

9/

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E INFORMÁTICA

**“CRISTALIZAÇÃO E ANÁLISE CRISTALOGRÁFICA PRELIMINAR DA N-
ACETILGLICOSAMINA 6-FOSFATO DESACETILASE DE ESCHERICHIA
COLI”**

FREDERICO MORAES FERREIRA

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências “Física Aplicada”

Orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva

São Carlos – São Paulo
2000

USP/IFSC/SBI



8-2-001334

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

Ferreira, Frederico Moraes

"Cristalização e Análise Cristalográfica preliminar da N-Acetilglicosamina 6-Fosfato desacetilase de Escherichia Coli" / Frederico Moraes Ferreira – São Carlos, 2000

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2000
– páginas: 72

Área: Física Aplicada

Prof. Dr. Glaucius Oliva

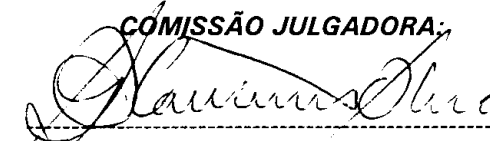
1. Crsitalografia de proteínas, 2. Açucares aminados, 3. Difração de raios-x

I. Título

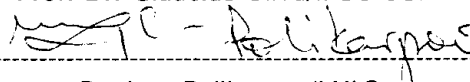


**MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
REDERICO MORAES FERREIRA APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO
CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 23 DE MAIO DE 2000**

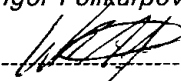
COMISSÃO JULGADORA:



Prof. Dr. Glaucius Oliva/IFSC-USP



Dr. Igor Polikarpov/LNLS



Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Júnior/UNESP

Aos meus pais, à Dona Nita e
à Fernanda

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo amor desinteressado, pela educação e pelo esforço que fizeram para que eu chegasse aqui.

À Fernanda, que esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e não me deixou esmorecer.

Ao amigo Paulão, pelos momentos que passamos juntos; e também pela orientação durante a iniciação científica sem a qual não teria realizado este projeto.

Ao meu orientador Glaucius Oliva, pela oportunidade de trabalho concedida, pela paciência e pela orientação.

Ao Prof. Dr. Richard Garrat, pela dedicação e pelas discussões tão objetivas, claras e precisas que contribuíram muito para este trabalho; e também pela paciência na revisão manuscrita do artigo.

Ao Prof. Dr. Fernando Delboni, pela amizade e pela ajuda na parte experimental do trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Castellano, que tão prontamente esclareceu minhas dúvidas pelos corredores do grupo.

Ao Dr. Guillermo Henrique-Mendoza (Faculdade de Medicina da Universidade Autônoma do México), pelas mais de 100 mg de proteína fornecidas, sem as quais não teria realizado o projeto.

Às bibliotecárias Mara, Neuza e Betânia.

A todo o corpo técnico do grupo de cristalografia: Susana, Joso, Bianca, Wanda, Gê e Gustão.

A todos aqueles que tive a satisfação de conviver durante os anos que passei no grupo: Iulek, Rodrigo, João, Cristininha, Regiane, Diet, Frank, Single, Záuli, Bunda Max, Zé, Pavão, Débora, Ivan, Stefano, PH, Carlos, Cláudia Munte, Edson, Cecília (pelos espectros de dicroísmo também), Marcio, Marcelo, Artur, Ane, Andresa, Fernanda, Celina, Antônio e mais aqueles que no momento eu possa ter esquecido.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Sumário

Figuras	III
Tabelas	VIII
Abreviações	VIII
Resumo	IXX
Abstract	X
1 Introdução	1
1.1 Características da proteína	3
1.2 Cristalização	4
1.3 Fontes de raios-X	6
1.3.1 Geradores convencionais	6
1.3.2 Radiação Síncroton	8
1.4 Espalhamento Thomson	10
1.4.1 Interferência de Ondas Espalhadas	10
1.4.2 Espalhamento por uma molécula ou por uma cela unitária	12
1.4.3 Espalhamento por um cristal	12
1.5 Lei de Bragg e Construção de Ewald	14
1.6 A Função de Patterson	16
1.7 O método de oscilação	16
1.8 Função de auto-rotação	18
1.8.1 A Função de Rotação Rápida	19
1.9 Produção de derivados isomorfos de átomos pesados	20
2 Objetivos	23
3 Materiais e Métodos	24

3.1 Equipamentos e reagentes	24
3.2 Purificação	26
3.3 Protocolo de verificação das condições da amostra	27
3.4 Cristalização	28
3.5 Coleta de dados	30
3.5.1 Preparação dos cristais	30
3.5.2 O experimento de difração	31
3.6 Processamento dos dados	31
3.7 Produção de derivados isomorfos de átomos pesados	32
3.7.1 "Screening" de Derivados	34
3.7.2 Qualidade dos derivados	36
3.7.3 Localização dos átomos pesados	36
4 Resultados e Discussões	37
4.1 A qualidade da amostra	37
4.2 Cristalização	41
4.2.1 A Otimização dos Cristais	43
4.3 Coleta de dados	50
4.4 Processamento dos Dados	55
4.5 A Unidade Assimétrica e Simetria não-cristalográfica	56
4.6 Derivados	59
5 Conclusões	64
6 Perspectivas	66
7 Referências	68
ANEXO I	73
ANEXO II	81

Figuras

Figura 1.1: Hidrólise do N-acetil-D-glicosamina-6-fosfato em D-glicosamina-6-fosfato e acetato, catalisada pela N-acetilglicosamina 6-fosfato desacetilase cujo gene codificante é o nagA. _____ 2

Figura 1.2: Isomerização e desaminação do D-glicosamina-6-fosfato produzindo D-frutose-6-fosfato e amônia realizada pela glicosamina 6-fosfato desaminase cujo gene codificante é o nagB. _____ 2

Figura 1.3: Diagrama de fases de cristalização de proteínas baseado nas variações das concentrações da proteína e do precipitante. São apresentados os diferentes caminhos percorridos no diagrama pelos quatro métodos de cristalização mais utilizados. Todos os sistemas devem alcançar a zona de nucleação, atravessar a zona meta estável e eventualmente chegar à curva de solubilidade. As condições iniciais são representadas pelo símbolo "•". (A) Batch, (B) difusão de vapor, (C) diálise, (D) difusão por interface livre (extraído de Chayen 1998). _____ 5

Figura 1.4: Câmara de ânodo rotatório. O sistema de refrigeração não está representado. O ânodo é cilíndrico e gira entorno do eixo mostrado (extraído de Giacovazzo, 1992). _____ 6

Figura 1.5: Sobreposição dos espectros contínuo e característico obtidos em fonte convencional de raios-X. As curvas (a) e (b) representam os potenciais de aceleração V_1 e V_2 respectivamente. As linhas características são as mesmas em ambos os espectros e suas intensidades diminuem com o potencial de aceleração (extraído de Sherwood 1976). _____ 7

Figura 1.6: Representação esquemática de um anel de armazenamento de elétrons. São mostrados apenas os componentes básicos. A radiação é produzida quando os elétrons são acelerados nos magnetos curvados e nos dispositivos de inserção (extraído de Helliwell 1992 apud Walker 1986). ____ 9

Figura 1.7: Pontos espalhadores O e O' separados de \vec{r} ; \vec{s} e \vec{s}_0 são vetores unitários. Segundo a construção $\vec{AO} = -\vec{r} \cdot \vec{s}_0$ e $\vec{BO} = \vec{r} \cdot \vec{s}$ (extraído de Giacovazzo et al. 1992). _____ 11

Figura 1.8: Reflexão de raios-X em dois planos da rede pertencentes a mesma família. d é a distância interplanar (extraído de Giacovazzo et al. 1992). _____ 14

Figura 1.9: Construção de Ewald (extraído de Giacovazzo et al. 1992) . _____ 15

Figura 1.10: O movimento de oscilação do espaço recíproco. Aqui os planos da rede recíproca estão fixos e a esfera de Ewald gira sobre o ponto O de $\Delta\phi$, AO é a direção do feixe incidente. A intercessão da esfera de Ewald com os planos da rede recíproca dá origem as reflexões que são gravadas no detetor (extraído de Giacovazzo 1992). _____ 17

Figura 4.1: Gel de poliacrilamida 15% para verificação da pureza da amostra. Nas raias 1 e 4 têm-se os marcadores de peso molecular e nas raias 2 e 3, em aproximadamente 41kDa, observa-se a desacetilase fervida e não-fervida respectivamente. _____ 37

Figura 4.2: Cromatograma de ultra filtração da desacetilase realizado em PBS 150 mM pH 7,4 em coluna Superdex HiLoad S200. A observação de um único pico levanta a hipótese de que o contaminante seja também um oligômero como a desacetilase. _____ 38

Figura 4.3: Gel de poliacrilamida 15% para comparação dos três lotes de proteína recebidos. Nas raias 1, 4, 7, e 10 tem-se os marcadores de peso molecular. Nas raias 2 e 3 observa-se a desacetilase não-fervida e fervida, respectivamente com um ano e com dois meses de armazenamento, nas raias 5 e 6 com quatro meses e nas raias 8 e 9 com menos de 10 dias de armazenamento. Nenhuma alteração das condições da amostra foi observada. _____ 39

Figura 4.4: Espectro de dicroísmo circular da desacetilase para verificação do enovelamento da desacetilase. As amostras foram diluídas a concentração de $0,1 \text{ mg}^{-1}\text{ml}$ em solução tampão fosfato 25 mM pH 7,3. _____ 40

Figura 4.5: Espectro de dicroísmo circular da desacetilase (Souza et al. 1997). _____ 40

Figura 4.6 : Géis de poliacrilamida mostrando a purificação da desacetilase através da cristalização. (a) na raia 1 têm-se os marcadores de peso molecular, na raia 3 tem-se a desacetilase na forma desnaturada e na raia 2 tem-se a desacetilase proveniente do cristal da FCI dissolvido. (b) na raia 1 têm-se os marcadores de peso molecular, na raia 2 tem-se a desacetilase na forma desnaturada e na raia 3 observa-se a desacetilase proveniente do cristal da FCI dissolvido. _____ 42

Figura 4.7: Dependência do tamanho, morfologia externa e nucleação dos cristais da FCI em relação a concentração de PEG 4000 (W/V) em tampão Acetato de sódio 100 mM pH 4,4. (a) 5 %, (b) 10% e (c) 15 %. _____ 44

Figura 4.8: Dependência do tamanho, morfologia externa e nucleação dos cristais da FCI em relação ao pH a uma concentração de 5% de PEG 4000. (a) pH 4, 7, (b) pH 5,0 e (c) pH 5,4. _____ 44

Figura 4.9 : Cristais da forma FCI obtidos através da substituição do agente precipitante PEG 4000 por PEG 1500. Observa-se a alteração da morfologia externa. _____ 45

Figura 4.10: Cristais da forma FCI obtidos através da substituição do agente precipitante PEG 4000 por PEG 400. Observa-se a alteração na morfologia externa , na nucleação e no tamanho dos cristais. _____ 46

Figura 4.11: Cristais da forma FCI obtidos através da alteração do método de cristalização de difusão de vapor da gota pendurada para difusão de vapor do sanduíche de gota. Observa-se faces sextavadas fornecendo ao

cristal uma seção reta hexagonal. A nucleação e o tamanho dos cristais também foram alterados. _____ 47

Figura 4.12: Cristal da FCII obtidos em 1,85 M de dihidrogênio Fosfato de sódio hidratado. Dimensões $1 \times 0,6 \times 0,4$ (mm)³. Nesta foto o precipitado amorfo foi removido. _____ 48

Figura 4.13: Cristais imperfeitos da FCII obtidos em 1,85 M de dihidrogênio Fosfato de sódio hidratado. _____ 48

Figura 4.14: Influência do tempo de armazenamento da amostra na qualidade dos cristais. Nas fotos (a) e (b) foram utilizadas amostras com 1 ano e três meses e de 1 mês armazenamento respectivamente. Nas duas condições a concentração de fosfato foi de 1,7 M. _____ 49

Figura 4.15: Padrão de difração típico dos cristais de FCI crescidos em 4 % de PEG 4000 em Acetato de sódio 150 mM pH 5,3. Fonte convencional com distância cristal-detetor de 200 mm e oscilação de 0,5°. Resolução máxima de 2,7 Å na direção da diagonal da figura. À direita e acima: ampliação do quadrado da figura principal – parâmetro de rede de 490 Å. _____ 51

Figura 4.16: Padrão de difração típico dos cristais da FCII crescidos em 1,80 M de dihidrogênio Fosfato de sódio pH 4,0. Fonte convencional com distância cristal-detetor de 120 mm e oscilação de 0,5°. Resolução máxima de 2,4 Å. _____ 53

Figura 4.17: Padrão de difração típico dos cristais da FCII crescidos em 1,85 M de dihidrogênio Fosfato de sódio pH 4,0. Fonte de luz síncrotron (LNLS) com distância cristal-detetor de 150 mm e oscilação de 0,5°. Resolução máxima de 1,8 Å. _____ 54

Figura 4.18: Seção $\kappa = 180^\circ$ da função de auto-rotação da desacetilase. Para o cálculo desta função foram incluídos dados entre 20 Å e 3 Å de resolução utilizando-se um raio de integração de 15 Å. As curvas de nível foram traçadas em unidades de σ do mapa (desvio padrão). __ 58

Tabelas

- Tabela 3.1:** Procedência dos reagentes utilizados nos experimentos. ____ 26
- Tabela 4.1:** Amplitudes dos 20 maiores picos encontrados no espaço rotacional e seus respectivos ângulos em graus de orientação do eixo de rotação. _____ 59
- Tabela 4.2:** Compostos utilizados nos experimentos de produção de derivados e suas respectivas concentrações, tempos de “soaking” e χ^2 resultante da comparação das reflexões dos derivados com àquelas do conjunto nativo. _____ 61
- Tabela 4.3:** Volumes finais das gotas, concentrações do glicerol e respectivos erros de medida – concentração de equivalência 14 %. ____ 61
- Tabela 4.4:** Volumes finais das gotas, concentrações do PEG 4000 e respectivos erros de medida – concentração de equivalência 24 %. ____ 62
- Tabela 4.5:** Volumes finais das gotas, concentrações do PEG 6000 e respectivos erros de medida – concentração de equivalência 45 %. ____ 62
- Tabela 4.6:** Volumes finais das gotas, concentrações de PEG 8000/glicina e respectivos erros de medida– concentração de equivalência 38 %. _____ 62
- Tabela 4.7:** Volumes finais das gotas, concentrações do Tartrato de sódio e respectivos erros de medida – concentração de equivalência 70 %. _____ 63
- Tabela 4.8:** Volumes finais das gotas, concentrações do Cloreto de sódio e respectivos erros de medida– concentração de equivalência 20 %. _____ 63

Abreviações

BMCD	Biological Macromolecule Crystallization Database
Desacetilase	N-acetilglicosamina 6-fosfato desacetilase
FCI	Forma cristalina I
FCII	Forma cristalina II
Fru6P	D-frutose 6-fosfato
GlcN	Glicosamina
GlcNAc6P	N-acetilglicosamina 6-fosfato
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MAD	Multwavelenght Anomalous Dispersion
MIR	Multiple Isomorphous Replacement
MPD	2-metil-2,4-pentanodiol
NCBI	Nacional Centre for Biological Information
PBS	Tampão fosfato salino
PEG 400	Polietilenoglicol PM=400
PEG 1500	Polietilenoglicol PM=1500
PEG 4000	Polietilenoglicol PM=4000
PEG 6000	Polietilenoglicol PM=6000
PEG 8000	Polietilenoglicol PM=8000
SDS	Dodecilsulfato de sódio
V_m	Coeficiente de Matthews

Resumo

A N-Acetilglicosamina 6-fosfato desacetilase (EC 3.5.1.25), uma enzima envolvida na via catabólica de açúcares aminados da *Escherichia coli*, foi cristalizada pela técnica de difusão de vapor utilizando-se fosfato como agente precipitante. Experimentos de difração de raios-X mostraram que os cristais pertencem ao sistema cristalino ortorrômbico com grupo espacial $P2_12_12$. Os parâmetros de cela são $a = 82,09(2) \text{ \AA}$, $b = 114,50(1) \text{ \AA}$ e $c = 80,17(1) \text{ \AA}$. Os cristais difrataram a uma resolução máxima de $1,8 \text{ \AA}$ e um conjunto de dados foi coletado até $2,0 \text{ \AA}$. O conteúdo da unidade assimétrica provavelmente é um dímero, produzindo um coeficiente de Matthews de $2,30 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$.

Abstract

N-Acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase (EC 3.5.1.25), an enzyme involved in amino sugar catabolism from *Escherichia coli*, has been crystallized by the vapor diffusion technique using phosphate as precipitant. X-ray diffraction experiments show the crystals to belong to the orthorhombic crystal system with space group $P2_12_12$. The unit cell parameters are $a = 82.09(2)$ Å, $b = 114.50(1)$ Å and $c = 80.17(1)$ Å. The crystals diffract to a maximum resolution of 1.8 Å and a initial dataset was collected to 2.0 Å. The asymmetric unit content is likely to be a dimer, yielding a Matthews coefficient of 2.30 Å³ Da⁻¹.

1 Introdução

A N-acetilglicosamina 6-fosfato desacetilase (EC 3.5.1.25) é uma enzima da via catabólica de amino açúcares da bactéria *Escherichia coli*. Esta bactéria utiliza açúcares aminados do meio ambiente, tais como glicosamina (GlcN) e N-acetilglicosamina 6-fosfato (GlcNAc6P), para a síntese de peptidoglicano de parede celular e de lipopolissacarídeos de componentes de membrana externa. Estes açúcares também podem ser utilizados como fontes de carbono e nitrogênio (White 1968). Para este propósito, a *E. coli* possui uma série de enzimas cujos genes codificantes estão dispostos em dois operons divergentes, o *nagE* e o *nagBACD*, localizados a 15 minutos no cromossomo bacteriano (Plumbridge 1990). Estes operons constituem um regulon, o qual torna-se ativado levando a expressão de seus genes quando células são crescidas em presença de tais amino açúcares. O gene *nagE* codifica para a enzima II N-acetilglicosamina-específica do sistema de fosfo-*enol*-piruvato fosfotransferase, cujo produto é o GlcNAc6P. (Plumbridge; Kolb 1991). Os genes *nagA* e *nagB* do outro operon codificam respectivamente para as enzimas GlcNAc6P desacetilase e GlcN6P desaminase (EC 5.3.1.10). A desacetilase converte o produto de reação do sistema fosfotransferase fosfo-*enol*-piruvato dependente, o GlcNAc6P, em GlcN6P e acetato (Figura 1.1). Em seguida a desaminase catalisa a isomerização e desaminação do GlcN6P produzindo D-frutose 6P (Fru6P) e amônia (Figura 1.2).

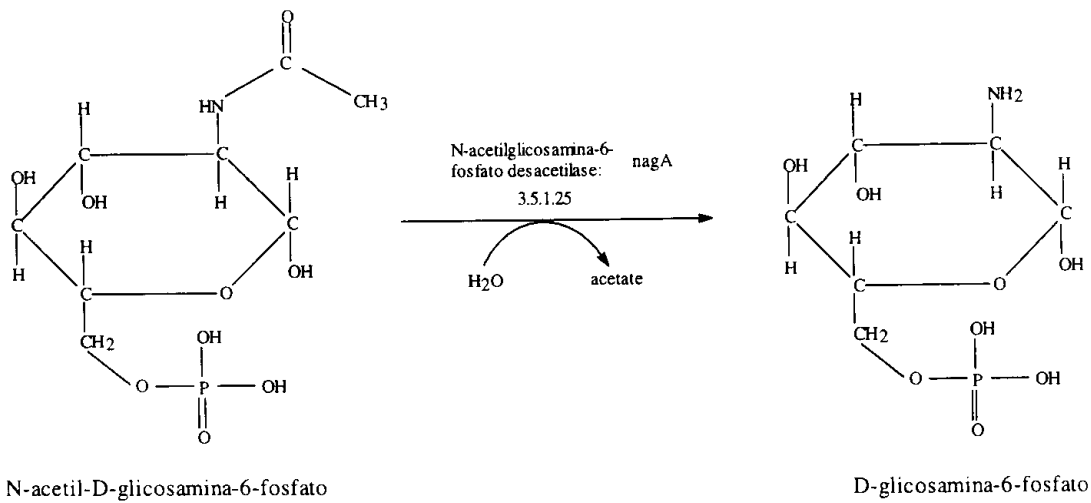


Figura 1.1: Hidrólise do N-acetil-D-glicosamina-6-fosfato em D-glicosamina-6-fosfato e acetato, catalisada pela N-acetilglicosamina 6-fosfato desacetilase cujo gene codificante é o *nagA*.

GlcNAc6P, produto do transporte da GlcN6P, é um metabólito chave para a regulação da via e de fato foi demonstrado (Plumbridge; Kolb 1991) ser este metabólito o indutor intracelular do regulon *nagE – nagBACD* pelo deslocamento específico do repressor *Nag* de seus sítios de ligação de DNA (Comb; Roseman 1958, Plumbridge; Kolb 1991). Além disso, este açúcar é ativador alostérico da desaminase (Dobrogosz 1968; Calcagno *et al.* 1982) e coindutor de

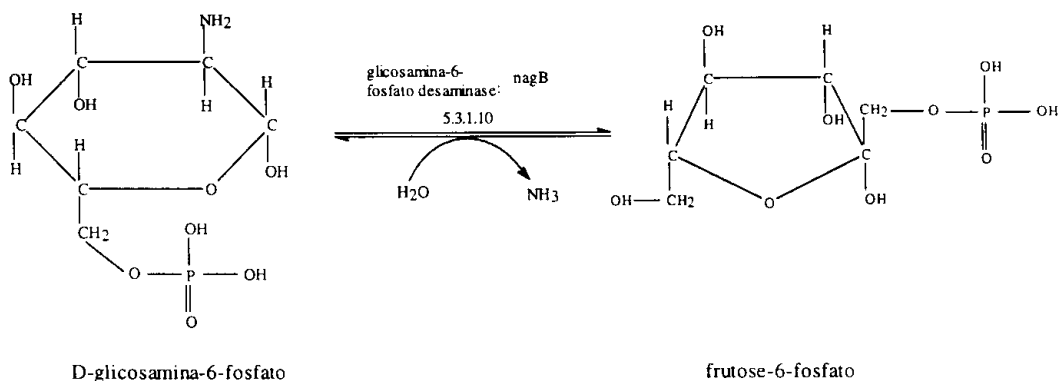


Figura 1.2: Isomerização e desaminação do D-glicosamina-6-fosfato produzindo D-frutose-6-fosfato e amônia realizada pela glicosamina 6-fosfato desaminase cujo gene codificante é o *nagB*.

uma proteína repressora codificada pelo *nagC*. Sendo também substrato da reação de desacetilase, cuja atividade é o maior fator de controle de sua concentração intracelular, este metabólito regulatório desempenha um importante papel na regulação do catabolismo de amino açúcares.

A desacetilase é também necessária à incorporação do GlcN6P exógeno a componentes da parede celular. Os processos de desacetilação da GlcNAc6P e de N-acetilação da D-glicosamina-1-fosfato são passos essenciais nessa via (White; Pasternak 1967, Mengin-Lecreulx *et al.* 1994).

Alguns dos mecanismos que constituem a via de catabolismo de açúcares aminados foram completamente elucidados após a determinação da estrutura tridimensional da desaminase em ambos estados alostéricos (Oliva *et al.* 1995; Horjales *et al.* 1999). Nesse contexto, a função multiregulatória do Glc6NacP atrai a atenção para o estudo de sua desacetilase, o qual irá contribuir para uma maior compreensão dos processos que compõem o catabolismo de amino açúcares em *Escherichia coli* e, por conseguinte, em outras bactérias.

1.1 Características da proteína

A desacetilase é um tetrâmero de subunidades idênticas de 41KDa e seu espectro de dicroísmo circular na faixa do ultravioleta distante sugere que esta seja uma proteína pertencente à família estrutural α/β (Souza *et al.*, 1997). O coeficiente de sedimentação do oligômero é 6,5 $s_{20,w}$ e o seu pI é 4,9.

Na proteína nativa, dois grupos tiol por cadeia são titulados com 5-5'-ditio -bis (2-nitrobenzoato) (NbS₂). Um deles reage rapidamente e o outro mais lentamente. A reação com o sulfidril mais reativo inibe completamente a atividade da enzima. Três grupos tiol, do total de oito por subunidade, são modificados por metil iodato sem significativa alteração dos seus parâmetros cinéticos. A enzima metilada torna-se insensível a inibição do NbS₂.

1.2 Cristalização

Cristalizar uma proteína significa levá-la a seu estado de super saturação. Nesta condição o número de interações atrativas entre as moléculas é maximizado e o de repulsivas ou dispersivas é minimizado. Para se alcançar tal estado, a estratégia é dirigir o sistema através de estados de equilíbrio de fases por meio de minimização da energia livre. Na prática, isso significa levar o sistema muito lentamente para um estado de solubilidade mínima e assim, alcançar um grau limite de super saturação ou cristalização (McPherson 1982).

É grande o número de metodologias empregadas na cristalização de proteínas (McPherson 1982, Ducruix; Giegé 1992). Dentre elas, a difusão de vapor em gota suspensa é a mais utilizada, seguida de "batch" e diálise em um menor número (McPherson *et al.* 1995 *apud* Gilliland *et al.* 1994) e por fim, difusão por interface livre,

emergindo como o método escolhido para cristalização em microgravidade (Koszelak *et al.* 1995, Chayen *et al.* 1997).

Num experimento de cristalização todos os métodos precisam, por diferentes rotas, alcançar a zona de nucleação, atravessar a zona meta-estável e eventualmente chegar à curva de solubilidade, isto é, à super saturação (Figura 1.3). Para que a supersaturação seja alcançada, um grande número de parâmetros deve ser determinado. Alguns desses parâmetros são: a espécie e concentração de precipitante, o pH, o sistema tampão, a pressão, a temperatura e a presença de sais, tensoativos, ligantes, inibidores, etc.

A despeito de algumas tecnologias como monitoramento dinâmico de difusão de vapor por temperatura (DeLucas *et al.* 1994),

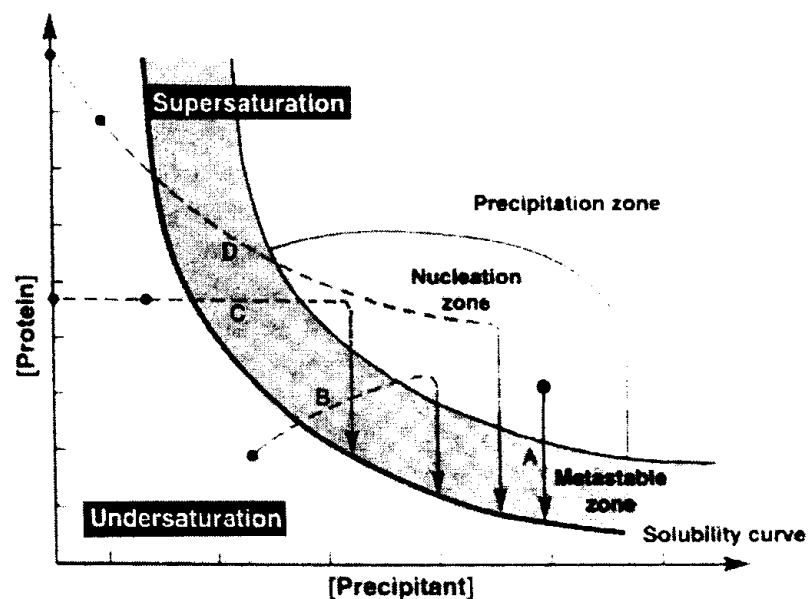


Figura 1.3: Diagrama de fases de cristalização de proteínas baseado nas variações das concentrações da proteína e do precipitante. São apresentados os diferentes caminhos percorridos no diagrama pelos quatro métodos de cristalização mais utilizados. Todos os sistemas devem alcançar a zona de nucleação, atravessar a zona meta estável e eventualmente chegar à curva de solubilidade. As condições iniciais são representadas pelo símbolo "*". (A) Batch, (B) difusão de vapor, (C) diálise, (D) difusão por interface livre (extraído de Chayen 1998).

espalhamento dinâmico de luz (D'Arcy 1994, Ferré-D'Amoré; Burley 1997) e sistemas robotizados de cristalização (Mikol *et al.* 1990) serem empregados na obtenção de cristais, a cristalização de proteínas é um experimento empírico e ainda permanece uma arte.

1.3 Fontes de raios-X

1.3.1 Geradores convencionais

As fontes normalmente utilizadas para experimentos de difração de raios-X produzem radiação através do mesmo princípio físico, podendo variar substancialmente nas suas construções (Figura 1.4). Raios-X são produzidos quando um feixe de elétrons acelerados por uma alta diferença de potencial colide com um alvo metálico sendo, portanto, desacelerado. O resultado é a produção de um espectro contínuo de raios-X. Quando a energia dos elétrons ultrapassa deter-

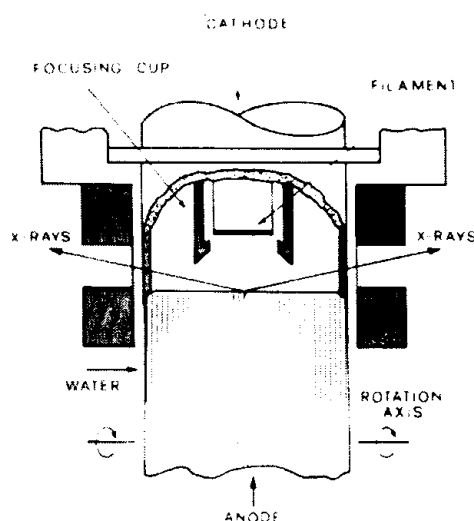


Figura 1.4: Câmara de ânodo rotatório. O sistema de refrigeração não está representado. O ânodo é cilíndrico e gira em torno do eixo mostrado (extraído de Giacovazzo, 1992).

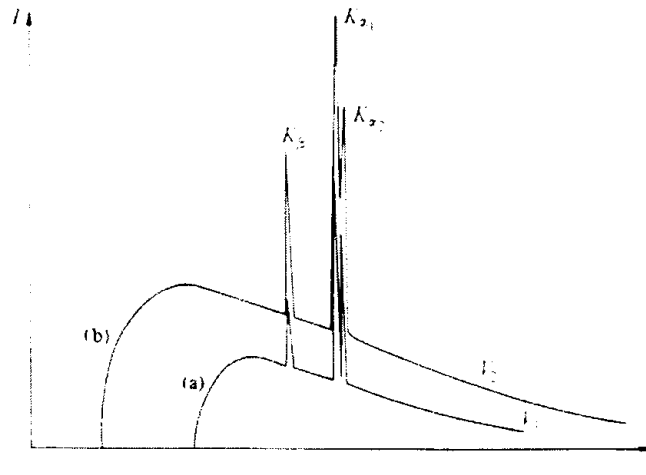


Figura 1.5: Sobreposição dos espectros contínuo e característico obtidos em fonte convencional de raios-X. As curvas (a) e (b) representam os potenciais de aceleração V_1 e V_2 respectivamente. As linhas características são as mesmas em ambos os espectros e suas intensidades diminuem com o potencial de aceleração (extraído de Sherwood 1976).

minado valor, um segundo tipo de espectro, descontínuo e com linhas muito estreitas, é observado sobreposto ao primeiro (Figura 1.5). Este é denominado espectro característico e depende do material que constitui o alvo. As linhas características de cada espectro correspondem às transições de orbitais de alta energia para orbitais de número quântico principal $n = 1, 2, 3$. Quando os orbitais envolvidos na transição são adjacentes, a linha é denominada α . Quando os orbitais são separados por outra camada a linha é denominada β . Desde que, para cada número quântico principal n existe n níveis de energia correspondendo aos possíveis valores do número quântico l (de 0 a $n-1$), as linhas α e β são divididas em múltiplas linhas, muito próximas entre si devido à pequena diferença de energia.

As linhas K_α são as de maior intensidade e por esse motivo são normalmente utilizadas no experimento de difração de raios-X padrão.

Na prática, a escolha do comprimento de onda é limitada aos valores das linhas K_{α} características dos metais normalmente utilizados. A saber: linhas K_{α} de cobre e molibdênio de comprimentos de onda de 1,578 Å e 0,730 Å respectivamente. Outros fatores são levados em consideração na escolha do comprimento de onda. Para uma dada distância cristal-detetor e cela unitária, os feixes difratados estarão mais separados se um comprimento de onda maior for utilizado, conseqüentemente o volume acessível do espaço recíproco será menor. A absorção da radiação pela amostra é também um fator importante. Finalmente, um último fator é a eficiência do método de detecção.

1.3.2 Radiação Síncroton (Helliwell 1992)

Os aceleradores de partículas foram originalmente desenvolvidos para pesquisa de física de alta energia, no estudo da estrutura subatômica da matéria. Entretanto, alguns deles começaram a ser exclusivamente desenhados para a produção da radiação síncroton depois que suas aplicações foram reconhecidas na pesquisa biológica, química e em outras áreas da física (Figura 1.6). A tecnologia de tais aceleradores se desenvolveu consideravelmente, de maneira que agora são induzidas às partículas trajetórias sofisticadas por meio de multipolos "Wigglers" e onduladores. Estes magnetos proporcionam uma extensão da faixa espectral para comprimentos de onda de mais alta energia, assim como feixes mais intensos.

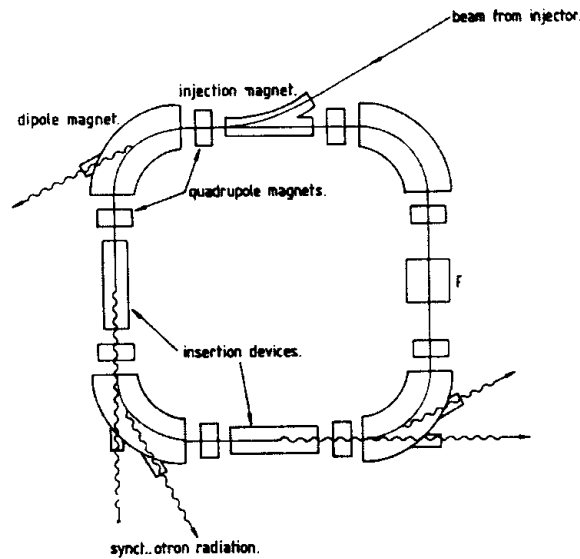


Figura 1.6: Representação esquemática de um anel de armazenamento de elétrons. São mostrados apenas os componentes básicos. A radiação é produzida quando os elétrons são acelerados nos ímãs curvados e nos dispositivos de inserção (extraído de Helliwell 1992 *apud* Walker 1986).

A emissão a partir de ímãs curvados já era duas magnitudes maior que a das fontes convencionais e com o advento dos onduladores e “Wigglers”, este valor ultrapassou sete ordens de grandeza. Por esta e outras razões, a luz síncrotron vem substituindo as fontes de raios-X convencionais nos experimentos de difração de raios-X por monocristais de proteínas. Algumas das vantagens da radiação síncrotron são alto fluxo (grande número de fótons), alto brilho (bem colimada), sintonização e estrutura temporal definida.

1.4 Espalhamento Thomson (Bludell; Johnson 1976, Sherwood 1976, Giacobazzo *et al.* 1992, Drenth 1994)

Supondo uma partícula livre de carga e e massa m sob ação do campo eletromagnético de uma onda plana de frequência ν . O campo exercerá sobre a partícula uma força periódica $\vec{F} = e\vec{E}$ e portanto, a partícula executará um movimento oscilatório com aceleração $\vec{a} = \frac{e}{m}\vec{E}$ de mesma frequência da radiação incidente. De acordo com o eletromagnetismo clássico, uma partícula carregada em movimento acelerado é uma fonte de radiação. Thomson mostrou que a intensidade de radiação espalhada é:

$$I_{eTh} = I_i \frac{e^4}{m^2 r^2 c^2} \left(\frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \right) \quad (1.1)$$

onde I_i é a intensidade da radiação incidente, c é a velocidade da luz, r é a distância do ponto de observação, 2θ é o ângulo de observação em relação a direção do feixe incidente e $P = \left(\frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \right)$ é o fator de polarização.

1.4.1 Interferência de Ondas Espalhadas

Supondo dois centros espalhadores situados nos pontos O e O' separados de \vec{r} (Figura 1.7) Quando sob ação de uma onda plana, eles se tornarão fontes secundárias de ondas esféricas sujeitas a

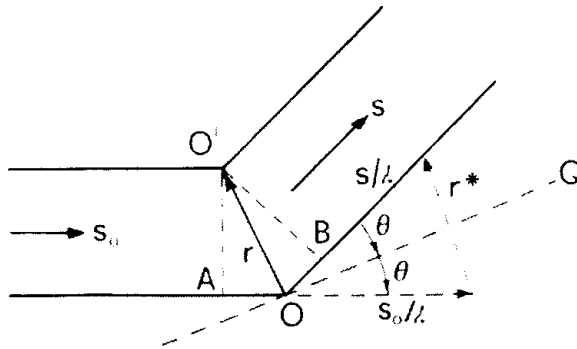


Figura 1.7: Pontos espalhadores O e O' separados de \vec{r} ; \vec{s} e \vec{s}_0 são vetores unitários. Segundo a construção $AO = -\vec{r} \cdot \vec{s}_0$ e $BO = \vec{r} \cdot \vec{s}$ (extraído de Giacovazzo *et al.* 1992).

interferência mútua. A diferença de fase entre as ondas espalhadas por O e O' na direção de vetor unitário \vec{s} será:

$$\alpha = \frac{2\pi}{\lambda} (\vec{s} - \vec{s}_0) \cdot \vec{r} = 2\pi \vec{r}^* \cdot \vec{r} \quad (1.2)$$

onde $\vec{r}^* = \lambda^{-1}(\vec{s} - \vec{s}_0)$ cujo módulo $r^* = \frac{2\sin\theta}{\lambda}$ e 2θ é o ângulo entre as direções de observação e de propagação do feixe.

Se A_0 é a amplitude da onda espalhada pelo objeto O (cuja fase é assumida 0) a onda espalhada por O' é descrita por $A'_0 \exp(2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r})$. Assim, para N pontos espalhadores:

$$F(r^*) = \sum_{j=1}^N A_j \exp(2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}_j) \quad (1.3)$$

A intensidade espalhada pelo objeto em termos de unidades de intensidade espalhada por um elétron livre seria $\frac{I_0}{I_{eTh}} = f^2$ onde f é o fator de espalhamento do objeto.

De acordo com esta nova convenção:

$$F(r^*) = \sum_{j=1}^N f_j \exp(2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}) \quad (1.4)$$

e para uma distribuição contínua de carga:

$$F(r^*) = \int_V \rho(\vec{r}) \exp(2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}) d\vec{r} \quad (1.5)$$

1.4.2 Espalhamento por uma molécula ou por uma cela unitária

Seja $\rho_j(\vec{r}-\vec{r}_j)$ a densidade eletrônica do j -ésimo átomo localizado na posição \vec{r}_j , então a densidade eletrônica de uma molécula de N átomos ou uma cela unitária contendo N átomos é:

$$F_M(r^*) = \int_S \sum_j \rho_j(\vec{r}-\vec{r}_j) \exp(2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}) d\vec{r} \quad (1.6)$$

$$= \sum_{j=1}^N \int_S \rho_j(R_j) \exp(2\pi i r^* \cdot (\vec{r}_j + \vec{R}_j)) d\vec{R}_j \quad (1.7)$$

$$= \sum_{j=1}^N f_j(r^*) \exp(2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}_j) \quad (1.8)$$

onde $f_j(r^*)$ é o fator de espalhamento do j -ésimo átomo (fator térmico incluso).

1.4.3 Espalhamento por um cristal

Uma rede tridimensional infinita pode ser representada pela função rede:

$$L(\vec{r}) = \sum_{uvw=-\infty}^{+\infty} \delta(\vec{r} - \vec{r}_{uvw}) \quad (1.9)$$

onde δ é função delta de Dirac e $\vec{r}_{uvw} = u\vec{a} + v\vec{b} + w\vec{c}$ (u, v e w inteiros) é o vetor genérico da rede. Supondo que $\rho_M(\vec{r})$ descreve a densidade eletrônica do interior de uma cela unitária de uma rede tridimensional infinita, então, a função densidade eletrônica para o cristal total é a convolução das funções $L(\vec{r})$ e $\rho_M(\vec{r})$:

$$\rho_\infty = \rho_M(\vec{r}) * L(\vec{r}) \quad (1.10)$$

Assim, a amplitude de onda espalhada pelo cristal é:

$$F_\infty(\vec{r}^*) = T[\rho_M(\vec{r})].T[L(\vec{r})] \quad (1.11)$$

$$= F_M(\vec{r}^*) \frac{1}{V} \cdot \sum_{hkl=-\infty}^{+\infty} \delta(\vec{r}^* - \vec{r}_H^*) \quad (1.12)$$

$$= \frac{1}{V} \cdot F_M(H) \cdot \sum_{hkl=-\infty}^{+\infty} \delta(\vec{r}^* - \vec{r}_H^*) \quad (1.13)$$

onde $T[]$ é o operador transformada de Fourier, V é o volume da cela unitária e $\vec{r}_H^* = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*$ é o vetor genérico da rede recíproca. O

produto escalar de $\vec{r}_H^* = \vec{r}$ por \vec{a}, \vec{b} e \vec{c} fornece:

$$\begin{aligned} \vec{a} \cdot (\vec{s} - \vec{s}_0) &= h\lambda \\ \vec{b} \cdot (\vec{s} - \vec{s}_0) &= k\lambda \\ \vec{c} \cdot (\vec{s} - \vec{s}_0) &= l\lambda \end{aligned} \quad (1.14)$$

que são as condições de difração de Laue.

1.5 Lei de Bragg e Construção de Ewald (Giacovazzo *et al.* 1992)

Um método qualitativo simples para se obter as condições de reflexão foi proposto por W. L. Bragg, que considerou a difração como conseqüência da reflexão do feixe de raios-X pelos planos da rede pertencentes à mesma família. Na Figura 1.8, seja θ o ângulo entre o feixe primário e uma dada família de planos de índice de Miller h , k e l . A diferença de caminho entre as ondas espalhadas nos pontos D e B é:

$$AB + BC = 2d \operatorname{sen}\theta \quad (1.15)$$

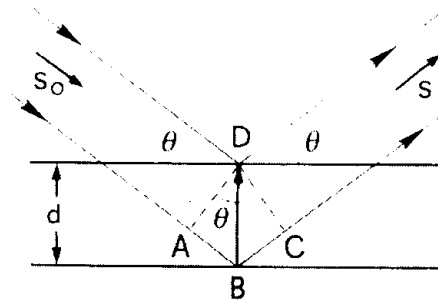


Figura 1.8: Reflexão de raios-X em dois planos da rede pertencentes a mesma família. d é a distância interplanar (extraído de Giacovazzo *et al.* 1992).

Se esta diferença de caminho é um número inteiro n de comprimento de onda, então as ondas interferem com um máximo de superposição:

$$2d_H \operatorname{sen}\theta = n\lambda \quad (1.16)$$

Outra maneira usual de se interpretar a difração de raios-X foi proposta por P. P. Ewald. Na Figura 1.9, dada uma esfera de raio $1/\lambda$

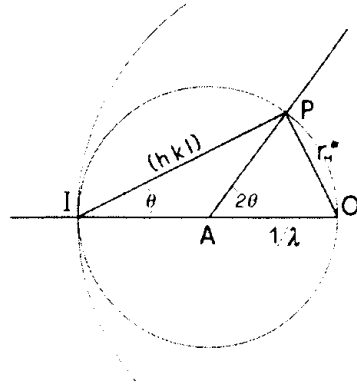


Figura 1.9: Construção de Ewald (extraído de Giacovazzo *et al.*1992).

na qual IO é o caminho percorrido pelo feixe primário e O é a origem da rede recíproca. Quando o vetor do espaço recíproco \vec{r}_H^* toca a superfície da esfera, então o plano da rede direta correspondente estará paralelo a IP fazendo um ângulo θ com o feixe primário. Assim:

$$OP = r_H^* = \frac{1}{d_H} = IO \sin \theta = \frac{2 \sin \theta}{\lambda} \quad (1.17)$$

que coincide com a Lei de Bragg.

Portanto, a condição necessária e suficiente para que a Lei de Bragg seja verificada para uma família de planos h , k , e l é que um ponto da rede recíproca definido pelo vetor \vec{r}_H^* toque a superfície da esfera de Ewald.

1.6 A Função de Patterson

A função de Patterson é definida com a auto-convolução da densidade eletrônica $\rho(\vec{r})$, isto é:

$$P(\vec{u}) = \rho(\vec{r}) * \rho(-\vec{r}) = \int_v \rho(\vec{r}) \rho(\vec{u} + \vec{r}) d\vec{r} \quad (1.17)$$

onde

$$\rho(\vec{r}) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} F(\vec{r}) \exp(-2\pi i \vec{h} \cdot \vec{r}) \quad (1.18)$$

Portanto,

$$P(\vec{u}) = \frac{1}{V} \sum_h |F_h|^2 \cos(2\pi \vec{h} \cdot \vec{u}) \quad (1.19)$$

A função de Patterson é centro simétrica e apresenta máximos correspondentes aos possíveis vetores interatômicos no interior da cela unitária; a altura de cada pico é proporcional ao produto dos números atômicos dos átomos interligados por \vec{u} .

1.7 O método de oscilação

No experimento de difração de raios-X o método de oscilação é o mais utilizado na coleta de dados. Este método é constituído de um movimento de rotação do cristal sobre um de seus eixos. A rotação do eixo é normal ao feixe de raios-X e as reflexões são gravadas num detetor plano também normal a direção do feixe. Quando o cristal for rotacionado sobre o eixo ϕ da cabeça goniométrica, pontos individuais

da rede recíproca irão cortar a esfera de reflexão e estas reflexões serão gravadas no detetor (Figura 1.10).

Dados tridimensionais são coletados tomando-se uma série de fotografias de pequenos ângulos de oscilação ($\Delta\phi = 0,5^\circ - 3^\circ$). Desta maneira, uma mesma reflexão é posta em condição de difração inúmeras vezes, provocando uma impressão mais escura no detetor, o que permite a coleta de reflexões menos intensas. Alguns "spots" são parcialmente gravados no detetor devido ao fato de estarem muito próximos do início ou do fim da faixa de oscilação, o que implica que a porção remanescente da reflexão seja gravada em filmes adjacentes.

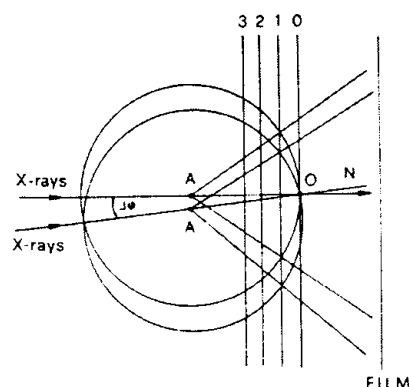


Figura 1.10: O movimento de oscilação do espaço recíproco. Aqui os planos da rede recíproca estão fixos e a esfera de Ewald gira sobre o ponto O de $\Delta\phi$, AO é a direção do feixe incidente. A interseção da esfera de Ewald com os planos da rede recíproca dá origem as reflexões que são gravadas no detetor (extraído de Giacovazzo 1992).

O ângulo de oscilação através do qual é necessário girar o cristal para a coleta do espaço recíproco até uma dada resolução é dado por $\phi = 180^\circ + 2\theta_{\max}$. Se o cristal possui simetria então este ângulo é menor que 180° .

O ângulo de oscilação ideal $\Delta\phi$ é escolhido de maneira a permitir um número máximo de reflexões com um número mínimo de sobreposições. Para um dado ângulo de oscilação, eventualmente duas ou mais reflexões oriundas de planos diferentes podem atingir o mesmo ponto do detetor (“overlap”).

1.8 Função de auto-rotação (Tong; Rossmann 1997)

Dadas duas moléculas homólogas A e B, a rotação [C] que faz com que elas assumam a mesma orientação é a mesma que faz com que seus vetores interatômicos se sobreponham. O conjunto de vetores interatômicos de uma molécula é representado pela sua função de Patterson. Assim, uma função de auto-rotação ordinária (Rossmann; Blow 1962) pode ser definida como a sobreposição de uma função de Patterson e a versão rotacionada de outra função de Patterson:

$$R([C]) = \int_r P_A(u) \cdot P_B([C]u) du \quad (1.20)$$

onde [C] é uma matriz de rotação.

O volume de integração é usualmente uma esfera centrada na origem do Patterson, cujo raio pode ser escolhido de maneira a excluir os vetores entre átomos de diferentes moléculas do cristal que geralmente são maiores que os intramoleculares.

A matriz de rotação [C] é usualmente representada por um conjunto de ângulos polares (ϕ, ψ, κ) ou Eulerianos ($\theta_1, \theta_2, \theta_3$). Em

ambos os sistemas, o significado de cada ângulo depende da convenção que utilizada.

É esperado que a função de rotação R alcance seu máximo quando a rotação $[C]$ é tal que as duas moléculas se sobrepõem. Na prática, o espaço rotacional é dividido em pontos nos quais a função é calculada.

As funções de rotação podem ser classificadas pela maneira como são calculadas. A função de rotação pode ser rápida, quando as funções de Patterson a serem sobrepostas são expandidas em termos de esféricos harmônicos, o que diminuir consideravelmente o tempo de cálculo; ou lenta, quando a função é calculada através da integração direta da equação 1.20. As funções de rotação podem também ser classificadas de acordo com a origem das funções de Patterson a serem sobrepostas. Caso elas sejam calculadas a partir da mesma molécula, a função R é dita de auto-rotação. E caso as funções de Patterson sejam oriundas de moléculas diferentes, R é denominada função de rotação cruzada.

1.8.1 A Função de Rotação Rápida

Na função de rotação do tipo rápida as funções de Patterson são expandidas em termos de esféricos harmônicos:

$$S_{lmn}(r, \theta, \phi) = f_l(k_{ln} r) Y_l^m(\theta, \phi) \quad (1.21)$$

de maneira que:

$$P_A(r, \theta, \phi) = \sum_{lmn} a_{lmn} S_{lmn} \quad (1.22)$$

$$P_B(r, \theta, \phi) = \sum_{l'm'n'} b_{l'm'n'}^* \cdot S_{l'm'n'}^* \quad (1.23)$$

onde f_l é a função esférica de Bessel normalizada, onde l e K_{ln} são escolhidos tal que $f_l(k_{ln}R) = 0$. Y_l^m são os esféricos harmônicos normalizados. Os coeficientes de expansão podem ser calculados por:

$$a_{lmn} = \sum_h F_h^2 T_{lmn}(h) \quad (1.24)$$

onde T_{lmn} é a transformada de Fourier de S_{lmn} .

Com as expansões para as funções de Patterson e algumas propriedades dos esféricos harmônicos, a equação 1.21 pode ser simplificada:

$$R(\theta_1, \theta_2, \theta_3) = \sum_m \sum_{m'} f'_{lmn}(\theta_2) e^{-im\theta_1} e^{-im'\theta_3} \quad (1.25)$$

onde a rotação é representada por um conjunto de ângulos Eurlianos $(\theta_1, \theta_2, \theta_3)$ e a função f'_{lmn} só depende de θ_2 . Portanto, dado qualquer que seja θ_2 , a equação pode ser calculada por transformada de Fourier rápida (Brigham 1974).

1.9 Produção de derivados isomorfos de átomos pesados

Os métodos utilizados para a derivação de fases *ab initio* (Blundell; Johnson 1976, Ke 1997) são a substituição isomórfica múltipla (MIR de "Multiple Isomorphous Replacement"), a dispersão

anômala a múltiplos comprimentos de onda (MAD de “Multwavelength Anomalous Diffraction”) e a combinação das duas técnicas. Tais métodos requerem a incorporação de átomos pesados no interior da macromolécula, de maneira a modificar os fatores de estrutura observados. A localização das posições desses centros espalhadores permite a estimativa das fases dos fatores de estruturas da molécula estudada.

A maioria dos derivados são produzidos por difusão direta de soluções contendo compostos de átomos pesados em cristais previamente preparados de proteína nativa. Basicamente três variáveis devem ser determinadas: a espécie de metal a ser utilizada, a sua concentração e o tempo de “soaking”. Muitas vezes a escolha de uma solução de estabilização diferente daquela na qual o cristal foi crescido, pode aumentar o número de compostos a serem testados (Rould 1997). A procura em bancos de dados (Islam *et al.* 1998) por combinações de átomos pesados, pH, tampões e concentrações de precipitante pode ser muito útil. E, em alguns casos, a presença de um aminoácido particular na seqüência primária da proteína pode sugerir uma modificação covalente, por exemplo, a reação de grupos sulfidril da cisteína com o mercúrio. De fato, isso pode ocorrer, pois a desacetilase possui três grupos tiol, de um total de oito por subunidade, que são reativos e que são modificados por metil iodeto sem significantes alterações de seus parâmetros cinéticos (Souza *et al.* 1997). Modificações covalentes antes da cristalização (cocrystalização) podem ser tentadas, entretanto esta pré-reação pode

promover mudanças conformacionais na proteína e a cristalização freqüentemente ocorre em uma forma diferente ou não isomórfica (Blundell; Johnson 1976, Petsko 1985).

Uma técnica que tem sido aplicada com muito sucesso é a mutagênese sítio dirigida para troca de metioninas por seleno-metioninas (Hendrickson *et al.* 1990) e mais recentemente por teluro-metioninas (Budisa *et al.* 1997). É uma possibilidade a ser considerada já que a proteína em questão é produto de expressão gênica.

2 Objetivos

A análise da estrutura tridimensional de proteínas tem contribuído muito para o entendimento de inúmeros processos biológicos que, a despeito de poderem ser verificados a décadas, não podiam, entretanto, ser estudados com o nível de detalhamento que a cristalografia de macromoléculas pode proporcionar. Nesse contexto, este projeto é parte de um projeto ainda maior, cujo objetivo é determinar a estrutura tridimensional da GlcNAc6P desacetilase e relacionar a estrutura às funções desempenhadas pela mesma propondo o seu mecanismo de catálise enzimático. Portanto, os objetivos do corrente projeto são:

- purificação e cristalização da enzima;
- caracterização dos seus cristais;
- coleta e processamento de dados;
- e obtenção de derivados isomorfos de átomos pesados para a determinação das fases.

3 Materiais e Métodos

3.1 Equipamentos e reagentes

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida foram realizados pelo método de Laemmli (1970) com a cuba e a poliacrilamida da Gibco[®], e a fonte da Pharmacia Biotech[®] com tensão constante de 140 V. As amostras de proteína foram tratadas com SDS (dodecilsulfato de sódio) da Sigma Chemicals Company[®]. Após o experimento os géis foram corados com coomassie da Sigma[®]. Os marcadores de massa molecular utilizados foram: soro Albumina Bovina (BSA) de 66 kDa da Riedel-de-Haën[®]; Ovo Albumina (OVA) de 45 kDa, Anidrase Carbônica Bovina (ACB) de 29 kDa, Inibidor de Tripsina de Soja (ITS) de 20 kDa e Citocromo C (CIT C) de 12 kDa da Sigma[®]; e Inibidor de Calicreína (IK) de 6 kDa.

Os experimentos de ultrafiltração em gel foram realizados com o equipamento Äkta Explorer 10 da Pharmacia Biotech[®] com a coluna preparativa Superdex HiLoad 200 de diâmetro interno de 16 mm e comprimento de 60 cm – faixa de separação entre 10 kDa e 600 kDa.

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados com o espectropolarímetro J720 da Jasco[®].

Os experimentos de difusão de vapor em camada de óleo foram realizados com óleo de silicone e de parafina da Hampton Research[®].

Experimentos preliminares de difração de raios-X para caracterização dos cristais foram realizados em fonte convencional de ânodo rotatório RU-200, radiação K_{α} de Cu (cobre) de comprimento de onda de 1,5408 Å,

monocromatizada por cristal de grafite acoplado ao detetor de área RAXIS-IIC.

Experimentos de difração de raios-X também foram realizados na linha de feixe da estação de Cristalografia de Proteínas (Polikarpov *et al.*, 1997) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Os dados de difração foram coletados com detetor Mar345 Image Plate Detector System[®].

A tabela 2.1 apresenta a procedência dos reagentes utilizados nos experimentos de cristalização, na produção de derivados de átomos pesados e na manufatura dos tampões.

Os fatorias utilizados nos experimentos de cristalização foram: Crystal Screen I e II, Grid Screen MPD , Grid Screen PEG 6000 , Grid Screen PEG 6000/Cloreto de lítio, Grid Screen Sulfato de amônia e Grid Screen Cloreto de sódio (vide soluções em Anexo I).

No experimento de determinação da concentração do precipitante alternativo da solução de estabilização, as alterações de volume das gotas foram medidas com micro seringa Exmire 10 μ L da Ito Corporation[®].

A água utilizada para o preparo das soluções foi obtida em um sistema Milli – Q_{plus} da Millipore[®]. Os valores de pH dos tampões foram medidos com o pHmetro Φ 310 da Beckman[®].

Tabela 3.1: Procedência dos reagentes utilizados nos experimentos.

Reagente	Procedência
Acetato de fenilmercúrio	Sigma [®]
Acetato de mercúrio	Aldrich [®]
Acetato de sódio (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Merck [®]
Ácido clorídrico (HCl)	Merck [®]
Ácido cloromercuribenzóico	Aldrich [®]
Ácido 4-cloromercuribenzenosulfônico (monosódico)	Fluka [®]
Ácido etilmercurisalicílico	Aldrich [®]
Ácido mersalil	Aldrich [®]
Ácido p-hidroximercuribenzóico	Sigma [®]
Cianeto de mercúrio II	Aldrich [®]
Cloreto de mercúrio	Sigma [®]
Cloreto de metilmercúrio	Strem Chemicals [®]
Cloreto de sódio (NaCl)	Merck [®]
Dihidrogênio fosfato de sódio hidratado (NaH ₂ SO ₄ .12H ₂ O)	Merck [®]
Etilenoglicol	Sigma [®]
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	Merck [®]
Glicerol	Mallinckrodt [®]
Hepes (N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'[2-ac. Etanosulfônico]) pK _a =7,5	Sigma [®]
Hidróxido de sódio (NaOH)	Merck [®]
Iodeto de mercúrio	Strem Chemicals
MPD 100 % (2-metil-2,4-pentanodiol)	Hampton Research [®]
Polietilenoglicol (H(OCH ₂ -CH ₂) _n OH) n= 8,2-9,1 PM=400	Aldrich [®]
Polietilenoglicol (H(OCH ₂ -CH ₂) _n OH) n= 29-36 PM=1500	Hampton Research [®]
Polietilenoglicol (H(OCH ₂ -CH ₂) _n OH) n= 68-84 PM=4000	Hampton Research [®]
Polietilenoglicol (H(OCH ₂ -CH ₂) _n OH) n= 158-204 PM=6000	Hampton Research [®]
Polietilenoglicol (H(OCH ₂ -CH ₂) _n OH) PM=8000	Hampton Research [®]
Sulfato de amônia ((NH ₃) ₂ SO ₄)	Merck [®]
Tartrato de sódio (C ₄ H ₄ NaO ₆)	Merck [®]
Tetratiocianato de mercúrio e cobalto (II)	Aldrich [®]
Tiocianeto de mercúrio II	Aldrich [®]
Tris (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol) pK _a =8,0	Mallinckrodt [®]

3.2 Purificação

A purificação da desacetilase foi obtida a partir de cepas de *E.coli* K12 superprodutoras (Souza *et al.* 1997), em colaboração com o Dr. Guillermo Hernandez-Mendoza do Departamento de

Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade Autônoma do México (UNAM).

3.3 Protocolo de verificação das condições da amostra

Como a proteína teve que ser transportada da Cidade do México até São Carlos, muitas vezes sob condições inadequadas, um protocolo de verificação das condições da amostra foi estabelecido.

Primeiro a verificação da pureza da amostra foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15%. Neste experimento as amostras foram tratadas com SDS e fervidas por 5 minutos a temperatura de 373 K.

Posteriormente, as amostras foram submetidas a um experimento de dicroísmo circular para verificação do enovelamento da proteína. Nestes experimentos as amostras de proteína foram diluídas a concentração de $0,1 \text{ mg}^{-1}\text{ml}$ em PBS 25 mM pH 7,3. A varredura de comprimentos de onda foi feita na faixa de ultravioleta distante entre 180 nm e 240 nm.

Experimentos de ultrafiltração em gel também foram realizados na tentativa de remover contaminações da amostra. Estes experimentos foram realizados com fluxo de 10 ml min^{-1} sendo as frações coletadas com o volume de 1 ml e monitoradas por absorção do comprimento de onda de 280 nm; o tampão de corrida utilizado foi o PBS 150 mM pH 7,4 e o volume de amostra injetado foi de 1 ml a concentração de 10 mg ml^{-1} de enzima.

3.4 Cristalização

A metodologia empregada na cristalização da N-acetilglicosamina 6-fosfato desacetilase foi a difusão de vapor em gota suspensa. Todos os ensaios foram realizados nas temperaturas de 293 K e 289 K com gotas de 10 μL de volume total preparadas misturando-se 5 μL da solução contendo a enzima com 5 μL da solução do reservatório contendo o agente precipitante. A concentração da solução de proteína utilizada nos testes foi de 10 mg ml^{-1} em PBS 150 mM pH 7,4.

A abordagem inicial ao problema da cristalização foi à procura em bancos de dados por condições de cristalização de proteínas pertencentes à mesma família ou semelhantes. Para tanto, foi utilizado o programa de alinhamento de sequências primárias BLAST (Madden *et al.* 1996) no banco de dados NCBI (National Centre for Biological Information) e a consulta direta no banco de dados de cristalização BMCD (Biological Macromolecules Crystallization Database).

Uma segunda estratégia utilizada foi a determinação do limite de solubilidade da desacetilase através de testes de precipitação reversível com sulfato de amônia $((\text{NH}_3)\text{SO}_4)$. A partir deste ponto, experimentos de cristalização foram realizados a partir de uma solução estoque saturada de $(\text{NH}_3)\text{SO}_4$ diluída entre concentrações de 30% (V/V) e 60% (V/V), nos tampões Hepes/NaOH 100 mM, Tris/HCl 100 mM e fosfato salino 150 mM. Nestes experimentos o

pH dos tampões foi variado em incrementos de 0,5 unidade ao longo de suas respectivas faixas de tamponação.

Uma outra abordagem foi feita empregando-se o método de matriz esparsa ou de fatorial incompleto, no qual entre as condições testadas do espaço amostral, cada variável particular de cristalização é ao menos uma vez ensaiada (Jancarike; Kim 1991). Nestes ensaios foram utilizados os fatores citados no item 2.1.

Finalmente, uma terceira série de experimentos de cristalização foi realizada utilizando-se o dihidrogênio sulfato de sódio hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), sendo o pH variado em incrementos de 0,1 unidade.

Um protocolo padrão de otimização das condições de cristalização foi estabelecido:

- refinamento da condição inicial com incrementos menores da concentração de precipitante e de pH;
- ajuste da concentração da enzima;
- troca do agente precipitante;
- adição ou substituição de/para precipitantes do tipo glicerol, etilenoglicol e polietilenoglicol;
- difusão de vapor em camada de óleo (Chayen 1997);
- recristalização;
- alteração da metodologia empregada para sanduíche de gota, "batch", difusão por interface livre e microdiálise (McPherson 198, Ducruix; Giegé 1992) e acupuntura em gel (Moreno; Soriano-García 1999).

Em alguns casos a quantidade de proteína na gota pode não ser suficiente para que o cristal cresça e atinja dimensões adequadas para o experimento de difração; em outros, o excesso pode causar precipitação amorfa induzindo imperfeições nos cristais.

A troca ou mesmo a adição de outros tipos de precipitante, a adição de camada de óleo e a mudança da metodologia empregada alteram a cinética de cristalização, resultando muitas vezes num melhoramento das qualidades do cristal.

3.5 Coleta de dados

3.5.1 Preparação dos cristais

Os cristais utilizados na coleta de dados por difração de raios-X foram instantaneamente congelados a temperatura de 100 K. Inicialmente os cristais foram transferidos por alguns minutos para uma solução crioprotetora composta por 20 % (V/V) de glicerol e pela solução do reservatório, sendo diretamente montados em “loops” sobre a cabeça goniométrica centrada no feixe de nitrogênio gasoso (Garmam; Schneider 1997). A técnica de “annealing” foi implementada objetivando o melhoramento do padrão de difração (Harp *et al.* 1998).

3.5.2 O experimento de difração

Os experimentos de difração de raios-X foram realizados utilizando-se o método de oscilação descrito no item 1.7 sendo os cristais preparados conforme o item 3.5.1.

A caracterização inicial dos cristais foi feita em fonte convencional de ânodo através da coleta de imagens de $0,5^\circ$ de oscilação com distância cristal-detetor adequada aos parâmetros de rede dos cristais e a resolução máxima atingida.

Objetivando o melhoramento da qualidade dos dados, experimentos de difração de raios-X foram realizados na linha de feixe da estação de Cristalografia de Proteínas (Polikarpov *et al.* 1997) do LNLS onde um conjunto completo de dados foi coletado através de imagens de $0,5^\circ$ de oscilação com distância cristal-detetor também adequada aos parâmetros de rede dos cristais e a resolução máxima atingida. O comprimento de onda utilizado foi de $1,378 \text{ \AA}$, cuja escolha foi determinada pelo balanço entre a minimização dos efeitos de absorção e maximização do fluxo no espectro disponível pela linha (Polikarpov *et al.* 1998).

3.6 Processamento dos dados

As intensidades das reflexões coletadas nos experimentos de difração foram indexadas e escalonadas com os programas

DENZO e SCALEPACK (Otwinowski; Minor 1997) respectivamente.

Na tentativa de se determinar o conteúdo da cela unitária e a simetria não-cristalografica, várias funções de auto-rotação foram calculadas para raios de integração entre 15 Å e 40 Å, incluindo dados entre resoluções de: 20 Å e 2,0 Å; 20 Å e 2,5; 20 Å e 3,0 Å; e 20 Å e 3,5 Å. Condições com fatores de estrutura normalizados e remoção de origem também foram testadas. Para tanto, foram utilizados os programas AMORE (Navaza 1994), ALMN (Dodson 1985) e POLARRFN, do pacote CCP4 (Dodson 1994) e GLRF do pacote REPLACE (Tong; Rossmann 1997).

3.7 Produção de derivados isomorfos de átomos pesados

Os experimentos de alinhamento de sequência de desacetilase com outras proteínas de estrutura tridimensional conhecida não mostraram homologia significativa. Dada a inexistência de um modelo inicial de fases para substituição molecular, o caminho natural foi a obtenção de derivados isomorfos de átomos pesados.

O experimento básico de produção de derivados isomorfos consiste na transferência do cristal nativo para uma solução contendo o átomo pesado escolhido. Tal solução pode ser a própria solução mãe ou uma solução de estabilização com precipitante diferente.

Os primeiros ensaios utilizando-se a solução mãe foram realizados com os seguintes reagentes: ácido cloromercuribenzóico, ácido

etilmercurisalicílico, ácido p-hidroximercuribenzóico, acetato de mercúrio, cianeto de mercúrio II, tiocianeto de mercúrio II, tetratiocianato de mercúrio e cobalto (II), cloreto de mercúrio, ácido mersalil, acetato de fenilmercúrio, ácido 4-cloromercuribenzenosulfônico (monosódico), iodeto de mercúrio e cloreto de metilmercúrio.

Como já mencionado, sais de fosfato interferem na solubilidade de potenciais reagentes de átomos pesados. Com o intuito de se aumentar o número de reagentes de átomos pesados a serem testados, optou-se pela busca de uma solução de estabilização diferente daquela na qual o cristal foi obtido. A diferença crucial entre a solução mãe e a solução de estabilização é que a primeira contém uma concentração de proteína remanescente (Rould 1997), de maneira que a solução de estabilização deve compensar a ausência deste ingrediente chave. Para se estabelecer tais condições, foi utilizado um protocolo, o qual a suposição básica é simples. É assumido que, para que a integridade dos cristais seja mantida em diferentes solventes, a solução contendo o precipitante alternativo não deve retirar água do cristal e nem doar água para o cristal (Schruder 1988). O protocolo consiste em colocar em equilíbrio gotas de volumes iguais, contendo o precipitante alternativo, em contato com reservatórios contendo concentrações crescentes do precipitante original. Depois de alguns dias, a concentração da gota que não apresentou variação do volume inicial será a concentração da solução do novo precipitante para a qual o cristal será transferido. O volume inicial das gotas foi de 10

μL e as alterações de volume foram medidas com micro seringa em quatro gotas diferentes para cada condições

A transferência do cristal da solução mãe para a solução de estabilização foi feita através da transferência do cristal por gotas de soluções intermediárias (de 20 a 30 soluções)* de concentrações decrescentes do precipitante original e crescentes do novo precipitante (Ray *et al.* 1991). As transferências entre as soluções intermediárias foram feitas em intervalos de 4 minutos para a difusão da solução pelo cristal. Este experimento foi realizado com os precipitantes glicerol, polietilenoglicol PEG 4000, PEG 6000, PEG 8000/glicina (2:1), Tartrato de sódio, Cloreto de sódio e MPD (todos em solução PBS 150 mM pH 7,4).

3.7.1 “Screening” de Derivados

A estratégia empregada para o “screening” de derivados compreendeu 4 estágios (Petsko 1985), sendo aplicada a vários reagentes simultaneamente:

- usando cristais menores e de pior qualidade, e partindo da concentração de 10 mM, o primeiro teste foi a verificação da degradação visível do cristal para um tempo de “soaking” de 12 horas. Nos casos afirmativos, a concentração do reagente e/ou

* as gotas foram previamente equilibradas contra a solução original, pois o método utilizado para determinar a concentração do agente precipitante substituto possui erro.

tempo de “soaking” foram diminuídos e o teste era aplicado novamente.

- os cristais que sobreviveram ao 1º estágio passaram para o experimento de difração. Quando apenas reflexões de baixa resolução eram observadas ou um aumento apreciável de mosaicidade era detectado, a concentração do reagente era novamente diminuída.
- com os cristais que difrataram, foi feita uma coleta de dados de três imagens de 1º de oscilação. Estes dados foram então comparados com o conjunto de dados nativo, para a verificação da presença de diferenças isomórficas. Para tanto, foi utilizado como critério preliminar o χ^2 * resultante da promediação dos dados. Se $\chi^2 \approx 1$, então obviamente não há diferenças isomórficas; se χ^2 é muito grande, tipicamente 50, o derivado é dito não-isomórfico. Entretanto, se o $\chi^2 \approx 10$, então as diferenças isomórficas são maiores que os erros esperados, e isto indica um derivado em potencial. Nos casos em que o $\chi^2 \approx 2$ trata-se de um derivado com baixa substituição e, portanto, de pouco poder para derivação das fases.
- nas condições em que diferenças isomórficas foram detectadas, um conjunto completo de dados foi coletado, utilizando-se cristais maiores e de melhor qualidade.

$$** \chi^2 = \sum_{hkl} \frac{(I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle)^2}{\text{Erro}^2 \frac{n}{n-1}}$$

3.7.2 Qualidade dos derivados

Vários são os critérios de avaliação da qualidade dos derivados e do seu poder de fornecer fases (McRee 1993). Um critério preliminar é que a intensidade média do conjunto de dados do possível derivado seja superior em 10 % àquelas do conjunto de dados nativo e o valor absoluto das diferenças, $|F_p - F_{ph}|$ (onde F_p e F_{ph} são os fatores de estrutura da proteína e do derivado, respectivamente), deve diminuir com a resolução, caso contrário o derivado é dito não-isomorfo

O poder que um derivado tem de fornecer as fases pode ser analisado através da relação entre os magnitudes das amplitudes dos átomos pesados e os seus erros $\langle F_H \rangle / \langle E \rangle$ ("phasing power"). Este número deve ser maior que 2 para um bom derivado e para derivados muito bons ele pode alcançar até 4 (McRee 1993).

Independentemente de qualquer critério adotado para a avaliação do derivado, na prática, a melhor alternativa é fazer o cálculo das fases e verificar no mapa de densidade eletrônica se é possível identificar alguma cadeia lateral da proteína.

3.7.3 Localização dos átomos pesados

O procedimento padrão para localização dos átomos pesados no interior da cela unitária é a análise das secções de Harker dos mapas de Patterson diferença. Estes mapas são obtidos a partir de síntese de Fourier, cujas fases são nulas e os coeficientes são os quadrados das diferenças dos fatores de estrutura dos conjuntos de

4 Resultados e Discussões

4.1 A qualidade da amostra

A Figura 4.1 apresenta o gel de poliacrilamida 15% utilizado para a verificação da pureza da desacetilase. Nas raias 1 e 4 tem-se os marcadores de peso molecular. Observa-se nas raias 2 e 3 em aproximadamente 41kDa a desacetilase fervida e não-fervida respectivamente. Este resultado mostra que as subunidades do tetrâmero são unidas por ligações fracas, de maneira que, embora a amostra da raia 3 não tenha sido fervida, apenas a ação do SDS foi suficiente para romper tais ligações. Ainda na raia 3, observa-se uma porção da amostra na forma tetramérica posicionada em uma região

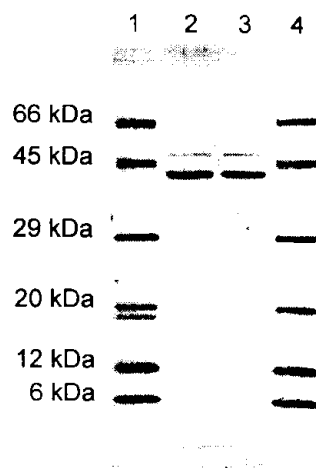


Figura 4.1: Gel de poliacrilamida 15% para verificação da pureza da amostra. Nas raias 1 e 4 têm-se os marcadores de peso molecular e nas raias 2 e 3, em aproximadamente 41kDa, observa-se a desacetilase fervida e não-fervida respectivamente.

de alto peso molecular que não ocorre na raia 2 onde a amostra foi desnaturada. Em ambas as raias, 2 e 3, observa-se a presença de um contaminante de peso molecular superior a 45 kDa. Em experimentos de ultrafiltração em gel, não foi observado nenhum pico correspondente ao peso molecular do suposto contaminante, levantando a hipótese de que ele seja também um oligômero (Figura 4.2). Por outro lado, apenas um pico foi observado no cromatograma, mas provavelmente, devido à resolução da coluna. Nesta etapa a presença do contaminante foi ignorada devido a sua proporção em relação à quantidade de desacetilase no gel.

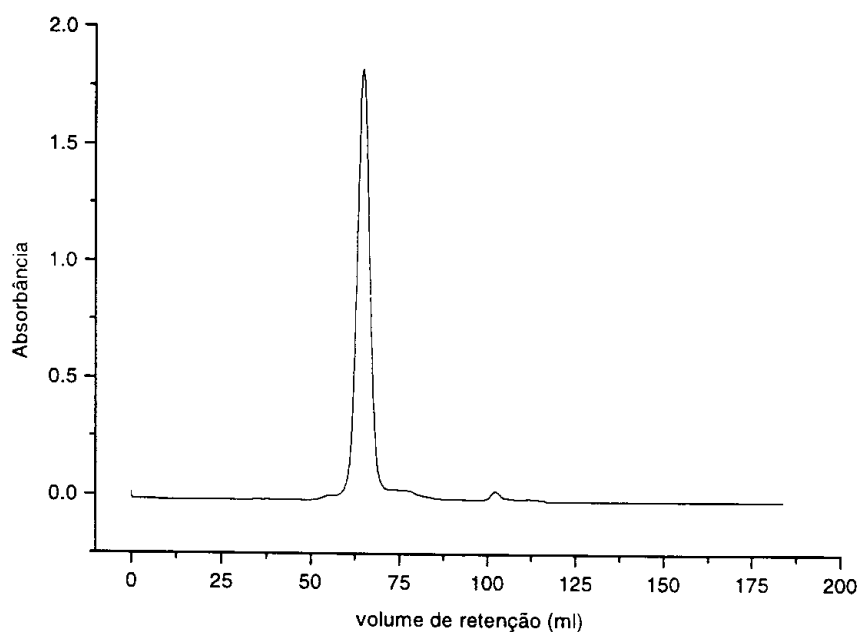


Figura 4.2: Cromatograma de ultra filtração da desacetilase realizado em PBS 150 mM pH 7,4 em coluna Superdex HiLoad S200. A observação de um único pico levanta a hipótese de que o contaminante seja também um oligômero como a desacetilase.

A Figura 4.3 apresenta o gel de poliacrilamida 15% dos três lotes de proteína recebidos. Nas raias 1, 4, 7, e 10 tem-se os marcadores de peso molecular. Nas raias 2 e 3 observa-se a desacetilase não-fervida e fervida, respectivamente com um ano e com dois meses de armazenamento, nas raias 5 e 6 com quatro meses e nas raias 8 e 9 com menos de 10 dias de armazenamento. Nenhuma alteração apreciável da proteína dos três lotes foi verificada.

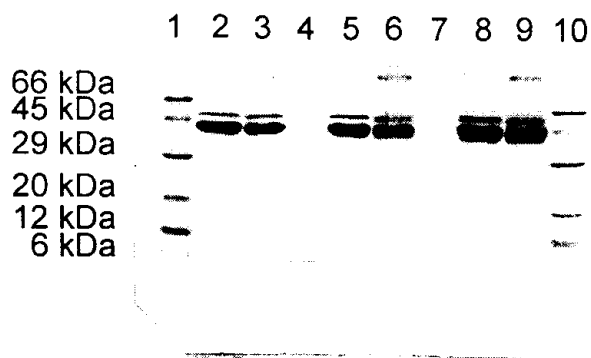


Figura 4.3: Gel de poliacrilamida 15% para comparação dos três lotes de proteína recebidos. Nas raias 1, 4, 7, e 10 tem-se os marcadores de peso molecular. Nas raias 2 e 3 observa-se a desacetilase não-fervida e fervida, respectivamente com um ano e com dois meses de armazenamento, nas raias 5 e 6 com quatro meses e nas raias 8 e 9 com menos de 10 dias de armazenamento. Nenhuma alteração das condições da amostra foi observada.

Os experimentos de dicroísmo circular realizados com os três lotes de desacetilase recebidos apresentaram invariavelmente a mesma curva (Figura 4.4) mostrando que a proteína utilizada nos experimentos de cristalização manteve o seu enovelamento original (Figura 4.5).

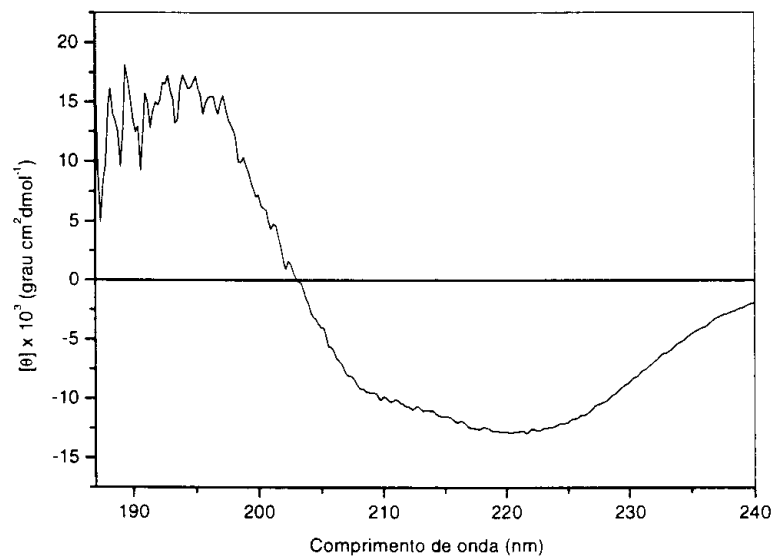


Figura 4.4: Espectro de dicroísmo circular da desacetilase para verificação do envelhecimento da desacetilase. As amostras foram diluídas a concentração de 0,1 mg⁻¹ml em solução tampão fosfato 25 mM pH 7,3.

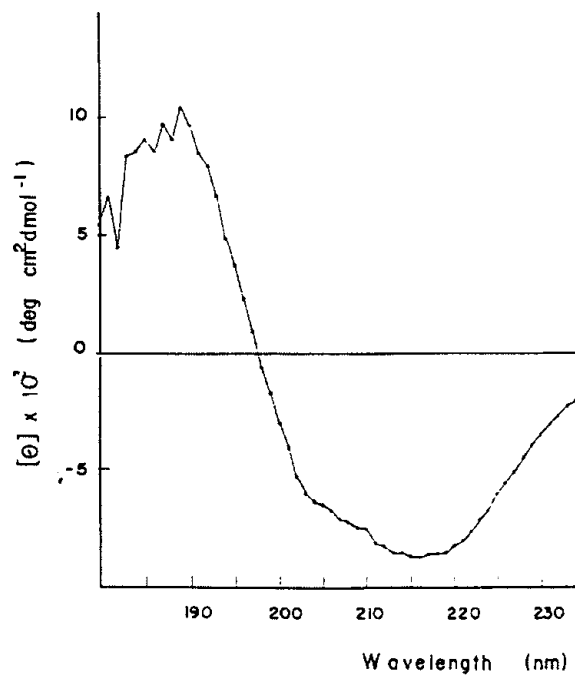


Figura 4.5: Espectro de dicroísmo circular da desacetilase (Souza *et al.* 1997).

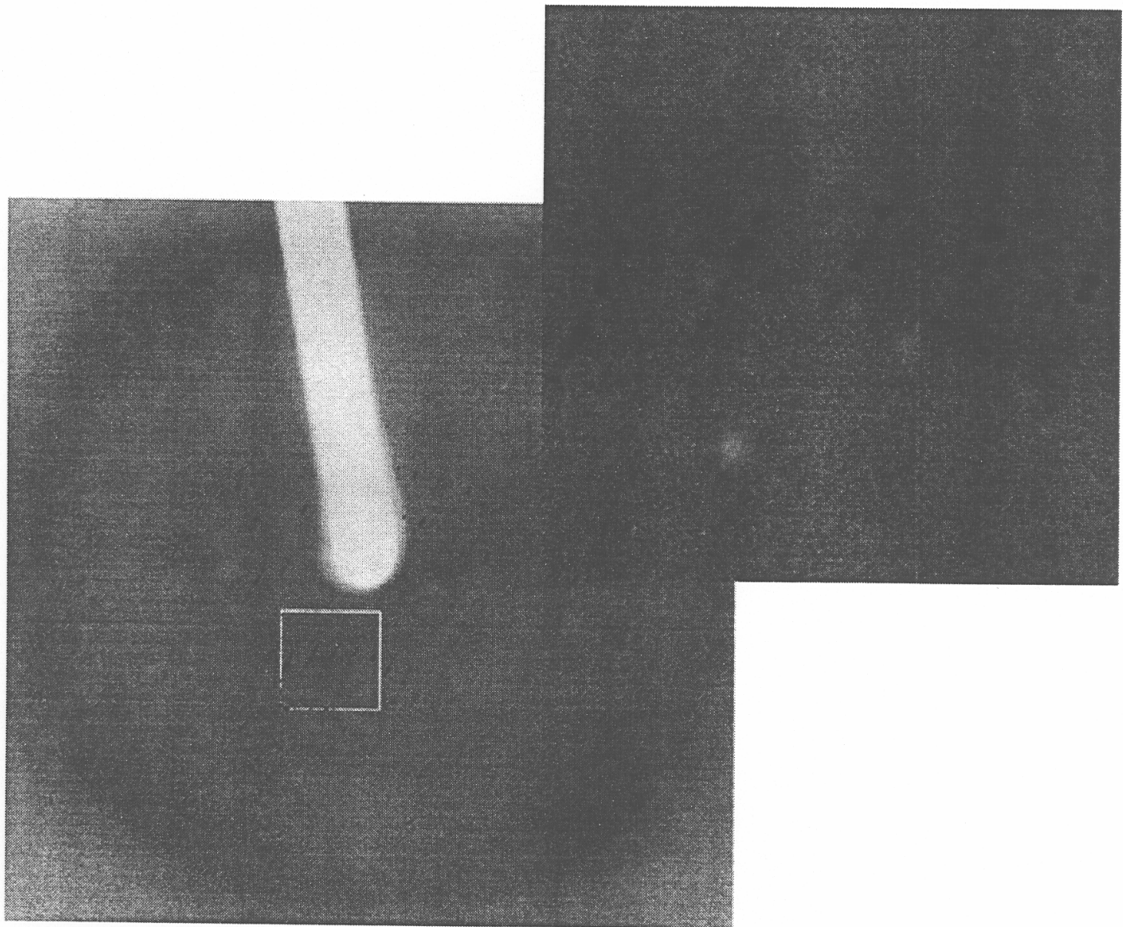


Figura 4.15: Padrão de difração típico dos cristais de FCI crescidos em 4 % de PEG 4000 em Acetato de sódio 150 mM pH 5,3. Fonte convencional com distância cristal-detetor de 200 mm e oscilação de $0,5^\circ$. Resolução máxima de $2,7 \text{ \AA}$ na direção da diagonal da figura. À direita e acima: ampliação do quadrado da figura principal – parâmetro de rede de 490 \AA .

uma diminuição do parâmetro de rede c passando à $465,23 \text{ \AA}$. Os da FCI cristais obtidos em PEG 400 e pelo método de difusão de vapor em sanduíche de gota não tiveram um número suficiente de reflexões para a determinação dos parâmetros de rede.

Experimentos de difração de raios-X em fonte convencional foram realizados com cristais da FCII de dimensões $0,5 \times 0,3 \times 0,2 \text{ mm}^3$ crescidos em 1,80 M de dihidrogênio Fosfato de sódio pH 4,0. O padrão de difração (Figura 4.16) apresentou simetria de Laue ortorrômbica e as ausências

sistemáticas indicaram que os cristais pertencem ao grupo espacial $P2_12_12$ com parâmetros de rede $a = 80,77(1) \text{ \AA}$, $b = 113,83(2) \text{ \AA}$ e $c = 79,72(2) \text{ \AA}$. Os desvios padrões foram estimados a partir de 304 reflexões de uma imagem de $0,5^\circ$. A resolução máxima atingida foi de $2,4 \text{ \AA}$.

Nos experimentos de difração de raios-X realizados na estação de Cristalografia de Proteínas do LNLS, cristais da FCII de dimensões $0,9 \times 0,6 \times 0,4 \text{ mm}^3$ difrataram a uma resolução máxima de $1,8 \text{ \AA}$. Tais experimentos proporcionaram um aumento significativo da resolução em relação àqueles realizados em fonte convencional. Os parâmetros de rede determinados foram $a=82,09(2) \text{ \AA}$, $b=114,50(1) \text{ \AA}$ e $c=80,17(1) \text{ \AA}$ com os desvios padrões estimados a partir de 2052 reflexões de uma imagem de $0,5^\circ$ de oscilações (Figura 4.17). A partir destes resultados, um conjunto completo de dados foi coletado em 193 imagens de $0,5$ graus de oscilação com a distância cristal-detetor de 150 mm . Neste experimento o emprego da técnica de "anneiling" foi também um fator importante para obtenção de dados de alta resolução.

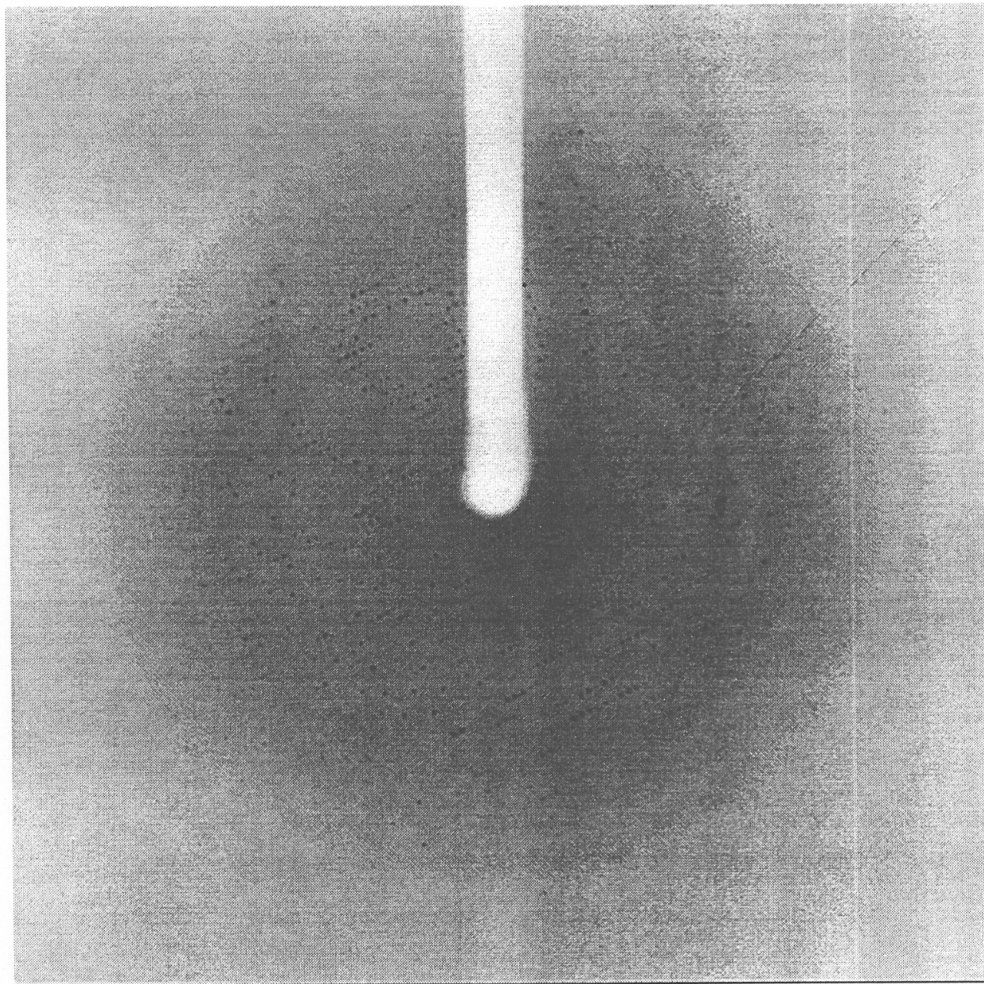


Figura 4.16: Padrão de difração típico dos cristais da FCII crescidos em 1,80 M de dihidrogênio Fosfato de sódio pH 4,0. Fonte convencional com distância cristal-detetor de 120 mm e oscilação de 0,5°. Resolução máxima de 2,4 Å.

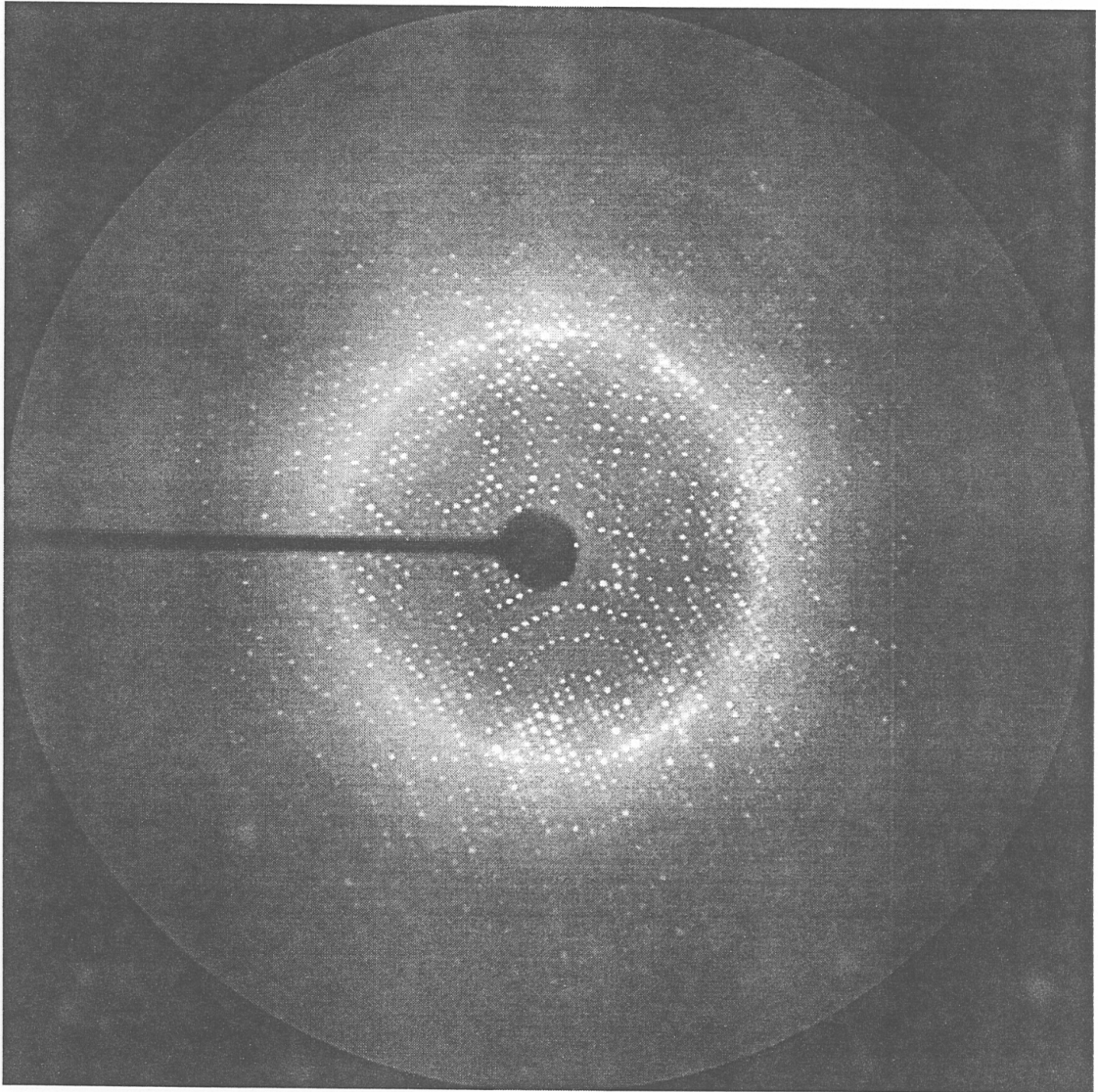


Figura 4.17: Padrão de difração típico dos cristais da FCII crescidos em 1,85 M de dihidrogênio Fosfato de sódio pH 4,0. Fonte de luz síncrotron (LNLS) com distância cristal-detetor de 150 mm e oscilação de $0,5^\circ$. Resolução máxima de 1,8 Å.

4.4 Processamento dos Dados

O conjunto de dados da FCII coletado no LNLS foi processado. Um número total de 235.298 reflexões observadas foram promediadas para a obtenção de 69.233 reflexões únicas com R_{merge} e completiza globais de 0,06 e 98,2 % respectivamente.

Tabela 4.1 Reprocessamento dos dados. 173.345 reflexões observadas e 50.702 reflexões únicas.

Resolução (Å)	Reflexões independentes	Redundância	% de reflexões c/ $I/\sigma \geq 3$	Completaza (%)	R_{merge}
30,00 – 4,93	3386	3,7	76,9	91,3	0,06
4,93 – 3,91	3296	3,7	79,1	93,5	0,05
3,91 – 3,42	3400	3,8	79,2	97,0	0,05
3,42 – 3,11	3430	3,6	76,3	99,0	0,06
3,11 – 2,88	3430	3,5	74,4	99,0	0,06
2,88 – 2,71	3429	3,4	72,1	99,0	0,08
2,71 – 2,58	3365	3,4	71,9	98,7	0,08
2,58 – 2,47	3403	3,3	71,9	98,5	0,09
2,47 – 2,37	3352	3,3	72,9	98,2	0,10
2,37 – 2,29	3346	3,3	72,5	98,4	0,10
2,29 – 2,22	3371	3,3	72,6	98,1	0,14
2,22 – 2,15	3359	3,3	73,2	98,6	0,13
2,15 – 2,10	3367	3,3	73,2	98,6	0,15
2,10 – 2,05	3378	3,2	72,3	99,3	0,18
2,05 – 2,00	3390	3,2	72,1	99,3	0,22
Global	50.702	3,4	74,6	97,7	0,06

Embora as reflexões observadas tenham se estendido até 1,8 Å de resolução, os critérios usuais de aceitação de nível de ruído (25% das reflexões c/ $I > 2\sigma(I)$) e acuracia ($R_{\text{merge}} < 0,25$) indicaram que este

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} |I - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle}$$

conjunto de dados seria melhor descrito como sendo de 2,0 Å de resolução. Assim, os dados foram reprocessados e um número total de 173.345 reflexões foram integradas até a resolução de 2 Å para obtenção de 50.702 reflexões únicas com R_{merge} e completiza globais de 0,06 e 97,7 % respectivamente. Na última faixa de resolução (2,05 - 2,00 Å), o R_{merge} é de 0,22 e a completiza é de 99% (Tabela 4.1).

4.5 A Unidade Assimétrica e Simetria não-cristalográfica

Assumindo-se dois monômeros por unidade assimétrica, o coeficiente de Matthews (V_m) é de $2,30 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, correspondente a 46,1% de solvente. Se apenas um monômero está presente, V_m é de $4,60 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ e o conteúdo de solvente é de 73,1 %.

Como já mencionado, de acordo com experimentos de sedimentação e ultrafiltração em gel, a desacetilase é ativa como um homotetrâmero (Souza et al, 1997).

Não foram encontrados picos não-cristalográficos na análise das funções de auto-rotação calculadas. A Figura 4.18 apresenta a projeção seção $\kappa = 180^\circ$ da função de auto rotação calculada e Tabela 4.2 apresenta as amplitudes dos picos encontrados e seus respectivos ângulos do eixo de rotação. Nesta função foram incluídos dados entre 20 Å e 3 Å de resolução utilizando-se um raio de integração de 15 Å. Observa-se em $\phi = 45^\circ$ e $\psi = 90^\circ$ a presença de um pico aparente, que não é observado para outras combinação de raios de integração e resolução. De fato, este pico diminui a sua intensidade com o

aumento do raio de integração e não é mais observado quando o raio de integração é de 30 Å. Tal comportamento não seria esperado, indicando que ele não deve ser um pico.

Se um dímero é o conteúdo da unidade assimétrica, então o tetrâmero poderia ser formado pelo eixo cristalográfico de ordem 2 do grupo espacial $P2_12_12$. Neste caso, os picos não-cristalográficos não seriam observados estando sobrepostos aos cristalográficos.

Se o conteúdo da unidade assimétrica é um monômero, então, não há simetria não-cristalográfica. Entretanto, esta hipótese implica que a proteína tenha sido cristalizada como um dímero, o que vai contra a evidência bioquímica de que a proteína é um tetrâmero. Ademais, alto conteúdo de solvente é incompatível com a boa ordem cristalina observada e a resistência dos cristais à radiação.

Uma terceira hipótese seria a presença de dois monômeros independentes relacionados por um eixo cristalográfico de ordem 2, aproximadamente paralelo a um dos eixos da cela. Todavia, não foram encontrados picos proeminentes nas seções de Harker do mapa de Patterson que pudessem corroborar esta última hipótese.

Finalmente, a quarta hipótese seria a presença de dois monômeros na unidade assimétrica com estruturas diferentes, o que é pouco provável, pois a proteína é um homotetrâmero.

Para que esta questão seja elucidada será necessária a determinação completa da estrutura.

Tabela 4.1: Amplitudes dos 20 maiores picos encontrados no espaço rotacional e seus respectivos ângulos em graus de orientação do eixo de rotação.

n°	ϕ	ψ	κ	Amplitude	Ampl./ σ
1	0	0	180	1000	10,15
2	0	90	180	1000	10,15
3	90	90	180	1000	10,15
4	0	180	90	314,53	3,1
5	45	90	180	314,53	3,1
6	0	0	90	314,53	3,1
7	135	90	180	314,53	3,1
8	0	75	180	260	2,54
9	180	75	180	260	2,54
10	0	15	180	260	2,54
11	180	15	180	260	2,54
12	0	156	90	247,96	2,42
13	180	156	90	247,96	2,42
14	0	24	90	247,96	2,42
15	180	24	90	247,96	2,42
16	132	75	180	243,14	2,37
17	132	105	180	243,14	2,37
18	48	105	180	243,14	2,37
19	48	75	180	243,14	2,37
20	90	156	90	236,61	2,3
21	90	24	90	236,61	2,3

4.6 Derivados

Os resultados dos experimentos de difusão de átomos pesados em cristais da FCII da desacetilase estão resumidos na Tabela 4.3. Nesta tabela estão relacionados os sais utilizados, a concentração e o tempo de “soaking” e o χ^2 resultante da adição das reflexões do derivado ao conjunto de dados nativo. A maioria dos compostos de metais pesados utilizados não se solubilizaram na solução mãe (1,79 M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)^{*} de maneira que a solução foi

^{*} o “screening” de derivados foi realizado a uma concentração de fosfato menor, na qual um maior número de núcleos foi induzido, possibilitando um maior número de testes.

considerada saturada e soluções de concentrações menores foram feitas a partir da diluição da primeira.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.3 verifica-se que a grande maioria dos compostos testados na produção de derivados não produziu diferenças isomórficas. Este fato deve-se a quantidade de fosfato e o pH da solução mãe. Resíduos como cisteínas e histidínas, outrora reativos, em pH's ácidos estão protonados e portanto não reativos.

Dentre os compostos testados destacou-se apenas o Cianeto de mercúrio II, que em aproximadamente 12 horas de "soaking" a uma concentração de 50 μ M produziu um χ^2 de 2,578. Todavia, de acordo com o critério de avaliação, esse foi considerado um derivado de pouco poder de derivação de fases.

As Tabelas 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9 apresentam os resultados obtidos nos experimentos substituição de solventes citados no item 2.7. Estas tabelas apresentam os volumes finais das gotas, as concentrações dos precipitantes alternativos e os respectivos erros de medida. A concentração de equivalência entre as concentrações de fosfato (1,79 M) e a concentração dos precipitantes alternativos são aquelas cujos os volumes finais (V_f) estão mais próximos do volume inicial das gotas (10 μ L).

Embora as concentrações dos precipitantes alternativos tivessem sido determinadas, em nenhum caso a transferência dos cristais foi bem sucedida. Invariavelmente os cristais apresentaram rachaduras antes que a concentração de fosfato alcançasse 1,5 M, mostrando que a presença de fosfato em altas concentrações é um

fator determinante para a manutenção da integridade dos cristais de desacetilase.

Tabela 4.2: Compostos utilizados nos experimentos de produção de derivados e suas respectivas concentrações, tempos de "soaking" e χ^2 resultante da comparação das reflexões dos derivados com àquelas do conjunto nativo.

Composto	tempo _{soaking} - []	χ^2
Acetato de fenilmercúrio	12 h - 1 %	1,504
Acetato de mercúrio	12 h - 1 %	0,946
Ácido cloromercuribenzóico	15 dias - 10 %	0,977
Ác. 4-cloromercuribenzenosulfônico	12 h - 2 %	1,389
Ácido etilmercurisalicílico	12 h - 1 %	1,203
Ácido mersalil	10 min. - 1 %	1,101
Ácido p-hidroximercuribenzóico	6 h - 1 %	0,992
Cianeto de mercúrio II	12 h - 50 μ M	2,587
Cloreto de mercúrio	12 h - 1 %	1,921
Cloreto de metilmercúrio	12 h - 1 %	0,956
Iodeto de mercúrio	12 h - 1 %	1,245
Tetratiocianato de mercúrio e cobalto II	1 h - 4%	1,560
Tiocianeto de mercúrio II	6 h - 1 %	1,340

Tabela 4.3: Volumes finais das gotas, concentrações do glicerol e respectivos erros de medida - concentração de equivalência 14 %.

V_f (μ L)	desv. (μ L)	Glicerol (% W/V)	Erro (%)
6,8	0,2	20	3
7,2	0,1	19	0
7,7	0,1	18	2
8,0	0,1	17	0
8,5	0,1	16	1
9,0	0,6	15	6
9,7	0,1	14	0
10,4	0,3	13	3
11,4	0,5	12	4
13,1	0,1	11	1
13,3	0,2	10	2
15,3	0,3	9	2

Tabela 4.4: Volumes finais das gotas, concentrações do PEG 4000 e respectivos erros de medida – concentração de equivalência 24 %.

V_f (μL)	Desv. (μL)	PEG 4000 (% W/V)	Erro (%)
8,5	0,2	30	2
8,6	0,2	28	2
9,1	0,3	26	3
9,8	0,5	24	5
10,8	0,6	22	5
12,3	0,2	20	1

Tabela 4.5: Volumes finais das gotas, concentrações do PEG 6000 e respectivos erros de medida – concentração de equivalência 45 %.

V_f (μL)	Desv. (μL)	PEG 6000 (% W/V)	Erro (%)
9,1	0,2	42,5	2
10,3	0,3	45	2
12,3	0,2	42,75	1
14,3	0,3	40,5	2
16,6	0,2	38,25	1
19,1	0,2	36	1

Tabela 4.6: Volumes finais das gotas, concentrações de PEG 8000/glicina e respectivos erros de medida – concentração de equivalência 38 %.

V_f (μL)	Desv. (μL)	PEG/glicina (% W/V)	Erro (%)
8,9	0,4	40	5
10,5	0,3	38	3
11,7	0,1	36	0
12,9	0,3	34	2
14,4	0,4	32	3
16,3	0,4	30	2

Tabela 4.7: Volumes finais das gotas, concentrações do Tartrato de sódio e respectivos erros de medida – concentração de equivalência 70 %.

V_f (μL)	Desv. (μL)	Tartrato de sódio(% W/V)	Erro (%)
5,2	0,1	100	1
5,5	0,1	95	2
6,1	0,7	90	11
7,5	0,2	85	3
7,4	0,8	80	11
8,6	0,2	75	2
9,6	0,3	70	3
11,5	0,5	65	5

Tabela 4.8: Volumes finais das gotas, concentrações do Cloreto de sódio e respectivos erros de medida – concentração de equivalência 20 %.

V_f (μL)	Desv. (μL)	NaCl (% W/V)	Erro (%)
3,6	0,1	65	3
4,1	0,2	60	5
4,4	0,4	55	10
4,7	0,1	50	1
5,2	0,1	45	1
5,9	0,3	40	4
6,5	0,4	35	6
7,4	0,2	30	2
8,6	0,2	25	2
9,9	0,2	20	2

5 Conclusões

Foram consumidos aproximadamente 70 mg de proteína em 1200 testes de cristalização para a obtenção de um cristal adequado para os experimentos de difração. Ainda assim, a condição de cristalização que produziu tais cristais não foi perfeitamente determinada, devido, não só, a ausência de um agente tamponante, como também o tempo de armazenamento da amostra utilizada no teste.

Os cristais de ambas as formas cristalinas foram caracterizados e aqueles da FCII tiveram o grupo espacial univocamente determinado. Um conjunto de dados de 97,7 % de completude até 2,0 Å de resolução foi coletado. A simetria não-cristalográfica não pôde ser determinada, assim como, o conteúdo da unidade assimétrica.

A obtenção de derivados de átomos pesados foi seriamente comprometida pela quantidade de fosfato e pelo pH em que os cristais foram crescidos. Entretanto, o número de compostos testados foi muito pequeno e apenas uma espécie de metal foi utilizada. Ademais, é grande o número de proteína que foram derivadas, a despeito de terem sido cristalizadas em altas concentrações de fosfato e baixos pH's (vide HAD – Heavy Atom Data bank; Islam *et al.*, 1998).

O critério utilizado para a avaliação dos derivados foi rigoroso e de fato, derivados como aquele obtido com o Cianeto de mercúrio II podem ser utilizados para derivação das fases; o programa SHARP (Statistical Heavy Atom Refinement and Phasing) é capaz de extrair de maneira adequada as informações de fases contidas em seus dados de difração.

Os resultados contidos nessa dissertação foram compilados em um artigo científico que foi publicado na revista *Acta Crystallographica section D – Biological Crystallography* (vide Anexo II).

6 Perspectivas

Para dar continuidade à esse projeto, um plano de atividades de doutoramento, propondo a completa elucidação da estrutura tridimensional da desacetilase foi submetido e aprovado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). Nesse plano foi proposto a produção de derivados de átomos pesados, cuja análise será diferente daquela até então utilizada. A partir dos derivados pretende-se determinar as fases, construir o modelo, refinar a sua estrutura e propor um mecanismo catalítico enzimático para a proteína.

O cronograma proposto para este projeto está previsto para 36 meses e as etapas de desenvolvimento são:

- Junho de 2000 a Novembro de 2000 (6 meses), complementação de créditos exigidos pelo programa de doutoramento do Instituto de Física de São Carlos;
- Dezembro 2000 a Setembro de 2001 (10 meses), produção de três derivados de átomos pesados com alto poder de fornecer fases;
- Outubro de 2001 a Novembro de 2002 (14 meses), resolução da estrutura, refinamento do modelo e proposição do mecanismo catalítico enzimático da proteína;
- Dezembro de 2002 a Maio de 2003 (6 meses), qualificação requerida pelo programa de doutoramento e redação final da tese.

É importante ressaltar que todos os equipamentos necessários para a execução desse projeto estão disponíveis no laboratório onde pretende-se realizar o mesmo. Eventualmente será preciso recorrer-se à laboratórios de

luz síncrotron no exterior, se porventura for inevitável o uso do método de MAD para a derivação das fases.

7 Referências

- BLUNDELL, T.L.; JOHNSON, L.N. *Protein Crystallography*. London, Academic Press, 1976.
- BRAY, T.L.; KIM, L.J.; ASKEW, R.P.; HARRINGTON, M.D.; ROSENBLUM, W.M.; WILSON, W.W.; DELUCAS, L.J. New crystallization systems envisioned for microgravity studies. *J. Appl. Cryst.*v.31, p. 515-522, 1998.
- BRIGHAM, E.O. *The Four Fourier Transform*. Prentice Hall, 1974.
- BUDISA, N.; KARNBROCK, W.; STEINBACHER, S.; HUMM, A.; PRADE, L.; NEUEFEIND, T.; MORODER, L.; HUBER, R. Bioincorporation of telluromethionine into proteins: A promising new approach for X-ray structure analysis of proteins. *J. Mol. Biol.*, v.271, p. 616-623, 1997.
- CALCAGNO, M.; CAMPOS, P.J.; MULLIERT, G.; SUÁSTEGUI, J. Purification, molecular and kinetic-properties of glucosamine 6-phosphate isomerase (Deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys Acta*, v.787, p. 165-173, 1984.
- CHAYEN, N.E. A novel technique to control the rate of vapour diffusion, giving larger protein crystals. *J. Appl. Cryst.*, v.30, p. 198-202, 1997.
- CHAYEN, N.E. Comparative studies of protein crystallization by vapour diffusion and microbatch techniques. *Acta Cryst.* v.D54, 8-15, 1998.
- COMB, D.G.; ROSEMAN, S. *J. Glucosamine metabolism* .4. Glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biol. Chem.* v.232(2), p. 807-827, 1958.
- D'ARCY, A. Crystallizing proteins – a rational approach? *Acta Cryst.* v.D50, p. 469-471, 1994.
- DELUCAS, L.J.; LONG, M.M.; MOORE, K.M.; ROSENBLUM, W.M.; BRAY, T.L.; SMITH, C.; CARSON, M.; NARAYANA, S.V.L.; HARRINGTON, M.D.; CARTER, D.; CLARK, A.D. NANNI, R.G.; DING, J.; JACOBOMOLINA, A.; KAMER, G.; HUGHES, S.H.; ARNOLD, E.; EINSPAHR, H.M.; CLANCY, L.L.; RAO, G.S.J.; COOK, P.F.; HARRIS, B.G.; MUNSON, S.H.; FINZEL, B.C.; MCPHERSON, A.; WEBER, P.C.; LEWANDOWSKI, F.A.; NAGABHUSHAN, T.L.; TROTTA, P.P.; REICHERT, P.; NAVIA, M.A.; WILSON, K.P.; THOMSON, J.A.; RICHARDS, R.N.; BOWERSOX, K.D.; MEADE, C.J.; BAKER, E.S.; BISHOP, S.P.; DUNBAR, B.J.; TRINH, E.; PRAHL, J.; SACCO, A.

- BUGG, C.E. Recent results and a new hardware developments for proteins. *J. Cryst. Growth*, v.135 (1-2), p. 183-195, 1994.
- DOBROGOSZ, W. J. N-acetylglucosamine assimilation in *Escherichia coli* and its regulation to catabolite repression. *J. Bacteriol.* v.95, p. 585-591, 1968.
- DODSON, E.J. *Proceeding of the Daresbury Study Weekend*, p.33-45. 1985.
- DODSON, E.J.; WINN, M.; RALPH, A. *Methods Enzymol.*, Collaborative computational project, number 4: Providing programs for protein crystallography, v.277, p. 620-633, 1997.
- DUCRUIX, A.; GIEGÉ, R. *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach*. Oxford, Oxford University Press, 1992.
- DRENTH, J. *Principles of protein X-ray crystallography*. New York, Springer-Verlag New York, Inc. 1994.
- FERRÉ-D'AMORÉ, A.R.; BURLEY, S.K. Dynamic light in evaluating crystallizability of macromolecules. *Methods Enzymol.* v.276, p. 157-166, 1997.
- GARMAN, E.F.; SCHNEIDER, T.R. Macromolecular cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.* v.30, p. 211-237, 1997.
- GIACOVAZZO, C.; MONACO, H.L.; VITERBO, D.; SCORDARI, F.; GILLI, G.; ZANOTTI, G.; CATTI, M. *Fundamentals of Crystallography*. New York, Oxford University Press Inc, 1992.
- HARP, J.M.; TIMM, D.E.; BUNICK, G.J. Macromolecular crystal annealing: overcoming increased mosaicity associated with cryocrystallography. *Acta Cryst.* v.D54, 622-628, 1998.
- HELLIWELL, J.R. *Macromolecular crystallography with synchrotron radiation*. Cambridge, Cambridge University Press, 1992.
- HENDRICKSON, W.A.; HORTON, J.R.; LEMASTER, D.M. Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD) – a vehicle for direct determination of 3-dimensional structure. *EMBO J.* v.9, p. 1665-1667, 1990.
- HORJALES, E.; ALTAMIRANO, M.M.; CALCAGNO, M.L.; GARRATT, R.C.; OLIVA, G. The allosteric transition of glucosamine 6-phosphate deaminase: The structure of the T state at 2.3 angstrom resolution. *Structure Fold Des.*, v.7, p. 527-537, 1999.
- ISLAM, A.S.; CARVIN, D.; STENBERG, M.J. E.; BLUNDELL, T.L. HAD, a data bank of heavy-atom binding sites in protein crystals: a resource for

- use in multiple isomorphous replacement and anomalous scattering. *Acta Cryst.* v.D54, p. 1199-1206, 1998.
- JANCARIK, J.; KIM, S.-H. Sparse-Matrix Sampling – A screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* v.24, p. 409-411, 1991.
- KOSZELAK, S., DAY, J., LEJA, C., CUDNEY, R., MCPHERSON, A. Protein and virus crystal - growth on International Microgravity Laboratory – 2. *Biophys. J.*, v.69, p. 13-19, 1995.
- KE, H. Overview of isomorphous replacement phasing. *Methods Enzymol.* v.276, p. 448-461, 1997.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of Bacteriophage T4. *Nature*, v.227(5259), p. 680-685, 1970.
- MADDEN, T.L., TATUSOV, R.L.; ZHANG, J. Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol.* v.266, p. 131-141, 1970.
- MCPHERSON, A. J. *Preparation and Analysis of Protein Crystals*. New York, John Wiley, 1982.
- MCPHERSON, A.; MALKIN, A. J.; KUNESTSOO, Y. G. The science of macromolecular crystallization. *Structure*, v.3, p. 759-768, 1995.
- MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* v.33, p. 491-497, 1968.
- MCREE, D.E. *Practical Protein Crystallography*. San Diego, Academic Press, Inc. 1993.
- MENGIN-LECREULX, D.; VAN HEIJENOORT, J. Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of *Escherichia coli* – characterization of the GLMU gene – products a bifunctional enzyme catalyzing 2 subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J. Bacteriol.* v.176, p. 5788-, 1994.
- MIKOL, V.; HIRSH, E.; GIEGÉ, R. Diagnostic of precipitant for biomacromolecule crystallization by quase-elasticlight – scattering. *J. Mol. Biol.* v.213, p. 187-195, 1990
- MORENO, A.; SORIANO-GARCÍA, M. Crystal-growth kinetics of protein single crystals along capillary tubes i rhe gel-acupuncture technique. *Acta Cryst.* v.D55, p. 577-580, 1999.
- NAVAZA, J. AMORE - An automated package for molecular replacement. *Acta Cryst.* v.A50, p. 157-153, 1994.

- OLIVA, G.; FONTES, M. R. M.; GARRAT, R. C.; ALTAMIARANO, M. M.; AND HORJALES, E. *Structure*, v.3, p. 1323-1332, 1995.
- OTWINOWSKI, Z.; MINOR W. Processing of X-ray data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* v.276, p. 307-325, 1997.
- PETSKO, G. A. Preparation of isomorphous heavy-atoms derivatives. *Methods. Enzimol.* v.115, p. 147-156, 1985.
- PLUMBRIDGE, J.A. Repression and induction of the *Nag* regulon of *Escherichia coli* K-12 – The roles of *NagC* and *NagA* in maintenance of the uninduced state. *Mol. Microbiol.* v.5, p. 2053-2062, 1991.
- PLUMBRIDGE, J.A. Induction of the *Nag* regulon of *Escherichia coli* by N-acetylglucosamine and glucosamine – role of the cyclic AMP – catabolite activator protein complex in expression of the regulon. *J. Bacteriol.* v.172, p. 2728-2735, 1990.
- PLUMBRIDGE, J.A., COCHET, O., SOUZA, J.M., ALTAMIRANO, M.M., CALCAGNO, M.L. AND BADET, B. Coordinated regulation of amino sugar-synthesizing and sugar – degrading enzymes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* v.175, p. 4951-4956, 1993.
- PLUMBRIDGE, J.A.; KOLB, A. Cap and *Nag* repressor binding to the regulatory regions of the *nagE-B* and *manX* genes of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* v.217(4), p. 661-679, 1991.
- POLIKARPOV, I.; PERLES, L. A.; DE OLIVEIRA, R. T.; OLIVA, G.; CASTELLANO, E. E.; GARRAT, R. C.; CRAIEVICH, A. Set-up and experimental parameters of the Protein Crystallography Beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. *J. Synchrotron Rad.* v.5, 72-76. 1998.
- POLIKARPOV, I., TEPLYAKOV, A.; OLIVA, G. The ultimate wavelength for protein crystallography? *Acta Cryst.* v.D53, p. 734 – 737, 1997.
- RAY, JR., W.J.; BOLIN, J.T.; PUVATHINGAL, J.M.; MINOR, W.; LIU, Y.; MUCHMORE, S.W. Removal of salt from salt-induced protein crystals without cross-linking. Preliminary examination of “desalted” crystals of Phosphoglucomutase by X-ray crystallography at low temperature. *Biochem.* v.30, p. 6866-6875, 1991.
- ROSSMANN, M. G.; BLOW, D. M. The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.* v.15, 24-31, 1962.
- ROULD, M. A. Screening for heavy-atom derivatives and obtaining accurate isomorphous differences. *Methods. Enzimol.* v.276, p. 462-473, 1997.

- SOUZA, J. M.; PLUMBRIDGE, J. A.; CALCAGNO, M. L.N-
acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase from *Escherichia coli*:
purification and molecular and kinetic characterization. *Arch.
Bioch. and Bioph.* v.340(2), p. 338-346, 1997.
- SCHRUDER, H. A.; GROENDIJK, H.; VAN DER LAAN, J. M.;
WIERENGA, R. K. The transfer of protein crystals from their
original moder liquor to a solution with a complet different
precipitant. *J. Appl. Cryst.* v.21, p. 426-429, 1988.
- TERWILLIGER C.T.; KIM, S.-H. Generalized method of determining
heavy-atom positions using the difference Patterson function. *Acta
Cryst.* v.A43, p. 1-5, 1987.
- TONG, L.; ROSSMANN, M. G. Rotation function calculation with GLRF
program. *Methods Enzymol.* v.276, p. 594-611, 1997.
- WHITE, R. J. Control fo amono sugar metabolismin *Escherichia coli*
and isolation fo mutantes unable to degrade amino sugar *Biochem.
J.* v.106, p. 847-858, 1968.
- WHITE, R. J.; PASTERNAK, C. A. Purification and properties of N-
acetylglucosamine 6- phosphate deacetylase from *Escherichia coli*.
Biochm. J. v.105, p. 121-, 1967.

ANEXO I

Soluções dos fatoriais utilizadas no testes de cristalização

Tube Number	Salt	Tube Number	Buffer †	Tube Number	Precipitant
1.	0.02 M Calcium Chloride dihydrate	1.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	1.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
2.	None	2.	None	2.	0.4 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate
3.	None	3.	None	3.	0.4 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
4.	None	4.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	4.	2.0 M Ammonium Sulfate
5.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	5.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	5.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
6.	0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	6.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	6.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
7.	None	7.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	7.	1.4 M Sodium Acetate trihydrate
8.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	8.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	8.	30% v/v iso-Propanol
9.	0.2 M Ammonium Acetate	9.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	9.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
10.	0.2 M Ammonium Acetate	10.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	10.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
11.	None	11.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	11.	1.0 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
12.	0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	12.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	12.	30% v/v iso-Propanol
13.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	13.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	13.	30% v/v Polyethylene Glycol 400
14.	0.2 M Calcium Chloride dihydrate	14.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	14.	28% v/v Polyethylene Glycol 400
15.	0.2 M Ammonium Sulfate	15.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	15.	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
16.	None	16.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	16.	1.5 M Lithium Sulfate monohydrate
17.	0.2 M Lithium Sulfate monohydrate	17.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	17.	30% Polyethylene Glycol 4000
18.	0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	18.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	18.	20% Polyethylene Glycol 8000
19.	0.2 M Ammonium Acetate	19.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	19.	30% v/v iso-Propanol
20.	0.2 M Ammonium Sulfate	20.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	20.	25% w/v Polyethylene Glycol 4000
21.	0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	21.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	21.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
22.	0.2 M Sodium Acetate trihydrate	22.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	22.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
23.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	23.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	23.	30% v/v Polyethylene Glycol 400
24.	0.2 M Calcium Chloride dihydrate	24.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	24.	20% v/v iso-Propanol
25.	None	25.	0.1 M Imidazole pH 6.5	25.	1.0 M Sodium Acetate trihydrate
26.	0.2 M Ammonium Acetate	26.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	26.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
27.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	27.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	27.	20% v/v iso-Propanol
28.	0.2 M Sodium Acetate trihydrate	28.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	28.	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
29.	None	29.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	29.	0.8 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate
30.	0.2 M Ammonium Sulfate	30.	None	30.	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
31.	0.2 M Ammonium Sulfate	31.	None	31.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
32.	None	32.	None	32.	2.0 M Ammonium Sulfate
33.	None	33.	None	33.	4.0 M Sodium Formate
34.	None	34.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	34.	2.0 M Sodium Formate
35.	None	35.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	35.	0.8 M mono-Sodium dihydrogen phosphate 0.8 M mono-Potassium dihydrogen phosphate
36.	None	36.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	36.	8% w/v Polyethylene Glycol 8000
37.	None	37.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	37.	8% w/v Polyethylene Glycol 4000
38.	None	38.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	38.	1.4 M tri-Sodium Citrate dihydrate
39.	None	39.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	39.	2% v/v Polyethylene Glycol 400, 2.0 M Ammonium Sulfate
40.	None	40.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	40.	20% v/v iso-Propanol, 20% w/v Polyethylene Glycol 4000
41.	None	41.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	41.	10% v/v iso-Propanol, 20% w/v Polyethylene Glycol 4000
42.	0.05 M mono-Potassium dihydrogen Phosphate	42.	None	42.	20% v/v Polyethylene Glycol 8000
43.	None	43.	None	43.	30% w/v Polyethylene Glycol 1500
44.	None	44.	None	44.	0.2 M Magnesium Formate
45.	0.2 M Zinc Acetate dihydrate	45.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	45.	18% w/v Polyethylene Glycol 8000
46.	0.2 M Calcium Acetate hydrate	46.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	46.	18% w/v Polyethylene Glycol 8000
47.	None	47.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	47.	2.0 M Ammonium Sulfate
48.	None	48.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	48.	2.0 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
49.	1.0 M Lithium Sulfate monohydrate	49.	None	49.	2% w/v Polyethylene Glycol 8000
50.	0.5 M Lithium Sulfate monohydrate	50.	None	50.	15% w/v Polyethylene Glycol 8000

† Buffer pH is that of a 1.0 M stock prior to dilution with other reagent components. pH with HCl or NaOH.

Crystal Screen contains fifty unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

27632 El Lazo Road, Suite 100
Laguna Niguel, CA 92677-3913 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
Technical Support e-mail: tech@hrmail.com
Internet: www.hamptonresearch.com

HAMPTON
RESEARCH

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

Tube Number	Salt	Tube Number	Buffer †	Tube Number	Precipitant
1	2.0 M Sodium chloride	1.	None	1.	10% w/v PEG 6000
2	0.01 M Hexadecyltrimethylammonium Bromide	2.	None	2	0.5 M Sodium Chloride, 0.01 M Magnesium Chloride hexahydrate
3.	None	3.	None	3.	25% v/v Ethylene Glycol
4.	None	4.	None	4.	35% v/v Dioxane
5.	2.0 M Ammonium Sulfate	5.	None	5.	5% v/v iso-Propanol
6.	None	6.	None	6.	1.0 M Imidazole pH 7.0
7.	None	7.	None	7.	10% w/v Polyethylene Glycol 1000 10% w/v Polyethylene Glycol 8000
8.	1.5 M Sodium Chloride	8.	None	8.	10% v/v Ethanol
9.	None	9.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	9.	2.0 M Sodium Chloride
10.	0.2 M Sodium Chloride	10.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	10.	30% v/v MPD
11.	0.01 M Cobaltous Chloride hexahydrate	11.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	11.	1.0 M 1.6 Hexanediol
12.	0.1 M Cadmium Chloride dihydrate	12.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	12.	30% v/v Polyethylene Glycol 400
13.	0.2 M Ammonium Sulfate	13.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	13.	30% w/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 2000
14.	0.2 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate	14.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	14.	2.0 M Ammonium Sulfate
15.	0.5 M Ammonium Sulfate	15.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	15.	1.0 M Lithium Sulfate monohydrate
16.	0.5 M Sodium Chloride	16.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	16.	4% w/v Ethylene Imine Polymer
17.	None	17.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	17.	35% v/v tert-Butanol
18.	0.01 M Ferric Chloride hexahydrate	18.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	18.	10% v/v Jeffamine M-600*
19.	None	19.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	19.	2.5 M 1.6 Hexanediol
20.	None	20.	0.1 M MES pH 6.5	20.	1.6 M Magnesium Sulfate heptahydrate
21.	0.1 M Sodium dihydrogen phosphate mono 0.1 M mono-Potassium dihydrogen Phosphate	21.	0.1 M MES pH 6.5	21.	2.0 M Sodium Chloride
22.	None	22.	0.1 M MES pH 6.5	22.	12% w/v Polyethylene Glycol 20,000
23.	1.6 M Ammonium Sulfate	23.	0.1 M MES pH 6.5	23.	10% v/v Dioxane
24.	0.05 M Cesium Chloride	24.	0.1 M MES pH 6.5	24.	30% v/v Jeffamine M-600*
25.	0.01 M Cobaltous Chloride hexahydrate	25.	0.1 M MES pH 6.5	25.	1.8 M Ammonium Sulfate
26.	0.2 M Ammonium Sulfate	26.	0.1 M MES pH 6.5	26.	30% w/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 5000
27.	0.01 M Zinc Sulfate heptahydrate	27.	0.1 M MES pH 6.5	27.	25% v/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 550
28.	None	28.	None	28.	1.6 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 6.5
29.	0.5 M Ammonium Sulfate	29.	0.1 M HEPES pH 7.5	29.	30% v/v MPD
30.	None	30.	0.1 M HEPES pH 7.5	30.	10% w/v Polyethylene Glycol 6000, 5% v/v MPD
31.	None	31.	0.1 M HEPES pH 7.5	31.	20% v/v Jeffamine M-600*
32.	0.1 M Sodium Chloride	32.	0.1 M HEPES pH 7.5	32.	1.6 M Ammonium Sulfate
33.	None	33.	0.1 M HEPES pH 7.5	33.	2.0 M Ammonium Formate
34.	0.05 M Cadmium Sulfate hydrate	34.	0.1 M HEPES pH 7.5	34.	1.0 M Sodium acetate
35.	None	35.	0.1 M HEPES pH 7.5	35.	70% v/v MPD
36.	None	36.	0.1 M HEPES pH 7.5	36.	4.3 M Sodium Chloride
37.	None	37.	0.1 M HEPES pH 7.5	37.	10% w/v Polyethylene Glycol 8000, 8% v/v Ethylene Glycol
38.	None	38.	0.1 M HEPES pH 7.5	38.	20% w/v Polyethylene Glycol 10,000
39.	0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	39.	0.1 M TRIS pH 8.5	39.	3.4 M 1.6 Hexanediol
40.	None	40.	0.1 M TRIS pH 8.5	40.	25% v/v tert-Butanol
41.	0.01 M Nickel(II) Chloride hexahydrate	41.	0.1 M TRIS pH 8.5	41.	1.0 M Lithium Sulfate monohydrate
42.	1.5 M Ammonium Sulfate	42.	0.1 M TRIS pH 8.5	42.	12% v/v Glycerol anhydrous
43.	0.2 M mono Ammonium dihydrogen Phosphate	43.	0.1 M TRIS pH 8.5	43.	50% v/v MPD
44.	None	44.	0.1 M TRIS pH 8.5	44.	20% v/v Ethanol
45.	0.01 M Nickel(II) Chloride hexahydrate	45.	0.1 M TRIS pH 8.5	45.	20% w/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 2000
46.	0.1 M Sodium Chloride	46.	0.1 M Bicine pH 9.0	46.	30% w/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 550
47.	None	47.	0.1 M Bicine pH 9.0	47.	2.0 M Magnesium Chloride hexahydrate
48.	2% v/v Dioxane	48.	0.1 M Bicine pH 9.0	48.	10% w/v Polyethylene Glycol 20,000

† Buffer pH is that of a 1.0 M stock (0.5 M for MES) prior to dilution with other reagent components. pH with HCl or NaOH.

Crystal Screen 2 contains forty-eight unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

27632 El Lazo Road, Suite 100
Laguna Niguel, CA 92677-3913 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
Technical Support e-mail: HamptonTS@aol.com
WEB: <http://www.hamptonresearch.com>

HAMPTON
RESEARCH

[MPD (% v/v)]	pH					
	4	5	6	7	8	9
10	A1	A2	A3	A4	A5	A6
20	B1	B2	B3	B4	B5	B6
40	C1	C2	C3	C4	C5	C6
65	D1	D2	D3	D4	D5	D6

The pH indicated on each Grid Screen reagent is the ACTUAL pH of the reagent at 22.0°C. All pH adjustments have been made using hydrochloric acid or sodium hydroxide.

Tube Number	(±)-2-Methyl-2,4-Pentanediol [% v/v]	Tube Number	Buffer
A1.	10	A1.	0.1 M Citric Acid pH 4.0
B1.	20	B1.	0.1 M Citric Acid pH 4.0
C1.	40	C1.	0.1 M Citric Acid pH 4.0
D1.	65	D1.	0.1 M Citric Acid pH 4.0
A2.	10	A2.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 5.0
B2.	20	B2.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 5.0
C2.	40	C2.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 5.0
D2.	65	D2.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 5.0
A3.	10	A3.	0.1 M MES pH 6.0
B3.	20	B3.	0.1 M MES pH 6.0
C3.	40	C3.	0.1 M MES pH 6.0
D3.	65	D3.	0.1 M MES pH 6.0
A4.	10	A4.	0.1 M HEPES pH 7.0
B4.	20	B4.	0.1 M HEPES pH 7.0
C4.	40	C4.	0.1 M HEPES pH 7.0
D4.	65	D4.	0.1 M HEPES pH 7.0
A5.	10	A5.	0.1 M Tris pH 8.0
B5.	20	B5.	0.1 M Tris pH 8.0
C5.	40	C5.	0.1 M Tris pH 8.0
D5.	65	D5.	0.1 M Tris pH 8.0
A6.	10	A6.	0.1 M Bicine pH 9.0
B6.	20	B6.	0.1 M Bicine pH 9.0
C6.	40	C6.	0.1 M Bicine pH 9.0
D6.	65	D6.	0.1 M Bicine pH 9.0

Chemical Analysis

(±)-2-Methyl-2,4-pentanediol (MPD)

M_r 118.18C₆H₁₄O₂

Al	<0.0001%	Cd	<0.0001%	Fe	<0.0001%	Mn	<0.0001%	Ni	<0.0001%	Zn	<0.0001%
Ba	<0.0001%	Co	<0.0001%	K	<0.002%	Mo	<0.0001%	Pb	<0.0001%	SO ₄	<0.005%
Bi	<0.0001%	Cr	<0.0001%	Li	<0.0001%	Na	<0.002%	Sr	<0.0001%	Cl	<0.005%
Ca	<0.0005%	Cu	<0.0001%	Mg	<0.0001%						

Citric Acid anhydrous

M_r 192.43C₆H₈O₇

Cl	<0.0005%	Oxalate	<0.05%	PO ₄	<0.0005%	SO ₄	<0.002%	Tartrate	<0.2%	Ca	<0.005%
Cd	<0.0005%	Co	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Fe	<0.0005%	Ni	<0.0005%	Pb	<0.0005%
Zn	<0.0005%										

Sodium Acetate

M_r 82.02C₂H₃NaO₂

≥ 99.5% Purity

Cl	<0.0005%	Co	<0.0005%	Mo	<0.0005%	SO ₄	<0.002%	Cr	<0.0005%	Zn	<0.0005%
Al	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Ni	<0.0005%	As	<0.00001%	Fe	<0.0005%	Pb	<0.0005%
Ba	<0.0005%	K	<0.005%	Sr	<0.0005%	Bi	<0.0005%	Li	<0.0005%	Ca	<0.001%
Mg	<0.0005%	Cd	<0.0005%	Mn	<0.0005%	PO ₄	<0.0005%				

MES

M_r 195.25C₆H₁₃NO₄S

≥ 99.5% Purity

Co	<0.0005%	Mo	<0.0005%	SO ₄	<0.0005%	Cr	<0.0005%	Cl	<0.005%	Ag	<0.00002%
Al	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Ni	<0.0002%	As	<0.00001%	Fe	<0.0005%	Pb	<0.00002%
Ba	<0.0005%	K	<0.01%	Sr	<0.0005%	Bi	<0.0005%	Li	<0.0005%	Zn	<0.0005%
Ca	<0.002%	Mg	<0.0005%	Cd	<0.0005%	Mn	<0.0005%	PO ₄	<0.002%	Hg	<0.00001%

27632 El Lazo Road, Suite 100
Laguna Niguel, CA 92677-3913 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
Technical Support e-mail: tech@hrmail.com
WEB: <http://www.hamptonresearch.com>

HAMPTON
RESEARCH

[Polyethylene Glycol 6000 (% w/v)]	pH						Tube Number	Polyethylene Glycol 6000 [% w/v]	Tube Number	Buffer
	4	5	6	7	8	9				
5	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A1. 5		A1.	0.1 M Citric Acid pH 4.0
							B1. 10		B1.	0.1 M Citric Acid pH 4.0
							C1. 20		C1.	0.1 M Citric Acid pH 4.0
10	B1	B2	B3	B4	B5	B6	D1. 30		D1.	0.1 M Citric Acid pH 4.0
							A2. 5		A2.	0.1 M Citric Acid pH 5.0
							B2. 10		B2.	0.1 M Citric Acid pH 5.0
20	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C2. 20		C2.	0.1 M Citric Acid pH 5.0
							D2. 30		D2.	0.1 M Citric Acid pH 5.0
30	D1	D2	D3	D4	D5	D6	A3. 5		A3.	0.1 M MES pH 6.0
							B3. 10		B3.	0.1 M MES pH 6.0
							C3. 20		C3.	0.1 M MES pH 6.0
							D3. 30		D3.	0.1 M MES pH 6.0
							A4. 5		A4.	0.1 M HEPES pH 7.0
							B4. 10		B4.	0.1 M HEPES pH 7.0
							C4. 20		C4.	0.1 M HEPES pH 7.0
							D4. 30		D4.	0.1 M HEPES pH 7.0
							A5. 5		A5.	0.1 M Tris pH 8.0
							B5. 10		B5.	0.1 M Tris pH 8.0
							C5. 20		C5.	0.1 M Tris pH 8.0
							D5. 30		D5.	0.1 M Tris pH 8.0
							A6. 5		A6.	0.1 M Bicine pH 9.0
							B6. 10		B6.	0.1 M Bicine pH 9.0
							C6. 20		C6.	0.1 M Bicine pH 9.0
							D6. 30		D6.	0.1 M Bicine pH 9.0

The pH indicated on each Grid Screen reagent is the ACTUAL pH of the reagent at 22.0°C. All pH adjustments have been made using hydrochloric acid or sodium hydroxide.

Chemical Analysis

Polyethylene Glycol 6,000
M_r 5000-7000

Peroxide <0.001%	Aldehyde < 0.005%	DNases, RNases, proteases, phosphatases: None detected									
Cl <0.005%	Co <0.0005%	Mo <0.0005%	SO ₄ <0.005%	Cr <0.0005%	Na <0.02%						
Al <0.0005%	Cu <0.0005%	Ni <0.0005%	As <0.00001%	Fe <0.0005%	Pb <0.0005%						
Ba <0.0005%	K <0.0005%	Sr <0.0005%	Bi <0.0005%	Li <0.0005%	Zn <0.0005%						
Ca <0.001%	Mg <0.0005%	Cd <0.0005%	Mn <0.0005%								

Citric Acid anhydrous

M_r 192.43 C₆H₈O₇

Cl <0.0005%	Oxalate <0.05%	PO ₄ <0.0005%	SO ₄ <0.002%	Tartrate <0.2%	Ca <0.005%					
Cd <0.0005%	Co <0.0005%	Cu <0.0005%	Fe <0.0005%	Ni <0.0005%	Pb <0.0005%					
Zn <0.0005%										

MES

M_r 195.25 C₈H₁₃NO₄S ≥ 99.5% Purity

Cc <0.0005%	Mo <0.0005%	SO ₄ <0.0005%	Cr <0.0005%	Cl <0.005%	Ag <0.00002%					
Al <0.0005%	Cu <0.0005%	Ni <0.0002%	As <0.00001%	Fe <0.0005%	Pb <0.00002%					
Ba <0.0005%	K <0.01%	Sr <0.0005%	Br <0.0005%	Li <0.0005%	Zn <0.0005%					
Ca <0.002%	Mg <0.0005%	Cd <0.0005%	Mn <0.0005%	PO ₄ <0.002%	Hg <0.00001%					

27632 El Lazo Road, Suite 100
Laguna Niguel, CA 92677-3913 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
Technical Support e-mail: tech@hrmail.com
WEB: <http://www.hamptonresearch.com>



	pH					
	4	5	6	7	8	9
0	A1	A2	A3	A4	A5	A6
10	B1	B2	B3	B4	B5	B6
20	C1	C2	C3	C4	C5	C6
30	D1	D2	D3	D4	D5	D6

Lithium Chloride (1.0 M)]

The pH indicated on each Grid Screen reagent is the ACTUAL pH of the reagent at 22.0°C. All pH adjustments have been made using hydrochloric acid or sodium hydroxide.

Tube Number	Polyethylene Glycol 6000 [% w/v]	Tube Number	Buffer
A1.	0	A1.	0.1 M Citric Acid pH 4.0
B1.	10	B1.	0.1 M Citric Acid pH 4.0
C1.	20	C1.	0.1 M Citric Acid pH 4.0
D1.	30	D1.	0.1 M Citric Acid pH 4.0
A2.	0	A2.	0.1 M Citric Acid pH 5.0
B2.	10	B2.	0.1 M Citric Acid pH 5.0
C2.	20	C2.	0.1 M Citric Acid pH 5.0
D2.	30	D2.	0.1 M Citric Acid pH 5.0
A3.	0	A3.	0.1 M MES pH 6.0
B3.	10	B3.	0.1 M MES pH 6.0
C3.	20	C3.	0.1 M MES pH 6.0
D3.	30	D3.	0.1 M MES pH 6.0
A4.	0	A4.	0.1 M HEPES pH 7.0
B4.	10	B4.	0.1 M HEPES pH 7.0
C4.	20	C4.	0.1 M HEPES pH 7.0
D4.	30	D4.	0.1 M HEPES pH 7.0
A5.	0	A5.	0.1 M Tris pH 8.0
B5.	10	B5.	0.1 M Tris pH 8.0
C5.	20	C5.	0.1 M Tris pH 8.0
D5.	30	D5.	0.1 M Tris pH 8.0
A6.	0	A6.	0.1 M Bicine pH 9.0
B6.	10	B6.	0.1 M Bicine pH 9.0
C6.	20	C6.	0.1 M Bicine pH 9.0
D6.	30	D6.	0.1 M Bicine pH 9.0

Tube Number: All Tubes Lithium Chloride [1.0 M]

Chemical Analysis

Lithium Chloride anhydrous

M_r 42.39

LiCl

N	<0.001%	Co	<0.0005%	Mo	<0.0005%	SO ₄	<0.005%	Cr	<0.0005%	Na	<0.005%
Al	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Ni	<0.0005%	As	<0.00001%	Fe	<0.0005%	Pb	<0.0005%
Ba	<0.001%	K	<0.005%	Sr	<0.0005%	Bi	<0.0005%	Li	<0.0005%	Zn	<0.0005%
Ca	<0.001%	Mg	<0.0005%	Cd	<0.0005%	Mn	<0.0005%				

Polyethylene Glycol 6,000

M_r 5000-7000

Peroxide	<0.001%	Aldehyde	<0.005%	DNases, RNases, proteases, phosphatases: None detected							
Cl	<0.005%	Co	<0.0005%	Mo	<0.0005%	SO ₄	<0.005%	Cr	<0.0005%	Na	<0.02%
Al	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Ni	<0.0005%	As	<0.00001%	Fe	<0.0005%	Pb	<0.0005%
Ba	<0.0005%	K	<0.0005%	Sr	<0.0005%	Bi	<0.0005%	Li	<0.0005%	Zn	<0.0005%
Ca	<0.001%	Mg	<0.0005%	Cd	<0.0005%	Mn	<0.0005%				

Citric Acid anhdrous

M_r 192.43

C₆H₈O₇

Cl	<0.0005%	Oxalate	<0.05%	PO ₄	<0.0005%	SO ₄	<0.002%	Tartrate	<0.2%	Ca	<0.005%
Cd	<0.0005%	Co	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Fe	<0.0005%	Ni	<0.0005%	Pb	<0.0005%
Zn	<0.0005%										

MES

M_r 195.25

C₆H₁₃NO₄S

≥ 99.5% Purity

Co	<0.0005%	Mo	<0.0005%	SO ₄	<0.0005%	Cr	<0.0005%	Cl	<0.005%	Ag	<0.00002%
Al	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Ni	<0.0002%	As	<0.00001%	Fe	<0.0005%	Pb	<0.00002%
Ba	<0.0005%	K	<0.01%	Sr	<0.0005%	Bi	<0.0005%	Li	<0.0005%	Zn	<0.0005%
Ca	<0.002%	Mg	<0.0005%	Cd	<0.0005%	Mn	<0.0005%	PO ₄	<0.002%	Hg	<0.00001%

27632 El Lazo Road, Suite 100
 Laguna Niguel, CA 92677-3913 U.S.A.
 Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
 Technical Support e-mail: tech@hrmail.com
 WEB: <http://www.hamptonresearch.com>



Ammonium Sulfate (M)	pH						Tube Number	Ammonium Sulfate (M)	Tube Number	Buffer
	4	5	6	7	8	9				
0.8	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A1. 0.8	A1. 0.1 M Citric Acid pH 4.0		
1.6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B1. 1.6	B1. 0.1 M Citric Acid pH 4.0		
2.4	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C1. 2.4	C1. 0.1 M Citric Acid pH 4.0		
3.2	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1. 3.2	D1. 0.1 M Citric Acid pH 4.0		
							A2. 0.8	A2. 0.1 M Citric Acid pH 5.0		
							B2. 1.6	B2. 0.1 M Citric Acid pH 5.0		
							C2. 2.4	C2. 0.1 M Citric Acid pH 5.0		
							D2. 3.2	D2. 0.1 M Citric Acid pH 5.0		
							A3. 0.8	A3. 0.1 M MES pH 6.0		
							B3. 1.6	B3. 0.1 M MES pH 6.0		
							C3. 2.4	C3. 0.1 M MES pH 6.0		
							D3. 3.2	D3. 0.1 M MES pH 6.0		
							A4. 0.8	A4. 0.1 M HEPES pH 7.0		
							B4. 1.6	B4. 0.1 M HEPES pH 7.0		
							C4. 2.4	C4. 0.1 M HEPES pH 7.0		
							D4. 3.2	D4. 0.1 M HEPES pH 7.0		
							A5. 0.8	A5. 0.1 M Tris pH 8.0		
							B5. 1.6	B5. 0.1 M Tris pH 8.0		
							C5. 2.4	C5. 0.1 M Tris pH 8.0		
							D5. 3.2	D5. 0.1 M Tris pH 8.0		
							A6. 0.8	A6. 0.1 M Bicine pH 9.0		
							B6. 1.6	B6. 0.1 M Bicine pH 9.0		
							C6. 2.4	C6. 0.1 M Bicine pH 9.0		
							D6. 3.2	D6. 0.1 M Bicine pH 9.0		

The pH indicated on each Grid Screen reagent is the ACTUAL pH of the reagent at 22.0°C. All pH adjustments have been made using hydrochloric acid or sodium hydroxide.

Chemical Analysis

Ammonium Sulfate

M_r 132.14 (NH₄)₂SO₄ ≥ 99.5% Purity

Cl	<0.0005%	Co	<0.0005%	Mo	<0.0005%	SO ₄	<0.005%	Cr	<0.0005%	Na	<0.005%
Al	<0.0005%	Cu	<0.0002%	Ni	<0.0005%	As	<0.00002%	Fe	<0.0002%	Pb	<0.002%
Ba	<0.0005%	K	<0.005%	Sr	<0.0001%	Bi	<0.0005%	Li	<0.0005%	Zn	<0.0005%
Ca	<0.001%	Mg	<0.0005%	Cd	<0.0001%	Mn	<0.0005%	NO ₃	<0.001%	PO ₄	<0.0005%

Citric Acid anhdrous

M_r 192.43 C₆H₈O₇

Cl	<0.0005%	Oxalate	<0.05%	PO ₄	<0.0005%	SO ₄	<0.002%	Tartrate	<0.2%	Ca	<0.005%
Cd	<0.0005%	Co	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Fe	<0.0005%	Ni	<0.0005%	Pb	<0.0005%
Zn	<0.0005%										

MES

M_r 195.25 C₆H₁₃NO₄S ≥ 99.5% Purity

Co	<0.0005%	Mo	<0.0005%	SO ₄	<0.0005%	Cr	<0.0005%	Cl	<0.005%	Ag	<0.00002%
Al	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Ni	<0.0002%	As	<0.00001%	Fe	<0.0005%	Pb	<0.00002%
Ba	<0.0005%	K	<0.01%	Sr	<0.0005%	Bi	<0.0005%	Li	<0.0005%	Zn	<0.0005%
Ca	<0.002%	Mg	<0.0005%	Cd	<0.0005%	Mn	<0.0005%	PO ₄	<0.002%	Hg	<0.00001%

HEPES

M_r 238.31 C₈H₁₅N₂O₄S ≥ 99.5% Purity

Co	<0.0005%	Mo	<0.0005%	Cr	<0.0005%	Cl	<0.0005%	Ag	<0.00002%	Pb	<0.00002%
Al	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Ni	<0.0002%	As	<0.00001%	Fe	<0.0005%	Zn	<0.0005%
Ba	<0.0005%	K	<0.01%	Sr	<0.0005%	Bi	<0.0005%	Li	<0.0005%	Hg	<0.00001%
Ca	<0.001%	Mg	<0.0005%	Cd	<0.0005%	Mn	<0.0005%	PO ₄	<0.002%		

27632 El Lazo Road, Suite 100
 Laguna Niguel, CA 92677-3913 U.S.A.
 Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
 Technical Support e-mail: tech@hrmail.com
 WEB: <http://www.hamptonresearch.com>



[Sodium Chloride (M)]	pH						Tube Number	Sodium Chloride (M)	Tube Number	Buffer
	4	5	6	7	8	9				
1.0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A1. 1.0	A1. 0.1 M Citric Acid pH 4.0		
							B1. 2.0	B1. 0.1 M Citric Acid pH 4.0		
							C1. 3.0	C1. 0.1 M Citric Acid pH 4.0		
2.0	B1	B2	B3	B4	B5	B6	D1. 4.0	D1. 0.1 M Citric Acid pH 4.0		
							A2. 1.0	A2. 0.1 M Citric Acid pH 5.0		
							B2. 2.0	B2. 0.1 M Citric Acid pH 5.0		
3.0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C2. 3.0	C2. 0.1 M Citric Acid pH 5.0		
							D2. 4.0	D2. 0.1 M Citric Acid pH 5.0		
							A3. 1.0	A3. 0.1 M MES pH 6.0		
4.0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	B3. 2.0	B3. 0.1 M MES pH 6.0		
							C3. 3.0	C3. 0.1 M MES pH 6.0		
							D3. 4.0	D3. 0.1 M MES pH 6.0		
							A4. 1.0	A4. 0.1 M HEPES pH 7.0		
							B4. 2.0	B4. 0.1 M HEPES pH 7.0		
							C4. 3.0	C4. 0.1 M HEPES pH 7.0		
							D4. 4.0	D4. 0.1 M HEPES pH 7.0		
							A5. 1.0	A5. 0.1 M Tris pH 8.0		
							B5. 2.0	B5. 0.1 M Tris pH 8.0		
							C5. 3.0	C5. 0.1 M Tris pH 8.0		
							D5. 4.0	D5. 0.1 M Tris pH 8.0		
							A6. 1.0	A6. 0.1 M Bicine pH 9.0		
							B6. 2.0	B6. 0.1 M Bicine pH 9.0		
							C6. 3.0	C6. 0.1 M Bicine pH 9.0		
							D6. 4.0	D6. 0.1 M Bicine pH 9.0		

The pH indicated on each Grid Screen reagent is the ACTUAL pH of the reagent at 22.0°C. All pH adjustments have been made using hydrochloric acid or sodium hydroxide.

Chemical Analysis

Sodium Chloride

M_r 132.14 (NH₄)₂SO₄ ≥ 99.5% Purity

N	<0.001%	As	<0.00001%	Cd	<0.0005%	SO ₄	<0.01%	Mg	<0.0005%	Pb	<0.0005%
Br	<0.005%	Ba	<0.0005%	Co	<0.0005%	Fe	<0.0001%	Mn	<0.0005%	Sr	<0.0005%
I	<0.001%	Bi	<0.0005%	Cr	<0.0005%	K	<0.005%	Mo	<0.0005%	Zn	<0.0005%
Al	<0.0005%	Ca	<0.001%	Cu	<0.0005%	Li	<0.0005%	Ni	<0.0005%	PO ₄	<0.0005%

Citric Acid anhydrous

M_r 192.43 C₆H₈O₇

Cl	<0.0005%	Oxalate	<0.05%	PO ₄	<0.0005%	SO ₄	<0.002%	Tartrate	<0.2%	Ca	<0.005%
Co	<0.0005%	Co	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Fe	<0.0005%	Ni	<0.0005%	Pb	<0.0005%
Zn	<0.0005%										

MES

M_r 195.25 C₆H₁₃NO₄S ≥ 99.5% Purity

Co	<0.0005%	Mo	<0.0005%	SO ₄	<0.0005%	Cr	<0.0005%	Cl	<0.005%	Ag	<0.00002%
Al	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Ni	<0.0002%	As	<0.00001%	Fe	<0.0005%	Pb	<0.00002%
Ba	<0.0005%	K	<0.01%	Sr	<0.0005%	Bi	<0.0005%	Li	<0.0005%	Zn	<0.0005%
Ca	<0.002%	Mg	<0.0005%	Cd	<0.0005%	Mn	<0.0005%	PO ₄	<0.002%	Hg	<0.00001%

HEPES

M_r 238.31 C₈H₁₈N₂O₄S ≥ 99.5% Purity

Co	<0.0005%	Mo	<0.0005%	Cr	<0.0005%	Cl	<0.0005%	Ag	<0.00002%	Pb	<0.00002%
Al	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Ni	<0.0002%	As	<0.00001%	Fe	<0.0005%	Zn	<0.0005%
Ba	<0.0005%	K	<0.01%	Sr	<0.0005%	Bi	<0.0005%	Li	<0.0005%	Hg	<0.00001%
Ca	<0.001%	Mg	<0.0005%	Cd	<0.0005%	Mn	<0.0005%	PO ₄	<0.002%		

27632 El Lazo Road, Suite 100
 Laguna Niguel, CA 92677-3913 U.S.A.
 Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
 Technical Support e-mail: tech@hrmail.com
 WEB: <http://www.hamptonresearch.com>



Table 1
Data processing and merging statistics.

173 345 observed reflections, 50 702 unique reflections.

Resolution shell (Å)	Number of independent reflections	Redundancy	Reflections $I/\sigma(I) \geq 3$ (%)	Completeness (%)	$R_{\text{merge}}^{\dagger}$
30.00–4.93	3386	3.7	76.9	91.3	0.06
4.93–3.91	3296	3.7	79.1	93.5	0.05
3.91–3.42	3400	3.8	79.2	97.0	0.05
3.42–3.11	3430	3.6	76.3	99.0	0.06
3.11–2.88	3430	3.5	74.4	99.0	0.06
2.88–2.71	3429	3.4	72.1	99.0	0.08
2.71–2.58	3365	3.4	71.9	98.7	0.08
2.58–2.47	3403	3.3	71.9	98.5	0.09
2.47–2.37	3352	3.3	72.9	98.2	0.10
2.37–2.29	3346	3.3	72.5	98.4	0.10
2.29–2.22	3371	3.3	72.6	98.1	0.14
2.22–2.15	3359	3.3	73.2	98.6	0.13
2.15–2.10	3367	3.3	73.2	98.6	0.15
2.10–2.05	3378	3.2	72.3	99.3	0.18
2.05–2.00	3390	3.2	72.1	99.3	0.22
Overall	50702	3.4	74.6	97.7	0.06

$$^{\dagger} R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} |I - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle}$$

which contained 1 ml of 1.85 M sodium dihydrogen phosphate pH 4.0. The largest single crystal (Fig. 1), of dimensions $1.0 \times 0.6 \times 0.3$ mm, grew in two weeks.

Crystals used for diffraction data collection were flash-frozen at cryogenic temperature (100 K). They were initially transferred for a few minutes to a conditioning solution consisting of the well solution with 20% (v/v) glycerol and were then directly mounted in loops on a goniometer head centered in a gaseous stream produced by a liquid-nitrogen boil-off (Garman & Schneider, 1997). Diffraction images at this stage systematically showed medium resolution, large mosaicity and streaked spot shapes. Dramatic improvement was achieved after annealing by removing the crystals from the cryostat and placing them in the same cryo-protective solution for at least 2 min and flash-cooling for a second time (Harp *et al.*, 1998).

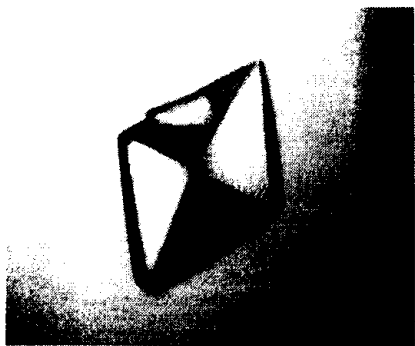


Figure 1
Large ($1.0 \times 0.6 \times 0.3$ mm) crystal of *N*-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase.

X-ray diffraction data were collected over 193 frames of 0.5° oscillation with a crystal-to-detector distance of 150 mm, using a MAR345 image-plate detector system mounted on the Protein Crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory (LNLS; Polikarpov *et al.*, 1998) using monochromatic radiation of 1.378 Å wavelength. The choice of wavelength was determined by the balance between minimizing absorption effects and maximizing the flux in the spectrum available at this beamline (Polikarpov *et al.*, 1997; Rossmann & Blow, 1962).

The intensities were indexed and scaled using *DENZO* and *SCALEPACK*, respectively (Otwinowski & Minor, 1997). The self-rotation function was calculated using the programs *AMoRe* (Navaza, 1994), *ALMN* and *POLARRFN* from the *CCP4* package (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) and *GLRF* from the *REPLACE* package (Tong & Rossmann, 1997; Rossmann & Blow, 1962).

3. Results and discussion

X-ray data collected from a crystal measuring $0.9 \times 0.6 \times 0.4$ mm showed orthorhombic Laue symmetry and systematic absences indicated the crystals to belong to the space group $P2_12_12$. The unit-cell parameters were determined to be $a = 82.09$ (2), $b = 114.50$ (1), $c = 80.17$ (1) Å with e.s.d.s estimated from the fitting of 2052 reflections in a 0.5° oscillation photograph and calculated with the program *DENZO* (Otwinowski & Minor, 1997). The calculated unit-cell volume is 7.535 (3) $\times 10^5$ Å³.

A total number of 173 345 reflections were integrated to a resolution of 2.0 Å and were then merged to obtain 50 702 unique reflections with an overall R_{merge} and completeness of 0.060 and 98.2%, respectively. In the last resolution shell (2.05–2.00 Å), the R_{merge} is 0.22 and the completeness is 99.3% (Table 1). Though observable reflections extend to a limit of 1.8 Å, the usual criteria of acceptable noise level [50% of the reflections with $I > 2\sigma(I)$] and accuracy ($R_{\text{merge}} < 0.25$) indicate that this initial data set is better described as extending to 2.0 Å resolution.

Assuming two monomers per asymmetric unit, the calculated Matthews coefficient

(V_m ; Matthews, 1968) is 2.30 Å³ Da⁻¹, which corresponds to 46.1% solvent. If only one monomer is present, V_m is 4.60 Å³ Da⁻¹ and the solvent content is 73.1%.

N-Acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase has been shown to be active as a homotetramer, following gel-filtration HPLC and sedimentation experiments (Souza *et al.*, 1997). If a dimer is contained in the asymmetric unit, then the tetrameric species could possibly be formed by the crystallographic twofold axis of the space group $P2_12_12$. Several self-rotation functions were calculated using different integration radii ranging from 15 to 40 Å and including data between 20.0 and 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5 Å resolution. Conditions with the Patterson origin removed and the use of normalized structure factors were also tested. No consistent evidence for a non-crystallographic peak in the self-rotation function was observed. This result can be interpreted either as only one monomer in the asymmetric unit or, alternatively, as two independent monomers related by a non-crystallographic twofold axis that is approximately parallel to one of the cell axes, although no special features were observed in the self-Patterson map that support this latter hypothesis. To elucidate this question, the complete structure determination will be required.

Sequence alignment has shown no significant homology with other proteins of known three-dimensional structure, so a model for molecular replacement is not available. An extensive search for heavy-atom derivatives is currently under way. The expression of Se-Met-substituted enzyme is also being pursued, envisaging the use of MAD techniques.

We thank Dr Richard Garratt for manuscript revision and Dr Igor Polikarpov for access to the beamtime at the Brazilian National Synchrotron Laboratory (LNLS). GO is an International Scholar of the Howard Hughes Medical Institute. We also thank FAPESP, PRONEX and CNPq for financial support. GM-H, FM and MC acknowledge support from PAPIIT (DGAPA-UNAM) and CONACYT.

References

- Calcagno, M., Campos, P. J., Mulliert, G. & Suástegui, J. (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **787**, 165–173.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst. D* **50**, 760–763.

crystallization papers

- Garman, E. F. & Schneider, T. R. (1997). *J. Appl. Cryst.* **30**, 211–273.
- Harp, J. M., Timm, D. E. & Bunick, G. J. (1998). *Acta Cryst.* **D54**, 622–628.
- Horjales, E., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., Garratt, R. C. & Oliva, G. (1999). *Structure*, **7**, 527–537.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–411.
- McPherson, A. Jr (1982). *Preparation and Analysis of Protein Crystals*, 1st ed., pp. 96–97. New York: John Wiley.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Navaza, J. (1994). *Acta Cryst.* **A50**, 157–163.
- Oliva, G., Fontes, M. R. M., Garratt, R. C., Altamirano, M. M. & Horjales, E. (1995). *Structure*, **3**, 1323–1332.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Plumbridge, J. A. (1990). *J. Bacteriol.* **172**, 2728–2735.
- Plumbridge, J. A. (1991). *Mol. Microbiol.* **5**, 2053–2062.
- Plumbridge, J. A., Cochet, O., Souza, J. M., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L. & Badet, B. (1993). *J. Bacteriol.* **175**, 4951–4956.
- Polikarpov, I., Perles, L. A., de Oliveira, R. T., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt, R. C. & Craievich, A. (1998). *J. Synchrotron Rad.* **5**, 72–76.
- Polikarpov, I., Teplyakov, A. & Oliva, G. (1997). *Acta Cryst.* **D53**, 734–737.
- Rossmann, M. G. & Blow, D. M. (1962). *Acta Cryst.* **15**, 24–31.
- Souza, J. M., Plumbridge, J. A. & Calcagno, M. L. (1997). *Arch. Biochem. Biophys.* **340**(2), 338–346.
- Tong, L. & Rossmann, M. G. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 594–611.
- White, R. J. (1968). *Biochem. J.* **106**, 847–858.