somente um gene para fumarase (FUM1), essa dupla localização acontece por translocação reversa, em que um único produto de translação é formado, com endereçamento para a mitocôndria, porém após a retirada do peptídeo de endereçamento uma parte dessas proteínas retorna para o citosol, movimentação que é determinada pelo enovelamento da proteína [29, 49]. Já em ratos, que também possuem somente um gene codificador de fumarase, a dupla localização acontece pela formação de dois produtos de translação derivados do mesmo RNAm [29]. Diferente da maioria dos eucariotos, a planta *Arabidopsis thaliana* possui dois genes para fumarase, um codifica a proteína endereçada para a mitocôndria (FUM1) e outro uma proteína menor, sem o peptídeo de endereçamento, que é citosólica (FUM2). Essas duas fumarases possuem 95% de similaridade, diferindo somente na região N-terminal [29].

Para a *Hs*FH, o modo como a dupla localização ocorre é pela produção de dois RNAm que produzirão duas proteínas com tamanhos diferentes, uma endereçada para a mitocôndria, com 44 resíduos a mais no N-terminal, e outra menor, que permanece no citosol [50].

Marka       3.0       1.1       6.0       1.1       6.0       1.1       6.0       1.1 <t< th=""><th><math display="block"> \begin{array}{c} 3 \\ \text{MeV} \\ \textbf{Soft} \\ Sof</math></th><th></th><th></th><th>β1</th><th>β2</th><th>α1</th><th>η1</th><th>α2</th><th>η2</th><th></th></t<>	$ \begin{array}{c} 3 \\ \text{MeV} \\ \textbf{Soft} \\ Sof$			β1	β2	α1	η1	α2	η2	
Here $1 = 1 = 1 = 1 = 1 = 1 = 1 = 1 = 1 = 1 $	HEFH I	HSFH	50	TT	60 TT	70 8	0 <u>222</u> 3	100 100	110	120
Soft	Soft	HsFH	SF	IPYDIE	GELKVPND	KYYGAOTVRSTMN	KEGGVTERMP:	PVIKAFGILK	RAAMEVNODYC.	DPKIANA
Here the second state is a second state of the second state is a	AGATE	ScFH	SFP	TETDAE	GEIHVPAD:	KYRGAQT <mark>ORSFON</mark> F	KIGGARERMPI	PLVHAFGVLK	KSAAIVNËSLGG	I DPRISKAT
TAPH	TAPE I AUDADOAL THE EVEN WARRANGE AND THE ADARDED AND THE ADARDED AT THE ADARDED	R6FH FumC		SPKD3M	GEIQIEEK GAIDVPAD	FYWGAQTQRSLENS KLWGAOTORSLEHS	RHGKQKMPI RHSTEKMP	SILIRALAIDA SLIHALALTA	KCTAQVNYBLCY RAAAKVNEDLCI	I SEEKASAI
MEEH       KAVDADSAMPETEINE WEIVEVPAKALHERGE GAVENUPEGGRCLERTOTELICLIGCACGOVEDILIEAPERAD         MEEH       MODADSAMPETEINE WEIVEVPAKALHERGE GAVENUPEGGRCLERTOTELICLIGCACGOVEDILIEAPERAD         MEEH       MCCOLOGODOLOGO       TT       DIODOLOGO       TT       DIODOLOGO       CO         MEEH       MCCOLOGODOLOGO       TT       DIODOLOGO       TT       DIODOLOGO       CO         MEEH       MCCOLOGODOLOGO       TT       DIODOLOGO       TT       DIODOLOGO       CO         REPH       DIAGONA CONTRACTOR DE LA TINO TOGOGO       TT       DIODOLOGO       TT       DIODOLOGO	MEPH       KAVDADSAMMENTER       10       100	TaFH	MEY	VERDIM	GEVKVPAD	RYWGAQTORSLEHF	RIGAWRFRMPI	LEIIRAYGMLK	KAAARANLELGE	LPEEIARAI
Harry GOLDOLO 100 Harry GOLDOL	HBFH       GG       GG       10       100	MtFH	MAVDADSANY	IDHDIM	GEVRVPAK.	ALWRAQTORAVENE	PHSGRGLEN	TQIRELCLLE	GACAQVNSDLCI	HAPEKADAH
HEFH <sup>13</sup> / <sub>140</sub> <sup>140</sup> / <sub>150</sub> <sup>140</sup> / <sub>150</sub> <sup>140</sup> / <sub>150</sub> <sup>150</sup> / <sub>150</sub> <sup>175</sup> / <sub>150</sub> <sup>110</sup> / <sub>150</sub> <sup>150</sup> /	HEFH       0.000.00.01       103       1.00									
HEFH       G30000001000000000000000000000000000000	HEFH       COOLDON CONTRACTOR NOT BELLEVEN COOLDON CONTRACTOR TO A DECOMPOSITION OF CONTRACTOR OF CONT									
Harry         0.000.000.00         2.00         0.000.000.00.00.00         TT         0.000.000.000.00         2.00           Harry         MKK ADDEVANG CASC TO THAN VARUE SERVE TAME CELCER TO THAN CORPORT AND THAN TAKEN TO THAN CARE ADDEVANG CASC TO THAN VARUE SERVE TAME CELCER TO THAN CORE CASC TO THAN VARUE SERVE TAME CELCER TO THAN CORE CASC TO THAN VARUE SERVE TAME CELCER TO THAN CORE CASC TO THAN VARUE SERVE TAME CELCER TO THAN CORE CASC TO THAN VARUE SERVE TAME CELCER TO THAN CORE CASC TO THAN VARUE SERVE TAME TO THE CASC TO THAN VARUE SERVE TAME TO THE CASC TO THAN VARUE SERVE TAME TO THE CASC TO THAN TO THE TAKE TO THE CASC TO THAN VARUE SERVE TAME TO THE TAME TO THE CASE TO THE CASE TO THE TAME TO THE TAME TO THE TAKE TO THE TAME TO THAT THE TAME TO THE TAME TO THE TAME TO THE TAME TO TH	Harry         0.000.000.00         2.00         0.000.000.000.00         TT         0.000.000.000.00         1.30         1.40         1.30         1.40         1.30         1.40         1.30         1.40         1.30         1.40         1.30         1.40         1.30         1.40         1.30         1.40         1.30         1.40         1.30         1.40         1.30         1.40         1.30         1.40         1.30         1.40         1.30         1.40 <th1.40< th="">         1.40         1.40</th1.40<>		α3	η3		α4		π1		α5
HEFH WE AD EVANG WITH THE TAY AND THE TAY ADDRESS TO THE VALUE TO THE COLOR ADDRESS A	HEFH WKAADENA CITEDE VVV COUNT OF SCOTTENEND VETTING AND THE CONTROL OF SCOTTENEND VIETNAME AND	HsFH	00000000	000	140	200000000000000000000000000000000000000	20000 17	2000	0 00000	000000000
BGFH       COLADBOARD REPORT LVVV GGGT GOVERNMENT STATE LLEGGER (SEED)       FENNEL NO. COLADBOARD REPORT LATING GGT GOVERNMENT STATE NEW STATE NE	acd bit of A ADB VAR A KIND DI VALVA COSCT ON THE ALL OF ALL TARK OF A DI PUNIT COSC ON THE TARK OF A DI PUNIT COSC ON THE ALL OF A DI VAL AND ALL ALL OF A DI VAL AND	UeFU	- VERSORVAR	7.NB10555	LUNGTOR		RETENLOOPL		VNKSOSSNDTET	
Repert Devine of the product of the	REFH DEAL TO THE TO THE THE TO	ScFH	QOAADEVASG	LDDEFP	LVVFOTGS	GTOSNMNANEVISN	RAIEILGGKI	SSK.QVHPNNH	CNOSOSSNDTFP	TVMHIAASL
PURCH       ALMANETIA       Construction       Construct	Pump       Clambe VIA Subject and the second	RbFH	DKATDRILEGE	FEDNFP	LVV%OTGS	GT QTNMNMNEVIAS	IANEELTSKK	GKSPVHPNDH	VNKGQSSNDSFP	TAMHIATVL
MEPH IAAAALA CONDUCTION CONTROL CONTR	MEPH IA AAEIA CHE DI IDVV GOST BELTINE IASI AK	TaFH	IOMAEEVIAGE	LDDRFP	LVVFOTGS	GTOTNMNVNEVIAN	RASEILGKPL	SK.YVHPNDH	VNRGOSSNDVFP	TAMYVATVL
HSFH 1000 200000000000 $\frac{\beta_3}{210}$ $\frac{\beta_4}{220}$ $\frac{\alpha_7}{220}$ $\frac{\alpha_7}{220}$ $\frac{\beta_5}{200}$ $\frac{\alpha_7}{200}$ $\frac{\beta_5}{200}$ $\frac{\beta_7}{200}$ $\frac{\beta_7}{2000}$ $\frac{\beta_7}{2000000000000000000000000000000000000$	HaFH 0000 0000000000000 210 220 220 230 TT <u>240</u> 000000000000000 <u>250</u> 250 250 250 250 <u>270</u> HaFH EVNEY BELOK BALANA BARRENA IN THE CAN HED AND FULLOR FROM OV VENTILAR BARRENTS FINANCE IN THE ANALY STATE TO ANY AND THE CAN HERE TO THE VENTILAR BARRENT STATE TO ANY AND THE CAN HERE TO THE VENTILAR BARRENT STATE TO ANY AND THE CAN HERE TO THE VENTILAR BARRENT STATE TO ANY AND THE CAN HERE TO THE VENTILAR BARRENT STATE TO ANY AND THE CAN HERE TO THE VENTILAR BARRENT STATE TO ANY AND THE CAN HERE TO THE VENTILAR BARRENT STATE TO ANY AND THE CAN HERE TO THE VENTILAR BARRENT STATE TO ANY AND THE CAN HERE TO THE VENTILAR BARRENT STATE TO ANY AND THE CAN HERE TO THE VENTILAR BARRENT STATE TO ANY AND THE CONTRACT TO THE VENTILAR BARRENT STATE TO ANY AND THE CONTRACT TO THE VENTILAR BARRENT STATE TO ANY AND THE CONTRACT STATE STATE TO ANY AND THE CONTRACT STATE TO ANY AND THE CONTRACT STATE STATE STATE TO ANY AND THE CONTRACT STATE STA	MtFH	IAMAAEIADG	HDDOFP	IDVFOTGS	GT S SNMN TNEVIAS	1 AK	GGVTLHPNDD	VNMSQSSNDTFP	TATHIAATE
Hash and the second state of the second state	HSFH 0.000 0.00000000000000000000000000000								***	
HAFH 0001 01000000000000000000000000000000	HIGH ADVANCE CONNECCE AND A CONNECTION OF THE AND A CONNECTION OF THE CONNECTION OF									
HSFH 0.000 0.000000000000 220 220 220 220 22	HSFH       0.000100000000000000000000000000000000			α6		B3 B	4	α7	B5	
Lip       220       230       240       250       260       # 270       280         ScH       Qigie i Bith Minabal Skippe I Vice The QAYP LTLOOP FSGY QOVYNGIONAESLKTJSF AN GOTAVC         ScH       Qigie i Bith Minabal Skippe I Vice The QAYP LTLOOP FSGY QOVYNGIONAESLKTJSF AN GOTAVC         RbH       ACCONTRALMANETSSJY SKAPPE I VICE THE QAAP LTLOOP FSGY QOVYNGIONAESLKTJSF AN GOTAVC         ALROIT FOLKT TOTJNE SAFADIVKIGATHLQAAP LTLOOP FSGY QOVYNGIONAESLKTJSF AN GOTAVC         ALROIT FOLKT TOTJNE SAFADIVKIGATHLQAAP LTLOOP FSGY QOVYNGIONAESLKTJSF AN GOTAVC         MEPH       AN CAN SKIPPE I VICE AN AFADIVKIGATHLQAAP LTLOOP FSGY AN OLANTIKAAN PRIY AN ACTAVC         MEPH       AVANHITALOOP FSGY AN ANALALAN FYN VYNSGATHLMAAVP VTLOOP FSGY AN ACLAR LAW KACLPRJOG AN ACLAR VAN ALGOTAVC         MEPH       AAVAN TTALOON SKIPP AN ANT VYNSGATHLMAAVP VTLOOP FSGY AN ACLAR LAW KALPAN ALGOTAVC         MEPH       AAVAN TTALOON SKIPP AN ANT VYNSGATHLMAAVP VTLOOP FSGY AN ACLAR LAW KALPAN ALGOTAVC         MEPH       INTROOP VILLOOP SKIPP AN ANT VYNSGATHLMAAVP VTLOOP FSGY AN ACLAR LAW KALPAN ALGOTAVC         MEPH       INTROOP VILLOOP SKIPP AN ANT VYNSGATHLMAAVP VTLOOP FSGY AN ACLAR LAW KALPAN ALGOTAVC         MEPH       INTROOP VILLOOP SKIPP AN ANT VYNSGATHLMAAVP VTLOOP FSGY AN ACLAR LAW KALPAN ALGOTAVC         MEPH       INTROOP VILLOOP SKIPP AN ALGOTAVYNSGATHLMAAVP VTLOOP SKIPP AN ALGOTAVC         ScH       INTROOP VILLOOP SKIPP AN ALGOTAVYNSGAN ALGOTAVACLAR LAW KALPAN ALGOTA	HaFH       C10       C20       C20 <td< th=""><th>HsFH</th><th>2000 20000</th><th>000000</th><th>000000</th><th></th><th></th><th>00000000000</th><th>200 -</th><th></th></td<>	HsFH	2000 20000	000000	000000			00000000000	200 -	
HERE EVENE ULD GLOCH HAAD DARKER AC IN CONTINUED AVENUED SOLVOVKIACIN LAAD MEN IND AND A CONTINUED AND A CONT	HERE A AVAIN THE CONSTRUCT AND A CONSTRUCT AND		210	2	20	230 240	250	260	* 270	280
PDFP       ATROCH       PALANE PTS_OVESROWDRINKING CHILLOCATELITION SEGURATION IN KEISKUVLU A GESTAVGE         PUNCE       ALKAGU GOLANT TO TINE SARAPA DIVKI GETHLUDAVD TILGED       VESKAAOLENNIKKISTSEDHUAH ALGETAVGE         TAFH       ALHOH YA VEG IATTEE ARAPD GIVKVCRTHLUDAVD TILGED       VESKAAOLENNIKKISTSEDHUAH ALGETAVGE         MERH       AAVAH I PALOC HDALAARAD WHT VYKSGRTHUMDAVD VILGOP       SERVAMS HUNKKESSENDUNG LAGTAVGE         MERH       AAVAH I PALOC HDALAARAD WHT VYKSGRTHUMDAVD VILGOP       SERVAMS HUNKKESSENDUNG LAGTAVGE         MERH       AAVAH I PALOC HDALAARAD WHT VYKSGRTHUMDAVD VILGOP       SERVAMS HUNKKESSENDUNG LAGTAVGE         MERH       AAVAH I PALOC HDALAARAD WHT VYKSGRTHUMDAVD VILGOP       SERVANS HUNKKESSENDUNG LAGTAVGE         MERH       AAVAH I PALOC HDALAARAD WHT VYKSGRTHUMDAVD VILGOP       SERVANS HUNKKESSENDUNG LAGTAVGE         MERH       AAVAH I PALOC HDALAARAD WHT VYKSGRTHUMDAVD VILGOP       SERVANS HUNKKESSENDUNG LAGTAVGE         MERH       INTRICH KAKAVAALIGL SEVTA HERE ARAH DALY ELS CANNT TA CHIKKEA NET FULGS OF RECIDENTING         NSKIGP DIKEPAEKVASETAGU SEVTA KAKANANA HUNKESSENDUNG KAKAN NITH CHIKKEA AND IFLISGER COLLING       SERVANS KAKAN AN IFLISGER COLUENTICA. SERVANS HUNKKEA AND IFLISGER COLIN HUNKESSENDUNG KAKAN AND IFLISGER COLUENTICA. SERVANS HUNKKEA AND IFLISGER COLINES TO THE SERVANS HUNKKEA AND IFLISGER COLINES TO THE SERVANS HUNKKEA AND IFLISGER COLINES TO THE SERVANS HUNKKEA AND IFLISGER COLOR AND	RbFH       ATROCT DALAM FTEL OVERDWORK I KINGTH LODATPLITLOGE SOGY I TOLEVALERIEDALKKVIL AND TOLEGE TO TALENE TO AND TALENCE TO	HSFH ScFH	OIGNEDIRELI OIGNEDIRELI	NEKNAL	DARSKEFA EARSKEFD	IIKIGRTHTODAV	PLTLGOEFSG	CVQQVKIAMIK (VOOVENGIOR)	IKAAMPRIISUA Vahslkilsela	OGGTAVGTG
Func Call Record Pocket Tother CRAFAD UV CRAFT LOOD AT PITLOGG PROGNAM PHALKETEYS PHUAPE AL COTAVE TAFFI ALAUHT PALOO PHOADAAAAALOWHT VV KORTH LMDAVP TLOOD PS GYAR O TPAGIER VRACLPRIGE TAVE MEFH AAVAHT PALOO PHOADAAAAALOWHT VV KORTH LMDAVP TLOOD PS GYAR O TPAGIER VRACLPRIGE TAVE HSFH TT 200000000000 $\downarrow 00000000000000000000000$	Func ALRKOF POLKTETOTISHESSRAFADIVKIGHTHLODATPITLOGETSGKVAMLERINIKELEVSEPHVAEFALGO TAFH ALVHET POLKTETOTISHESRAFADIVKIGHTHLODATPITLOGETSGKVAMLERINIKELEVSEPHVAEFALGO MTFH AAVAHITALOGI HDALAAAALDWHTVKSGRTHLMDAVPVTLOGEFSGVARQIFAGIERVRACLPRLGETAIG * HSFH TT 2000000000000 \$60 000000000000000000000	RbFH	ATROQUIPALS	NLFTSL	QYKSKDWD.	KIIKIGRTHLÕDAT	PLTLKQEFSG	TÕIEYALËR	IEDALKKVYLLA	<b>O</b> GGTAVGTG
MARTH       ANVAHUE BALOOMHDALAAMAADDWHTUVKSGATHLMDAVPVILGOEPSOFAROIEAGTERVRACTPREGED       EGTAVE         METH       ANVAHUE BALOOMHDALAAMAADWHTUVKSGATHLMDAVPVILGOEPSOFAROIEAGTERVRACTPREGED       EGTAVE         HSFH       TT       2002002000000       \$60       320       320       340       340       350       360         HSFH       TT       2002002000000       \$60       320       320       340       340       350       360         HSFH       INTRICABENVAAKVALUGL. PFVT PNKEBALAHDALVILG CAMMITTA CSUFKIANDIRYLG OPROCYHEIMIPE       S60       S60       360       360         SCFH       INTRICABENVAAKVALUGL. PFVT PNKEBALAHDALVILG CSALNTIA CSUFKIANDIRYLG OPROCYHEIMIPE       S60       S60 <t< th=""><th>MARTH       AAVAH       MARTH       AAVAH       <t< th=""><th>FumC</th><th>ALRKOLIRQLE ALHOHNVRAVE</th><th>CHIATE</th><th>NERSRAFAI</th><th>DIVKIGRTHLQDA1</th><th>PLTLGQEISG</th><th>VAMLEHNLKE Sagolentlam</th><th>IEYSLPHVAELA UKRAEKCIVNIA</th><th>LGGTAVGTG</th></t<></th></t<>	MARTH       AAVAH       AAVAH <t< th=""><th>FumC</th><th>ALRKOLIRQLE ALHOHNVRAVE</th><th>CHIATE</th><th>NERSRAFAI</th><th>DIVKIGRTHLQDA1</th><th>PLTLGQEISG</th><th>VAMLEHNLKE Sagolentlam</th><th>IEYSLPHVAELA UKRAEKCIVNIA</th><th>LGGTAVGTG</th></t<>	FumC	ALRKOLIRQLE ALHOHNVRAVE	CHIATE	NERSRAFAI	DIVKIGRTHLQDA1	PLTLGQEISG	VAMLEHNLKE Sagolentlam	IEYSLPHVAELA UKRAEKCIVNIA	LGGTAVGTG
HsFH     TT     2000000000000000000000000000000000000	A     A       HSFH     TT     2002002020000     β6     09     0000020000000000000000000000000000000	MtFH	AAVAHLIRAL	CHEDAL.	AAKALDWH	TVVKSGRTHLMDAV	PVTLGQEFSG	ARQIEAGIER	VRACLPRIGE	IGGTAVGTG
HSFH       TT       2002002020000000000000000000000000000	HSFH       TT       2000000000000000000000000000000000000					*				
HSFH       TT       2000000000000000000000000000000000000	HSFH       TT       2000000000000000000000000000000000000									
HsFH TT 1000000000000 10000000000000000000000	HsFH       TT       100000000000       1000000000000000000000000000000000000									
290       300       310       320       330       340       350       360         HsFH       INTRIGFAEKVAAKVAALTGI. PFVTAPNKE BALAAHDALVELSGAMNTTACSIMKTANDI FRLCSGPRSCICELIJE         RbFH       INTRIGFAEKVAAKVAALTGI. FFVTAPNKE BALAAHDALVELSGAMNTTACSIMKTANDI FRLCSGPRSCICELIJE         RbFH       INTRIGFAEKVAAKVAALTGI. FFVTAPNKE BALAAHDALVELSGAMNTTACSIMKTANDI FRLGSGPRCCYHELMIPE         RbFH       INSKIGFDIKFAEKVASFTAO. FFKTASNKESLAAHDALVEPSGTLNTIACSIMKTANDI FRLGSGPRCCYHELMIPE         TaFH       INAHPRFGELVARYLAEERIGI. PFRVAEN FFAALAHDALVEPSGTLNTIAVSIKKIANDI FRLGSGPRCGIGGIGIGIGIGIGIGIGIGIGIGIGIGIGIGIGIGIG	290       300       310       320       330       340       350         HsFH       INTRIGFAEKVAAKVAALGL.PFVTAPNKE BALAAHDAIVELSGAMNTTACSUKKIANDIRTLCSGERSGLCLUINSSCH       INTREGFDVKIAPDISSETGL.KFOTAPNKE BALAAHDAIVECSGALNTLACSUKKIANDIRLLSGERSGLCLUINSSCH         RbFH       INSKIGFDIKFAEKVASFTKQ.PFKTAPNKE BALAAHDAIVECSGALNTLACSUKKIANDIRLLSGERCGLGEIT         TaFF       INTHPEYARVADELAVITCA.FVTAPNKE BALAAHDAIVEFSGILNTLACSUKKIANDIRLLSGERCGLGEIT         TaFH       INAHPREGELVARVLAEETGL.PERVARENKE ALATCHANVEFSGILNTLACSUKKIANDIRWLASGPYGETGET         TAFH       INAHPREGELVARVLAEETGL.PERVARENKE ALATCHANVEFSGILNTLACSUKKIANDIRWLASGPYGETGET         MtFH       INAHPREGELVARVLAEETGL.PERVARENKE ALATCHANVEFSGILNTLACSUKKIANDIRWLASGPYGETGET         MtFH       INAPDOFGUVAVUVAVUVATULASETGL.PERVARENKE ALATCHANVEFSGLARTIZVSIT         MtFH       INAPDOFGUVAVUVAVUVATULASETGL.PERVARENKE ALATCHANVEFSGLARTIZVSIT         MtFH       INAPDOFGUVAVUVAVUVATULASETGLARGOGOGO TT       GOOGOGOGOGOGOGOGOGOGOGOGOGOGOGOGOGOGOG			α8	ßé	a9		10		67
HSFH INTRIGFAERVAARVAALDGL. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUFKTARDIPLOSGERSGLGLILIPE RDFH INTRYGFDVKIAEQISKIGGL. KFQTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUFKTARDIPLOSGERSGLGSGELILIPE RDFH INSKIGFDIKFAEKVABFTKQ. PFKTAPNRPESDAAHDALVELSGAMNITAGUFKTANDIRLLGSGPRCGLGELHPE FumC INTHPEYARVADELAVITCA. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUFKTANDIRLLSSGPRCGIGEISIPE AND THPEYARVADELAVITCA. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUFKTANDIRLLSSGPRCGIGEISIPE NTHPEYARVADELAVITCA. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUFKTANDIRLLSSGPRCGIGEISIPE NTHPEYARVADELAVITCA. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUFKTANDIRLGSGPRCGIGEISIPE NTHPEYARVADELAVITCA. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUFKTANDIRLSSGPRCGIGEISIPE NTHPEYARVADELAVITCA. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUFKTANDIRLSSGPRCGIGEISIPE NTHPEYARVADELAVITCA. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUFKTANDIRLSSGPRCGIGEISIPE NTHPEYARVADELAVITGA. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUFKTANDIRLSSGPRCGIGEISIPE NTHPEYARVADELAVITGA. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUFKTANDIRLSSGPRCGIGEISIPE NTHPEYARVADELAVITGA. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUTKTANDIRLSSGPRCGIGEISIPE NTHPEYARVADELAVITGA. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUTKTANDIRLSSGPRCGIGEISIPE NTHPEYARVADELAVITGA. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUTKTANDIRLSSGPRCGIGEISIPE NTHPEYARVADELAVITGA. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUTKTANDIRLSSGPRCGIGEISIPE NTHPEYARVADELAVITGA. PFVTAPNRPEADAAHDALVELSGAMNITAGUTKTANDIRLSSGPRCGUTGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGU	HSFH       INTRIGFACE VARY VARIAGEL, PFVTAPNKEE A LAARDALVEE'S GANNETACSIDE TAXDIRPLOSOF REGISTER         SCFH       INTREGED VKIAEQUISEE IS, KFQTAPNKEE A LAARDALVEE'S GINTIACSIDE KIANDIRPLOSOF REGISTER         RbFH       INSKIGFD IKFACK VARY A CAPRENE A LAARDALVEE'S GINTIACSIDE KIANDIRPLOSOF REGISTER         FumC       INTHPEYAR VADELAVITCA. PFVTAPNKEE SLAARDALVEE'S GINTIA'S VSIMETANDIRUKASOF YCCITCE TE         MtFH       INAPPEGELVARY LAEFT GC. PFVTAPNKEE A LAARDEL VEDSCALKTIAVSITETANDIRWKASOF YCCITCE TE         MtFH       INAPPEGELVARY LAEFT GC. PFVTAPNKEE A LAARDEL VEDSCALKTIAVSITETANDIRWKASOF YCCITCE TE         MtFH       INAPPEGELVARY LAEFT GC. PFVTAPNKEE A LAARDEL VEDSCALKTIAVSITETANDIRWKASOF YCCITCE TE         MtFH       INAPPEGELVARY LAEFT GC. PFVTAPNKEE A LAARDEL VEDSCALKTIAVSITETANDIRWKASOF YCCITCE TE         MtFH       INAPPEGELVARY VAVLVAOT GLSELRTAANSFEAQAARDGLVEAS GALRTIAVSITETANDIRWKASOF YCCITCE TE         MtFH       1NAPPEGELVARY VAVLVAOT GLSELRTAANSFEAQAARDGLVEAS GALRTIAVSITETANDIRWKASOF YCTCLAET         SCFH       PCSSIMPGKVNPTOCEALTMVAAQUM GNH VAVTVGSOR GENE HE LNVY KEMMI KNVTHSARLEDASVSTEURCVVEG         RbFH       PCSSIMPGKVNPTOCEALTMVAAQUM GNH VAVTVGSOR GENE HE LNVY KEMMI KNVTHSARLEDASVSTEURCVVEG         PbFH       PCSSIMPGKVNPTOCEALTMVAAQUM GNH VAVTVGSOR GENE HE LNVY KEMMI KNVTHSARLEDASVSTEURCVVEG         PbFH       PCSSIMPGKVNPTOVEALTMVAAQUM GNH VAVTVGSOR GENE HE VY KEMMI KNVTHSARLEDASVSTEURCVVEG         PbFH       PCSSIMPGKVNPTOVEALTMVAAQUM GNH VAVTVGSOR GENE HE VY K	HsFH	<b>TT</b> 20220	<u>α8</u>	ο	α9 202202 23	000000000000000000000000000000000000000	x10 20200200200	2222	<u>β7</u>
RbFH       INSKIGFDIKFARE VABET KQ. PPKTASING ESLAHDALVEPSCTINTIAVSTKIANDIR LESGERCCIGELHIPE         FumC       INTHPEYARRVADELAVITCA. PPVTASING ESLAHDALVEPSCTINTIAVSTKIANDIR LESGERCCIGELHIPE         TaFH       INAHPRESLVARYLAESICI. PFVTASING ENERALAAHDELVHVMGALKGLARSING INTIANSGPRCTIGEIFTPA         MtFH       INAPDDFSVRVVAVLVAGTGLSELRTAANSPEAQAARDGLVEASGALRTIAVSITKIANDIR MMGSGPLTCLAEIQIPD         HsFH       2000000000000000000000000000000000000	RbFH       INSKIGFDIKFAEXVAEFTKQ. PFRTADNKFESLAAHDALVEFSCTLNTIAVSTEKTANDIRLLGSGPRCCICETE         FumC       LNTHPEYARRVADELAVITCA. PFVTADNKFESLAAHDALVEFSCTLNTIAVSTEKTANDIRLLGSGPRCCICETE         MtFH       LNAHPREGLVARYVAVLVAQTGLSELRTAANSFEAQAARDGIVEASGALKTIAVSITKTANDIRWMLASGPRCCICETE         MtFH       LNAPDDFSVRVVAVLVAQTGLSELRTAANSFEAQAARDGIVEASGALRTIAVSITKTANDIRWMLASGPRCCICETE         MtFH       LNAPDDFSVRVVAVLVAQTGLSELRTAANSFEAQAARDGIVEASGALRTIAVSITKTANDIRWMGSGPLITCLAEIQ         MtFH       LNAPDDFSVRVVAVLVAQTGLSELRTAANSFEAQAARDGIVEASGALRTIAVSITKTANDIRWMGSGPLITCLAEIQ         MtFH       LNAPDDFSVRVVAVLVAQTGLSELRTAANSFEAQAARDGIVEASGALRTIAVSITKTANDIRWMGSGPLITCLAEIQ         MtFH       LNAPDDFSVRVVAVLVAQTGLSELRTAANSFEAQAARDGIVEASGALRTIAVSITKTANDIRWMGSGPLITCLAEIQ         MtFH       SCSIMPGKVNPTOCEA         SCFH       PGSSIMPGKVNPTOCEA         PGSSIMPGKVNPTOVEALTAVVAAQVMGNHVAVTVGSSNCHFELWVFKPMVIKINKNVHSARLGSDSVSTENCVVG         SCFH       PGSSIMPGKVNPTOVEALTAVSQUMGNHVAVTVGSSNCHEVTVKPRMVIKINTLSIRLITDAAXSFRVLCVCG         PGSSIMPGKVNPTOVEALTAVVSQUMGNHVTVIASSNCHVTVKPKPVVHINNLSIKLIDAAVSFRVLCVCG         PGSSIMPGKVNPTOVEALTAVVSQUMGNHVTVIASSNCHEVTVKPRMVIHNFLOSVKLLSDAVASPOUTLACT         MtFH       PGSSIMPGKVNPTOVEALTAVVVSQUAAQUTGNDAAVAAGANGANCAFELNVYFRMVHHNFLOSVKLLSDAVASPOUTLACT         MtFH       PGSSIMPGKVNPTOVEALTAVSQUAAQUTGNDAAAAGANCAFELNVYFRMVHAANILESFKLLTNVSRLEAQRCIACT         MtFH       PGSSIMPGKVNPTOVEALTAVSQUAAQUTGNDAAAAGAAAGANCAFELNVYFRMVHAAAAAAAAAAAAAAA	HsFH	TT <u>20000</u> 290	α8 200000 <b>30</b>	οο <mark>β</mark> 6 •	α9 <u>200200</u> <u>20</u> 310 320	330	10 2002000000000 340	350	β7 <b>360</b>
Funct       LINTHPEYARRVADELAVITCA. PFVTAPNKEBALATCALVQAHGALKGLASEMKTANDVEWLASGPRCEIGEISIEM         TAFH       INAHPREGELVARVIAENELGI. PFVTAPNKEBALATCALVUNMGALKGLASEMKTANDVEWLASGPRCEIGEIFIPA         MtFH       INAPDDFSVRVVAVLVAOTGLSELRTAANSFEAQAARDGLVEASGALRTIAVSTTKTANDIRVMGSGPLTCLAEIQIPD         (1)         (1)         (1)         (1)         (1)         (2)	Funct       LINTHPEYARRVADELAVITICA. PFVTAPNKEEALATCDALVOAHCALKGLAASIMKTANDVEWLASGPRCCICETE MTBH         MAHPREGELVARVIAERCL. PFVTAPNKEEALAATCDALVOAHCALKGLAASIMKTANDVEWLASGPRCCICETE MTBH       MLABREGELVARVIAERCL. PFVTAPNKEEALAATCDALVOAHCALKGLAASIMKTANDVEWLASGPRCCICETE MTBH         MSFH       COLOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOC	<i>Hsfh</i> Hsfh Scfh	TT <u>22020</u> 290 LNTRIGFAEKA	α8 000000 30 /AAKVAA /AEOISK	β6 9 LICL.PFV ENGL.KFO		00000000000000000000000000000000000000	10 00000000000 340 ACSIMKIAND ACSIFICAOD	<u>350</u> 350 IRFLCSGPRSCI	β7 360 GELILPENE
MtFH       INAPDDFSVRVVAVLVAOTSISELRITAANSFEAQAARDGIVEASCALRITAVSTITTANDIRUMSSCELTELAFIQIED         HsFH       000000000000000000000000000000000000	MtFH       INAPDDFGVRVVAVLVAOTGLSELRTAANSFEAQAARDGLVEASGALRTIAVSTTKAANDIRWAGGGLTTLAEIQ         HsFH       000000000000000000000000000000000000	<i>Hsfh</i> Hsfh Scfh Rdfh	TT <u>2000</u> 290 LNTRIGFAEKY LNTKPGFDVKJ INSKIGFDIKE	08 2020220 30 AAKVAA AEQISK AEKVAE	ο ο LTCL.PFV ETGL.KFQ FTKQ.PFK	009 310 310 310 310 320 310 320 310 320 310 320 310 320 310 320 310 320 320 320 320 320 320 320 32	OCCOCCOCCO 330 IVELSGAMNT IVECSCALNTI LVEFSCTLNTI	10 200000000000 340 ACSLFKTAOD ACSLFKTAOD AVSLMKTAND	2002 350 IRFLCSGPRSGI IRYLSSGPRCGI	β7 360 GELILPENE HELMLPENE GELHLPENE
all       a	all       all       all       all       n4         HsFH       2000000000000000000000000000000000000	HsFH ScFH RbFH FumC TaFH	TT 20021 290 LNTRIGFOKU LNTRIGFDKU INSKIGFDIKE LNTHPEYARKU LNTHPEYARKU	08 0000000 AAKVAA AEQISK AEKVAE ADELAE	β ο LTCL.PFV ETCL.FFV ETCL.FFV FTKQ.PFK ITCA.FFV ETCL.FFP	α9 310 310 320 TAPNKFEALAHDA TAPNKFEALAHDA TAPNKFEALAHDA TAPNKFEALAHDA TAPNKFEALAHDA	IVELSGAMNT IVELSGAMNT IVESGALNT IVESSTLNT IVESSTLNT IVESSTLNT IVENGALRG	10 340 ACSIMITAND ACSIMITAND AVSIMITAND AASTMITAND	350 IRPLCSGPRSGI IRYLCSGPRCGI IRLLGSGPRCGI VRWLASGPRCGI VRWLASGPRCGI	β7 360 GELILPENE HELMLPENE GELHLPENE GELSIPENE
A11       A12       N4       B8         HsFH       2022020202020202020200000000000000000	All         All <th>HsFH ScFH RbFH FumC TaFH MtFH</th> <th>TT 2002 290 INTRIGFAEKU INTKPGFDVKI INSKIGFDIKE INTHPEYARKU INAHPRESELU INAHPRESELU INAPDDFSVRU</th> <th>α8 0000000 30 (AAKVAA AEQISK AEKVAE (ADELAV (ARYLAE (VAVLVA</th> <th>β O O C C C C C C C C C C C C C</th> <th>α9 310 310 TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA VAENREAALAAHDA VAENREAAAAA</th> <th>IVELSGAMNT IVELSGAMNT IVECSCALNT IVECSCALNT IVOAHCALKG IVHVMCALKT IVHVMCALRT IVHVMCALRT</th> <th>ALO ACSIMITAND ACSIMITAND ACSIMITAND ASIMITAND AGAIMITAND AGAIMITAND</th> <th>350 IRPLCSGPRSGI IRPLCSGPRCGY IRLLSGPRCGI VRWLASGPRCGI IRWLASGPITGI</th> <th>β7 360 CELLIPENE HELMIPENE GELHIPENE GELHIPENE CEISIPENE CEISIPENE CEISIPENE</th>	HsFH ScFH RbFH FumC TaFH MtFH	TT 2002 290 INTRIGFAEKU INTKPGFDVKI INSKIGFDIKE INTHPEYARKU INAHPRESELU INAHPRESELU INAPDDFSVRU	α8 0000000 30 (AAKVAA AEQISK AEKVAE (ADELAV (ARYLAE (VAVLVA	β O O C C C C C C C C C C C C C	α9 310 310 TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA VAENREAALAAHDA VAENREAAAAA	IVELSGAMNT IVELSGAMNT IVECSCALNT IVECSCALNT IVOAHCALKG IVHVMCALKT IVHVMCALRT IVHVMCALRT	ALO ACSIMITAND ACSIMITAND ACSIMITAND ASIMITAND AGAIMITAND AGAIMITAND	350 IRPLCSGPRSGI IRPLCSGPRCGY IRLLSGPRCGI VRWLASGPRCGI IRWLASGPITGI	β7 360 CELLIPENE HELMIPENE GELHIPENE GELHIPENE CEISIPENE CEISIPENE CEISIPENE
MSFH         COLOCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	MSFH         CLOSO COLOR COL	HsFH ScFH RbFH FumC TaFH MtFH	TT 2002 290 LNTRIGFAEK LNTKPGFDVKJ INSKIGFDIKE LNTHPEYARR LNAHPRFGEL LNAPDDFGVR	α8 ΔΟΟΟΟΟΟ 30 VAAKVAA AEQISK VAEVAE VAEVAE VAVLVA	β Ο Ο CL.PFV ETCL.KFQ FTXQ.PFK ITCL.PFV ETCL.FFR CTCLSELR	α9 310 310 TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TANKFEALAAHDA	IVELSCAMNT IVELSCAMNT IVECSCALNT IVECSCALNT IVOAHCALKG IVOAHCALKG IVOAHCALKG IVOAKCALRT	ALO ACSIMITAND ACSIMITAND ACSIMITAND ASIMITAND ASIMITAND ASIMITAND	350 IRPLCSGPRSGI IRPLCSGPRCGY IRLSGPRCGI VRWLASGPRCGI IRWISGPLTGI	β7 360 CELLIPENE HELMIPENE GELHIPENE GELHIPENE CEIFIPANE AEIQIPDLQ
HsFH         2000000000000000000000000000000000000	HsFH         2002002002002002002000000000000000000	HsFH ScFH RbFH FumC TaFH MtFH	TT 2003 290 LNTRIGFAEKU LNTKPGFDVKJ INSKIGFDIKE LNTHPEYARKU LNAHPRFGELU LNAPDDFGVRU	08 000000 30 (AAKVAA AEQISK AEKVAE (ADELAV (ARYLAE VVAVLVA	ο ο CL.PFV ETGL.XFQ FTCL.XFQ FTCL.PFV ETGL.PFV ETGL.PFV CLSELR	α9 310 320 TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA VAENRFAALAAHDA VAENRFAALAAHDA TANSFEAQAARDO	OQQQQQQQQQQQQ 330 IVELSGAMNT IVECSGALNT IVESGLNT IVESGLNT IVEAGALRT IVEASGALRT	ACSIMITAND ACSIMITAND AVSIMITAND ASIMITAND ASIMITAND ASIMITAND AVSITITAND	350 IRPLCSGPRSGI IRVLGSGPRCGI VRWLASGPRCGI VRWLASGPRCGI IRWMGSGPLTGI	β7 360 HELMIPENE GELHIPENE GELFIPENE GELFIPENE AZIQIPDLO
370       380       390       400       410       420       430       440         HsFH       PGSSIMPGKVNPTOCEA       MTMAAU MANU MANU YAGISNEHFELNVPK PKMINIKNU HSARILGDASVSTENCVVCIANA       SCFH       PGSSIMPGKVNPTOVEALTAVCSOVMENNAAITPAGSOGOFELNVPKPVMINLLNSIRLITDAAYSERVHCVCIANAAN         RbFH       PGSSIMPGKVNPTOVEALTAVCSOVMENNAUTVIGSNEHFELNVPKPVMINLLNSIRLITDAAYSERVHCVCCIANAAN       FACTOR       STRLITDAAYSERVHCVCIANAAN         Fumc       PGSSIMPGKVNPTOVEALTAVCSOVMENNAUTVIGGSNEHFELNVPKPVIINILOSIELLSDSVNSEVTHCVKCLEPN       MANUALASSERVNPTOVEALTAVCSOVMENNUTVIANGGASGNEHELENVPKPVIINILOSIELLSDSVNSEVTHCVKCLEPN         Fumc       PGSSIMPGKVNPTOVEALPNVVVPGNDAAFAGSOGNFOLNVYKPVMVDAALESIKKLLGDAVASEDOHLAQGIEPN         MtFH       PGSSIMPGKVNPTOVEALPNVVVVPGNDAAIANGGANGAFELNVYIPMMARNITESFKLLTNVSRLFAORCIACLTAN         * *       *         MtFH       20000000       2000000000       2000000000000000000000000000000000000	370       380       390       400       410       420       430         HsFH       PGSSIMPGKVNPTQVEAKTNVAAQVMGNHAAITPAGSOGPELNVPKPMIAN_LNSIRLIDAAYSRVHCVEG         PGSSIMPGKVNPTQVEALTNVCSQVMGNNAAITPAGSOGPELNVPKPVMIAN_LNSIRLIDAAYSRVHCVEG         PbFH       PGSSIMPGKVNPTQVEALTNVCSQVMGNNAAITPAGSOGPELNVPKPVMIAN_LNSIRLIDAAYSRVHCVEG         PbFH       PGSSIMPGKVNPTQVEALTNVCSQVMGNNAITPAGSOGNEHLELNVPKPVMIAN_LNSIRLIDAAYSRVHCVEG         PumC       PGSSIMPGKVNPTQVEALTNVCSQVMGNNAITPAGSOGNEHLELNVPKPVLINLQSIELLSDSVNSVVHCVKG         PGSSIMPGKVNPTQVEALTNVCSQVMGNNATAITPAGSOGNFOLNVPRPNVINNLASISKLAGMESTNKHCAVG         PGSSIMPGKVNPTQVEALPMVVVVFVGNQAVAFAGSOGNFOLNVFKPVMVPAALESIKLGDAVASPQILAGG         MtFH       PGSSIMPGKVNPVLPENVTQVAAQVIGNDAAIAWGGANGAFELNVTIPMMARNILESFKLLTNVSRLFAQRCIAGI         MtFH       PGSSIMPGKVNPVLPENVTQVAAQVIGNDAAIAWGGANGAFELNVTIPMMARNILESFKLLTNVSRLFAQRCIAGI         413       N5       al4       al5       al6       al7       n6         450       460       470       480       490       500       510         HsFH       RINKLMNESLMLVTALNPHTGYDKAKKAKIAKTAHKKGILLKESALELTV       TAEQFDEWVKPKDMLGPK       500       510         HsFH       RINLELTKSLMLVTALNPHTGYDKAKNAHKKOILKKGILKESALELCV       TAEGFDEWVVPEMLGPK       TAEGFDEWVVPEMLGPK         ScFH       RINLLTKSLMLVTALNPHTGYDKAKNAHKGILKKGILKESALKELLLV       TEKEF	HsFH ScFH RbFH FumC TaFH MtFH	TT 2002 290 LNTRIGFAEKU LNTKPGFDVKJ INSKIGFDIKE LNTHPEYARKU LNAHPRFGELU LNAPDDFGVRU	08 000000 AAKVAA AEQISX AEKVAE ADELAV ARYLAE VVAVLVA	QQ Q Q LITCL.PFV ETCL.KFQ FTKQ.PFV FTKQ.PFV ETCL.PFR QTGLSELR	α9 310 320 TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEALAAHD TAPNKEALAAHD TANSEALAAHD	OQOOLOOLOOLOO 330 IVELSGAMNT IVECSGALNT IVECSGALNT IVEASGALRT IVEASGALRT IVEASGALRT	di0 COLOCOCOCOCO ACSIMITAND ACSIMITAND AVSIMITAND ASIMITAND ASIMITAND ASIMITAND ACSIMITANDA ACSIMITANDA	350 IRPLCSGPRSGI IRVLGSGPRCGI VRVLASGPRCGI VRVLASGPRCGI IRWIASGPYGGI IRWMGSGPLTGI	β7 360 CELIIPENE HEIMIPENE GELHIPENE GEIFIPENE GEIFIPANE AZIQIPDLO
HaFH PGSSIMPGKVNPTQCEALTHVAAQUMGNEVAVIVGGSNCHFELNVFRPMIARNUHBARLISDASVSPTENCVVGIQAN RbFH PGSSIMPGKVNPTQVEALTMVCSQVMGNAAITFAGSOGOFELNVFRPVMIANLINGIELIDASXSRVHCVEGIKAN RbFH PGSSIMPGKVNPTQVEALTMVCSQVMGNAVITFAGSOGOFELNVFRPVMIANLINGIELIDASVSPTHCVKGLEPN PGSSIMPGKVNPTQVEALTMVCSQVMGNAVATAGSOGNGELNVFRPMVIANLGSIELIDASVSPTHCVKGLEPN MTFH PGSSIMPGKVNPTQVEALTMVCVFQNQAVAFAGSOGNFOLNVFRPMVIANLESIKLLGDAVASFDOHLAQIEPN MtFH PGSSIMPGKVNPVLPEAVTQVAAQUIGNDAAIAWGGANGAFELNVYIPMMARNILESFKLLTNVSRLFAQRCIAGLTAN * * *	HaFH       PGSSIMPGKVNPTOCEARTHVAAQUNGNHAAVIVGGSNGHFELNVFEBMMIKNVHHAARTLGDASVSPTENCVVG         RbFH       PGSSIMPGKVNPTOVEALTMVCSQVMGNNAAITFAGSQCGFELNVFEPVMIANLJNSIRLITDAAYSFRUHCVKGI         RbFH       PGSSIMPGKVNPTQVEALTMVCSQVMGNNAAITFAGSQCGFELNVFEPVMIANLJNSIRLITDAAYSFRUHCVKGI         RbFH       PGSSIMPGKVNPTQVEALTMVCSQVMGNNAVTFAGSQCFELNVFEPVMIANLJNSIRLITDAAYSFRUHCVKGI         RbFH       PGSSIMPGKVNPTQVEALTMVCSQVMGNNAVFAGSQCFELNVFEPVMIANLSINSIRLITDAAYSFRUHCVKGI         MtFH       PGSSIMPGKVNPTQEALTNLCCQVMGNDVAINNGGASQNFELNVPRPNVIHNPLQSVRLLADGMESPNK4CAVGI         MtFH       PGSSIMPGKVNPVLPENVTRVFGDQAVAFAGSQCANCAFELNVFIPMVDAALESIKLLCDAVASFDQILAQGI         MtFH       PGSSIMPGKVNPVLPENVTQVAQUGNDAAIANGGANGAFELNVFIPMVDAALESIKLLCDAVASFDQILAQGI         MtFH       PGSSIMPGKVNPVLPENVTQVAQUGNDAAIANGGANGAFELNVFIPMVNARNILESFKLLTNVSRLEAQRCIAGI         MtFH       PGSSIMPGKVNPVLPENVTQVAQUGNDAAIANGGANGAFELNVFIPMVNTIPMMARNILESFKLLTNVSRLEAQRCIAGI         MtFH       PGSSIMPGKVNPVLPENVTQVAAQVIGNDAAIANGGANGAFELNVFIPMVNTIPMMARNILESFKLLTNVSRLEAQRCIAGI         MtFH       PGSSIMPGKVNPVLPENVTQVAAQVIGNDAAIANGGANGAFELNVFIDMMARNILESFKLLTNVSRLEAQRCIAGI         Addatag       0400000000000000000000000000000000000	HsFH HsFH ScFH RbFH FumC TaFH MtFH HsFH	TT 2002 290 INTRICFAEKU INTKPGFDVKJ INSKIGFDIKE INTHPEYARKU INAHPRFGELU INAHPRFGELU	08 2000000 AAKVAA AEQISK AELAV ARYLAE VAVLVA 20000	ο ο LTCL.PFV ETGL.KFQ FTKQ.PFV ETGL.PFR TTCA.PFV ETGL.PFR OTGLSELR α11 αcoccccc	α9 310 320 TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAATCA VAENREALAAHD TANSFEALAAHD TANSFEALAAHD TANSFEALAAHD	TT 200	α10       α c s L M KT AND       A c s L M KT AND       A c s L M KT AND       A S L M KT AND	2002 IRPLCSGPRSGI IRVLSSGPRCGI VRVLASGPRCGI VRVLASGPRCGI IRWMSSGPLTGI 200020020020	$\begin{array}{c} \beta 7 \\ 3 6 0 \\ \hline \\ 1 \\ \hline \\ 3 6 0 \\ \hline \\ 1 \\ \hline \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1$
RbFH       PGSSIMPGKVNPTOVEALTÁVCSŐVÉGN EVTVTIAGSNGHLELNVPRPVIIVNILŐSTELLSDSVNSPVTHCVÁČLEN PGSSIMPGKVNPTOCEALTALCOVAGNUVAINNGGASGNPELNVPRPMUHENFTŐSVRILAGGNESFNKHCAVGIEN MEFH         PGSSIMPGKVNPTOVEALPHVVVRVPGNQAVAPAGSÓRPLENVPRPMUHENFTŐSVRILAGGNESFNKHCAVGIEN MEFH         PGSSIMPGKVNPVLPEN VIQVAAQVIGNDAAIAWGGANGAFELNVYIPMMARNILESFKLLTNVSRLPAGRCIAGLTAN * * *         MAFH         A13       15       al6       al7       16         HaFH       20000000       200000000       20000000       2000000       510	RbFH       PGSSIMPGKVNPTQVEALTHVCSQVMCNEVTVTIACSNCHLELNVPRPVTIYNIJOSIELLSDSVNSVTHOVKCI         FumC       PGSSIMPGKVNPTQCEALTHVCSQVMCNEVTVTIACSNCHLELNVPRPVTHNPLQSVRLLADGMESTNKACAVGI         PGSSIMPGKVNPTQVEALPMVVVPVPGNQAVAPAGSCGANCAPENVPRPVTHNPLQSVRLLADGMESTNKACAVGI         MtFH       PGSSIMPGKVNPTVLPEAVTQVAAQVIGNDAAIANGGANGAFELNVYIPMMARNILESFKLLSDAVASPQUTLAGGI         MtFH       PGSSIMPGKVNPVLPEAVTQVAAQVIGNDAAIANGGANGAFELNVYIPMMARNILESFKLLSDAVASPQUTLAGGI         MtFH       PGSSIMPGKVNPVLPEAVTQVAAQVIGNDAAIANGGANGAFELNVYIPMMARNILESFKLLTNVSRLFAQRCIAGI         # * *       *         MtFH       PGSSIMPGKVNPVLPEAVTQVAAQVIGNDAAIANGGANGAFELNVYIPMMARNILESFKLLTNVSRLFAQRCIAGI         # * *       *         # sFH       PGSSIMPGKVNPVLPEAVTQVAAQVIGNDAAIANGGANGAFELNVYIPMMARNILESFKLLTNVSRLFAQRCIAGI         # sFH       PGSSIMPGKVNPVLPEAVTQVAAQVIGNDAAIANGGANGAFELNVYIPMMARNILESFKLLTNVSRLFAQRCIAGI         # sFH       PGSSIMPGKVNPVLPEAVTQVAAQVIGNDAAIANGGANGAFELNVYIPMMARNILESFKLLTNVSRLFAQRCIAGI         # sFH       PGSSIMPGKVNPVLPEAVTQVAAQVIGNDAAFENGGAFERAGE         # sFH       PGNAAFENT         # sFH       PGNAAFENT         # sFH       PINKLMNESLMLVTAENPHIGYDKAAKIAKKATAHKKGILKETAIELGY       TAEGFDEWVKPKDMLGPK         # sFH       RINKLMNESLMLVTAENPHIGYDKAAKNAKKAKIAKEGILLKESALELCV       TAEGFDEWVVPEHMLGPK         # sFH       RINKLMNESLMLVTAENPKIGYDAASKAKNAKKAKIAKEGILLKESALELCV	HsFH HsFH ScFH RbFH FumC TaFH MtFH HsFH	TT 2003 290 INTRICFAEKI INTRIGFDIKE INTREGEDIKE INTHPEYARE INTHPEYARE INAPDDFGVRV	08 0000000 AAKVAA AEQISK AAEQISK AAELAV ARYLAE VAVLVA 20000 38	ο ο LTCL.PFV ETGL.KFQ FTKQ.PFV ETGL.PFR ETGL.PFR OTGLSELR α11 20000000	α9           310         32           TAPNKEEALAAHD         32           TAPNKEALAAHD         32           TAPNKEALAAHD         32           TAPNKEALAAHD         33           TAPNKEALAAHD         33           TAPNKEALAAHD         34	TT 2001 TT 2001	α10       α c s L M KT AND       A s L M KT	2002 IRPLCSGPRSGI IRVLSSGPRCGI VRVLSSGPRCGI VRVLSSGPRCGI IRWSGPZGI IRWMSSGPLTGI 20020020020 430	$\begin{array}{c} \beta 7 \\ 3 6 0 \\ \hline \\ H 2 I M 1 P E N E \\ H 2 I M 1 P E N E \\ G 2 I H 1 P E N E \\ G 2 I F 1 P E N E \\ G$
$ \begin{array}{c} Func \\ FGSSIMPGKVNPTOCEALTHLCCOVMENDVAINMGGASENFELNVFRPMVIHNFF0SVRELADGMESENKECAVCIEPN \\ FaFH \\ PGSSIMPGKVNPTOVEALPNVVVVVPGNDQAVAFAGSOGNFOLNVYKPVMVDAALESIKELGDAVASFDOHLAQGIEPN \\ \hline                                  $	Func         PGSSIMPGKVNPTOCEALTNLCCQVMGNDVAINMGGASGNEPENVPEREVIENTOSVRELADGMESENKECAVG1           TaFH         PGSSIMPGKVNPTQVEALPNVVVFGDQQAVAFAGSGGFLNVVFREMVIENALESIKLLGDAVASEDGULAGG           MtFH         PGSSIMPGKVNPVLPEA         VTQVAAQVIGDQAAFAGSGGANGAFELNVVIENMARNILESFKULTNVSRLAQGTAGTAGT           ###         #         #         #           #afH         PGSSIMPGKVNPVLPEA         VTQVAAQVIGDDAAIANGGANGAFELNVVIENMARNILESFKULTNVSRLAQGTAGTAGT           ###         #         #         #           #afH         PGSSIMPGKVNPVLPEA         VTQVAAQVIGDDAAIANGGANGAFELNVVIENMARNILESFKULTNVSRLAQGTAGTAGT           #afH         PGSSIMPGKVNPVLPEA         VTQVAAQVIGDAATANGGANGAFELNVVIENMARNILESFKULTNVSRLAQGTAGTAGT           #afH         PGSSIMPGKVNPVLPEA         VTQVAAQVIGDAATANGGANGAFELNVVIENMARNILESFKULTNVSRLAQGTAGTAGT           #aff         PGSSIMPGKVNPVLPEA         VTQVAAQVIGDAATANGATANGATATANGGANGAFELNVVIENMARNILESFKULTNVSRLAQGTAGT           #aff         PGSSIMPGKVNPVLPEA         PGSSIMPGKVNPVLPEA           #aff         PGSSIMPGKVNPVLPEA         PGSSIMPGKVNPVLPEA <th>HsFH ScFH RbFH FumC TaFH MtFH HsFH HsFH</th> <th>TT 2003 290 INTRIGFAEKI INTRIGFDVKJ INSKIGFDIKE INTHPEYARKI INAHPFGELU INAHPFGELU INAHPGGEKVN 9GSSIMPGKVN</th> <th>08 000000 30 /AAKVAA AEQUSK /AEKVAE /AE</th> <th>β Q Q LTCL.PFV ETGL.KFQ FTKQ.PFK ETGL.PFR CTGLSELR α11 QCQQQQQ Q MINVAAQUV</th> <th>α9           210200         320           TAPNKERALAAHD         TAPNKERALAAHD           TAPNKERALAAHD         TAPNKERAHD           TAPNKERAHD         TAPNKERAHD           TAPNKERAHD         TAPNKERAHD           TAPNKERAHD         TAPNKERAHD           TAPNKERAHD         TAPNKERAHD           TA</th> <th>TT 2021 HFELNVFK</th> <th>α10       α α α α α       α α α  &lt;</th> <th>2002 IRFLCSGPRSGI IRYLGSGPRCGY IRLLSSGPRCGY IRLLSSGPRCGI IRWIASGPYGGI IRWIGSGPLTGI 2000000000000 430 LSDASVSFTENC</th> <th><math>\beta</math>7 360 HEIMIPENE <math>HEIMIPENE <math>GEIFIPENE <math>GEIFIPENE <math>GEIFIPENE <math>AEIQIPDLO <math>\eta</math>4 <math>\delta</math>8 440 VVGIQANTE <math>VVGIQANTE</math></math></math></math></math></math></th>	HsFH ScFH RbFH FumC TaFH MtFH HsFH HsFH	TT 2003 290 INTRIGFAEKI INTRIGFDVKJ INSKIGFDIKE INTHPEYARKI INAHPFGELU INAHPFGELU INAHPGGEKVN 9GSSIMPGKVN	08 000000 30 /AAKVAA AEQUSK /AEKVAE /AE	β Q Q LTCL.PFV ETGL.KFQ FTKQ.PFK ETGL.PFR CTGLSELR α11 QCQQQQQ Q MINVAAQUV	α9           210200         320           TAPNKERALAAHD         TAPNKERALAAHD           TAPNKERALAAHD         TAPNKERAHD           TAPNKERAHD         TAPNKERAHD           TAPNKERAHD         TAPNKERAHD           TAPNKERAHD         TAPNKERAHD           TAPNKERAHD         TAPNKERAHD           TA	TT 2021 HFELNVFK	α10       α α α α α       α α α  <	2002 IRFLCSGPRSGI IRYLGSGPRCGY IRLLSSGPRCGY IRLLSSGPRCGI IRWIASGPYGGI IRWIGSGPLTGI 2000000000000 430 LSDASVSFTENC	$\beta$ 7 360 HEIMIPENE $HEIMIPENE GEIFIPENE GEIFIPENE GEIFIPENE AEIQIPDLO\eta4\delta8440VVGIQANTE VVGIQANTE$
$\begin{array}{c} \mathbf{M} \mathbf{H} \mathbf{F} \mathbf{H} & \mathbf{P} \mathbf{G} \mathbf{S} \mathbf{S} \mathbf{I} \mathbf{N} \mathbf{P} \mathbf{G} \mathbf{V} \mathbf{N} \mathbf{V} \mathbf{I} \mathbf{P} \mathbf{A} \mathbf{A} \mathbf{O} \mathbf{V} \mathbf{I} \mathbf{G} \mathbf{V} \mathbf{A} \mathbf{O} \mathbf{O} \mathbf{O} \mathbf{O} \mathbf{O} \mathbf{O} \mathbf{O} O$	MtFH         PGSSINPGKVNPVLDEAVIQVAAQVIGNDAAIANGGANGAFELNVEIEMMARNILESFRILTNVSRLAQRCIAGI           # * *           HaFH         QQQQQQQQ         QQQQQQQQ         QQQQQQQQ         QQQQQQQQ         QQQQQQQ         QQQ         QQQ         QQQ         QQQ         QQQ         QQQ         QQ         QQ <th>HsFH ScFH RbFH FumC TaFH MtFH HsFH HsFH ScFH RbFH</th> <th>TT 2000 290 INTRIGFAEKU INTRIGFAEKU INSKIGFDIKE INTHPEYARKU INAHPEYARKU INAHPEYARKU INAHPEGEKU PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN</th> <th>038 30 30 30 30 30 30 30 30 30 30</th> <th>A QQ QQ Q LTGL.PFV ETGL.FFV ETGL.PFV ETGL.PFV ETGL.PFV CTGLSELR Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q</th> <th>α9 310 320 TAPNKE BALAAHDA TAPNKE BA</th> <th>TT 2001 HFELNVFKPW</th> <th>410 20000000000000 ACSIFKIAOD ACSIFKIAOD ASIMKIAND ACAIMAND ACAIMAND AC</th> <th>2002 IRPLCSGPRSGI IRPLCSGPRCGY IRPLSGPRCGY VRWLASGPRCGI IRWMGSGPLTGI 200020020020020 430 LSDASVSFTENC ITDAAYSFVHC LSDASVSFVHC</th> <th><math display="block">\begin{array}{c} \beta 7\\ 3 6 0\\ C \\ </math></th>	HsFH ScFH RbFH FumC TaFH MtFH HsFH HsFH ScFH RbFH	TT 2000 290 INTRIGFAEKU INTRIGFAEKU INSKIGFDIKE INTHPEYARKU INAHPEYARKU INAHPEYARKU INAHPEGEKU PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN	038 30 30 30 30 30 30 30 30 30 30	A QQ QQ Q LTGL.PFV ETGL.FFV ETGL.PFV ETGL.PFV ETGL.PFV CTGLSELR Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	α9 310 320 TAPNKE BALAAHDA TAPNKE BA	TT 2001 HFELNVFKPW	410 20000000000000 ACSIFKIAOD ACSIFKIAOD ASIMKIAND ACAIMAND ACAIMAND AC	2002 IRPLCSGPRSGI IRPLCSGPRCGY IRPLSGPRCGY VRWLASGPRCGI IRWMGSGPLTGI 200020020020020 430 LSDASVSFTENC ITDAAYSFVHC LSDASVSFVHC	$\begin{array}{c} \beta 7\\ 3 6 0\\ C \\ $
* * *     α13     η5     α14     α15     α16     α17     η6       HaFH     0.0000000     0.000000000000     0.00000000000000000000000000000000000		HsFH ScFH RbFH FumC TaFH MtFH HsFH ScFH RbFH ScFH FumC	TT 2000 290 INTRIGFAEM INTRIGFAEM INSKIGFDIKI INSKIGFDIKI INAHPRFGELV INAHPRFGELV INAHPRFGELV INAPDDFGVRV PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN	028 020000 30 (AAKVAA AEQISK (ADELAV (APVLAE (VAVLVA 20020 38 PTQCEA PTQCEA PTQCEA PTQCEA	βά 9 LTGL.PFV BTGL.FFV BTGL.FFV BTGL.PFR CGGLSELR 0 0 MTHVAAQU LTQVCVQV LTMVCSQV LTMVCSQV LTMVCSQV	α9 310 310 310 310 320 310 320 320 320 320 320 320 320 32	TT QQQ HFELNVFKPW HFELNVFKPW HLELNVFKPW	α10           2000000000000000000           340           ACSIFXIAND           ACSIFXIAND           ASIMXIAND           COCCOCCOCCOCC           420           IINNINSIRI           IINNINSIRI           IINNINSIRI           IINNINSIRI           IINNINSIRI           IINNINSIRI           IINNINSIRI           IINNINSIRI	2002 350 IRPLCSGPRSGI IRVLSGPRCGI VRWLASGPRCGI VRWLASGPRCGI IRWMSGPLTGI 20020020020020 430 LGDASVSFTENC ITDAAYSFKHO LSDSVNSFVTG LADGMESFNKHO	$\beta7$ 360 CELIIPENE $ELIIPENE CEISIPENE CEISIPENE CEISIPENECEISIPENE AEIQIPDIO1000000000000000000000000000000000000$
α13 η5 α14 α15 α16 α17 η6 HaFH 20020000 202202000 200000000000000000	αl3         η5         αl4         αl5         αl6         αl7         η6           HaFH         00000000         00000000         00000000         00000000         00000000         0000000         0000000         0000000         0000000         0000000         00000000         000000000000000000000000000000000000	HsFH ScFH RbFH MtFH HsFH ScFH FumC TaFH FumC TaFH FumC TaFH	TT 2002 290 INTRIGFAEM INTKPGFDVKJ INSKIGFDIKE INTHPEYARN INAHPRFGELV INAHPRFGELV INAHPDFGVRV PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN	a8 AAKVAA AEQISK AEKVAE AEKVAE AEKVAE ARVLAE VAVLVA SOOGO 36 PTOCEA IPTOCEA IPTOCEA IPTOCEA IPTOCEA IPTOCEA	AC Q Q Q LTCL.PFV ETCL.FFV ETCL.FFV ETCL.PFV ETCL.PFV ETCL.PFV CTGLSELR A11 ACQACACO Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	α9 310 310 310 320 TAPNKEEALAAHDA TANNEEALAAHDA TAN	TT QQQI HFELNVFKPM CFELNVFKPM HFELNVFKPM NFQLNVFKPM	α10           200000000000000           340           ACSIFKIAND           ACSIFKIAND           ASIMKIAND           ASIMINIA	3000 IRPLCSGPRSGI IRPLCSGPRCGY IRLLSGPRCGI VWLASGPRCGI IRLASGPYGGI IRWMSGPLTGI 2000000000000 430 LSDAVSFTENC LSDAVSFTENC LSDAVSFVHC LSDAVASFDQHI LTNVSRUPACK	$\beta7$ 360 C = L I I P E N E H = LMI P E N E G = I S I P E N E G = I S I P E N E C = I S I P E N E C = I S I P E N E C = I S I P E N E A = I Q I P D L Q A = Q Q 440 V = C I C A N T E V = C I C A N T E
α13 η5 α14 α15 α16 α17 η6 HaFH 20020202 20220202 20200202020 20202020	αl3         η5         αl4         αl5         αl6         αl7         η6           HaFH         20202020         510         510         510         556<	HSFH ScFH RbFH FumC TaFH MtFH HsFH ScFH RbFH RbFH MtFH	TT 2002 290 INTRIGFAEKU INTKPGFDVKJ INSKIGFDIKE INTHPEYARKU INAHPRFGELU INAHPRFGELU INAPDDFGVRU PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN	α8 30 30 30 (AAKVAA AEQISK AEKVAE AEVIAE VAVLVA 38 PTQCEA PTQCEA PTQCEA PTQVEA PTQVEA PVLVEA	βά 9 LTGL.PFV ETGL.KFQ FTXQ.PFK ITCA.PFV ETGL.PFR 0 GG020200 9 MINVAAOV LTAVCSOV LTAVCSOV LTAVCSOV LTAVCSOV LTAVCSOV VIQVAAOV	α9 310 310 320 TAPNKEEALAAHDA TAPNKEEALAAHDA TAPNKEEALAAHDA TAPNKEEALAAHDA TAPNKEEALAAHDA TAPNKEEALAAHDA VAENKEALAAHDA 000000000000000000000000000000000000	000000000000000000000000000000000000	α10         α C S IM XT AND         Δ C S IF XT AND         Δ A S IM XT AND         Δ Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	2000 IRPLCSGPRSGI IRPLCSGPRCGI VRVLASGPRCGI VRVLASGPRCGI TRWLASGPRCGI TRWLASGPRCGI IRWMSGPLTGI 2000000000000 430 LGDASVSFTENG LSDSVNSFVHC	β7 360 CELIIPENE GELSIPENE GEISIPENE GEISIPENE CEISIPENE CEISIPENE CEISIPENE CEISIPENE CEISIPENE CEISIPENE CEISIPENE ACCIEPENE ACCIEPENE ACCIEPENE ACCIEPENE ACCIEPENE
HaFH 222220220 202202202 202202202 202202202	HaFH         20220202         020202020         020202020         020202020         02020202	HSFH ScfH RbFH FumC TaFH MtFH HsFH ScfH RbFH RbFH TaFH MtFH	TT 2002 290 INTRIGFAEKI INTRIGFAEKI INTRIGFOIKI INSKIGFOIKI INAHPRESELU INAHPRESELU INAHPRESELU INAHPRESELU INAHPRESELU INAPDJESVRU PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN	a8 ACCOST AAKVAA AEQISK AEKVAE VADELAV ARVLAE VAVLVA SCOCO 38 PTOCEA IPTOVEA IPTOVEA IPTOVEA IPTOVEA IPTOVEA IPTOVEA	βά 9 LTGL.PFV ETGL.KFQ FTXQ.PFK ETGL.PFR 0 GGSSELR 0 MINVAAOV LTAVCSOV LTAVCSOV LTMLCCOV LTMLCCOV LTMLCCOV VTQVAAOV	α9 310 310 310 320 TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA 32002002002020 400 MGNHVAVTVGGSM MGNHVAVTVGGSM GNNAAITFAGSQ MGNHVAVTVGGSM GNDAAIAWGGAM	TT QQQQQQQQQQQQQ IVELSGAMNT IVELSGAMNT IVESGALNT IVQAHGALKGI IVVAHGALKT IVVAHGALKT IVVAHGALKT IVVAHGALKT IVVEASGALRT IVESGAMNT QFELNVFKPW NFQLNVFKPW NFQLNVFKPW AFELNVFKPW	alo acsimistian	2002 IRPLCSGPRSGI IRVLGSGPRCGI VRWLASGPRCGI VRWLASGPRCGI TRWLASGPYGGI IRWMSGPLTGI 200200200200 200200200200 200200200200 200200200200 200200200200 200200200200 200200200200 200200200200 200200200200 200200200200 20020020000 20020020000 2002000 2002000 200200 200200 2002000 2002000 2002000 2002000 200200000000	β7 360 CELIIPENE GELHIPENE GELHIPENE CEIFTPANE AEIQIPDLO η4 440 VVGIQANTE VVGIQANTE VVGIQANTE VVGIANTE AUGIEPNRE AVGIEPNRE AQGIEPNRE AQGIEPNRE
450 460 470 480 490 500 510	450         460         470         480         490         500         510           HsFH         RINKLMNESLMLVTALNPHIGYDKAKIAKTAHKNGSLLKETAIELGY         LTAEOFDEWVKPKOMLGPK         LTAEOFDEWVKPKOMLGPK           ScFH         RINELITKSLMLVTALNPKIGYDAASKVAKNAHKKCITLKESALELCV         LTEKEFDEWVVPEHMLGPK           RbFH         RINDLRDKSLMLVTALNPKIGYDAASKVAKNAHKKCITLKESALELCV         LTEKEFDEWVVPEHMLGPK           RbFH         RINDLRDKSLMLVTALNPKIGYDAASKVAKNAHKEGITLKEAAKKLNL         LSEESFDKIVVPEHMLGPC	HsFH HsFH RbFH FumC TaFH MtFH HsFH ScFH RbFH RbFH RbFH MtFH	TT 2003 290 INTRIGFAEKI INTKPGFDVKI INSKIGFDIKE INTHPEYARKI INAHPFGELVI INAHPFGELVI PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN K	a8 AAKVAA AEQISK AEKVAE VADELAV ARYLAE VAVLVA 22000 38 PTOCEA PTOCEA IPTOVEA IPTOVEA IPTOVEA IPTOVEA IPTOVEA	βά QQ Q LTCL.PFV ETCL.YFV FTXQ.PFK ETCL.PFR CTGLSELR (11 2022022 C C C C C C C C C C C C C	α9 310 310 320 TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA TAPNKFEALAAHDA 400 400 400 400 400 400 400 40	TT 200 HFELNVFKPV OFELNVFKPV AFELNVYKPV AFELNVYKPV AFELNVYKPV	c10 c c s m k t and a c s m k t a c m t a n b m s t m s t m s t m t a n b m s t	2002 IRPLCSGPRSGI IRVLGSGPRCGI IRVLGSGPRCGI VRWLASGPRCGI IRWLASGPRCGI IRWMGSGPLTGI 20020020020 430 LGDAVSFTENC IDAAYSFRVHC LSDSVNSFVHC LSDSVNSFVHC LGDAVASFDOHI LTNVSRLEAQRC	β7 360 CELIIPENE HELMIPENE GELHIPENE CEIFIPENE CEIFIPENE CEIFIPENE AZIQIPDIC η4 88 440 202 400 202 400 400
	HSFH RINKLMNESLMLVTAENVHEGYDKÄAKIAKTÄHENGSTLKETAIELGYTTAEQFDEWVKPKDMLGPK ScFH RINELITKSLMLVTAENVHKIGYDAASKVAKNANKKGITLKESALELCVLTEKEFDEWVVPENMLGPK RDFH RINDLEDKSLMLVTAENVHIGYDAASKVAKNAKEAHKEGITLKEAAKKINLLSEESFDKIVVPEKMVGQS	HSFH HSFH RbFH FumC HSFH HSFH HSFH ScFH RbFH FumC TaFH MtFH HSFH	TT 2003 299 INTRIGFAEKI INTRIGFAEKI INTRIGFDIKI INTHPEYARKI INAHPFGELVI INAHPFGELVI PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN PGSSIMPGKVN γGSSIMPGKVN γGSSIMPGKVN γGSSIMPGKVN	α8 200000 30 AAKVAA AEQISK ADELAV ARYLAE VAVLVA 20000 38 PTOCEA PTOCEA PTOVEA PTOVEA PTOVEA PTOVEA PTOVEA PTOVEA	βά QQ Q LTCL.PFV ETCL.YFQ FTXQ.PFK ETCL.PFR CTGLSELR α11 ααααααα Q MTNVAACV LTVVCVVV LTMLCCVV LTMLCCVV LTMLCCVV ALA ACCACCO CO CO CO CO CO CO CO CO CO	α9 310 310 320 TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD TAPNKEEALAAHD 400 400 400 400 400 400 400 40	COOCCOCCO COOCCOCCOCCO COCCCCCCCCCCCC	α10         2020000000000000000000000000000000000	2202 IRPLCSGPRSGI IRVLGSGPRCGI IRVLSGPRCGI VRWLASGPRCGI TRWLASGPYGGI IRWMGSGPLTGI 200200200200 430 LGDASVSFTENC LSDASVSFTENC LSDSVNSFVTC LSDSVNSFVTC LSDAVSFD0HI LTNVSRLFAQRC 96 2 200	β7 360 CELIIPENE GELLIPENE GELLIPENE GEISIPENE G
HSFH RINKLMNESLMLVWAINPHICYDKMAKIAKITHKNGSTLKETAIELGYHTAECFPEWVKPKOMLGPK	ROFH RINDLRDRSIMLY ALMOHICY ON ARKIAKEAHKHGITLKEAAKKINL. SEESFIKIVVPEKMVGQS	HSFH HSFH RbFH FumC TaFH MtFH HSFH RbFH ScFH RbFH MtFH MtFH	TT         2000/ 290           INTRIGFARM           INTRIGFARM           INTRIGFARM           INTRIGFORM           INTRIGFORM           INTRIGFORM           INTRIGFORM           STO           PGSSIMPGKVN           PGSSIMPGKVN           PGSSIMPGKVN           PGSSIMPGKVN           PGSSIMPGKVN           PGSSIMPGKVN           PGSSIMPGKVN           A13           A13           A50	α8 30 30 30 30 30 30 30 30 30 30	ACCOLOR OF A COLOR OF	α9           310         320           TAPNKEEALAAHD         300           YAENREAALAAHD         400           GOOGOOGOOGOO         400           MGNHVAVTVGESNG         400           MGNHVAVTVGESNG         400           MGNHVAVTVTIAGSNG         400           MGNHVAVTVTIAGSNG         400           MGNHVAVTVGESNG         400           MGNHVAVTVGESNG         400           MGNHVAVTVGESNG         400           MGNHVAVTVGESNG         400           MGNHVAVTVGESNG         400           MGNHVAVTVGANAGSNG         400           MGNHVAVTVTAAGSNG         400           MGNAAIAAHGANG         400           MGNAAIAAHGANG         400           MGNAAIAAHGANG         400           MGNAAIAAHGANG         400           MGNAAIAAHGANG         400           MGNAAIAAHGANG         400	CQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ	α10         2020000000000000000000000000000000000	2002 IRPLCSGPRSGI IRVLGSGPRCGI IRVLSGPRCGI VRWLASGPRCGI IRWASGPLTGI 20020000000000 430 LGDASVSFTENC LSDASVSFTENC LSDASVSFVHC LSDAVASFD0HI LTNVSRLFAQRO 9 200 10 10 10 10 10 10 10 10 10	β7 360 CELIIPENE GELLIPENE GELLIPENE GEISIPENE G
ROFH RINDLRDRSIMIVERING HIGY DNARIAKEAHKEGITIKEAAKKINL. SEESFEKIVVPEKMVGQS.		HSFH HSFH RbFH FumC TaFH MtFH HSFH RbFH RbFH RbFH MtFH HSFH HSFH HSFH	TT         2000/ 290           1NTRIGFAEKI           INTRIGFAEKI           INTRIGFAEKI           INTRIGFAEKI           INTRIGFAEKI           INTRIGFAEKI           INTHPEYARN           INAHPEYARN           PCSSIMPCKVN           PCSSIMPCKVN	028 30 30 30 30 30 30 30 30 30 30	ACCORDENSION OF A CONTRACT ON A CONTRACT OF	α9 310 310 310 310 310 310 320 320 320 320 320 320 320 32	TT QQQ HVELSGAMNT IVECSCALNT IVECSCALNT IVECSCALNT IVECSCALNT IVEASCALRT IVEA	α10         2000000000000000000000000000000000000	2002 350 IRPLCSGPRSGI IRPLCSGPRCGY IRPLSGPRCGY VRWLASGPRCGI VRWLASGPRCGI IRVLSGPRCGI IRVLSGPRCGI IRVLSGPRCGI IRVSGPLTCI 20020020020020 430 LGDASVSFTENC LSDSVNSFVTIC LGDAVSFVNC LGDAVSFVNC LGDAVSFVNC LGDAVSFVNC 430 510 510 510 510 510 510 510 51	$\begin{array}{c} \beta 7\\ 3 6 0\\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 2 \\ 2 \\ 3 \\ 3 \\ 4 \\ 3 \\ 4 \\ 3 \\ 3 \\ 4 \\ 4 \\ 4$
FUNC RINGLINESLMLVTAINTHECTORALEIAKAAHKEGLTLKAAALALGYISEASEDSWVRPEOMVGSMKAGR	FunC RINGLINESEMEVMAINTHTGYDKAABIAKKAHKEGLTEKAAALALGYMSEASEDSWVRPEOMVGSMKAGR.	HSFH RSFH RDFH FUMC TaFH MtFH HSFH SCFH RbFH SCFH MtFH HSFH HSFH RDFH RDFH	TT         2000/ 290           INTRIGFALKI           INTRIGFALKI           INTRIGFOKO           INSKIGFOKO           STO           PGSSIMPGKVN           RINKLMNESLA           RINKLMNESLA           RINKLMNESLA           RINKLMNESLA	α8 0 0 0 0 0 0 3 0 (AAKVAA (AEQISK (AEVIAE (AEVIAE (VAVLVA 20000 38 19 TOCEA 19 TOCEA 19 TOCEA 19 TOCEA 19 TOCEA 19 TOCEA 19 TOCEA 19 TOCEA 19 TOCEA 19 TOCEA 10 TOCE	ACCONTINUES OF A CONTINUES OF A CONT	α9           310         320           310         320           TAPNKFEALAHDA         320           TAPNKFEALAHDA         320           TAPNKFEALAHDA         320           TAPNKFEALAHDA         320           TAPNKFEALATCA         320           TAPNKFEALATCA         320           TAPNKFEALATCA         320           TANSFEAQARD         390           MCNHVAVTVGGSNG         400           MCNHVAVTVGGSNG         400           MCNHVATTFAGSOG         400           MCNHVATAGSOG         400           MCNHVATAGSOG         400           MCNHVATAGSOG         400           MCNHVATAGSOG         400           MCNTATA	TT QQQI TT TT TT TT QQQI TT TT	$\alpha 10$ $\alpha 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0$	2002 350 IRPLCSGPRSGI IRPLCSGPRCGY IRPLSGPRCGY VRWLASGPRCGI VRWLASGPRCGI IRLLSGPYGGI IRLSGPYGGI 20020020020020 430 LGDASVSFTENC LGDASVSFTENC LGDASVSFTENC LGDAVASFDOHI LTNVSRLFAORC 0 100 100 100 100 100 100 100	$\begin{array}{c} \beta 7\\ 3 6 0\\ 1 11 P E N 2\\ 1 2 11 P E N 2\\ 1 2 1 1 P E N 2\\ 1 2 1 2 1 2 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 $
TOPA REPERTING AND	THE REPERTING AND A DESCRIPTION AND A DESCRIPTIO	HSFH HSFH RbFH FumC TaFH MtFH HSFH ScFH RbFH FumC TaFH HSFH ScFH RbFH HSFH ScFH RbFH ScFH RbFH	TT         2000/ 290           INTRIGFAEM           INTRIGFAEM           INTRIGFOWN           INSKIGFO           INSKIGFO           INTHPEYARN           INAHDRFGEUN           INAHDRFGEUN           PGSSIMPGKVN           PGSSIMPGKVN           PGSSIMPGKVN           PGSSIMPGKVN           PGSSIMPGKVN           PGSSIMPGKVN           PGSSIMPGKVN           RINKLMNESLN           RINKLMNESLN           RINKLMNESLN           RINKLMNESLN           RINKLENSLN           RINKLENSLN	α8           0000000           30           (AAKVAA           (AEKVAA           (AEVAA	βά           Q         •           L         TGL.PFV           P         TGL.PFV           BTGL.YFV         PFXQ.PFK           ITCA.PFV         RTGL.PFR           QTGLSELR         •	α9           310         320           310         320           TAPNKFEALAHDA         320           TANKFEALAHDA         320           TANKFEALAHDA         320           TANKFEALAHDA         320           GOOGOOGOGOGOGO         400           MGNHVAVTVGGSNG         400           MGNHVAVTVIGSNG         400           MGNHVAVTVIGSNG         400           MGNHVAVIVIGSNG         400           MG	TT QQQQ TVELSGAMNT IVELSGAMNT IVECSGALNT IVECSGALNT IVEASGALRT IVOAHGALKG IVOAHGALK	α10         2000000000000000000000000000000000000	2002 IRPLCSGPRSGI IRPLCSGPRSGI IRPLCSGPRCGI VRWLASGPRCGI VRWLASGPRCGI IRLLSGPYGGI IRLLSGPYGGI IRLSGPRCGI IRLSGPRCGI IRLSGPRCGI IRLSGPRCGI IRLSGPRCGI A30 LGDASVSFIENC LGDASVSFIENC LGDASVSFIENC LGDAVASFDOHI LTNVSRLFAQRO 0 5 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10	β7 360 CELLIPENE GELLMIPENE GELSIPENE GELSIPENE GELSIPENE GELSIPENE ACOMPTON 40 VUCIOANTE VUCIOANT

**Figura 6.** Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos de fumarases de class II: humana (*Hs*FH), *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*FH), *Eschericia coli* (FumC), *Rickettsia buchneri* (*Rb*FH), *Thermus aquaticus* (*Ta*FH) e *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*FH). Em destaque estão as regiões do monômero que compõe o sítio. Região 1 está em vermelho, região 2 em azul e região 3 em roxo. Resíduos catalíticos estão marcados com uma estrela. A caixa verde indica a posição do sítio B.

A deficiência na atividade da *Hs*FH causa uma diminuição na produção de energia devido a interrupção do fluxo de metabólitos pelo ciclo do ácido cítrico [51]. A fumarase humana também é considerada um supressor tumoral e estudos recentes classificam o fumarato como um oncometabólito, ou seja, a presença de

altos níveis de fumarato no organismo é um indicador do desenvolvimento de câncer [52].

### 1.2.2.1 Mutações da enzima fumarase humana

Em 2010, Bayley *et al.* sistematizaram um banco de dados contendo todas as mutações reportadas para o gene da fumarase (EC 4.2.1.2) associadas a casos clínicos (www.lovd.nl/FH). Duzentas e sete variações no gene que codifica a *Hs*FH já foram reportadas. Dentre elas, o tipo mais frequente é a *missense* (50%), seguida de mutações silenciosas (16%), *frameshifts* (11%) e *nonsense* (9%), que resultam em proteínas truncadas e diversas deleções, inserções e duplicações [9]. As mutações *missense* estão distribuídas por todas as regiões da proteína, sendo 23 no D1, 75 no D2 e 6 no D3.

Uma análise das mutações reportadas em pacientes mostra que a maioria esta relacionada com o desenvolvimento de MCUL e HLRCC e que a posição das mutações não tem relação direta com o tipo de enfermidade desenvolvida pelo paciente. As mutações relatadas possivelmente afetam a estabilidade estrutural da proteína e a busca por moléculas que estabilizam esses mutantes pode ser uma estratégia no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento dessas doenças.

Infelizmente, ainda não há tratamento específico para combater os transtornos metabólicos causados pela deficiência de fumarase. Embora FHs de diferentes organismos tenham sido estudadas [21-26, 53-55], uma caracterização cinética detalhada da *Hs*FH ainda não foi reportada.

O estudo detalhado da fumarase humana e seus mutantes, além de possibilitar um melhor entendimento sobre o comportamento da enzima e elucidar o impacto das mutações sobre sua função e estrutura, poderá também fornecer importantes bases estruturais para o desenvolvimento de novas terapias.

Sendo assim, o presente trabalho visa utilizar métodos de biologia estrutural para mapear as características biofísicas, bioquímicas e estruturais da proteína nativa e de mutantes selecionados, de forma a contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares que modulam o desenvolvimento das doenças raras diretamente relacionadas com mutações na fumarase. Neste trabalho, combinamos o uso das técnicas difração de raios X por monocristais, varredura por fluorimetria diferencial, espalhamento dinâmico de luz e cinética enzimática para caracterizar os efeitos de cada mutação na estrutura da proteína, na estabilidade de seu arranjo oligomérico e na sua atividade catalítica.

Foram selecionadas 8 mutações *missense*, ou seja, mutações genéticas que resultam na substituição de um resíduo de aminoácido, reportadas para pacientes com MCUL (N107T, H180R, Q185R, K230R e G282V) [7, 11], HRLCC (S365G e N373D) [56, 57] e Ácidúria Fumárica (E362Q) [7], localizadas ao longo das regiões que compõe o sítio ativo e próximas à ele e que são reportadas mais de uma vez em pacientes [9]. As mutações selecionadas para este estudo estão na figura 7.



Figura 7. Representação em cartoon do monômero da *Hs*FH. Em rosa estão destacadas as localizações dos resíduos mutantes escolhidos para esse trabalho

### CONCLUSÕES

### 5. CONCLUSÕES

Fumarato hidratases ou fumarases (FH) catalisa a reação estereoespecífica de hidratação/desidratação do fumarato em L-malato e podem ser encontradas nas formas mitocondrial e citosólica. A enzima mitocondrial participa do Ciclo do ácido cítrico (Ciclo do ácido tricarboxílico – TCA ou Ciclo de Krebs) convertendo fumarato em L-malato na sétima etapa do ciclo, já a forma citosólica participa no metabolismo de aminoácidos e quando migra para o núcleo pode atuar no reparo ao dano ao DNA. A fumarase humana também atua como supressor tumoral e mutações nessa enzima estão relacionadas com casos de MCUL e HLRCC.

Diante da importância dessa enzima, nosso estudo centrou-se na completa caracterização da enzima fumarase humana (*Hs*FH) e dos mutantes N107N*Hs*FH, H180R*Hs*FH, Q185R*Hs*FH, K230R*Hs*FH, E362Q*Hs*FH, S365S*Hs*FH e N373D*Hs*FH através da combinação de técnicas bioquímicas e biofísicas.

Pela primeira vez para fumarases foi realizado o experimento de caracterização cinética avaliando a influência dos dois substratos na mesma mistura reacional. Os resultados comprovam a influência do produto formado na velocidade global da reação e permitiram a determinação correta dos parâmetros cinéticos. Os estudos estruturais da enzima nativa confirmam a semelhança estrutural compartilhada entre a fumarase humana e outras fumarases de classe II. Além disso, a presença de moléculas de HEPES na extremidade C-terminal da proteína e sua influência positiva na eficiência catalítica levanta a hipótese da relevância desse sítio para a atividade enzimática. Estudos para investigar essas hipóteses estão em planejamento.

A produção dos mutantes H180R*Hs*FH, Q185R*Hs*FH, K230R*Hs*FH, E362Q*Hs*FH, S365S*Hs*FH e N373D*Hs*FH demonstrou a importância desses resíduos para a atividade catalítica. Somente o mutante N107T*Hs*FH manteve a atividade com valores de velocidade e K<sub>m</sub> menores que a nativa.

Os estudos de estabilidade térmica indicaram que as mutações influenciam na ligação de moléculas como citrato de sódio e ácido succínico e os resultados são consistentes com a ideia de que as mutações estudadas interferem na acomodação dos substratos. No entanto, os estudos estruturais

dos mutantes demostram, que apesar das mutações influenciarem na atividade enzimática, não afetam a formação do tetrâmero.

O entendimento do funcionamento da enzima humana permite estudos seletivos envolvendo fumarases de organismos patogênicos. A caracterização da enzima fumarase humana e seus mutantes presente nesse trabalho fornece base para o desenvolvimento de novos estudos envolvendo as doenças relacionadas à essas mutações.

•

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Donaldson L. On the State of the Public Health: Annual Report of the Chief Medical Officer 2009. In: Health Do, editor. UK2009.

2. de Vrueh R, Baekelandt, E.R.F., de Haan J.M.H. Priority Medicines for Europe and the World Update Report: Background Paper 6.19 - Rare Diseases. Switzerland: Wolrd Health Organization; 2013.

3. R. de Vrueh PD, E.R.F.Baekelandt, J.M.H. de Haan. Background paper 6.19 rare diseases: update on 2004 background paper written by S. van Weely and H.G.M. Leufken. 2013.

4. Rodriguez-Monguio R, Spargo T, Seoane-Vazquez E. Ethical imperatives of timely access to orphan drugs: is possible to reconcile economic incentives and patients' health needs? Orphanet journal of rare diseases. 2017;12(1):1. Epub 2017/01/07.

5. National Institutes of Health. Genetic and Rare Disease Information Center. 2008 [07/30/2018]; Available from: https://rarediseases.info.nih.gov/.

6. Giugliani R, Vairo FP, Riegel M, de Souza CF, Schwartz IV, Pena SD. Rare disease landscape in Brazil: report of a successful experience in inborn errors of metabolism. Orphanet journal of rare diseases. 2016;11(1):76. Epub 2016/06/11.

7. Alam NA, Rowan AJ, Wortham NC, Pollard PJ, Mitchell M, Tyrer JP, et al. Genetic and functional analyses of FH mutations in multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis, hereditary leiomyomatosis and renal cancer, and fumarate hydratase deficiency. Hum Mol Genet. 2003;12(11):1241-52. Epub 2003/05/23.

8. Lehtonen HJ. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: update on clinical and molecular characteristics. Familial cancer. 2011;10(2):397-411. Epub 2011/03/16.

9. Bayley JP, Launonen V, Tomlinson IP. The FH mutation database: an online database of fumarate hydratase mutations involved in the MCUL (HLRCC) tumor syndrome and congenital fumarase deficiency. BMC Med Genet. 2008;9:20. Epub 2008/03/28.

10. Alam NA, Barclay E, Rowan AJ, Tyrer JP, Calonje E, Manek S, et al. Clinical features of multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis: an underdiagnosed tumor syndrome. Arch Dermatol. 2005;141(2):199-206. Epub 2005/02/23.

11. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EE, Kelsell D, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. Nat Genet. 2002;30(4):406-10. Epub 2002/02/28.

12. Patel VM, Handler MZ, Schwartz RA, Lambert WC. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome: An update and review. Journal of the American Academy of Dermatology. 2017;77(1):149-58. Epub 2017/03/21.

13. Picaud S, Kavanagh KL, Yue WW, Lee WH, Muller-Knapp S, Gileadi O, et al. Structural basis of fumarate hydratase deficiency. Journal of inherited metabolic disease. 2011;34(3):671-6. Epub 2011/03/30.

14. Bourgeron T, Chretien D, Poggi-Bach J, Doonan S, Rabier D, Letouze P, et al. Mutation of the fumarase gene in two siblings with progressive encephalopathy and fumarase deficiency. J Clin Invest. 1994;93(6):2514-8. Epub 1994/06/01.

15. Ottolenghi C, Hubert L, Allanore Y, Brassier A, Altuzarra C, Mellot-Draznieks C, et al. Clinical and biochemical heterogeneity associated with fumarase deficiency. Human mutation. 2011;32(9):1046-52. Epub 2011/05/12.

16. Allegri G, Fernandes MJ, Scalco FB, Correia P, Simoni RE, Llerena JC, Jr., et al. Fumaric aciduria: an overview and the first Brazilian case report. Journal of inherited metabolic disease. 2010;33(4):411-9. Epub 2010/06/16.

17. Mann PJ, Woolf B. The action of salts on fumarase. I. The Biochemical journal. 1930;24(2):427-34. Epub 1930/01/01.

18. Massey V. Studies on Fumarase .4. The Effects of Inhibitors on Fumarase Activity. Biochemical Journal. 1953;55(1):172-7.

19. Massey V. Studies on fumarase. III. The effect of temperature. The Biochemical journal. 1953;53(1):72-9. Epub 1953/01/01.

20. Massey V. Studies on fumarase. II. The effects of inorganic anions on fumarase activity. The Biochemical journal. 1953;53(1):67-71. Epub 1953/01/01.

21. Frieden C, Bock RM, Alberty RA. Studies of the Enzyme Fumarase .2. Isolation and Physical Properties of Crystalline Enzyme. Journal of the American Chemical Society. 1954;76(9):2482-4.

22. Alberty RA, Massey V, Frieden C, Fuhlbrigge AR. Studies of the Enzyme Fumarase .3. The Dependence of the Kinetic Constants at 25-Degrees Upon the Concentration and Ph of Phosphate Buffers. Journal of the American Chemical Society. 1954;76(9):2485-93.

23. Alberty RA, Koerber BM. Studies of the Enzyme Fumarase .7. Series Solutions of Integrated Rate Equations for Irreversible and Reversible Michaelis-Menten Mechanisms. Journal of the American Chemical Society. 1957;79(24):6379-82.

24. Frieden C, Wolfe RG, Alberty RA. Studies of the Enzyme Fumarase .4. The Dependence of the Kinetic Constants at 25-Degrees on Buffer Concentration, Composition and Para-H2. Journal of the American Chemical Society. 1957;79(7):1523-5.

25. Alberty RA, Miller WG, Fisher HF. Studies of the Enzyme Fumarase .6. Study of the Incorporation of Deuterium into L-Malate during the Reaction in Deuterium Oxide. Journal of the American Chemical Society. 1957;79(15):3973-7.

26. Alberty RA, Peirce WH. Studies of the Enzyme Fumarase .5. Calculation of Minimum and Maximum Values of Constants for the General Fumarase Mechanism. Journal of the American Chemical Society. 1957;79(7):1526-30.

27. Adam J, Yang M, Bauerschmidt C, Kitagawa M, O'Flaherty L, Maheswaran P, et al. A role for cytosolic fumarate hydratase in urea cycle metabolism and renal neoplasia. Cell Rep. 2013;3(5):1440-8. Epub 2013/05/07.

28. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry. 6th ed. New York: W.H. Freeman; 2013.

29. Yogev O, Naamati A, Pines O. Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions. Febs Journal. 2011;278(22):4230-42. Epub 2011/09/21.

30. Weaver T, Banaszak L. Crystallographic studies of the catalytic and a second site in fumarase C from Escherichia coli. Biochemistry. 1996;35(44):13955-65. Epub 1996/11/05.

31. Woods SA, Schwartzbach SD, Guest JR. Two biochemically distinct classes of fumarase in Escherichia coli. Biochimica et biophysica acta. 1988;954(1):14-26. Epub 1988/04/28.

32. Shibata H, Gardiner WE, Schwartzbach SD. Purification, characterization, and immunological properties of fumarase from Euglena gracilis var. bacillaris. J Bacteriol. 1985;164(2):762-8. Epub 1985/11/01.

33. Flint DH, Emptage MH, Guest JR. Fumarase a from Escherichia coli: purification and characterization as an iron-sulfur cluster containing enzyme. Biochemistry. 1992;31(42):10331-7. Epub 1992/10/27.

34. Feliciano PR, Drennan CL, Nonato MC. Crystal structure of an Fe-S clustercontaining fumarate hydratase enzyme from Leishmania major reveals a unique protein fold. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(35):9804-9. Epub 2016/08/17.

35. Feliciano PR, Gupta S, Dyszy F, Dias-Baruffi M, Costa AJ, Michels PAM, et al. Fumarate hydratase isoforms of Leishmania major: Subcellular localization, structural and kinetic properties. International Journal of Biological Macromolecules. 2012;51(1-2):25-31.

36. Puthan Veetil V, Fibriansah G, Raj H, Thunnissen AM, Poelarends GJ. Aspartase/fumarase superfamily: a common catalytic strategy involving general base-catalyzed formation of a highly stabilized aci-carboxylate intermediate. Biochemistry. 2012;51(21):4237-43. Epub 2012/05/04.

37. Fibriansah G, Veetil VP, Poelarends GJ, Thunnissen AM. Structural basis for the catalytic mechanism of aspartate ammonia lyase. Biochemistry. 2011;50(27):6053-62. Epub 2011/06/15.

38. Tsai M, Koo J, Yip P, Colman RF, Segall ML, Howell PL. Substrate and product complexes of Escherichia coli adenylosuccinate lyase provide new insights into the enzymatic mechanism. J Mol Biol. 2007;370(3):541-54. Epub 2007/05/29.

39. Weaver T. Structure of free fumarase C from Escherichia coli. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2005;61(Pt 10):1395-401. Epub 2005/10/06.

40. Blanchard JS, Cleland WW. Use of Isotope Effects to Deduce the Chemical Mechanism of Fumarase. Biochemistry. 1980;19(19):4506-13.

41. Yoon MY, Thayer-Cook KA, Berdis AJ, Karsten WE, Schnackerz KD, Cook PF. Acid-base chemical mechanism of aspartase from Hafnia alvei. Archives of biochemistry and biophysics. 1995;320(1):115-22. Epub 1995/06/20.

42. Garrard LJ, Bui QT, Nygaard R, Raushel FM. Acid-base catalysis in the argininosuccinate lyase reaction. The Journal of biological chemistry. 1985;260(9):5548-53. Epub 1985/05/10.

43. Porter DJ, Rudie NG, Bright HJ. Nitro analogs of substrates for adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase. Archives of biochemistry and biophysics. 1983;225(1):157-63. Epub 1983/08/01.

44. Suzuki T, Sato M, Yoshida T, Tuboi S. Rat liver mitochondrial and cytosolic fumarases with identical amino acid sequences are encoded from a single gene. The Journal of biological chemistry. 1989;264(5):2581-6. Epub 1989/02/15.

45. Kinsella BT, Doonan S. Nucleotide sequence of a cDNA coding for mitochondrial fumarase from human liver. Biosci Rep. 1986;6(10):921-9. Epub 1986/10/01.

46. Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. Methods Mol Biol. 1999;112:531-52. Epub 1999/02/23.

47. Weaver TM, Levitt DG, Donnelly MI, Stevens PP, Banaszak LJ. The multisubunit active site of fumarase C from Escherichia coli. Nat Struct Biol. 1995;2(8):654-62. Epub 1995/08/01.

48. Weaver T, Lees M, Banaszak L. Mutations of fumarase that distinguish between the active site and a nearby dicarboxylic acid binding site. Protein Sci. 1997;6(4):834-42. Epub 1997/04/01.

49. Yogev O, Singer E, Shaulian E, Goldberg M, Fox TD, Pines O. Fumarase: a mitochondrial metabolic enzyme and a cytosolic/nuclear component of the DNA damage response. PLoS Biol. 2010;8(3):e1000328. Epub 2010/03/17.

50. Dik E, Naamati A, Asraf H, Lehming N, Pines O. Human Fumarate Hydratase Is Dual Localized by an Alternative Transcription Initiation Mechanism. Traffic. 2016;17(7):720-32.

51. Ratcliffe PJ. Fumarate hydratase deficiency and cancer: activation of hypoxia signaling? Cancer Cell. 2007;11(4):303-5. Epub 2007/04/10.

52. Yang M, Soga T, Pollard PJ, Adam J. The emerging role of fumarate as an oncometabolite. Frontiers in oncology. 2012;2:85. Epub 2012/08/07.

53. Bock RM, Alberty RA. Studies of the Enzyme Fumarase .1. Kinetics and Equilibrium. Journal of the American Chemical Society. 1953;75(8):1921-5.

54. Mescam M, Vinnakota KC, Beard DA. Identification of the catalytic mechanism and estimation of kinetic parameters for fumarase. J Biol Chem. 2011;286(24):21100-9. Epub 2011/04/19.

55. Rose IA, Weaver TM. The role of the allosteric B site in the fumarase reaction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(10):3393-7. Epub 2004/03/03.

56. Gardie B, Remenieras A, Kattygnarath D, Bombled J, Lefevre S, Perrier-Trudova V, et al. Novel FH mutations in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) and patients with isolated type 2 papillary renal cell carcinoma. Journal of medical genetics. 2011;48(4):226-34. Epub 2011/03/15.

57. Toro JR, Nickerson ML, Wei MH, Warren MB, Glenn GM, Turner ML, et al. Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America. Am J Hum Genet. 2003;73(1):95-106. Epub 2003/05/29.

58. Lorsch J. METHODS IN ENZYMOLOGY Volume 529 Laboratory Methods in Enzymology: DNA PREFACE. Method Enzymol. 2013;529:Xix-Xix.

59. de Padua RAP, Nonato MC. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant human fumarase. Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications. 2014;70:120-2.

60. Sambrook J, Russell DW. The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2006. v, 800 p. p.

61. Niesen FH, Berglund H, Vedadi M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. Nat Protoc. 2007;2(9):2212-21. Epub 2007/09/15.

62. Hassell AM, An G, Bledsoe RK, Bynum JM, Carter HL, Deng SJJ, et al. Crystallization of protein-ligand complexes. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography. 2007;63:72-9.

63. Chaikuad A, Knapp S, von Delft F. Defined PEG smears as an alternative approach to enhance the search for crystallization conditions and crystal-quality improvement in reduced screens. Acta Crystallographica Section D-Structural Biology. 2015;71:1627-39.

64. Huschmann FU, Linnik J, Sparta K, Uhlein M, Wang X, Metz A, et al. Structures of endothiapepsin-fragment complexes from crystallographic fragment screening using a novel, diverse and affordable 96-compound fragment library. Acta crystallographica Section F, Structural biology communications. 2016;72(Pt 5):346-55. Epub 2016/05/04.

65. Kabsch W. Xds. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010;66(Pt 2):125-32. Epub 2010/02/04.

66. Evans P. Scaling and assessment of data quality. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2006;62(Pt 1):72-82. Epub 2005/12/22.

67. Leslie AGW, Powell HR. Processing diffraction data with MOSFLM. Evolving Methods for Macromolecular Crystallography: THE STRUCTURAL PATH TO THE UNDERSTANDING OF THE MECHANISM OF ACTION OF CBRN AGENTS. 2007;245:41-51.

68. Evans PR, Murshudov GN. How good are my data and what is the resolution? Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography. 2013;69:1204-14.

69. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. J Appl Crystallogr. 2007;40(Pt 4):658-74. Epub 2007/08/01.

70. Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography. 2010;66:213-21.

71. Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2012;68(Pt 4):352-67. Epub 2012/04/17.

72. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography. 2010;66:486-501.

73. Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta crystallographica Section D, Biological crystallography. 2010;66(Pt 1):12-21.

74. Schrödinger. The PyMOL Molecular Graphics System, version 1.8. LLC.

75. Genda T, Watabe S, Ozaki H. Purification and characterization of fumarase from Corynebacterium glutamicum. Biosci Biotechnol Biochem. 2006;70(5):1102-9. Epub 2006/05/24.

76. Rose IA, Warms JV, Kuo DJ. Proton transfer in catalysis by fumarase. Biochemistry. 1992;31(41):9993-9. Epub 1992/10/20.

77. Rose IA. Restructuring the active site of fumarase for the fumarate to malate reaction. Biochemistry. 1997;36(40):12346-54. Epub 1997/10/07.

78. Rose IA. How fumarase recycles after the malate -> fumarate reaction. Insights into the reaction mechanism. Biochemistry. 1998;37(51):17651-8.

79. Frieden C, Alberty RA. The Effect of Ph on Fumarase Activity in Acetate Buffer. Journal of Biological Chemistry. 1955;212(2):859-68.

80. Mechaly AE, Haouz A, Miras I, Barilone N, Weber P, Shepard W, et al. Conformational changes upon ligand binding in the essential class II fumarase Rv1098c from Mycobacterium tuberculosis. FEBS Lett. 2012;586(11):1606-11. Epub 2012/05/09.

81. Sigurdardottir AG, Winter A, Sobkowicz A, Fragai M, Chirgadze D, Ascher DB, et al. Exploring the chemical space of the lysine-binding pocket of the first kringle domain of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) yields a new class of inhibitors of HGF/SF-MET binding. Chemical Science. 2015;6(11):6147-57.

82. Ylisaukko-oja SK, Kiuru M, Lehtonen HJ, Lehtonen R, Pukkala E, Arola J, et al. Analysis of fumarate hydratase mutations in a population-based series of early onset uterine leiomyosarcoma patients. Int J Cancer. 2006;119(2):283-7. Epub 2006/02/16.

83. Erlanson DA, Fesik SW, Hubbard RE, Jahnke W, Jhoti H. Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2016;15(9):605-19. Epub 2016/07/16.

84. Erlanson DA. Introduction to fragment-based drug discovery. Top Curr Chem. 2012;317:1-32. Epub 2011/06/23.

85. Schiebel J, Radeva N, Krimmer SG, Wang X, Stieler M, Ehrmann FR, et al. Six Biophysical Screening Methods Miss a Large Proportion of Crystallographically Discovered Fragment Hits: A Case Study. ACS Chem Biol. 2016;11(6):1693-701. Epub 2016/03/31.

86. Carvajal-Carmona LG, Alam NA, Pollard PJ, Jones AM, Barclay E, Wortham N, et al. Adult leydig cell tumors of the testis caused by germline fumarate hydratase mutations. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(8):3071-5. Epub 2006/06/08.