UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Mariana Araújo Ajalla Aleixo

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

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

Área de Concentração: Química e Física Biológica

Orientadora: Profª Drª Maria Cristina Nonato

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

Ribeirão Preto

2018

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

Aleixo, Mariana Araújo Ajalla

Mapeamento das bases estruturais e suas correlações com patogenias humanas associadas à mutações na fumarase humana. Ribeirão Preto, 2018.
112 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química e Física Biológica.
Orientador: Nonato, Maria Cristina.

1. Fumarate Hidratase 2. Doenças Raras 3. Cristalografia 4. Cinética Enzimática

FOLHA DE APROVAÇÃO

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

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

Área de Concentração: Química e Física Biológica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

Ao síncrotron de SOLEIL e a pesquisadora Beatriz Guimarães da FIOCRUZ

A CAPES pelo apoio financeiro

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

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

RESUMO

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

Fumarato hidratases ou fumarases (FH) catalisam a reação estereoespecífica reversível de hidratação do fumarato em L-malato. Essas enzimas se apresentam em todas as classes de organismos, desde procariotos a eucariotos, e podem ser encontradas nas formas mitocondrial e citosólica. A enzima tem papel importante na produção de energia pois participa do ciclo do ácido cítrico, na resposta ao dano do DNA e como supressor tumoral. A fumarase humana (*Hs*FH), que pertence à classe II, é codificada pelo gene 1q42.1, possui 467 aminoácidos em cada monômero com peso molecular de 50,2 kDa cada. Estudos associaram mutações no gene da FH com diversas doenças humanas como acidúria fumárica, leiomiomatoses de útero e pele (MCUL), que quando associadas com um agressivo carcinoma múltiplo de células é conhecido como leiomiomatose hereditária e câncer renal (HLRCC). Apesar da grande importância da fumarase humana no metabolismo energético, ainda há pouca informação em relação ao mecanismo catalítico adotado pela enzima e o efeito estrutural e cinético causado pelas mutações envolvidas com essas doenças. Diante disso, nosso trabalho utilizou uma abordagem híbrida que envolve a caracterização biofísica, bioquímica e estrutural da enzima *Hs*FH, e seus mutantes: N107T*Hs*FH, H180R*Hs*FH, Q185R*Hs*FH, K230R*Hs*FH, G282V*Hs*FH, E362Q*Hs*FH, S365G*Hs*FH e N373D*Hs*FH, identificados em pacientes. Estudos cinéticos foram realizados em sete diferentes pHs e, pela primeira vez para fumarases, o ensaio foi realizado com os dois substratos presentes na mesma mistura reacional, confirmando a contribuição da reação reversa para a velocidade global da enzima. De acordo com os estudos de termoflúor a proteína é estabilizada em pHs alcalinos e através da ligação de compostos no sítio ativo. A estrutura da enzima *Hs*FH nativa foi resolvida a 1,8 Å e identificou a presença de moléculas de HEPES complexadas na região C-terminal da enzima. Os estudos cinéticos demonstraram um aumento da eficiência catalítica na presença do HEPES, sugerindo um possível papel alostérico de seu sítio de ligação para a atividade catalítica. Foram determinadas as estruturas para os mutantes N107T*Hs*FH, H180R*Hs*FH, Q185R*Hs*FH, K230R*Hs*FH, E362Q*Hs*FH, S365G*Hs*FH e N373D*Hs*FH. As mutações Q185R, E362Q, S365G e N373D foram identificadas no sítio ativo afetando diretamente a capacidade da proteína em ligar os substratos, enquanto que a mutação H180R foi localizada no sítio B, que conduz os substratos e produtos para dentro e fora do sítio ativo. Já a mutação K230R está localizada no domínio central, mas os resultados de termoflúor demonstram um efeito direto na capacidade da enzima em acomodar o substrato. A mutação N107T, localizada longe do sítio ativo foi a única que permaneceu ativa e teve seus parâmetros cinéticos residuais determinados. O presente trabalho contribui para o entendimento das bases estruturais que correlacionam mutações na *Hs*FH, deficiência enzimática e patologia.

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

ABSTRACT

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

Fumarate hydratases or fumarases (FH) catalyze the reversible stereospecific hydration of fumarate to L-malate. They are present in all classes of organisms, from prokaryotes to eukaryotes, and can be found in the mitochondrial and cytosolic forms. The enzyme has an important role in energy production as part of the well-known Citric Acid Cycle, in DNA damage response and as tumor suppressor. Human fumarase (*Hs*FH) belongs to class II and is encoded by 1q42.1 gene. *Hs*FH is tetrameric and has 467 amino acids per monomer, with predicted molecular weight of 50.2 kDa. Several studies associated FH gene mutations with some human diseases such as fumaric aciduria, multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis (MCUL), which when associated with an aggressive form of multiple cell carcinoma is known as hereditary leiomyomatosis and renal cancer (HLRCC) syndrome. Although the major role of *Hs*FH in energetic metabolism, there are still little structural and kinetic information about the mutants involved in these diseases. Thus, this study aims, through a hybrid approach, composed by biophysics, biochemical and structural characterization of mutants N107T*Hs*FH, H180R*Hs*FH, Q185R*Hs*FH, K230R*Hs*FH, G282V*Hs*FH, E362Q*Hs*FH, S365G*Hs*FH and N373D*Hs*FH identified from patients. Steady-state kinetics studies were performed in seven different pHs and, for the first time, the contribution of both substrates was analyzed simultaneously in a single kinetic assay and allowed to quantify the contribution of the reverse reaction for kinetics. According to thermofluor studies, structural stability can be achieved at alkaline pHs and suggests that ligand binding can modulate the protein stability. *Hs*FH crystal structure was solved at 1.8 Å resolution and identified HEPES molecules complexed with the enzyme C-terminal region. Kinetics studies with HEPES showed an increase of the catalytic efficiency and suggests that HEPES binding site might have an allosteric role. Crystal structures for the mutants N107T*Hs*FH, H180R*Hs*FH, Q185R*Hs*FH, K230R*Hs*FH, E362Q*Hs*FH, S365G*Hs*FH and N373D*Hs*FH were determined. The mutations Q185R, E362Q, S365G and N373D were identified in the active site and affect the substrate binding capacity directly, while mutation H180R was localized in the B site, which conducts the substrates and products in and out the active site. The mutation K230R is localized in the central domain, but thermofluor results demonstrate a direct effect on the ability of the enzyme to accommodate the substrate. The N107T mutation located far from the active site was the only one that remained active and had its residual kinetic parameters determined. The present work contributes to the understanding of the structural bases that correlate mutations in *Hs*FH, enzymatic deficiency and pathology.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação enzimática catalisada pela enzima fumarase (FH). 5

Figura 2. Ciclo do ácido cítrico (Ciclo do ácido tricarboxílico – TCA ou Ciclo de Krebs). Estruturas das enzimas participantes do ciclo, ou parte dos complexos, retiradas do *Protein Data Bank* (PDB). Citrato-sintase (código PDB: 2CTS), Aconitase (código PDB: 2B3Y), Isocitrato-desidrogenase (código PDB: 5YFN), Complexo α-cetoglutarato-desidrogenase (código PDB: 2JGD), Succinil-CoA sintetase (código PDB: 2FP4), Succinato-desidrogenase (códigos PDB: 1NEK), Fumarase (código PDB: 3E04), Malato-desidrogenase (código PDB: 1MLD).....6

Figura 3. Representação da estrutura tridimensional da enzima LmFH-2. A) Representação do dímero da fumarase de L. major. Em azul estão as hélices α e em rosa as fitas β. Em amarelo e laranja, representado em *stick,* está o cluster [4Fe-4S]. B) Cluster [4Fe-4S] em destaque. Em verde estão representados os resíduos de cisteína que participam da ligação e em rosa o substrato L-malato. Átomos de enxofre estão em amarelo, ferro em laranja, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e carbonos em rosa ou verde. (PDB ID: 5L2R) 7

Figura 4. Superfamília da Aspartase/Fumarase. Representação em cartoon do monômero de algumas enzimas da superfamília. A) Fumarase humana (Código PDB: 5D6B, dados não publicados), B) Aspartase de *Bacillus sp.* cepa YM55-1 (Código PDB: 3R6V [37]), C) Adenilosuccinato liase de *Escherichia coli* (Código PDB: 2PTR [38]) D) Tetrâmero de FumC de *E. coli* representando a estrutura quaternária das fumarases de classe II (Código PDB: 1YFE [39]). O círculo preto indica a região de um dos quatro sítios ativos da enzima. 8

Figura 5. Representação da proposta de mecanismo catalítico para as enzimas Aspartase, Fumarase, Argininosuccinato liase e Adenilosuccinato liase. Figura modificada de Veetil *et al.* [36]. 9

Figura 6. Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos de fumarases de class II: humana (*Hs*FH), *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*FH), *Eschericia coli* (FumC), *Rickettsia buchneri* (*Rb*FH), *Thermus aquaticus* (*Ta*FH) and *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*FH). Em destaque estão as regiões do monômero que compõe o sítio. Região 1 está em vermelho, região 2 em azul e região 3 em roxo. Resíduos catalíticos estão marcados com uma estrela. A caixa verde indica a posição do sítio B. 11

Figura 7. Representação em cartoon do monômero da *Hs*FH. Em rosa estão destacadas as localizações dos mutantes escolhidos para esse trabalho 13

Figura 8. Representação esquemática de um poço da placa *Cryschem* (*Hampton Research*) utilizada nos experimentos de cristalização. A) Técnica da gota pendurada B) Técnica da gota sentada. (Figura gentilmente cedida por Pinheiro, M. P.).....24

Figura 9. Fragmentos utilizados para *soaking* dos cristais da proteína *Hs*FH.....26

Figura 10. Perfil de purificação da enzima *Hs*FH em coluna de níquel. 1) Pellet 2) Sobrenadante 3) Efluente 1 4) Eflente 2 5) Marcador de peso molecular (kDa) 6) Lavagem com o tampão 10 mM de imidazol 7) Lavagem com o tampão 25 mM de imidazol 8) Segunda lavagem com o tampão 10 mM de imidazol 9) *Hs*FH eluída após a clivagem com tampão 10 mM de imidazol 10) Lavagem com tampão 500 mM de imidazol. 29

Figura 11. Análise do perfil de polidispersividade encontrado para a *Hs*FH obtido através da utilização de técnicas de espalhamento dinâmico de luz. Gráfico representando o perfil de distribuição do tamanho (nm) em função do volume...30

Figura 12. Perfil pH versus atividade específica para a enzima fumarase humana (*Hs*FH) utilizando L-malato (rosa) ou fumarato (roxo) como substrato. A curva foi construída a partir da medida da velocidade inicial de consumo ou produção de fumarato a 250 nm e 25ºC. Foram utilizados 12 nM da enzima, 10 mM de L-malato e 500µM de fumarato.....31

Figura 13. Caracterização cinética no estado estacionário da *Hs*FH. Os dados foram ajustados à equação de Michaelis-Menten (Equação 1). A) Fumarato foi usado como substrato em diferentes concentrações (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 µM). B) L-malato foi usado como substrato em diferentes concentrações (0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 18, 25, 30, 40 e 50 mM) 33

Figura 14. Caracterização cinética no estado estacionário da *Hs*FH. Gráfico de superfície da cinética completa. Os dados foram ajustados à equação 2. 34

Figura 15. Gráfico da variação da temperatura de desenovelamento ΔT_m para a enzima *Hs*FH em diferentes pHs e concentrações de NaCl. R é a referência em água; os tampões presentes nos pHs 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 são acetato de sódio, Citrato de sódio, ácido succínico, MES monoidratado, BIS-TRIS, Imidazol, HEPES, Tris, BIS-TRIS Propano, AMPD eglicina, respectivamente, todos na concentração de 50 mM. 37

Figura 16. Cristal de *Hs*FH obtido na condição0,1 M HEPES pH 7,5, 4% m/v polietilenoglicol 10000 e 1% v/v 2-metil-pentanodiol (MPD).....38

Figura 17. Representação em *cartoon* para a *Hs*FH. A) Monômero da *Hs*FH com o domínio 1 (D1) colorido em azul, domínio 2 (D2) colorido em rosa e domínio 3 (D3) colorido em amarelo. B) Estrutura do tetrâmero funcional da *Hs*FH. Os painéis mostram a visão ortogonal da estrutura com os sítios ativos indicados pelas setas. 39

Figura 18. Representação em cartoon do sítio ativo da *Hs*FH. A) Em destaque a His 235 e a água 778 com as distâncias interatômicas em preto. Em roxo está destacado o SS-loop. B) Região no tetrâmero onde as figuras A e C se localizam. C) Alinhamento das estruturas *Hs*FH (5UPP) em cinza com FumC de *E. coli* (1YFE) em verde, destacando as His 235 (5UPP) e His 188 (1YFE) com as moléculas de água W 778 (1YFE) e W 26 (1YFE). Distâncias para 5UPP. 40

Figura 19. Representação do sítio de ligação do HEPES. As distâncias entre os átomos estão representadas na figura em Å. A) Os círculos pretos representam a localização das moléculas de HEPES entre dois tetrâmeros de unidades assimétricas distintas. B) Resíduos de D3/A estão representados em amarelo e D3/A em azul. Interações polares indicadas por linhas verdes pontilhadas. C) Representação da interface entre os tetrâmeros. 42

Figura 20. Superfície de potencial eletrostático de isoformas de fumarases Classe II. *Homo sapiens* FH (5UPP), *Thermus thermophilus* FH (1VDK), *Escherichia coli* FumC (1YFE);*Saccharomyces cerevisiae* (strain ATCC 204508 / S288c) FH (1YFM); *Rickettsia prowazekii* FH (3GTD), *Mycobacterium tuberculosis* FH (3NO9); *Burkholderia pseudomallei* Fh (3TV2); *Mycobacterium smegmatis* FH (3RD8); *Rhizobium meliloti* FH (4HGV) 43

Figura 21. Análise do fator de temperatura em *cartoon putty*. A região C-terminal de 3E04 é mostrada em roxo. A região C-terminal de 5UPP com a molécula de HEPES é mostrada em azul cian. Átomos de C, N, O e S estão representados em branco, azul, vermelho e amarelo, respectivamente. 44

Figura 22. Gel de poliacrilamida dos mutantes da *Hs*FH. Em vermelho estão destacadas as frações contendo a proteína pura. Nos géis A, B, C e G estão representadas as frações referentes à purificação por cromatorgrafia de afinidade. Nos géis D, E e F estão representadas a proteína após a purificação por afinidade e as frações da gel filtração. A) Mutante N107T*Hs*FH B) Mutante H180R*Hs*FH C) Mutante K230R*Hs*FH D) Mutante E362Q*Hs*FH E) Mutante S365G*Hs*FH F) Mutante N373D*Hs*FH, G) Mutante Q185R*Hs*FH. 47

Figura 23. Análise do perfil de polidispersividade encontrado para os mutantes da enzima *Hs*FH obtido através da utilização de técnicas de espalhamento dinâmico de luz. Gráfico representando o perfil de distribuição do tamanho (nm) em função do volume. A) Mutante N107T*Hs*FH B) Mutante H180R*Hs*FH C) Mutante

Q185R*Hs*FH D) Mutante K230R*Hs*FH E) Mutante E362Q*Hs*FH F) Mutante S365G*Hs*FH G) Mutante N373D*Hs*FH.....49

Figura 24. Caracterização cinética no estado estacionário do mutante N107T*Hs*FH. Gráfico de superfície da cinética completa. Os dados foram ajustados à equação 2. 51

Figura 25. Resultados dos experimentos de termoflúor dos mutantes da enzima *Hs*FH com os valores de diferença na temperatura de desenovelamento (ΔTm em °C) em relação à referência em água. Cada coluna representa um pH diferente e cada linha uma concentração de NaCl (mM). Os experimentos foram realizados usando o kit *Solubility and Stability 2* (Hampton Research). Em azul está a referência em água, verde ΔTm > 2.0 °C, amarelo -2.0°C < ΔTm < 2.0 °C e vermelho ΔTm < -2.0 °C. 53

Figura 26. Exemplos de cristais dos mutantes da *Hs*FH. A) Cristais do mutante H180R*Hs*FH na condição 0,2M tartarato de amônio dibásico, 14% (m/v) PEG 3350. Proteína a 6 mg/mL. B) Cristal do mutante E362Q*Hs*FH na condição 0,1 M MES pH 6,5, 12% (m/v) PEG 20k. Proteína a 4 mg/mL. C) Cristal do mutante S365G*Hs*FH na condição 0,1 M BIS-TRIS pH 6,5, 20% (m/v) PEG 3350, 2% Tacsimato pH 6,0. Proteína a 4 mg/mL. D) Cristal do mutante N373D*Hs*FH na condição 0,1 M MES pH 6,5, 12% (m/v) PEG 20 K. Proteína a 4 mg/mL. 55

Figura 27. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,8; representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo treonina 107 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita). 58

Figura 28. RMSD por resíduo entre o mutante N107T*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.....59

Figura 29. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,1; representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo arginina 180 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita). 59

Figura 30. RMSD por resíduo entre o mutante H180R*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP 60

Figura 31. Representação em *cartoon* do sítio ativo e sítio B dos mutantes N107T*Hs*FH e H180R*Hs*FH sobrepostos à estrutura da enzima nativa. Em cinza estão os resíduos da *Hs*FH nativa, em vermelho os resíduos mutados. 61

Figura 32. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,2; representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo arginina 185 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita). 61

Figura 33. Representação em *cartoon* da *Hs*FH e do mutante Q185R*Hs*FH. Em cinza a estrutura 5UPP com a molécula de HEPES, em roxo 3E04 e em rosa o mutante Q185R*Hs*FH. Átomos de C, N, O e S estão representados em branco, azul, vermelho e amarelo, respectivamente. 62

Figura 34. RMSD por resíduo entre o mutante Q185R*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP 62

Figura 35. Alinhamento das estruturas das enzimas *Hs*FH (5UPP) representada em cinza e Q185R*Hs*FH, representada em rosa. Estão destacados o resíduo catalítico His 235, e os resíduos 185. A superfície da proteína nativa está representada em cinza escuro. 63

Figura 36. Representação em cartoon da estrutura do mutante K230R*Hs*FH. Em azul claro estão representados os monômeros que compõe a unidade assimétrica e em escura estão as moléculas geradas por um eixo de rotação de ordem 2 e que formam os tetrâmeros funcionais. 64

Figura 37. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,0 para cadeia A (superior esquerda), 1,6 para cadeia B (superior direita) e 1,1 para as cadeias C e D (inferior esquerda e direita, respectivamente); representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo arginina 230. 65

Figura 38. Representação em *cartoon* da estrutura da proteína K230R*Hs*FH. A) Sobreposição da estrutura da enzima *Hs*FH nativa em cinza e do mutante K230R*Hs*FH em verde escuro. Em destaque em vermelho o resíduo Arg 230 e os resíduos Gln 185 e His 235. B) Sobreposição das estruturas das proteínas *Hs*FH nativa em cinza, do mutante K230R*Hs*FH em verde escuro e do mutante Q185R*Hs*FH em rosa. Estão destacados os resíduos 185, em vermelho para Q185R*Hs*FH, em verde escuro para K230R*Hs*FH e em cinza para *Hs*FH nativa. 66

Figura 39. RMSD por resíduo entre o mutante K230R*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A da proteína nativa em relação às cadeias A, B, C e D do mutante. B) Valores da cadeia B proteína nativa em relação às cadeias A, B, C e D do mutante. 66

Figura 40. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,0; representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo glutamina 362 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita).....67

Figura 41. Sobreposição das estruturas das proteínas *Hs*FH nativa, em cinza, e E362Q*Hs*FH, em azul. Estão destacados os resíduos 362 da *Hs*FH nativa em cinza e E362Q*Hs*FH em vermelho. Em amarelo está a região do SS-loop.....68

Figura 42. RMSD por resíduo entre o mutante E362Q*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP 68

Figura 43. RMSD por resíduo entre o mutante S265G*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A da proteína nativa em relação às cadeias A, B, C e D do mutante. B) Valores da cadeia B proteína nativa em relação às cadeias A, B, C e D do mutante. 69

Figura 44. Sobreposição das estruturas das proteínas S365G*Hs*FH e *Hs*FH nativa (5UPP e 3E04). Em cinza está representada a cadeia B de 5UPP, em verde cadeia C do mutante S365G*Hs*FH e em roxo cadeia C da 3E04. Representação em *cartoon putty.* Átomos de C, N, O e S estão representados em branco, azul, vermelho e amarelo, respectivamente.....70

Figura 45. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 2,0; representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo ácido aspártico 373 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita).....70

Figura 46. RMSD por resíduo entre o mutante N373D*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP 71

Figura 47. Alinhamento das estruturas das enzimas *Hs*FH nativa (5UPP) representada em cinza e N373D*Hs*FH, representada em azul escuro. O SS-loop está destacado em amarelo. O resíduo Asp 373 está em vermelho. 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas mutações sítio-dirigidas N107T*Hs*FH, H180R*Hs*FH, K230R*Hs*FH e G282V*Hs*FH. 18

Tabela 2. Composição dos tampões utilizados para o experimento de determinação do pH de atividade ótimo para a enzima *Hs*FH nativa 22

Tabela 3. Composição do PEG *Smear* utilizado nos experimentos de cristalização. 25

Tabela 4. Parâmetros cinéticos para *Hs*FH. 32

Tabela 5. Parâmetros cinéticos da *Hs*FH para os dois substratos. 34

Tabela 6. Resultados de ΔT_m para *Hs*FH. 36

Tabela 7. Resultados de ΔT_m da enzima *Hs*FH para a comparação entre NaCl e KCl. 37

Tabela 8. Dados cristalográficos e estatísticos para *Hs*FH. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses. 40

Tabela 9. Parâmetros cinéticos para HsFH. 45

Tabela 10. Rendimento de cada mutante de *Hs*FH, em mg de proteína por litro de cultura de bactérias, após a purificação por afinidade e por cromatografia de exclusão de tamanho 47

Tabela 11. Valores obtidos para os picos da distribuição de tamanho das partículas em solução no DLS. 48

Tabela 12. Parâmetros cinéticos do mutante N107T*Hs*FH para os dois substratos. 50

Tabela 13. Comparação dos valores das temperaturas de desenovelamento para a enzima *Hs*FH e seus mutantes estudados utilizando termoflúor. 52

Tabela 14. Experimentos de cristalização e coleta de dados dos mutantes E362Q*Hs*FH, H180R*Hs*FH, K230R*Hs*FH, N107T*Hs*FH, Q185R*Hs*FH, S365G*Hs*FH e N373D*Hs*FH. 56

Tabela 15. Dados cristalográficos e estatísticos para N107T*Hs*FH, H180R*Hs*FH, Q185R*Hs*FH, K230R*Hs*FH, E362Q*Hs*FH, S365G*Hs*FH e N373D*Hs*FH. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses. 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
DLS	*Dynamic Light Scattering*
DMSO	Dimetilsulfóxido
EU	União Europeia
FDA	*Food and Drug Administration*
FH	Fumarato hidratase ou fumarase
FUM	Fumarato
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2 hidoxietil peperazina
HLRCC	*Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer*
Hs	*Homo sapiens*
*Hs*FH	Fumarase humana
IPTG	Isopropiltio-β-D-galactosídeo
k_{cat}	*Turnover* da enzima
kDa	quiloDalton
K_{eq}	Constante de equilíbrio
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Luria-Bertani
Lm	*Leishmania major*
MAL	L-malato
MCUL	*Multiple Cutaneous and Uterine Leiomyomatosis*
MES	Ácido 2-etanosulfônico
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMIM	*Online Mendelian Inheritance in Man*
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	*Protein Data Bank*
PEG	Polietilenoglicol
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SUS	Sistema Único de Saúde
TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico

SUMÁRIO

RESUMO ..... **I**

ABSTRACT ..... **II**

LISTA DE FIGURAS ..... **III**

LISTA DE TABELAS ..... **IX**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ..... **XI**

1. INTRODUÇÃO **2**

1.1 Doenças Raras 2

1.2 Fumarases 5

1.2.1 Fumarases classe I 6

1.2.2 Fumarases de classe II 8

1.2.2.1 Mutações da enzima fumarase humana 12

2. OBJETIVOS **15**

3. MATERIAIS E MÉTODOS **17**

3.1 Mutagênese sítio-dirigida para produção dos mutantes G282V*Hs*FH, H180R*Hs*FH, K230R*Hs*FH e N107T*Hs*FH 17

3.2 Produção heteróloga da enzima *Hs*FH nativa e seus mutantes 18

3.2.2 Purificação por cromatografia de afinidade 19

3.2.3 Purificação por cromatografia de exclusão por tamanho 20

3.3 Caracterização biofísica: Termoflúor e DLS. 21

3.4 Ensaios de atividade para a proteína *Hs*FH nativa 21

3.4.1 Determinação do pH ótimo 21

3.4.2 Ensaios cinética enzimática 22

3.5 Estudos estruturais 23

3.5.1 Cristalização 23

3.5.2 *Fragment screening* 25

3.5.3 Coleta de dados e processamento 26

3.5.4 Resolução da estrutura 27

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 29

4.1 *Hs*FH nativa 29

4.1.1 Expressão e purificação 29

4.1.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) 29

4.1.3 Atividade enzimática 30

4.1.3.1 Determinação do pH ótimo para *Hs*FH 30

4.1.3.2 Cinética enzimática 31

4.1.4 Ensaios de Termoflúor 34

4.1.5 Estrutura da *Hs*FH nativa 38

4.1.6 Estudo de busca de fragmentos por cristalografia 45

4.2 Estudo dos mutantes da enzima fumarase humana 46

4.2.1 Construção e produção heteróloga dos mutantes propostos por mutagênese sítio-dirigida 46

4.2.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) 48

4.2.3 Atividade enzimática 49

4.2.3.1 Cinética enzimática do mutante N107T*Hs*FH..... 49

4.2.4 Avaliação da estabilidade térmica dos mutantes baseada em fluorimetria diferencial de varredura 51

4.2.5 Estudos estruturais dos mutantes 54

4.2.5.1 N107T*Hs*FH 58

4.2.5.2 H180R*Hs*FH..... 59

4.2.5.3 Q185R*Hs*FH..... 61

4.2.5.4 K230R*Hs*FH 63

4.2.5.5 E362Q*Hs*FH 67

4.2.5.6 S365G*Hs*FH 69

4.2.5.7 N373D*Hs*FH 70

5. CONCLUSÕES 74

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 77

7. APÊNDICES 85

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Raras

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

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

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

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

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

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

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

Dentre as mais de 5.000 doenças classificadas como raras existe a leiomiomatose cutânea e uterina múltipla (*Multiple Cutaneous and Uterine Leiomyomatosis* – MCUL, OMIM 150800), a síndrome de leiomiomatose hereditária e carcinoma de células renais (*Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer* – HLRCC, OMIM 605839) e doenças metabólicas como a acidúria fumárica ou

deficiência de fumarase (OMIM 606812), todas essas relacionadas com alterações na atividade da enzima fumarato hidratase (fumarase – FH) [7].

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

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

1.2 Fumarases

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

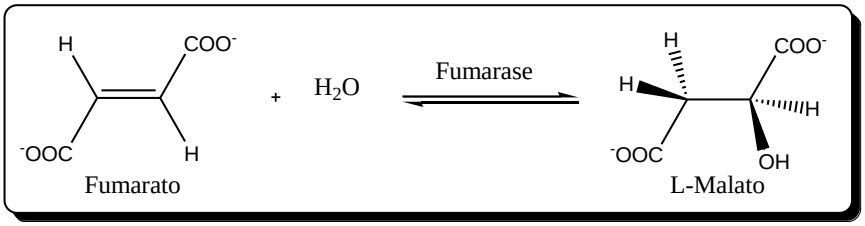

Figura 1. Reação enzimática catalisada pela enzima fumarase (FH).

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

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

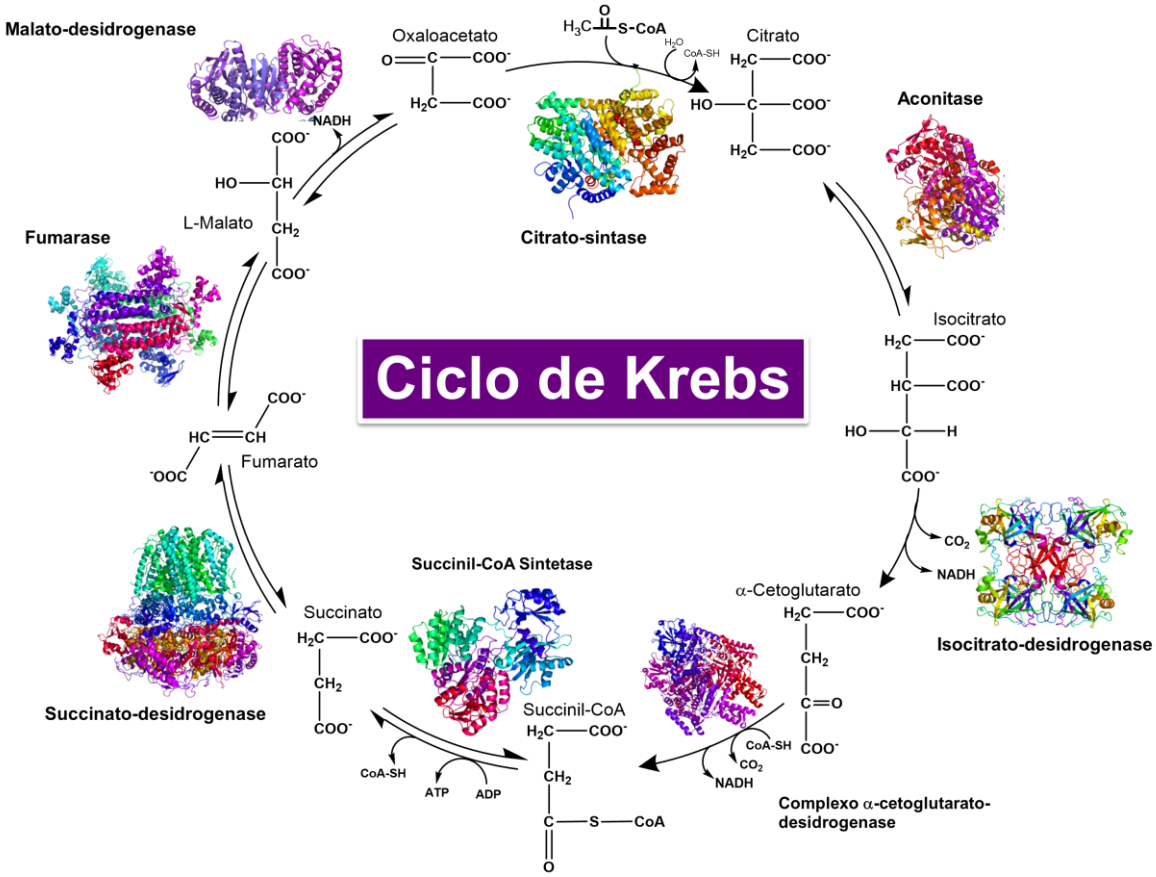

Figura 2. Ciclo do ácido cítrico (Ciclo do ácido tricarboxílico – TCA ou Ciclo de Krebs). Estruturas das enzimas participantes do ciclo, ou parte dos complexos, retiradas do *Protein Data Bank* (PDB). Citrato-sintase (código PDB: 2CTS), Aconitase (código PDB: 2B3Y), Isocitrato-desidrogenase (código PDB: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

1.2.1 Fumarases classe I

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

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

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

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

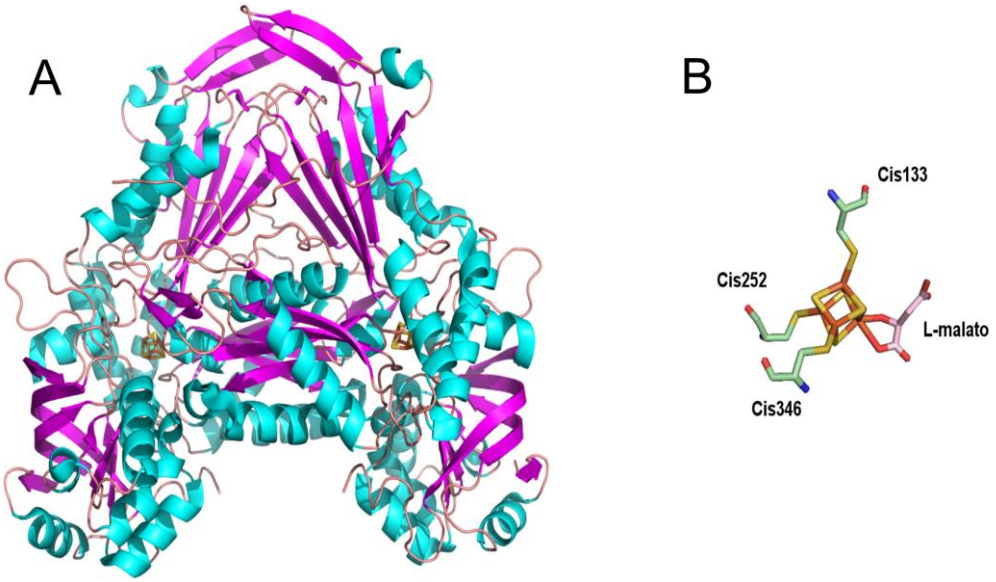

Figura 3. Representação da estrutura tridimensional da enzima LmFH-2. A) Representação do dímero da fumarase de L. major. Em azul estão as hélices α e em rosa as fitas β. Em amarelo e laranja, representado em *stick,* está o cluster [4Fe-4S]. B) Cluster [4Fe-4S] em destaque. Em verde estão representados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

Estudos envolvendo as fumarases de classe I abordam principalmente a possibilidade de uso dessas enzimas como alvo terapêutico contra, especialmente, doenças parasitárias, uma vez que entre classe I e classe II de fumarases observa-se uma baixa similaridade, de aproximadamente 20% [35] e humanos apresentam apenas fumarase de classe II. Ou seja, devido ao papel fundamental que a FH exerce no metabolismo desses parasitas e a diferença com relação à enzima humana, o desenvolvimento de fármacos seletivos e específicos se torna possível.

1.2.2 Fumarases classe II

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

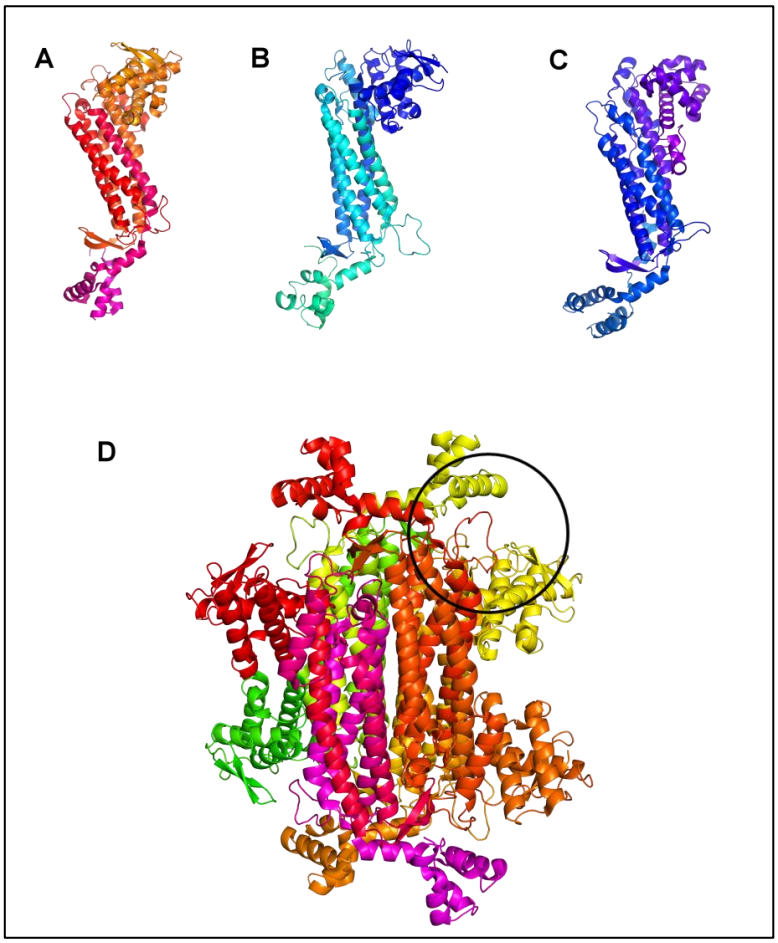

Figura 4. Superfamília da Aspartase/Fumarase. Representação em cartoon do monômero de algumas enzimas da superfamília. A) Fumarase humana (Código PDB: 5D6B, artigo não publicado), B) Aspartase de *Bacillus sp.* cepa YM55-1 (Código PDB: 3R6V [37]), C) Adenilosuccinato liase de *Escherichia coli* (Código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

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

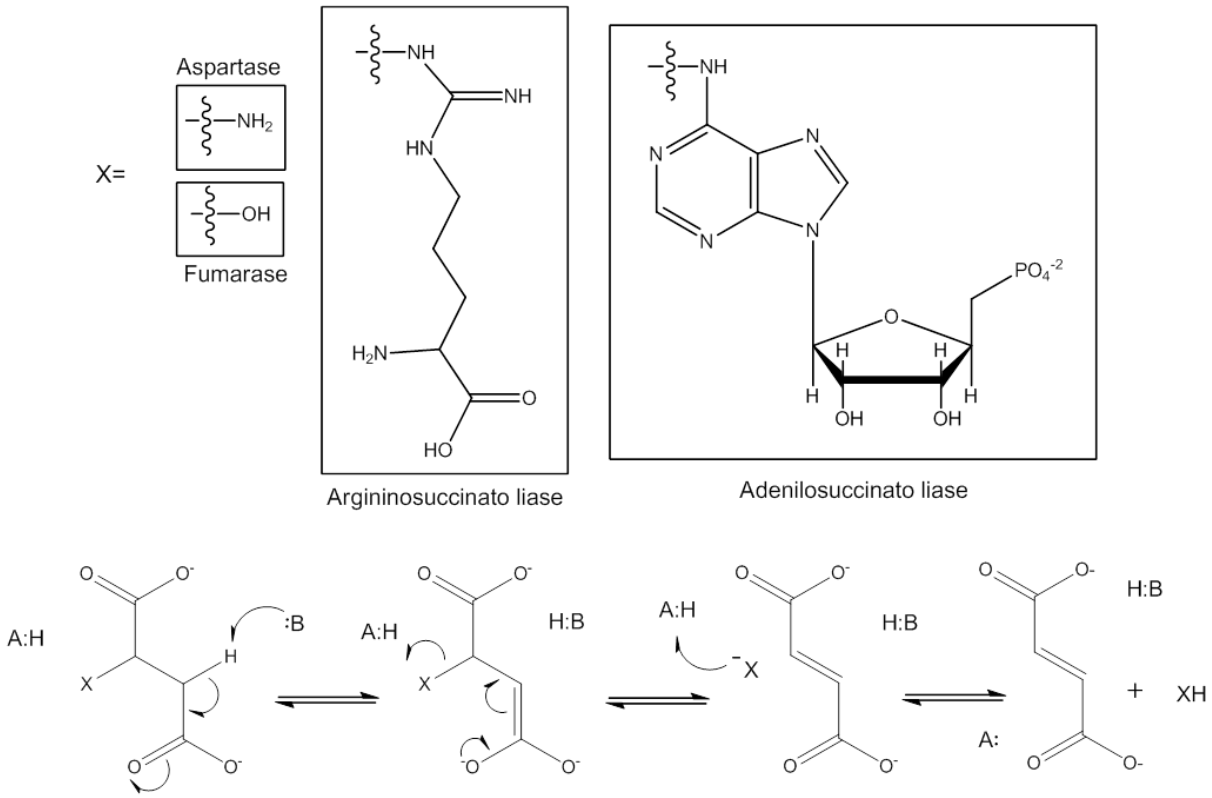

Figura 5. Representação da proposta de mecanismo catalítico para as enzimas Aspartase, Fumarase, Argininosuccinato liase e Adenilosuccinato liase. Figura modificada de Veetil *et al.* [36].

Fumarases de classe II são homotetraméricas, de peso molecular em torno de 200 kDa e independentes de metais [31]. São expressas em bactérias (fumarase C de *E. coli*) e eucariotos superiores como mamíferos [44, 45]. Estruturalmente, essa classe de fumarases é caracterizada como proteínas predominantemente compostas de hélices α divididas em três domínios (D1, D2 e D3), sendo D2 o principal responsável pelas interações que estabilizam o tetrâmero. A fumarase humana (*Hs*FH), que pertence a classe II, é codificada pelo gene 1q42.1, possui 467

aminoácidos em cada monômero, peso molecular de 50,2 kDa e ponto isoelétrico teórico de 6,91 [46].

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

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

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

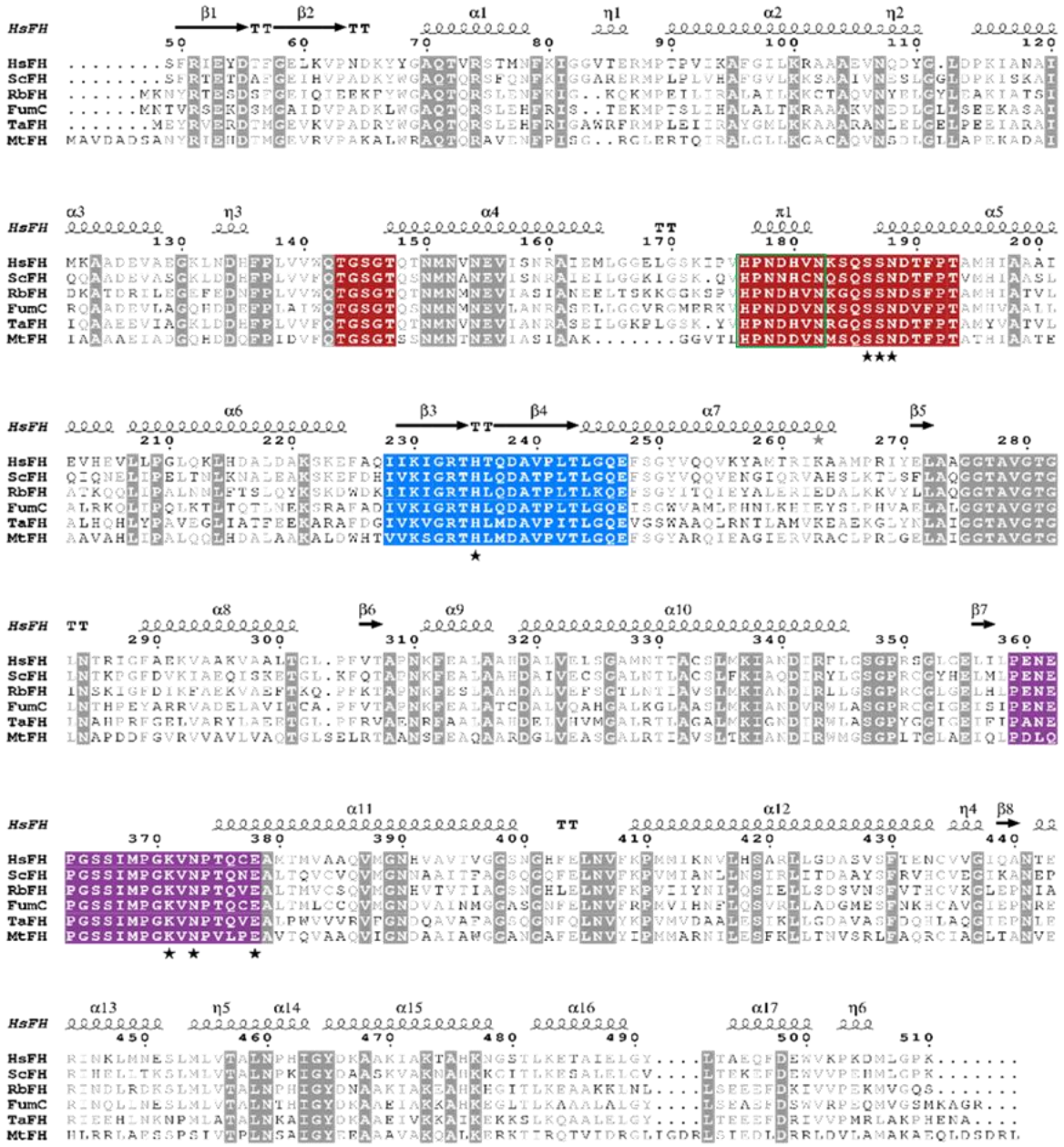

Figura 6. Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos de fumarases de class II: humana (*Hs*FH), *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*FH), *Eschericia coli* (FumC), *Rickettsia buchneri* (*Rb*FH), *Thermus aquaticus* (*Ta*FH) e *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*FH). Em destaque estão as regiões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

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

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

1.2.2.1 Mutações da enzima fumarase humana

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

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

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

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

Sendo assim, o presente trabalho visa utilizar métodos de biologia estrutural para mapear as características biofísicas, bioquímicas e estruturais da proteína nativa e de mutantes selecionados, de forma a contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares que modulam o desenvolvimento das doenças raras

diretamente relacionadas com mutações na fumarase. Neste trabalho, combinamos o uso das técnicas difração de raios X por monocristais, varredura por fluorimetria diferencial, espalhamento dinâmico de luz e cinética enzimática para caracterizar os efeitos de cada mutação na estrutura da proteína, na estabilidade de seu arranjo oligomérico e na sua atividade catalítica.

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

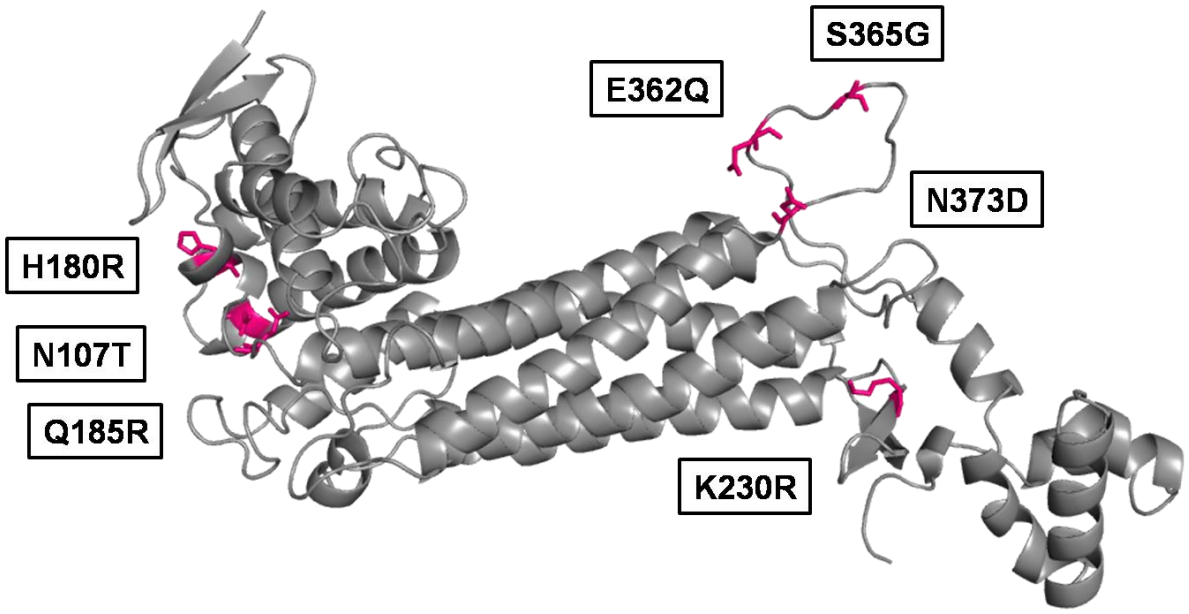

Figura 7. Representação em cartoon do monômero da *Hs*FH. Em rosa estão destacadas as localizações dos resíduos mutantes escolhidos para esse trabalho

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Considerando o importante papel da fumarase no ciclo do ácido cítrico e como supressor tumoral, este trabalho visa a caracterização fumarase humana nativa assim como dos mutantes E362Q, G282V, H180R, K230R, N107T, Q185R, S365G, N373D identificados em pacientes e localizados em diferentes domínios da proteína. Para tanto será utilizadas as técnicas de difração de raios X em monocristais, varredura por fluorimetria diferencial, espalhamento dinâmico de luz e caracterização por cinética enzimática com o objetivo de caracterizar os efeitos de cada mutação na estrutura da proteína, na estabilidade do arranjo oligomérico da proteína e na sua atividade catalítica.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Mutagênese sítio-dirigida para produção dos mutantes G282V*Hs*FH, H180R*Hs*FH, K230R*Hs*FH e N107T*Hs*FH

As mutações foram realizadas utilizando o kit QuikChange® II XL SiteDirected Mutagenesis Kit (Stratagene California). Esse método permite a replicação de todo o plasmídeo do DNA molde, utilizando *primers* centrados no local da mutação, que se sobrepõe para ambos os lados [58]. Dessa forma é possível obter o plasmídeo do mutante de interesse sem a necessidade de subclonagens. Foi utilizado como molde a enzima *Hs*FH nativa anteriormente clonada em nosso laboratório no vetor de expressão pET-28a(+)-SUMO.

A primeira etapa de produção dos mutantes é a amplificação do gene a partir de *primers* contendo a mutação (Tabela 1) utilizando a enzima *Phusion DNA polimerase* (NEB), em um termociclador (Mastercycle Gradient – Eppendorf). Para cada mutante foram testadas duas concentrações de Mg^{+2} (1,5 e 2,0 mM). Cada reação contém 1x de *Buffer GC* 5x (NEB), 50 ng do gene da *Hs*FH nativa, 1 µM de primer *forward*, 1 µM de primer *reverse*, 200 µM de dNTPmix (Invitrogen), 2 U da enzima *Phusion DNA polymerase* (NEB), 3% (v/v) DMSO e 1,5 ou 2,0 mM de Mg^{+2} em 50 µL de reação. A reação compreendeu uma desnaturação inicial a 98 °C por 30 s, seguida de 25 ciclos de desnaturação (98 °C por 30 s), anelamento (72 °C por 30 s) e extensão (72 °C por 2 min), com extensão final a 72 °C por 10 minutos. Ao término da amplificação foram adicionados a cada mistura reacional 3,3 µL de *Tango Buffer* (Thermo Fisher Scientific) e 1 µL da enzima DpnI (10 U/µL - Thermo Fisher Scientific). Cada reação foi incubada a 37 °C por duas horas e a inativação da enzima foi realizada por incubação a 80 °C por 20 minutos. Ao término da inativação as reações foram purificadas utilizando o kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas mutações sítio-dirigidas N107T*Hs*FH, H180R*Hs*FH, K230R*Hs*FH e G282V*Hs*FH.

Nome	Sequência (5' – 3')
*Hs*FH N107T Fwd	CCATAATCCTGAGTAACTTCTGCGGCCGCACGTT
*Hs*FH N107T Rev	AACGTGCGGCCGCAGAAGTTACTCAGGATTATGG
*Hs*FH Q185R Fwd	GGAAGGTGTCGTTAGAGCTACGAGATTTGTTCACGTGATC
*Hs*FH Q185R Rev	GATCACGTGAACAAATCTCGTAGCTCTAACGACACCTTCC
*Hs*FH K230R Fwd	CTGCGTGTGGGTACGACCAATACGGATGATTTGGGCGAATTCTTTT
*Hs*FH K230R Rev	AAAAGAATTCGCCCAAATCATCCGTATTGGTCGTACCCACACGCAG
*Hs*FH G282V Fwd	TGCGGGTATTCAGAACGGTACCCACAGCG
*Hs*FH G282V Rev	CGCTGTGGGTACCGTTCTGAATACCCGCA

Uma alíquota de cada reação foi utilizada para transformar bactérias competentes por eletroporação, em uma cubeta de 0,4 cm, com pulso de 1,8 kV a 25 µFd e 100 Ω (BioRad GenePulser Xcell). As células foram semeadas em meio LB sólido adicionado de 30 µg/mL de canamicina, em uma placa de Petri e incubadas em estufa bacteriológica por 16 horas a 37 °C. As colônias selecionadas foram posteriormente inoculadas em 10 mL de meio LB com 30 µg/mL de canamicina, incubadas a 37 °C, por 16 horas e em agitação de 180 rpm (*Shaker* INFORS HT Multitron Pro). As células foram coletadas por centrifugação em 16000 x *g* a 4 ºC, o DNA foi extraído utilizando-se o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) seguindo as instruções do fabricante e então enviado para sequenciamento para confirmar a presença da mutação.

3.2 Produção heteróloga da enzima *Hs*FH nativa e seus mutantes

Os genes que codificam as enzimas *Hs*FH nativa e os mutantes e H180R*Hs*FH, E362Q*Hs*FH, S365G*Hs*FH e N373D*Hs*FH foram previamente clonados em nosso laboratório em vetor pET-28a(+)-SUMO pelo nosso grupo de pesquisa [59]. O vetor pET-28a(+)-SUMO é uma versão modificada do vetor pET-28a(+) que possui o gene de codificação da proteína Smt3 de 11kDa, ubiquitina de *Saccharomyces cerevisae* (UniProtKB/Swiss-prot: Q12306.1), chamada de SUMO. Essa construção permite a expressão da SUMO fusionada a uma cauda de poli-histidina na extremidade N-terminal da proteína de interesse. A clivagem para

retirada da SUMO é feita pela SUMO-protease ULP1 (*Ubiquitin-like-specific Protease 1* – EC 3.4.22.68) de *Saccharomyces cerevisae* (UniProtKB/Swiss-prot: Q02724.1).

Cepas de *E. coli* BL21 (DE3) competentes foram transformadas, por meio de choque térmico [60]. As bactérias, previamente armazenadas a -80 °C, foram descongeladas em gelo por 15 minutos. Em seguida, 200 ng do DNA da *Hs*FH foram adicionados em 50 µL da suspensão de bactérias competentes e gentilmente homogeneizados. A mistura foi incubada em gelo durante 30 minutos, seguido de choque térmico a 42 °C por 2 minutos. Posteriormente, as bactérias foram mantidas em gelo por mais 5 minutos e em seguida foram adicionados 250 µL de meio de cultura LB; a suspensão foi colocada sob agitação de 180 rpm (Shaker INFORS HT Multitron Pro) à 37 °C por 1 hora.

Terminado o tempo de incubação, 80 µL da suspensão de células foram semeadas em meio LB sólido, preparado em uma placa de Petri, previamente homogeneizado com 30 µg/mL do antibiótico canamicina. A placa foi incubada em estufa bacteriológica a 37 ºC por 16 a 18 horas.

O pré-inóculo foi preparado com uma colônia adicionada a 10 mL de meio LB suplementado com o antibiótico canamicina (30 µg/mL) e cultivado a 37 ºC, por 16 a 18 horas, sob agitação constante de 180 rpm. A cultura foi então diluída na proporção 1:100 em meio LB contendo canamicina (30 µg/mL) e incubado a 37 ºC, sob agitação por 2,5 horas até atingir densidade ótica entre 0,5 e 0,6 u.a. a 600 nm, sendo então adicionado 500 µM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para início da expressão da proteína de interesse. A cultura permaneceu a 18 ºC, sob agitação constante (180 rpm – *Shaker* INFORS HT Multitron Pro) por 24 horas. As células foram coletadas por centrifugação em 8000 x *g* a 4 ºC e armazenadas a -20 ºC.

3.2.2 Purificação por cromatografia de afinidade

Para a purificação por afinidade foi utilizada como fase estacionária 2 mL de resina de níquel Ni-NTA (Qiagen), empacotados em coluna Poly-Prep®. Foi utilizado como eluente o tampão A composto por 50 mM de Fosfato de Sódio monobásico (NaH_2PO_4) pH 8,5 e 300 mM de KCl.

As células foram resuspendidas em tampão A contendo 1 mM do inibidor de proteases PMSF (Fenilmetilsulfonilflúor) e lisadas por ultrassonicação a 10 W de potência em 10 ciclos de 30 segundos de pulso intercalados com intervalos de 40 s, no gelo. Após centrifugação a 16000 x *g* por 30 min a 4 ºC, o sobrenadante foi separado e aplicado na coluna pré-equilibrada com tampão A. Para a retirada de contaminantes a coluna foi lavada com um gradiente em passos de tampão A contendo 10 mM e 25 mM de imidazol e utilizando 10 volumes de coluna em cada etapa. A concentração de imidazol foi então reduzida a 10 mM e a proteína ULP1 adicionada para a clivagem *in situ* da SUMO fusionada a cauda de histidina e incubada a 8 °C por 16 horas. A enzima *Hs*FH foi eluida da resina com 5 volumes de coluna de tampão A contendo 10 mM de imidazol. A protease ULP1 e a cauda fusionada a SUMO foram retiradas da coluna com 10 volumes de coluna de tampão A com 500 mM de imidazol.

A proteína foi concentrada em concentrador de 30 kDa e dialisada em tampão B (50mM de Tris pH 8,5; 150 mM de KCl). O cálculo da concentração foi realizado utilizando a absorbância da proteína em 280 nm (ε_{280nm}=24410 M^{-1} cm^{-1})

3.2.3 Purificação por cromatografia de exclusão por tamanho

As proteínas foram concentradas e submetidas à etapa de purificação por cromatografia de exclusão por tamanho usando a coluna Superdex™ 200 10/300 (*GE Healthcare*) no sistema de cromatografia Äkta *purifier* (*GE Healthcare*). A coluna foi equilibrada com tampão contendo 50 mM de Tris pH 8,5 e 150 mM de KCl.

O grau de pureza das proteínas foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida 14% (v/v) em condições desnaturantes. A revelação do gel foi feita com o corante azul de Coomassie R-250 (Vetec). As frações correspondentes ao pico de eluição da proteína de interesse foram combinadas, concentradas e quantificadas. O cálculo da concentração foi realizado utilizando a absorbância em 280 nm (ε_{280nm}=24410 M^{-1} cm^{-1})

3.3 Caracterização biofísica: Termoflúor e DLS.

Os estudos de estabilidade térmica foram realizados utilizando a técnica de termoflúor que monitora o desenovelamento térmico de proteínas em função da temperatura, através do sinal de fluorescência do SYPRO® *orange* (479/570 nm) (*Invitrogen*). As análises do perfil de desnaturação térmica da proteína foram feitas utilizando uma placa de PCR de 96 poços (*BioRad Laboratories*) e uma variação de temperatura de 1 ºC/min no intervalo de 25 a 95 ºC. A intensidade de fluorescência é plotada como uma função da temperatura, o que gera usualmente uma curva sigmoidal [61]. O ponto de inflexão da curva permite a determinação da temperatura de desenovelamento, T_m, da proteína [61]. Os experimentos foram realizados em um termociclador em tempo real - Mx3005P (*Agilent Technologies*), a concentração de proteína utilizada foi 10µM e de SYPRO® *Orange* 1x. Para a análise do perfil de estabilidade térmica da *Hs*FH e seus mutantes na presença de diferentes condições físico-químicas, foram testados inicialmente os kits *Solubility & Stability Screen* 1 e 2 (*Hampton Research*), assim como diferentes concentrações de substrato.

A técnica de DLS é uma técnica não destrutível, que permite avaliar o grau de polidispersividade das amostras. Os experimentos foram realizados utilizando 50 µL de solução de proteína, em triplicata, no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) em cubeta de quartzo ZEN2112, a 16 °C. Cada amostra teve sua temperatura equilibrada no equipamento por 60 s a 16 °C, em seguida foi exposta ao feixe de laser por 10 s e o espalhamento da luz medido a 90 °. O número de leituras de cada medida foi otimizado automaticamente pelo programa do equipamento (Zetasizer Software).

3.4 Ensaios de atividade para a proteína *Hs*FH nativa

3.4.1 Determinação do pH ótimo

O experimento para determinação do pH ótimo para a atividade enzimática da enzima *Hs*FH nativa foi realizado em um leitor de microplacas Spectra Max Plus 384 (*Molecular devices*) a temperatura ambiente. Foi realizado o monitoramento por 3 min de uma única concentração de substrato (10 mM de L-malato ou 0,5 mM de

fumarato) e 12 nM de proteína. Os tampões e pHs utilizados encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Composição dos tampões utilizados para o experimento de determinação do pH de atividade ótimo para a enzima *Hs*FH nativa.

pH	Tampão
5,0	50 mM Acetato de Sódio, 150 mM KCl
5,5	50 mM Acetato de Sódio, 150 mM KCl
6,0	50 mM MES, 150 mM KCl
6,5	50 mM MES, 150 mM KCl
7,0	50 mM HEPES, 150 mM KCl
7,5	50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl
8,0	50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl
8,5	50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl
9,0	50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl

3.4.2 Ensaios cinética enzimática

A atividade enzimática foi monitorada pelo acompanhamento da formação ou consumo de fumarato em 250 nm (ε_{250nm} = 1,450 mM^{-1} cm^{-1}) para soluções contendo até 1 mM de fumarato e 272 nm (ε_{272nm} = 0,480645 mM^{-1} cm^{-1}) para maiores concentrações em leitor de microplacas Spectra Max Plus 384 (*Molecular devices*). A reação foi iniciada pela adição de 12 nM de proteína em uma solução composta por 50 mM do tampão, 150 mM KCl e um dos substratos, fumarato (FUM) ou L-malato (MAL) em um volume total 0,2 mL. Foram utilizadas as seguintes concentrações de L-malato: 0,5; 1; 2; 5; 10; 15; 18; 25; 30; 40 e 50 mM e fumarato: 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 mM. O experimento de cinética completa para a *Hs*FH nativa foi realizado em diferentes pHs: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0 e o monitoramento foi feito durante 60 segundos.Os dados foram analisados através da equação 1:

$$v/[E] = \frac{k_{cat}[S]}{K_m[S]} \qquad \text{Equação 1}$$

onde, [E] representa a concentração da enzima, k_{cat} é a constante catalítica, [S] é a concentração de substrato e K_m é a constante de Michaelis-Menten para cada substrato.

Foi realizado o experimento de caracterização cinética utilizando os dois substratos da enzima juntos na mesma solução. A mistura reacional era composta por 50 mM Tris-HCl pH 8,5 e 150 mM KCl e ambos os substratos num volume total de 0,2 mL. Os parâmetros cinéticos k_{cat} e K_m, foram obtidos variando a concentração de L-malato (0,039, 0,078, 0,156, 0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 7.5, 10, 15, 20 e 40 mM) e fumarato (0,007062, 0,015125, 0,3125, 0,625, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 mM) na mistura reacional. A reação foi iniciada pela adição da enzima (concentração final de 12 nM) e monitorada por 60 segundos. As constantes cinéticas foram estimadas utilizando as equações 2 e 3:

$$v\text{net}/[\text{E}] = \frac{k_{cat}^{f}\left[FUM\right]}{K_m^{FUM}\left(1+\frac{\left[MAL\right]}{K_m^{MAL}}\right)+\left[FUM\right]} - \frac{k_{cat}^{r}\left[MAL\right]}{K_m^{MAL}\left(1+\frac{\left[FUM\right]}{K_m^{FUM}}\right)+\left[MAL\right]} \qquad \text{Equação 2}$$

$$K_{eq} = \frac{k_{cat}^{f} K_m^{MAL}}{k_{cat}^{r} K_m^{FUM}} \qquad \text{Equação 3}$$

onde [FUM] e [MAL] são as concentrações de cada substrato, [E] é a concentração da enzima, K_m^{FUM} e K_m^{MAL} são as constantes de Michaelis-Menten para FUM e MAL respectivamente, k_{cat}^{f} é a constante catalítica para a conversão fumarato em L-malato, k_{cat}^{r} é a constante catalítica para a conversão L-malato em fumarato, $v\text{net}$ é a velocidade global da catálise e K_{eq} é a constante de equilíbrio da reação. Os dados foram analisados com os programas Sigmaplot (*Systat Sofware*) e Origin (OriginLab, Northampton, MA).

3.5 Estudos estruturais

3.5.1 Cristalização

Os experimentos de cristalização para a enzima *Hs*FH nativa e seus mutantes foram realizados em placas *Cryschem* (*Hampton Research*) de 24 poços pelo método de difusão de vapor utilizando as técnicas da gota sentada e pendurada

(Figura 8). Como padrão experimental foram utilizados no reservatório 500 µL de solução de cristalização e na gota foram misturados 2 µL de solução de proteína (4 mg/mL) e 2 µL de solução do reservatório. O sistema foi selado com a fita adesiva *Crystal clear* (*Henkel Consumer Adhesives*), para gota sentada e lamínula siliconizada para gota pendurada e armazenado à temperatura constante de 21 °C.

O método de difusão de vapor se baseia no aumento da concentração da solução de proteína até um estado de supersaturação por evaporação dos componentes voláteis da solução de cristalização. Esses componentes são gradualmente transferidos da solução da gota para a solução do reservatório por difusão de vapor, até que a pressão de vapor entre ambas entre em equilíbrio (Figura 8).

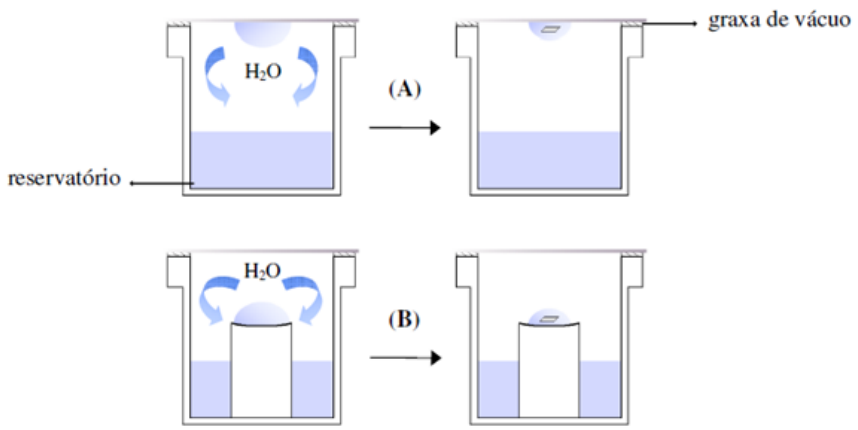

Figura 8. Representação esquemática de um poço da placa *Cryschem* (*Hampton Research*) utilizada nos experimentos de cristalização. A) Técnica da gota pendurada B) Técnica da gota sentada. (Figura gentilmente cedida por Pinheiro, M. P.)

Com o intuito de obter cristais da enzima nativa com diferentes ligantes, foi realizado um *screening* em torno da condição anteriormente reportada [59] com variação do agente precipitante, concentração de proteína, do tampão, dos substratos e de ligantes: citrato de sódio, succinato de sódio, tacsimato, tiomalato de sódio e tartrato de sódio. Em alguns casos o ligante foi incorporado ao cristal pela técnica de *soaking* [62]. Também foram utilizados os kits comerciais *PEG/Ion* 1 e 2 e *PEGRx* 1 e 2 (*Hampton Research*) na busca de uma nova condição de cristalização.

Dentre as condições testadas para a enzima nativa também foram utilizados, como agente precipitante, misturas de PEGs com diferentes composições conforme tabela 3 [63].

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

PEG	2K	3350	4K	5K
PEG S 01	70%	10%	10%	10%
PEG S 02	10%	70%	10%	10%
PEG S 03	10%	10%	70%	10%
PEG S 04	10%	10%	10%	70%
PEG S 05	25%	25%	25%	25%

As condições consideradas promissoras foram otimizadas com variação da concentração de proteína, volume da gota, volume do reservatório e concentração do precipitante. Os cristais selecionados para a coleta de dados de difração de raios X foram banhados em solução crioprotetora que contém a condição de cristalização com o agente precipitante em torno de 10% mais concentrado e 25% (v/v) glicerol.

Para o estudo estrutural dos mutantes foi realizada uma varredura inicial utilizando os kits disponíveis comercialmente, baseados em variação por matriz esparsa *Crystal Screen 1* e *2*, Index, PEG/Ion 1 e 2, PEGRx 1 e 2 (Hampton Research). Também foram ensaiadas as condições de cristalização obtidas para a enzima nativa.

Um total de 4368 condições de cristalização foram testadas para a enzima *Hs*FH e seus mutantes.

3.5.2 *Fragment screening*

Neste estudo o *fragment screening* foi realizado utilizando a técnica de *soaking*, onde os cristais são incubados em uma solução contendo o ligante, por tempo variável. Os cristais de *Hs*FH nativa foram incubados em 2 µL da condição de cristalização acrescidos de 100 mM do fragmento escolhido por 2 ou 16 horas. Em seguida foram mergulhados em solução crioprotetora contendo a condição de cristalização, 25% (v/v) de glicerol e aproximadamente 10% (v/v) a mais de agente precipitante e resfriados em nitrogênio líquido.

Na Figura 9 estão listados os fragmentos utilizados através da técnica de *soaking*. Os compostos foram selecionados baseados na biblioteca da empresa *Jena Biosciences* [64]. Também foi utilizada uma biblioteca de fragmentos sintetizada pelo laboratório do Professor Flávio Emery, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e disponibilizada pelo mesmo.

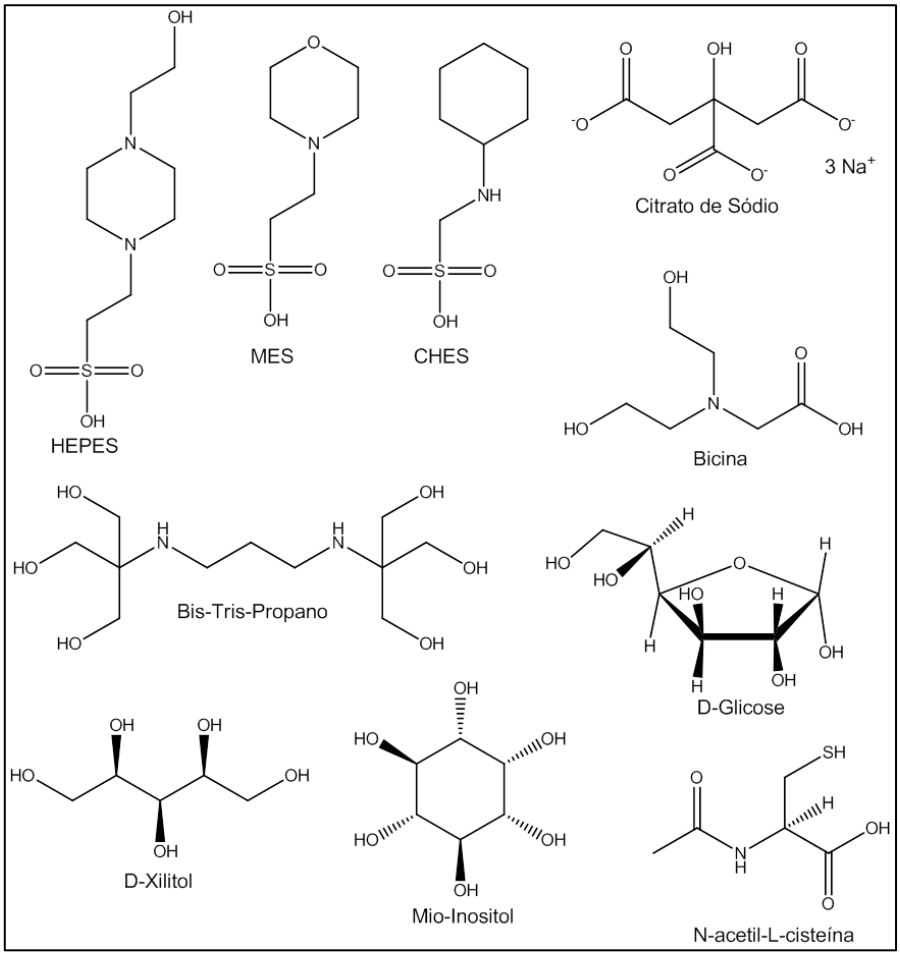

Figura 9. Fragmentos utilizados para *soaking* dos cristais da proteína *Hs*FH.

3.5.3 Coleta de dados e processamento

A coleta de dados de difração de raios X foi realizada a 100 K na linha de luz de cristalografia de proteínas PROXIMA1 em SOLEIL (Número da proposta 20160042), França, utilizando o detector PILATUS 6M (Dectris, Baden, Suiça). Um total de 1200 a 2000 imagens com o ângulo de oscilação de 0,1° foram coletadas com o tempo de exposição de 0,1 s por imagem e a distância entre o cristal e o detector de 244,6 a 345,3 mm. Dados de difração de raios X foram processados e escalonados nos programas *XDS* [65], *SCALA* [66], iMosflm [67] e AIMLESS [68].

3.5.4 Resolução da estrutura

As estruturas da *Hs*FH nativa e de seus mutantes foram resolvidas pelo método de substituição molecular usando o programa *Phaser* [69], do pacote *Phenix* [70]. Para a proteína nativa foram utilizadas como modelo as coordenadas de uma estrutura da fumarase humana previamente resolvida no nosso laboratório (PDB 5D6B) [59] e para os mutantes foram utilizadas as coordenadas da *Hs*FH determinadas nesse trabalho (PDB 5UPP). A estrutura foi refinada com *Phenix.refine* [71] seguida de ciclos de inspeção manual do mapa de densidade eletrônica e construção do modelo usando o programa *Coot* [72] e novo refinamento com o *Phenix.refine*. A qualidade do modelo foi regularmente verificada com *MolProbity* [73]. As figuras foram geradas com o programa *PyMOL* e Coot [74]. As coordenas atômicas e os fatores de estrutura foram depositados no *Protein Data Bank* (PDB). A estrutura da enzima nativa foi refinada pelo aluno de iniciação científica Victor Lopes Rangel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Hs*FH nativa

4.1.1 Expressão e purificação

A produção heteróloga da enzima *Hs*FH em *E. coli* BL21 (DE3) foi realizado com sucesso e a proteína foi obtida na fração solúvel. A purificação foi feita por cromatografia de afinidade em resina de níquel com rendimento de cerca de 70 mg de proteína por 1 L de cultura. O sucesso da purificação da proteína foi monitorado por eletroforese SDS-PAGE (Figura 10).

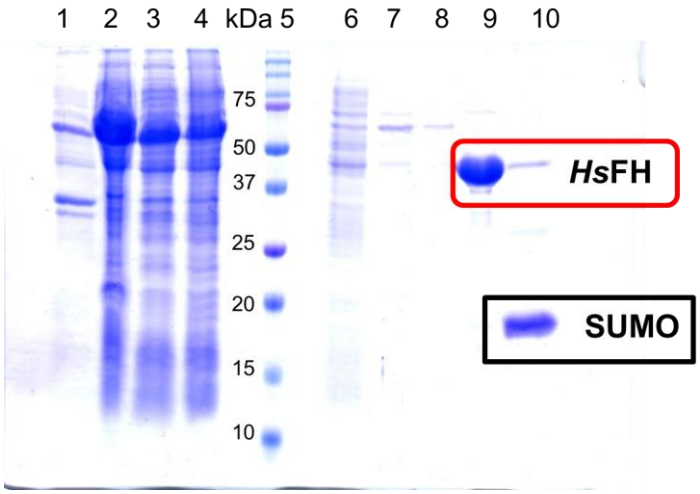

Figura 10. Perfil de purificação da enzima *Hs*FH em coluna de níquel. 1) Pellet 2) Sobrenadante 3) Efluente 1 4) Eflente 2 5) Marcador de peso molecular (kDa) 6) Lavagem com o tampão 10 mM de imidazol 7) Lavagem com o tampão 25 mM de imidazol 8) Segunda lavagem com o tampão 10 mM de imidazol 9) *Hs*FH eluída após a clivagem com tampão 10 mM de imidazol 10) Lavagem com tampão 500 mM de imidazol e a proteína SUMO.

4.1.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

.

A análise do estado de agregação da *Hs*FH por DLS indicou a homogeneidade da amostra, que se encontra monodispersa, de diâmetro hidrodinâmico 10,23 ± 2,2 nm, e índice de polidispersividade de 20,4 %, o que corresponde ao tamanho esperado para a *Hs*FH (Figura 11).

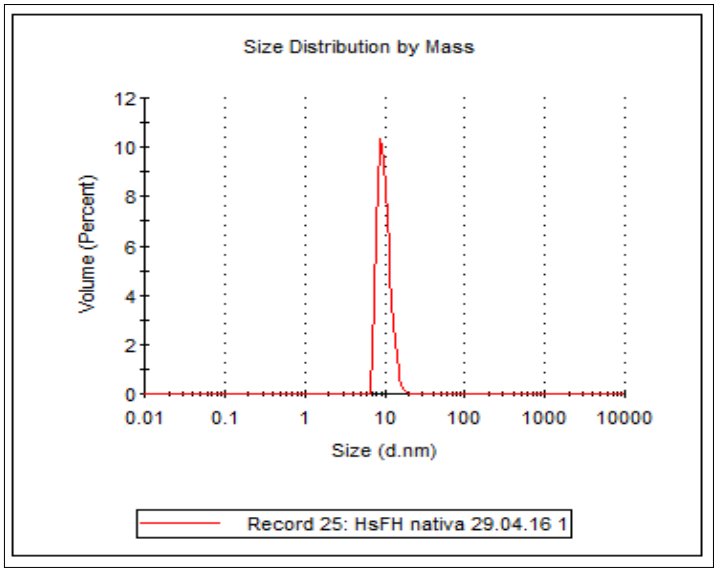

Figura 11. Análise do perfil de polidispersividade encontrado para a *Hs*FH obtido através da utilização de técnicas de espalhamento dinâmico de luz. Gráfico representando o perfil de distribuição do tamanho (nm) em função do volume.

4.1.3 Atividade enzimática

4.1.3.1 Determinação do pH ótimo para *Hs*FH

De forma a determinar em o perfil de atividade ótimo para cada substrato (L-malato e fumarato), foram realizados ensaios de atividade específica na presença de soluções tampões em diferentes pHs (5 a 9) (Figura 12).

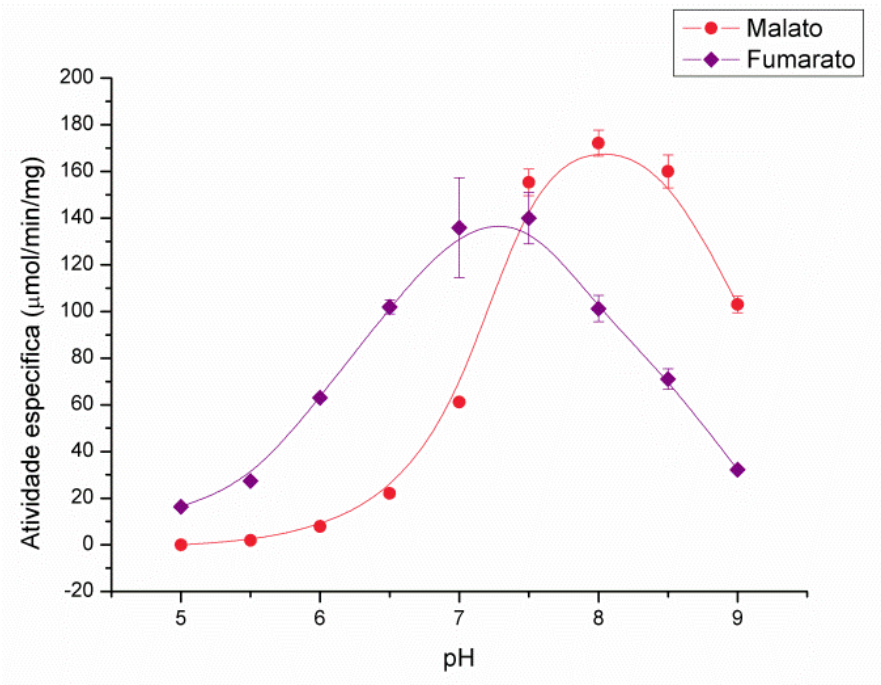

Figura 12. Perfil pH versus atividade específica para a enzima fumarase humana (*Hs*FH) utilizando L-malato (rosa) ou fumarato (roxo) como substrato. A curva foi construída a partir da medida da velocidade inicial de consumo ou produção de fumarato a 250 nm e 25ºC. Foram utilizados 12 nM da enzima, 10 mM de L-malato e 500µM de fumarato.

Os resultados obtidos evidenciam que o pH ótimo de atividade da enzima *Hs*FH para cada substrato difere, sendo entre 7 e 7,5 para fumarato e entre 7,5 e 8,5 para L-malato. Esses valores são similares aos encontrados para outras fumarases de classe II [75] e corroboram as propostas anteriores para o mecanismo de catálise.

4.1.3.2 Cinética enzimática

Para uma melhor avaliação do comportamento da enzima nos diferentes pHs foram realizados ensaios de cinética com uma variação de pH de 6,0 a 9,0 para cada substrato. Estes ensaios foram realizados utilizando a seguinte condição: 50 mM do tampão escolhido para o pH específico, 150 mM de KCl e uma variação da concentração de substratos. Os parâmetros cinéticos k_{cat} e K_m para os substratos L-malato e fumarato foram determinados a partir da equação de Michaelis-Menten e estão apresentados na tabela 4 e na figura 13.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos para *Hs*FH.

	Fumarato			L-Malato		
pH	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
6.0	330 ± 20	66 ± 1	$2{,}0x10^5 \pm 1x10^4$	ND	ND	ND
6.5	400 ± 40	175 ± 7	$4{,}3x10^5 \pm 5x10^4$	380 ± 20	24,1 ± 0,4	$6{,}3x10^4 \pm 3x10^3$
7.0	270 ± 30	202 ± 7	$7{,}4x10^5 \pm 9x10^4$	600 ± 100	59 ± 2	$1{,}0x10^5 \pm 2x10^4$
7.5	370 ± 30	286 ± 6	$7{,}7x10^5 \pm 6x10^4$	1080 ± 90	88 ± 3	$8{,}2x10^4 \pm 8x10^3$
8.0	280 ± 40	260 ± 10	$9{,}0x10^5 \pm 1x10^4$	2700 ± 200	325 ± 4	$1{,}2x10^5 \pm 1x10^4$
8.5	280 ± 10	105 ± 3	$3{,}7x10^5 \pm 2x10^4$	3400 ± 100	414 ± 4	$1{,}2x10^5 \pm 5x10^4$
9.0	310 ± 20	60 ± 1	$2{,}0x10^5 \pm 1x10^4$	ND	ND	ND

ND= não determinado.

Utilizando o fumarato como substrato foi possível determinar as constantes cinéticas para todos os pHs testados, porém para o L-malato em pH 6 a reação enzimática não foi detectada pelo método utilizado. Isso ocorre, possivelmente, devido à característica dos resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise. Para a desidratação do L-malato em fumarato é necessária a retirada de um próton e uma hidroxila da molécula, a retirada desse próton ocorre através de uma base presente na enzima, provavelmente o grupo $–COO^-$ do glutamato no sítio ativo [30, 76-78]. Em pHs mais baixos o grupo carboxila permanece protonado, não podendo assim atuar na retirada do próton. Enquanto que para a reação reversa, ou seja, a conversão de fumarato em L-malato a protonação desse grupo favorece a catálise.

Em pH 9, a reação de formação de fumarato ocorre lentamente, de modo que, nas concentrações testadas não foi possível atingir o platô de saturação (Figura 13).

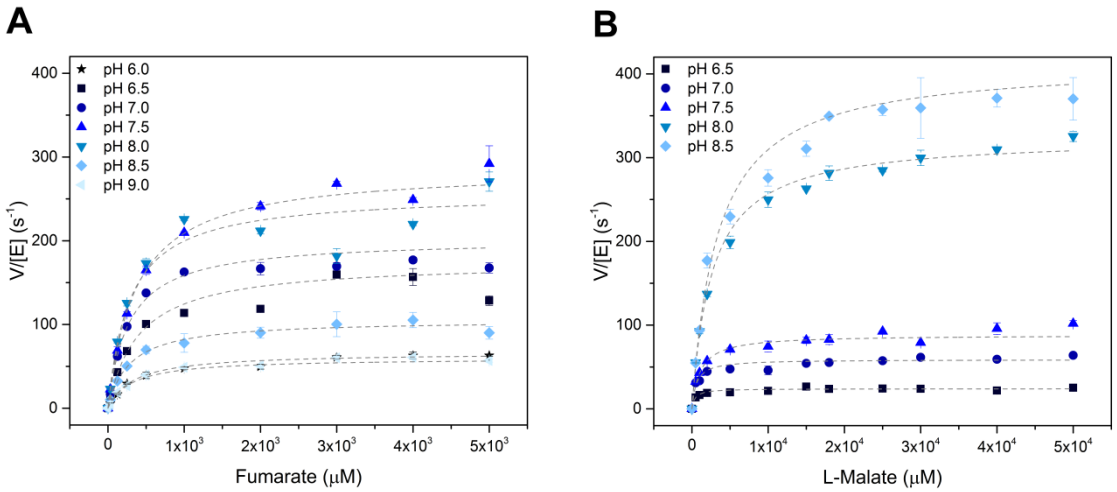

Figura 13. Caracterização cinética no estado estacionário da *Hs*FH. Os dados foram ajustados à equação de Michaelis-Menten (Equação 1). A) Fumarato foi usado como substrato em diferentes concentrações (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 µM). B) L-malato foi usado como substrato em diferentes concentrações (0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 18, 25, 30, 40 e 50 mM)

Uma vez que a enzima fumarase humana catalisa a conversão reversível de fumarato em L-malato, é possível que haja uma contribuição das duas reações no comportamento cinético da enzima. Com o intuito de obter uma caracterização cinética mais fiel ao comportamento da enzima foi realizado um experimento com os dois substratos presentes na mesma mistura reacional.

O experimento foi realizado em pH 8,5 pois é onde ocorre a menor diferença entre as eficiências catalíticas dos substratos. Os parâmetros cinéticos estão relacionados na tabela 5 e na figura 14. O valor de *turnover* (k_{cat}^{r}) encontrado para a formação de fumarato é 1,4 vezes maior que para o seu consumo (k_{cat}^{f}). A constante de Michaelis-Menten K_m^{MAL}, para L-malato, foi 7 vezes maior que K_m^{FUM}, para fumarato. A constante de equilíbrio para *Hs*FH foi de 4,3 ± 0,2 um valor similar com o encontrado nos primeiros estudos realizados com fumarase extraída de corações suínos [79].

Tabela 5. Parâmetros cinéticos da *Hs*FH para os dois substratos.

	***Hs*FH**
k_{cat}^{f} (s^{-1})	170 ± 10
K_m^{FUM} (mM)	0,20 ± 0,04
k_{cat}^{r} (s^{-1})	280 ± 10
K_m^{MAL} (mM)	1,4 ± 0,3

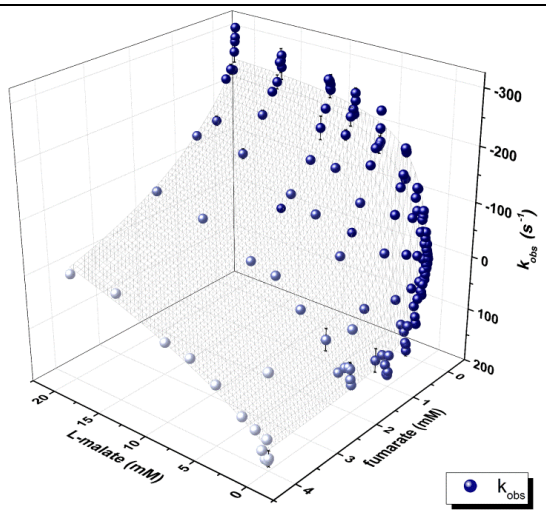

Figura 14. Caracterização cinética no estado estacionário da *Hs*FH. Gráfico de superfície da cinética completa. Os dados foram ajustados à equação 2.

Com o experimento considerando a influência da reação reversa, realizado pela primeira vez para fumarases, foi possível explicar uma deformação em torno de 10 mM nas curvas dos dados cinéticos para L-malato como substrato, que ocorre devido à influência da reação reversa (Figura 12). Essa interferência pode chegar a 13%, porém conforme as concentrações de substrato se elevam, essa influência se torna menor.

4.1.4 Avaliação da estabilidade térmica da fumarase baseada em fluorimetria diferencial de varredura: ensaios de termoflúor

Foram realizados os ensaios de termoestabilidade utilizando os kits comerciais *Solubility & Stability* 1 e 2 (*Hampton Research*). As curvas de referência para os dois kits mostraram o perfil sigmoidal característico e o T_m encontrado para *Hs*FH foi de 51,24 ± 0,03 ^{o}C.

Dentre os aditivos que estabilizaram a enzima, e aumentaram o valor de T_m, encontram-se os osmólitos, que são moléculas de estabilização de um modo geral e compostos orgânicos com similaridade estrutural com os substratos da enzima, como ácido succínico e malonato de sódio com T_m 57 ^oC e 55 ^oC respectivamente.

Segundo Massey [18], tanto o ácido succínico, quanto o malonato de sódio são considerados como inibidores competitivos da fumarase, assim como citrato, indicando que a estabilidade observada nos pHs 5,0 e 5,5 (Figura 15), que correspondem aos tampões citrato de sódio e ácido succínico, respectivamente, se deve provavelmente à interação dessas moléculas com a proteína, do que ao pH. Para se comprovar essa hipótese foi realizado o mesmo experimento com tampão acetato de sódio nos pHs 5,0 e 5,5.

A comparação entre diferentes tampões no mesmo pH confirmou que a estabilidade inicialmente reportada se deve à ligação das moléculas de citrato e succinato e não à influência do pH, uma vez que o experimento com acetato não indicou um aumento da estabilidade da proteína (Tabela 6). Esses resultados também validam o experimento de termoflúor como ferramenta de busca de ligantes para proteínas.

Tabela 6. Resultados de ΔT_m para *Hs*FH.

	Tampão	Sal	ΔT_m (°C)
1	Referência	-	**0**
2	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5,0	1 M Cloreto de Sódio	-10,97
3	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5,0	500 mM Cloreto de Sódio	-5,8
4	50 mM Ácido Succínico pH 5,5	1 M Cloreto de Sódio	-0.98
5	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5,0	250 mM Cloreto de Sódio	-0,68
6	50 mM Ácido Succínico pH 5,5	500 mM Cloreto de Sódio	-0,07
7	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,5	50 mM Cloreto de Sódio	0,06
8	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,5	-	0,1
9	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5,0	200 mM Cloreto de Sódio	0,16
10	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,0		0,2
11	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,0	50 mM Cloreto de Sódio	0,3
12	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,5	150 mM Cloreto de Sódio	0,45
13	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,5	250 mM Cloreto de Sódio	0,47
14	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,5	100 mM Cloreto de Sódio	0,52
15	Tris pH 8,5	150 mM Cloreto de Potássio	0,54
16	50 mM Ácido Succínico pH 5,5	200 mM Cloreto de Sódio	0,59
17	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,0	100 mM Cloreto de Sódio	0,72
18	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,0	150 mM Cloreto de Sódio	0,74
18	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,5	200 mM Cloreto de Sódio	0,77
20	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5,0	150 mM Cloreto de Sódio	0,86
21	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,5	500 mM Cloreto de Sódio	0,9
22	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,0	200 mM Cloreto de Sódio	0,94
23	50 mM Ácido Succínico pH 5,5	250 mM Cloreto de Sódio	0,97
24	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,0	250 mM Cloreto de Sódio	1,14
25	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,5	1 M Cloreto de Sódio	1,24
26	50 mM Ácido Succínico pH 5,5	150 mM Cloreto de Sódio	1,49
27	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,0	500 mM Cloreto de Sódio	1,63
28	50 mM Ácido Succínico pH 5,5	-	1,9
29	50 mM Ácido Succínico pH 5,5	100 mM Cloreto de Sódio	1,94
30	50 mM Ácido Succínico pH 5,5	50 mM Cloreto de Sódio	2,12
31	50 mM Acetato de Sódio triidratado pH 5,0	1 M Cloreto de Sódio	2,27
32	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5,0	100 mM Cloreto de Sódio	2,36
33	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5,0	50 mM Cloreto de Sódio	3,06
34	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5,0	-	3,7

Também foi observado que ocorre um aumento na termoestabilidade da proteína com o aumento do pH, o que já foi relatado para a fumarase porcina [21]. O aumento da concentração de sal (NaCl) e portanto um aumento da força iônica, também auxilia na estabilidade térmica da enzima, como demonstrado no gráfico da figura 14. Comparações entre concentração e tipo de sal indicam que

não existem diferenças entre NaCl e KCl na estabilização térmica da enzima (Tabela 7).

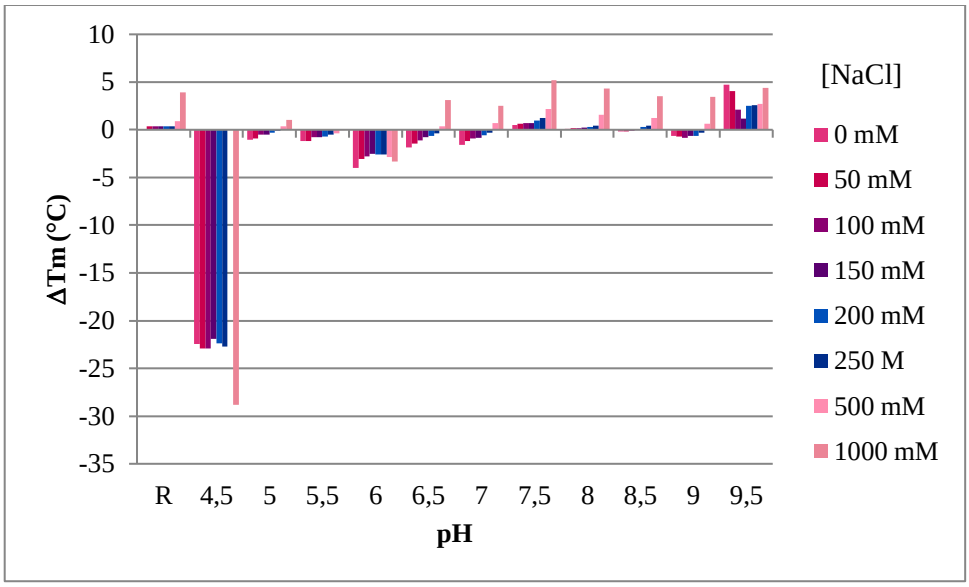

Figura 15. Gráfico da variação da temperatura de desenovelamento ΔT_m para a enzima *Hs*FH em diferentes pHs e concentrações de NaCl. R é a referência em água; os tampões presentes nos pHs 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 são acetato de sódio, Citrato de sódio, ácido succínico, MES monoidratado, BIS-TRIS, Imidazol, HEPES, Tris, BIS-TRIS Propano, AMPD eglicina, respectivamente, todos na concentração de 50 mM.

Tabela 7. Resultados de ΔT_m da enzima *Hs*FH para a comparação entre NaCl e KCl.

	Tampão	Concentração de Sal (mM)	ΔT_m (°C)*	
			KCl	NaCl
1	50 mM Tris pH 8,5	0	0	0
2	50 mM Tris pH 8,5	50	-0,09	-0,15
3	50 mM Tris pH 8,5	100	0,06	-0,09
4	50 mM Tris pH 8,5	150	0,23	0,21
5	50 mM Tris pH 8,5	200	0,25	0,26
6	50 mM Tris pH 8,5	250	0,35	0,36
7	50 mM Tris pH 8,5	500	1,06	1,15
8	50 mM Tris pH 8,5	1000	2,97	3,06

*Cada valor representa a media da triplicata para ΔTm (°C).

4.1.5 Estudo estrutural da *Hs*FH nativa

Apesar de existirem duas estruturas de *Hs*FH depositadas no PDB (3E04; 5D6B), não havia nenhuma publicação descrevendo a fumarase humana estruturalmente. Dessa forma os experimentos cristalográficos foram iniciados utilizando condições de cristalização já conhecidas para fumarase [59], assim como a adição de inibidores ou substratos da enzima.

Os cristais de *Hs*FH são observados normalmente após um dia da realização dos experimentos e em uma grande parte das condições testadas, porém, são, em sua maioria, cristais pequenos em formato de agulha ou canudo, que não apresentam difração de raios X. Diante disso foi realizada a busca por uma nova condição de cristalização mais adequada para a fumarase humana.

Dentre as condições testadas, 23 cristais foram selecionados para a coleta de dados de difração de raios-X. A estrutura de *Hs*FH nativa foi resolvida a partir do cristal exibido na figura 16 obtido na condição 0,1 M HEPES pH 7,5, 4% m/v polietilenoglicol 10000 e 1% v/v 2-metil-pentanodiol (MPD).

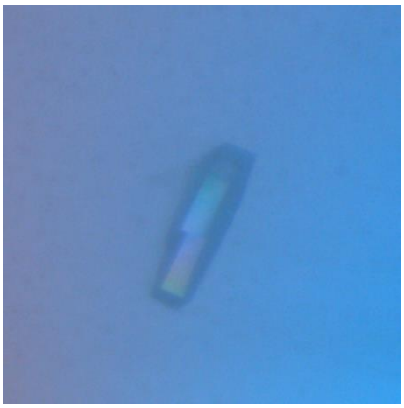

Figura 16. Cristal de *Hs*FH obtido na condição0,1 M HEPES pH 7,5, 4% m/v polietilenoglicol 10000 e 1% v/v 2-metil-pentanodiol (MPD).

A *Hs*FH cristalizou no grupo espacial $C222_1$ tendo como agente precipitante polietilenoglicol 10.000. A estrutura cristalográfica da *Hs*FH foi resolvida a uma resolução de 1,8 Å por substituição molecular utilizando como modelo uma estrutura da fumarase humana previamente depositada na base de dados (PDB 5D6B) [59]. Os dados estatísticos estão resumidos na tabela 8. A

unidade assimétrica contém duas cópias do monômero relacionadas por um eixo de simetria não-cristalográfica. Cada monômero é composto por 24 hélices α e 8 fitas β que podem ser divididos em três domínios. O primeiro domínio – D1 (resíduos 49-188) está localizado no N-terminal e é formado por um *β-hairpin* e cinco α-hélices. O segundo, D2 (resíduos 189-439) contem seis hélices α, sendo que cinco delas formam o *20-helix bundle core*, responsável pelas interações intermoleculares que estabilizam o tetrâmero. D3 (resíduos 440-510) é o menor dos domínios e possui dois motivos *helix-turn-helix* e uma hélice adicional que conecta D2 e D3 (Figura 17). O sítio ativo das fumarases de classe II é altamente conservado entre os organismos e é formado por resíduos de três das quatro subunidades. Os resíduos envolvidos na atividade catalítica são Ser186, Ser187, Arg188, His235, Glu362 Lys371, Asn373, Glu378 e cada tetrâmero funcional possui quatro sítios ativos idênticos.

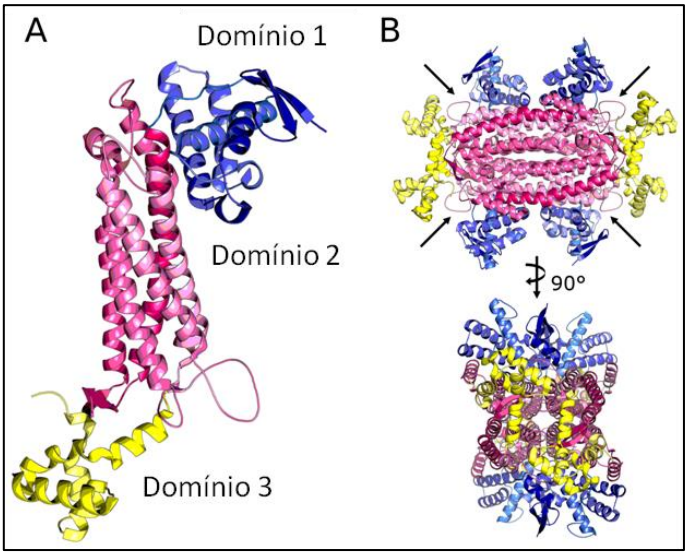

Figura 17. Representação em *cartoon* para a *Hs*FH. A) Monômero da *Hs*FH com o domínio 1 (D1) colorido em azul, domínio 2 (D2) colorido em rosa e domínio 3 (D3) colorido em amarelo. B) Estrutura do tetrâmero funcional da *Hs*FH. Os painéis mostram a visão ortogonal da estrutura com os sítios ativos indicados pelas setas.

É reportada para as fumarase uma sequência assinatura, ou seja, uma sequência de aminoácidos conservada entre as espécies que possuem FH de classe II (GSSXXPXKXNPXXXE); parte dessa sequência é chamada SS-loop (GSSXXPXKXN), e é considerada importante para a atividade enzimática [36]. Esse loop está visível e encontra-se numa posição considerada aberta. Estudos estruturais com FumC de *E. coli* indicaram a presença de uma molécula de água

importante para a catálise enzimática, que aparece no sítio ativo mesmo quando os substratos não estão presentes [30, 39, 48]. No sítio ativo da *Hs*FH (5UPP) também se encontra uma molécula de água localizada próxima à His235 (2,7 Å) e que quando comparada com a estrutura de FumC que não possui ligantes (1YFE), está quase na mesma posição [39] (Figura 18).

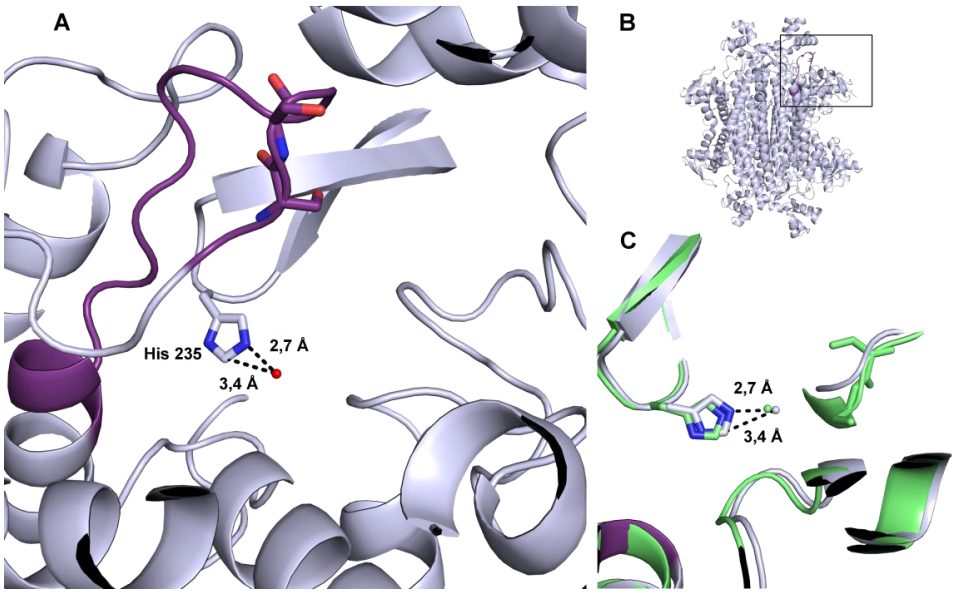

Figura 18. Representação em cartoon do sítio ativo da *Hs*FH. A) Em destaque a His 235 e a água 778 com as distâncias interatômicas em preto. Em roxo está destacado o SS-loop. B) Região no tetrâmero onde as figuras A e C se localizam. C) Alinhamento das estruturas *Hs*FH (5UPP) em cinza com FumC de *E. coli* (1YFE) em verde, destacando as His 235 (5UPP) e His 188 (1YFE) com as moléculas de água W 778 (1YFE) e W 26 (1YFE). Distâncias para 5UPP.

Tabela 8. Dados cristalográficos e estatísticos para *Hs*FH. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses.

Processamento de dados	
Grupo espacial	C 2 2 2_1
Parâmetros de rede	
***a, b, c* (Å)**	125,43 148,01 129,76
α, β, γ (°)	90,00 90,00 90,00
Comprimento de onda (Å)	0,98
Resolução (Å)	48,8-1,8 (1,9-1,8)
Reflexões totais	588061 (84921)
Reflexões únicas	111411 (16130)
Multiplicidade	5,3 (5,3)
Completeza (%)	100,0 (100,0)
<I/σ(I)>	5,1 (1,5)
Wilson B-factor	18,7
R_{merge}	0,14 (0,67)
R_{meas}	0,15 (0,74)
R_{pim}	0,064 (0,321)
CC (½)	0,99 (0,87)

Refinamento	
Reflexões usadas no refinamento	110727 (10896)
Reflexões usadas no R_{free}	5565 (554)
R_{work}	0,15
R_{free}	0,2
Número de átomos exceto hidrogênio	7909
Macromoléculas	7013
Ligantes	30
Solvente	866
Resíduos proteicos	924
R.m.s d	
Ligações (Å)	0,008
Ângulos (°)	1,3
Ramachandran	
Favorecidos (%)	97,9
Permitidos (%)	2,1
***Outliers* (%)**	0,00
Rotâmeros *outliers* (%)	0,3
Clash score	1,1
Fator de temperatura médio (Å²)	
Macromoléculas	30,6
Ligantes	60,7
Solvente	40,5
Números de grupos TLS	8

A superposição dos Cα dos resíduos de cada monômero demonstrou um alto nível de similaridade estrutural entre eles com um RMSD de 0,14 Å. A análise dos fatores de temperatura para cada resíduo indicou regiões de maior flexibilidade nas duas cadeias: Gly71–Asn78, Lys447-Glu451 e Glu495 – Lys504. Essas regiões estão localizadas externamente, em contato direto com o solvente. O modelo final contem duas cadeias polipeptídicas, 962 moléculas de água e duas moléculas de HEPES. As moléculas de HEPES são responsáveis por interações entre unidades assimétricas distintas, e importantes para o empacotamento cristalino da proteína (Figura 19).

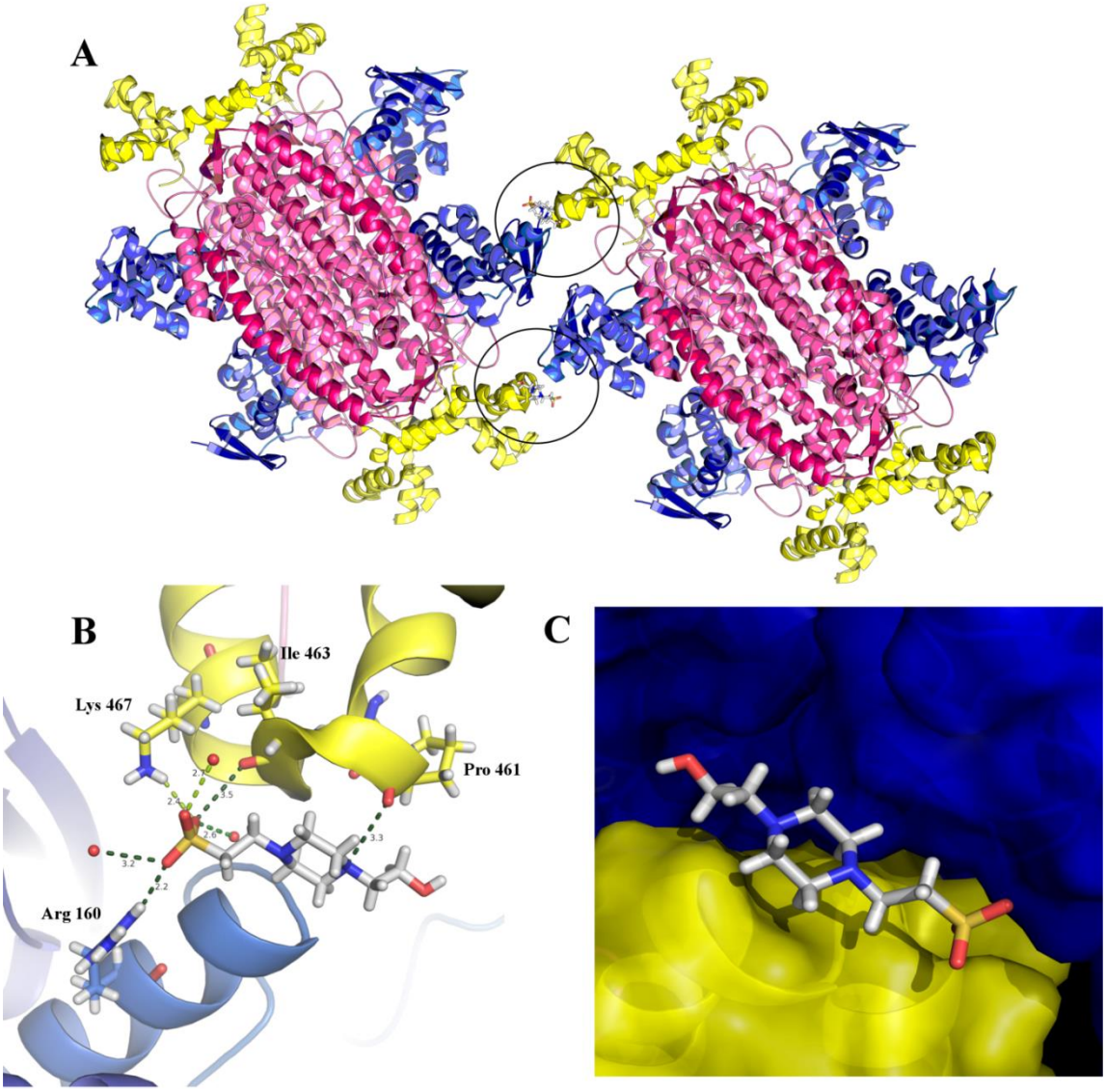

Figura 19. Representação do sítio de ligação do HEPES. As distâncias entre os átomos estão representadas na figura em Å. A) Os círculos pretos representam a localização das moléculas de HEPES entre dois tetrâmeros de unidades assimétricas distintas. B) Resíduos de D3/A estão representados em amarelo e D3/A em azul. Interações polares indicadas por linhas verdes pontilhadas. C) Representação da interface entre os tetrâmeros.

A estrutura da enzima HsFH é similar à outras fumarases de classe II composta principalmente de hélices alfa formando um tetrâmero funcional. O sítio ativo, composto por resíduos de três subunidades está no fundo de uma cavidade rasa, com um segundo sítio de ligação posicionado mais externamente nessa mesma cavidade.

Membros da classe II das fumarases compartilham 20-90% de identidade sequencial. As diferenças estão espalhadas por toda a proteína, causando

pequenas diferenças na distribuição de cargas na superfície das proteínas, o que pode ser devido a necessidade de se adaptar a diferentes ambientes químicos específicos para cada espécie (Figura 20)

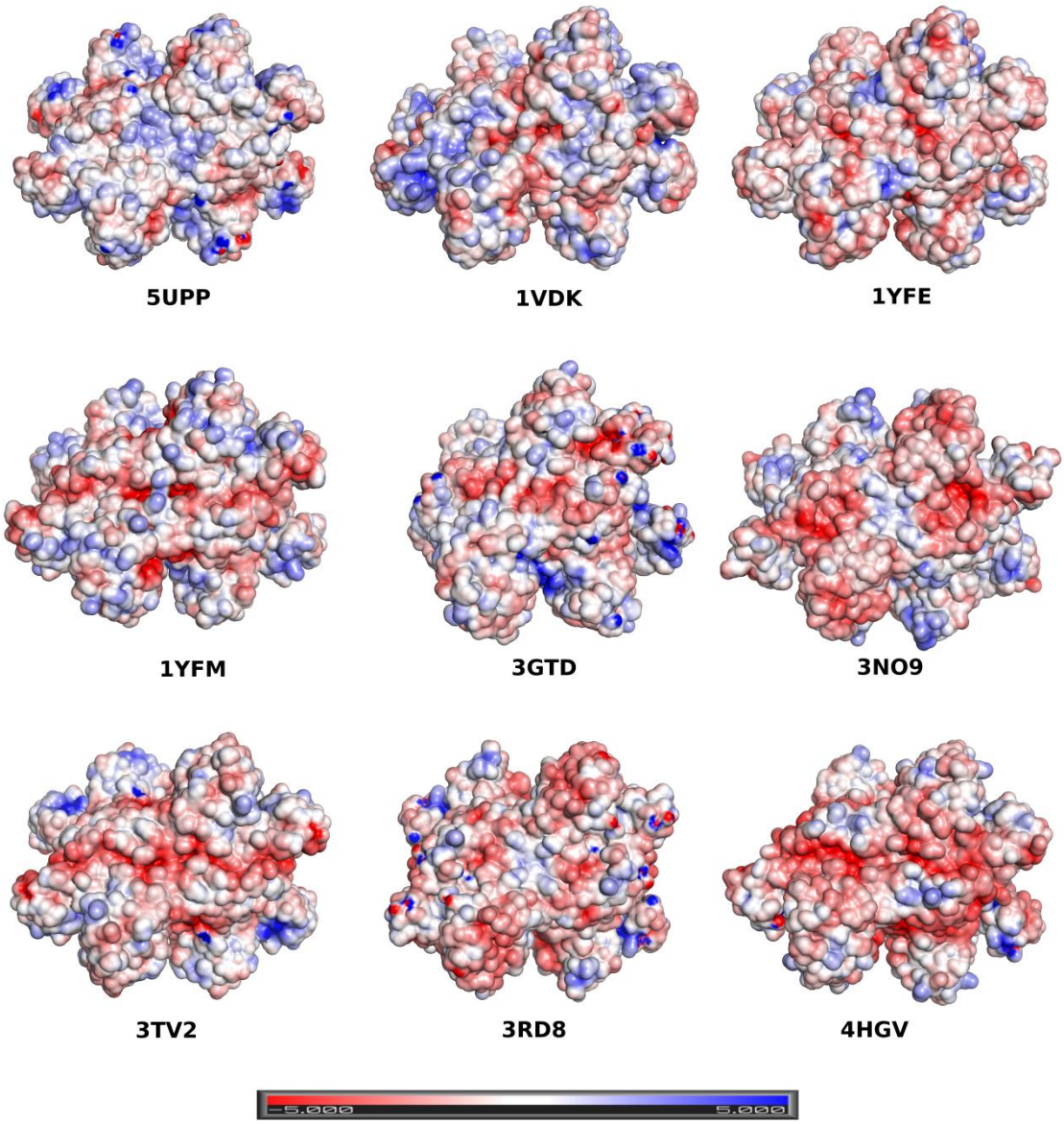

Figura 20. Superfície de potencial eletrostático de isoformas de fumarases Classe II. *Homo sapiens* FH (5UPP), *Thermus thermophilus* FH (1VDK), *Escherichia coli* FumC (1YFE);*Saccharomyces cerevisiae* (strain ATCC 204508 / S288c) FH (1YFM); *Rickettsia prowazekii* FH (3GTD), *Mycobacterium tuberculosis* FH (3NO9); *Burkholderia pseudomallei* Fh (3TV2); *Mycobacterium smegmatis* FH (3RD8); *Rhizobium meliloti* FH (4HGV)

Estudos estruturais de FumC de *E. coli* (PDB 1FUR [48]), indicam que a His129 (His176 para *Hs*FH), localizada no sítio B pode ser encontrada em duas conformações, dependendo da presença de ligantes no sítio. Quando uma molécula

de L-malato é encontrada no sítio B, a His129 sofre uma reorientação em direção a região de solvente, para acomodar o ligante. Na nossa estrutura, a cadeia lateral da His176 está apontada na direção da entrada do sítio e estabilizada por interações com os átomos NH da Pro177 (3.4 Å), Asn178 (3.1 Å) e Asp179 (3.1 Å). Análises do empacotamento cristalino indicam que essa conformação da His176, voltada para a entrada dos sítios A e B, está relacionada com a proximidade das moléculas relacionadas por simetria.

Estudos estruturais da FH de *M. tuberculosis* demonstraram dois estados conformacionais distintos para o domínio C-terminal no sítio ativo; uma conformação aberta para o sítio vazio e uma conformação fechada para quando há compostos ligados [80]. Um alinhamento das estruturas de *Mt*FH com a 5UPP mostrou que a nossa estrutura se assemelha a conformação aberta. Ao comparar essa região com a estrutura de *Hs*FH depositada sob o código 3E04, é confirmada a possibilidade de duas conformações para o domínio 3. Enquanto a nossa estrutura está na conformação aberta, sendo estabilizada pelas moléculas de HEPES, a 3E04 se encontra na conformação fechada (Figura 21). Também é importante ressaltar que essa é uma região flexível da proteína, sendo que os dados depositados para 3E04 não apresentam densidade eletrônica para o domínio 3 de todos os monômeros.

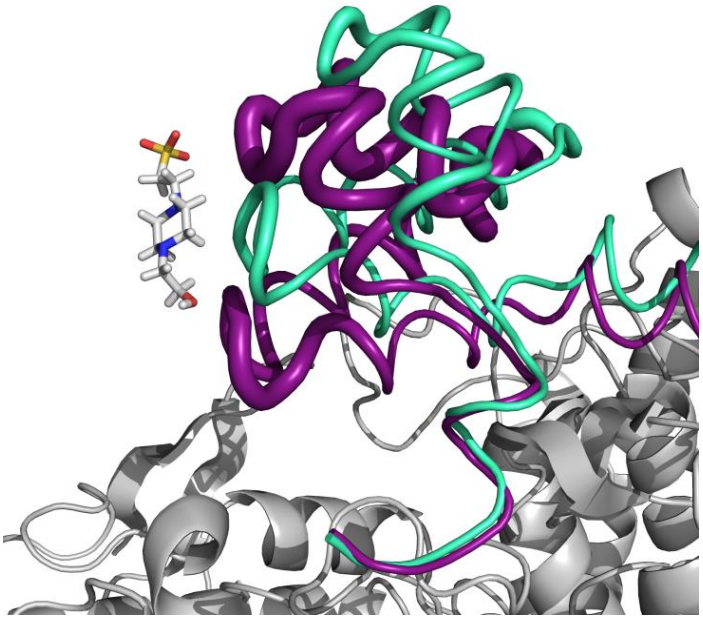

Figura 21. Análise do fator de temperatura em *cartoon putty*. A região C-terminal de 3E04 é mostrada em roxo. A região C-terminal de 5UPP com a molécula de HEPES é mostrada em azul cian. Átomos de C, N, O e S estão representados em branco, azul, vermelho e amarelo, respectivamente.

A regulação alostérica da função enzimática é crucial no controle de eventos celulares e fornece um mecanismo refinado de ajuste proteico. Até o presente momento, pouco se sabe a respeito de sítios alostéricos e/ou moduladores alostéricos para a enzima humana. Estudos mostram que o HEPES, além de outras moléculas sulfatadas já foram previamente utilizados como sonda na busca de sítios alostéricos e inibidores [81]. A molécula de HEPES, encontrada em uma cavidade rasa no domínio 3 (Pro461, Ile463 e Lys467), nos levou a investigar se a presença do HEPES complexado com *Hs*FH poderia ser resultado do protocolo de cristalização ou poderia sugerir a existência de um sítio alostérico.na enzima humana. Curiosamente, mutação na Lys467 já foi descrita estar associada com leiomiosarcoma uterino [82].

Quando TRIS e HEPES foram comparados no ensaio enzimático, os resultados mostraram um aumento em 1.5 vezes na eficiência catalítica quando HEPES foi usado (Tabela 9). Considerando a possível relevância do domínio 3 para a regulação alostérica, a maior eficiência catalítica na presença do HEPES, assim como a importância do resíduo Lys467 para a atividade catalítica, propomos que esse sítio deva ser melhor investigado com relação ao seu papel para catálise.

Tabela 9. Parâmetros cinéticos para HsFH.

	Fumarato			**L-Malato**			
	K_m (μM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	K_m (μM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	Keq
1	370 ± 50	370 ± 10	1,0E+06±1E+05	1200 ± 70	245 ± 7	2,0E+05±1E+04	4,9±0,7
2	240 ± 20	380 ± 15	1,58E+06±1,5E+05	600 ± 100	185 ± 5	3,1E+05±1E+04	5±1
3	250 ± 30	160 ± 10	6,4E+05±9E+04	2900 ± 400	370 ± 7	1,3E+05±2E+04	5±1
4	400 ± 20	170 ± 3	4,3E+05±2E+04	3400 ± 200	340 ± 10	1,0E+05±4E+04	4±2

1) 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl. 2) 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl. 3) 50 mM Tris pH 8.5, 150 mM KCl. 4) 50 mM Tris pH 8.5, 150 mM NaCl

4.1.6 Estudo de busca de fragmentos por cristalografia

A busca de fragmentos como ligantes de proteínas tem se tornado uma abordagem moderna para a identificação de novos compostos de partida para o desenho de fármacos [83]. Mais ainda, a busca por fragmentos pode identificar sítios secundários nas proteínas, como sítios alostéricos, de grande relevância biológica. Essa abordagem envolve o uso de bibliotecas de pequenas moléculas que obedecem o critério da “regra dos três” [84]. Quanto menor a complexidade dos

fragmentos, maior a probabilidade em se ligar a proteína alvo, resultando assim em taxas maiores de acerto e uma busca mais eficiente do espaço químico. Os fragmentos identificados como ligantes podem ser melhorados através do uso de estratégias para crescer a molécula.

É descrito na literatura a limitação de inúmeros métodos biofísicos na identificação de fragmentos como ligantes proteicos [85]. A cristalografia de raios-X vem então emergindo como uma ferramenta de busca de fragmentos, uma vez que as informações estruturais permitem o fácil acesso ao mecanismo de interação proteína e ligante.

Os estudos de *fragment Screening* para a enzima fumarase (*Hs*FH) foram realizados utilizando uma biblioteca por nós elaborada e que engloba fragmentos comerciais e fragmentos fornecidos pelo Prof Flavio Emery. Foram enviados para coleta de dados 41 cristais de *Hs*FH com o fragmento incorporado pela técnica de *soaking.* Foram coletados 24 conjuntos de dados dos experimentos de *soaking*, que estão em fase de refinamento.

.

4.2 Estudo dos mutantes da enzima fumarase humana

4.2.1 Construção e produção heteróloga dos mutantes propostos por mutagênese sítio-dirigida

Das oito mutações selecionadas (Figura 7), sete foram concluídas com sucesso. Ainda não foi possível comprovar a mutação G282V, uma vez que, devido a limitações do processo de sequenciamento associada com o tamanho do gene, a região do gene contendo a mutação não pôde ser observada.

A produção heteróloga dos mutantes de *Hs*FH em *E. coli* BL21 (DE3) se mostrou eficiente e todas as proteínas modificadas foram obtidas na fração solúvel. A purificação feita por cromatografia de afinidade em resina de níquel e por cromatografia de exclusão por tamanho resultou em alto rendimento (Tabela 10) dos mutantes em sua forma pura (Figura 22).

Tabela 10. Rendimento de cada mutante de *Hs*FH, em mg de proteína por litro de cultura de bactérias, após a purificação por afinidade e por cromatografia de exclusão de tamanho

Mutante	Rendimento (mg/L de cultura)
N107T*Hs*FH	72
H180R*Hs*FH	30
Q185R*Hs*FH	38
K230R*Hs*FH	66
E362Q*Hs*FH	26
S365G*Hs*FH	40
N373D*Hs*FH	40

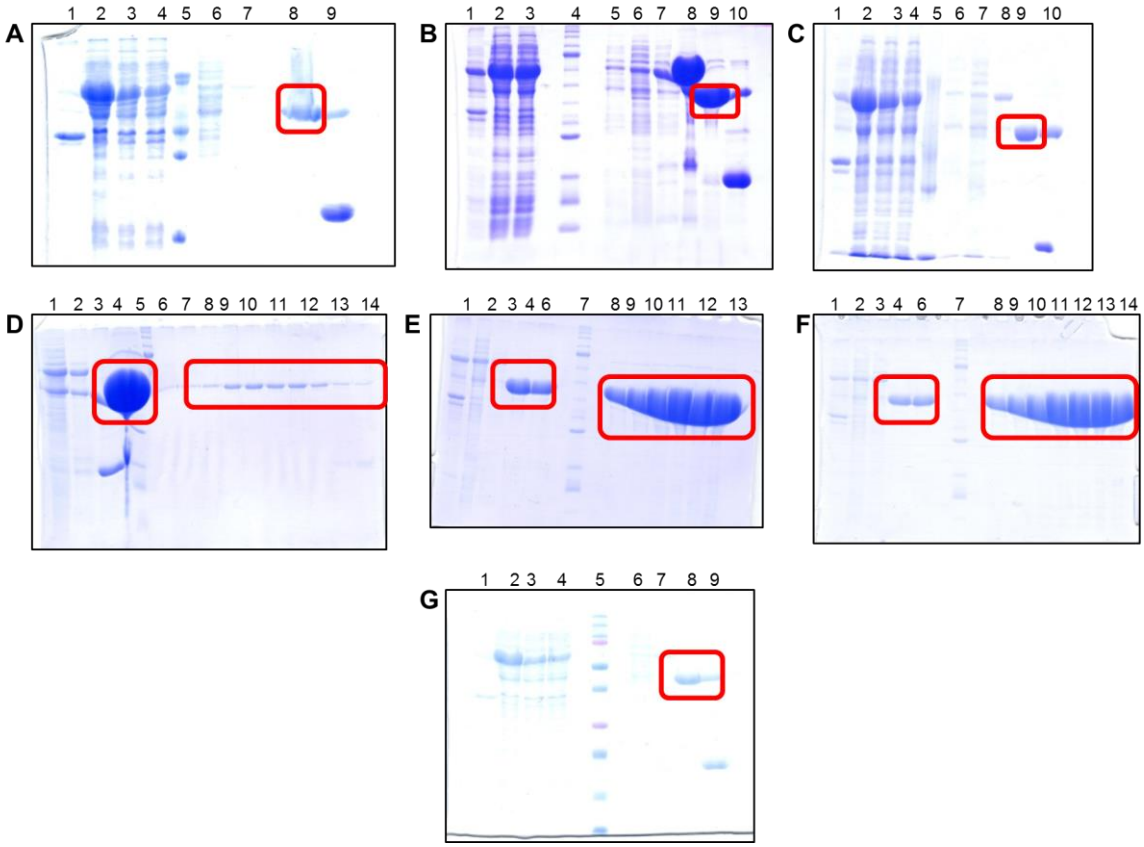

Figura 22. Gel de poliacrilamida dos mutantes da *Hs*FH. Em vermelho estão destacadas as frações contendo a proteína pura. Nos géis A, B, C e G estão representadas as frações referentes à purificação por cromatorgrafia de afinidade. Nos géis D, E e F estão representadas a proteína após a purificação por afinidade e as frações da gel filtração. A) Mutante N107T*Hs*FH B) Mutante H180R*Hs*FH C) Mutante K230R*Hs*FH D) Mutante E362Q*Hs*FH E) Mutante S365G*Hs*FH F) Mutante N373D*Hs*FH, G) Mutante Q185R*Hs*FH.

4.2.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A análise dos resultados indica que as amostras se encontram homogêneas com uma polidispersividade em torno de 20% ou menor e com diâmetro hidrodinâmico entre 10,54 e 12,47 nm, que correspondem ao tamanho aproximado para a *Hs*FH (Figura 23 e Tabela 11).

Tabela 11. Valores obtidos para os picos da distribuição de tamanho das partículas em solução no DLS.

Mutante	Diâmetro (nm)	Polidispersividade (%)
***Hs*FH nativa**	10 ± 2	20,4
N107T*Hs*FH	10 ± 2	15,9
H180R*Hs*FH	9 ± 2	18,4
Q185R*Hs*FH	10 ± 2	20,0
K230R*Hs*FH	11 ± 2	14,5
E362Q*Hs*FH	9 ± 1	12,4
S365G*Hs*FH	10 ± 2	18,0
N373D*Hs*FH	10 ± 2	20,7

Para *Hs*FH e seus mutantes os resultados de DLS permitem somente a determinação da homogeneidade da amostra e seu estado de agregação. Já o estado oligomérico não pode ser determinado através da estimativa do diâmetro hidrodinâmico das proteínas em solução. Isto porque devido a forma não globular do monômero (Figura 23), ambos monômero e tetrâmero são esperados possuir diâmetros hidrodinâmicos semelhantes.

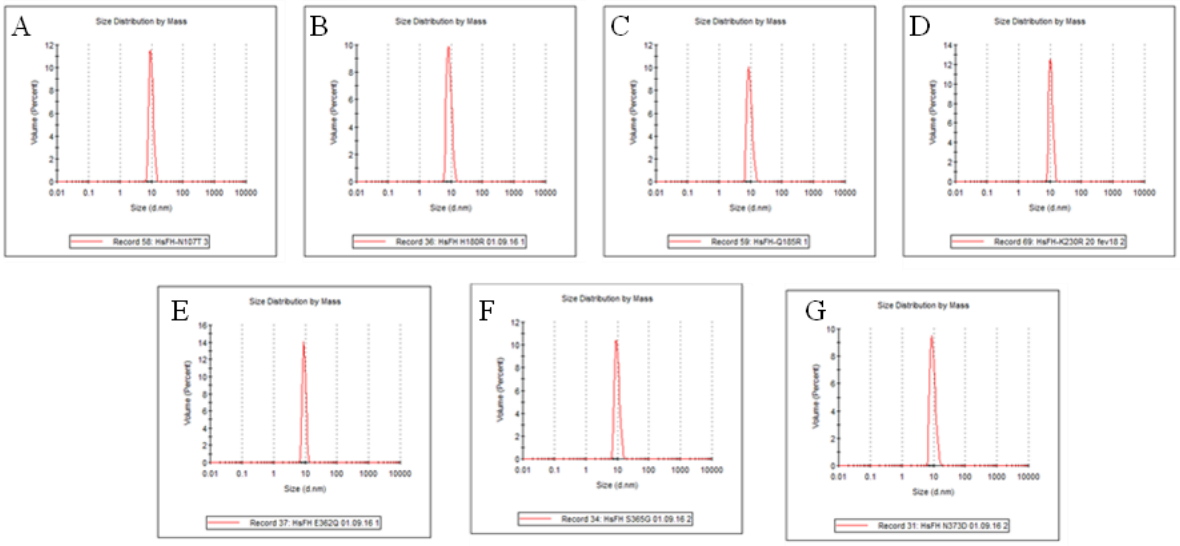

Figura 23. Análise do perfil de polidispersividade encontrado para os mutantes da enzima *Hs*FH obtido através da utilização de técnicas de espalhamento dinâmico de luz. Gráfico representando o perfil de distribuição do tamanho (nm) em função do volume. A) Mutante N107T*Hs*FH B) Mutante H180R*Hs*FH C) Mutante Q185R*Hs*FH D) Mutante K230R*Hs*FH E) Mutante E362Q*Hs*FH F) Mutante S365G*Hs*FH G) Mutante N373D*Hs*FH.

4.2.3 Atividade enzimática

O experimento de atividade enzimática foi realizado com todos os mutantes produzidos, utilizando as condições reacionais estabelecidas para a enzima nativa e analisando inicialmente apenas uma concentração para cada substrato (1 mM para fumarato e 10 mM para L-malato). Dentre os sete mutantes testados, apenas o mutante N107T possui atividade enzimática mensurável. Portanto, o ensaio completo para determinação dos parâmetros cinéticos foi realizado apenas com o mutante N107T*Hs*FH.

4.2.3.1 Cinética enzimática do mutante N107T*Hs*FH

Com o intuito de se obter uma caracterização cinética comparativa com a cinética da enzima nativa, o ensaio foi realizado com os dois substratos presentes na mesma mistura reacional, de forma a também analisar a influência dos dois substratos no comportamento cinético do mutante. O experimento foi

realizado em pH 8,5 e os parâmetros cinéticos estão relacionados na tabela 12 e na figura 24. A constante de equilíbrio para N107T*Hs*FH foi de 2,8 um valor 1,5 vezes menor que o encontrado para a enzima nativa.

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

N107T*Hs*FH	
k_{cat}^{f} (s^{-1})	140±12
K_m^{FUM} (mM)	0,12±0,02
k_{cat}^{r} (s^{-1})	254±6
K_m^{MAL} (mM)	0,63±0,08

O mutante N107T*Hs*FH apresentou valores de k_{cat} e K_m menores que os encontrados para a enzima nativa, tanto para L-malato (MAL) quanto para fumarato (FUM). Uma diminuição nos valores de k_{cat} indica que a mutação afeta a velocidade da reação, tonando-a mais lenta. No entanto, a também diminuição de K_m é comumente relacionada com um aumento da afinidade da proteína pelo substrato. Estudos realizados com pacientes que possuem essa mutação não apresentam dados de atividade enzimática para fumarase [7, 11, 86] e, portanto, esse é o primeiro ensaio para atividade da enzima com essa mutação.

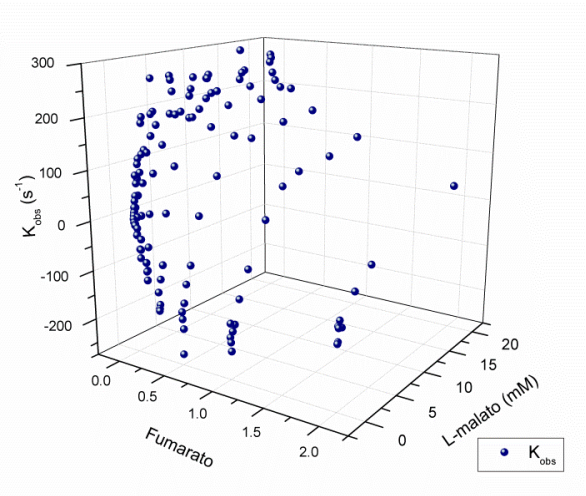

Figura 24. Caracterização cinética no estado estacionário do mutante N107T*Hs*FH. Gráfico de superfície da cinética completa. Os dados foram ajustados à equação 2.

4.2.4 Avaliação da estabilidade térmica dos mutantes baseada em fluorimetria diferencial de varredura

Foram realizados os ensaios utilizando os kits comerciais *Solubility & Stability* 1 e 2 (*Hampton Research*) em que são variados o tipo de tampão, pH, concentração de sal e influência de aditivos. As curvas de referência para a enzima *Hs*FH nativa e seus mutantes apresentam um perfil sigmoidal característico e os dados de temperatura de desenovelamento (T_m) encontrados para a enzima nativa seus mutantes se encontram na tabela 13 e nos apêndices A e B.

Tabela 13. Comparação dos valores das temperaturas de desenovelamento para a enzima *Hs*FH e seus mutantes estudados utilizando termoflúor.

Proteína	T_m (°C)
***Hs*FH nativa**	51,2
N107T*Hs*FH	40,6
H180R*Hs*FH	36,5
Q185R*Hs*FH	39,8
K230R*Hs*FH	52
E362Q*Hs*FH	50
S365G*Hs*FH	36,5
N373D*Hs*FH	51,7

Os menores valores de T_m são encontrados para os mutantes H180R*Hs*FH e S365G*Hs*FH, em que a mutação ocorre pela troca por resíduos diferentes quimicamente. Essa mudança de termoestabilidade pode estar mais relacionada com o tipo da troca, do que da posição do resíduo, uma vez que o mutante E362Q*Hs*FH, a apenas 2 resíduos de distância do S365G*Hs*FH, tem um Tm 13,5 °C maior, e muito semelhante ao da nativa.

Na figura 23 estão relacionados os valores de ΔT_m para a enzima nativa e seus mutantes em diferentes condições, com variação de pH e concentração de NaCl. Quando comparados com os dados da enzima nativa em que há uma estabilização térmica pela presença de ácido cítrico e ácido succínico nos pHs 5,0 e 5,5 respectivamente, para os mutantes essa estabilização não é observada. Isso se deve, provavelmente, pela impossibilidade de ligação dessas moléculas na enzima, uma vez que as mutações realizadas causam em sua maioria perda da atividade e tais moléculas são conhecidas por serem inibidores competitivos de fumarases [18]. Entretanto, quando em altas concentrações (250 mM) e em pH 7,0, a estabilização dos mutantes é observada, em alguns casos, maior que para a enzima nativa (Apêndice A).

*Hs*FH nativa

NaCl (mM) \ pH	51.2	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
0	-22	-	3.8	-4	-2	-2	0.5	0	-0.15	-1	4.7
50	-23	5.1	3.2	-3	-1	-1	0.6	0.2	-0.15	-1	4
100	-23	4.5	2.8	-3	-1	-1	0.7	0.2	-0.09	-1	2.1
150	-22	2.8	2.3	-2	-1	-1	0.7	0.2	-0.01	-1	1.2
200	-22	-0	2	-3	-1	-1	1	0.3	0.3	-1	2.5
250	-23	0.2	1.9	-3	-0	-0	1.2	0.4	0.4	-0	2.6
500	-	-2	2.2	-3	0.4	0.7	2.2	1.5	1.3	0.6	2.7
1000	-29	0.5	3.3	-3	3.1	2.5	5.2	4.3	3.5	3.4	4.4

N107T*Hs*FH

NaCl (mM) \ pH	-	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
0	40.6	-	-6.3	0.8	3.0	3.0	1.8	2.9	3.9	5.1	4.4	7.0
50	2.2	-14.2	-6.7	3.5	1.8	4.4	3.2	4.4	5.4	5.3	5.7	8.1
100	4.6	-15.0	-4.7	1.9	2.1	4.1	4.5	6.0	5.8	5.8	5.8	8.3
150	4.1	-	-7.5	1.7	1.9	6.5	5.2	6.1	5.8	5.9	6.5	8.7
200	4.6	-10.1	-7.4	1.9	2.0	4.6	5.1	6.6	6.2	5.9	4.8	8.3
250	4.7	-	-4.3	1.4	1.8	4.9	5.9	7.2	6.3	6.4	4.7	8.4
500	4.6	-4.3	-	1.4	0.1	5.3	5.7	8.4	7.0	6.7	7.0	8.9
1000	5.7	-	-	2.3	-3.7	5.8	8.0	8.3	7.4	7.3	10.2	9.6

H180R*Hs*FH

NACl (mM) \ pH	-	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
0	36.5	-8.0	-4.5	-1.1	0.0	2.8	-5.1	1.2	2.4	4.8	4.3	5.1
50	1.6	-5.3	-4.7	-1.1	-0.3	1.8	-1.3	4.6	5.0	5.8	5.4	5.4
100	4.3	-6.6	-4.3	-0.7	-0.5	3.0	1.7	5.5	5.3	6.8	5.3	6.3
150	5.5	-7.2	-4.0	-0.2	0.4	4.6	3.5	6.9	7.0	7.6	6.1	6.8
200	6.3	-6.9	-4.2	1.5	2.0	5.8	4.6	7.6	8.0	7.9	6.2	7.1
250	6.3	-6.3	-4.0	0.9	2.8	5.9	5.2	8.0	8.4	8.4	6.8	6.9
500	7.2	-3.9	-2.1	2.9	2.2	7.4	7.3	9.5	9.5	8.2	8.1	7.8
1000	9.5	-2.7	3.9	5.8	4.1	8.3	8.8	10.8	10.3	9.8	8.9	9.0

Q185R*Hs*FH

NaCl (mM) \ pH		4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
0	39.8	-10.9	-10.1	-0.1	-0.3	3.4	1.6	3.1	2.7	2.9	1.0	0.7
50	4.2	-6.8	-9.7	1.2	0.4	5.0	3.3	6.0	3.9	3.3	1.8	1.5
100	4.4	-8.3	-6.5	1.7	1.2	5.0	3.7	6.6	5.0	4.0	1.7	2.1
150	4.8	-9.6	-5.9	3.5	1.6	5.0	3.5	7.4	5.2	4.1	2.6	1.5
200	5.2	-7.1	-4.8	4.3	2.5	5.2	4.1	7.1	6.1	4.8	3.6	1.9
250	5.9	-7.1	-4.1	3.6	2.1	5.4	4.9	7.7	6.1	5.3	3.0	2.1
500	6.6	-7.2	-2.1	6.4	3.7	6.4	6.7	9.1	7.4	5.9	4.0	2.7
1000	7.5	-3.7	8.7	9.2	3.9	8.0	8.0	10.4	8.4	7.3	5.9	4.6

K230R*Hs*FH

NaCl (mM) \ pH	52	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
0	-21.6	-16.4	-5.3	-4.2	-2.1	-1.0	0.4	0.4	0.3	0.0	0.2
50	-16.6	-15.8	-4.2	-4.2	-1.9	-0.9	0.6	0.7	0.4	0.2	0.3
100	-20.8	-14.3	-3.7	-4.0	-2.0	-0.9	0.6	0.7	0.6	0.3	0.4
150	-22.2	-12.5	-3.5	-4.0	-1.9	-0.9	0.8	0.8	0.8	0.4	0.4
200	-	-12.4	-3.0	-3.8	-1.8	-0.7	1.0	0.9	1.1	0.2	0.7
250	-	-10.9	-2.3	-3.7	-1.7	-0.5	1.1	1.1	1.1	0.7	1.1
500	-0.5	-5.7	-0.2	-3.3	-0.5	1.0	2.0	2.3	2.1	2.1	2.2
1000	-5.8	-2.4	2.1	-2.8	1.9	2.8	4.4	4.7	4.4	3.6	4.3

E362Q*Hs*FH

NaCl (mM) \ pH	-	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
0	50	-21.8	-15.6	-5.7	-4.9	-2.7	-2.0	0.5	0.6	0.7	0.5	0.5
50	0.9	-22.2	-14.4	-4.4	-4.7	-2.7	-1.6	0.9	0.9	1.1	0.8	0.8
100	1.2	-	-12.8	-4.4	-4.9	-2.5	-1.7	1.0	1.1	1.2	0.8	0.9
150	1.4	-19.6	-11.5	-4.1	-4.9	-2.1	-0.6	1.1	1.2	1.3	1.0	1.1
200	1.6	-8.3	-10.8	-3.6	-4.8	-2.0	-1.0	1.1	1.2	1.5	0.8	1.3
250	1.7	-20.4	-9.9	-3.2	-4.6	-1.9	-1.0	1.2	1.5	1.3	1.2	1.2
500	2.5	-18.6	-5.4	-1.2	-4.1	-0.6	0.3	2.1	1.9	2.4	2.3	2.3
1000	4.6	-14.6	-0.5	1.6	-4.0	1.7	2.5	4.1	4.1	4.2	4.3	4.5

S365G*Hs*FH

NaCl (mM) \ pH	-	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
0	36.5	-	-17.7	-6.6	-5.5	-3.0	-2.6	0.3	-0.3	0.0	-0.4	0.0
50	0.4	-24.1	-16.8	-4.9	-5.3	-2.6	-2.0	0.6	0.1	0.1	0.0	0.1
100	0.7	-23.8	-15.8	-4.1	-4.7	-2.4	-1.8	0.5	0.0	0.0	0.0	0.1
150	0.9	-22.1	-15.8	-4.1	-4.9	-2.2	-1.4	0.8	0.6	0.5	0.3	0.5
200	1.1	-23.7	-14.0	-3.5	-4.9	-2.1	-0.3	1.1	0.4	0.6	0.1	0.7
250	1.1	0.2	-13.0	-1.8	-4.6	-1.8	-1.0	1.2	0.8	0.7	0.5	0.8
500	2.2	-	-8.2	-1.3	-5.1	-0.9	0.0	2.2	1.8	1.5	1.9	1.9
1000	4.1	-5.3	-4.1	4.3	-1.4	1.4	2.0	5.0	4.0	3.7	3.8	4.3

N373D*Hs*FH

NaCl (mM) \ pH		4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
0	51.7	-23.1	-17.2	-5.0	-4.9	-2.8	-2.5	-0.1	-0.8	-0.9	-1.3	-1.0
50	-0.1	-24.6	-15.0	-4.7	-4.6	-2.9	-2.4	-0.2	-0.6	-0.8	-1.1	-1.0
100	-0.1	-17.5	-13.5	-4.6	-4.8	-3.0	-2.3	-0.3	-0.7	-0.9	-1.1	-0.9
150	-0.2	-	-11.2	-3.3	-4.8	-2.8	-2.1	-0.2	-0.7	-0.9	-0.9	-0.7
200	0.0	-	-11.2	-3.7	-4.9	-2.7	-2.0	-0.3	-0.6	-0.7	-1.2	-0.6
250	0.0	-9.9	-9.7	-3.6	-4.8	-2.6	-2.1	-0.1	-0.6	-0.7	-1.0	-0.7
500	0.5	-16.1	-5.8	-1.5	-4.7	-2.0	-1.3	0.4	0.0	0.1	-0.3	0.1
1000	2.7	1.5	-2.0	0.2	-4.6	-0.5	0.3	1.7	1.8	1.7	1.0	1.4

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

A análise da termoestabilidade dos mutantes indica que as mutações K230R, E362Q e N373D apresentam uma menor influência na temperatura de desenovelamento, os valores de T_m para os mutantes assemelham-se aos da enzima nativa. Essas mutações apresentam a troca de resíduos de mesmo tamanho e de características químicas semelhantes, o que possibilita que as interações desses resíduos com os demais das cadeias sejam conservadas. Os dados para os mutantes H180R*Hs*FH e S365G*Hs*FH indicam inicialmente que

várias das condições testadas aumentam sua estabilidade, porém ambos T_m são 15 °C menores que o da enzima nativa, portanto mesmo com essa aparente estabilização, os mutantes ainda se encontram mais instáveis estruturalmente.

Para a *Hs*FH nativa foi observado que ocorre um aumento na termoestabilidade da proteína com o aumento do pH e da concentração de NaCl, o que já foi relatado para fumarase porcina [21]. Para os mutantes esse aumento na termoestabilidade não é tão observado, apenas nos mutantes N107T*Hs*FH, H180R*Hs*FH e Q185R*Hs*FH podemos ver claramente esse efeito.

4.2.5 Estudos estruturais dos mutantes

Os mutantes da enzima *Hs*FH cristalizam em diferentes condições, porém seus cristais tendem a se formar como canudos ou agulhas, assim como a proteína nativa. Em algumas condições foram obtidos cristais em uma forma mais cuboide. Os cristais para a caracterização por difração de raios-X foram selecionados por meio de inspeção visual, levando em consideração o tamanho e a presença de faces bem definidas (Figura 26).

Dentre os cristais obtidos foram enviados para a coleta de dados de difração de raios-X um total de 67 e um mínimo de dois conjuntos de dados foi coletado para cada mutante. A condição de cristalização de cada mutante que gerou o conjunto de dados escolhido para o processamento, está descrita na tabela 14.

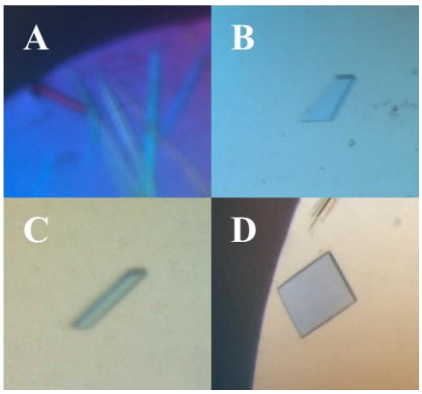

Figura 26. Exemplos de cristais dos mutantes da *Hs*FH. A) Cristais do mutante H180R*Hs*FH na condição 0,2M tartarato de amônio dibásico, 14% (m/v) PEG 3350. Proteína a 6 mg/mL. B) Cristal do mutante E362Q*Hs*FH na condição 0,1 M MES pH 6,5, 12% (m/v) PEG 20k. Proteína a 4 mg/mL. C) Cristal do mutante S365G*Hs*FH na condição 0,1 M BIS-TRIS pH 6,5, 20% (m/v) PEG 3350, 2% Tacsimato pH 6,0. Proteína a 4 mg/mL. D) Cristal do mutante N373D*Hs*FH na condição 0,1 M MES pH 6,5, 12% (m/v) PEG 20 K. Proteína a 4 mg/mL.

Os mutantes N107T*Hs*FH, H180R*Hs*FH e Q185R*Hs*FH cristalizaram no grupo espacial hexagonal P 6_5 2 2, em condições de cristalização diferentes, tendo em comum como precipitante PEG (polietileno glicol – 3350 para H180R*Hs*FH e Q185R*Hs*FH e 10000 para N107T*Hs*FH).

A coleta de dados de difração de raios X foi realizada na fonte de radiação sincrotron na linha de luz PROXIMA 1 em Soleil (Número da proposta: 20160042), França. Detalhes envolvendo a coleta de dados, estatísticas de refinamento e parâmetros do modelo estão resumidas na tabela 14. Somente o refinamento para os modelos N107T*Hs*FH, H180R*Hs*FH e Q185R*Hs*FH estão completos.

Tabela 14. Experimentos de cristalização e coleta de dados dos mutantes E362Q*Hs*FH, H180R*Hs*FH, K230R*Hs*FH, N107T*Hs*FH, Q185R*Hs*FH, S365G*Hs*FH e N373D*Hs*FH.

Mutante	Concentração da Proteína (mg/mL)	Condição de Cristalização	Resolução (Å)	Processamento	Grupo Espacial
N107T*Hs*FH	4	0,2 M HEPES pH 7,5, 16% (m/v) PEG 10.000	2,3	iMosflm Aimless	P $6_5$22
N180R*HsFH*	6	0,2 M de tartarato de amônio dibásico, 14% (m/v) PEG 3350	1,9	XDS SCALA	P $6_5$22
Q185R*Hs*FH	4	0,1 HEPES pH 7,5, 0,2 M Sulfato de Lítio monoidratado, 25% (m/v) PEG 3350	1,9	iMosflm Aimless	P $6_5$22
K230R*Hs*FH	6	0,1 M HEPES pH 7,5, 1% (v/v) MPD, 10% (m/v) PEG 10.000	2,0	iMosflm Aimless	C 2
E362Q*Hs*FH	4	0,1 M MES pH 6,5, 12% (v/v) PEG 20.000	2,0	XDS SCALA	P 2_1
S365G*Hs*FH	4	0,1 M BIS-TRIS pH 6,5, 20% (m/v) PEG 3350, 2%)v/v) Tacsimato pH 6,0	2,6	XDS SCALA	P 3_2 2 1
N373D*Hs*FH	4	0,1 M MES pH 6,5, 12% (v/v) PEG 20.000	1,6	XDS SCALA	C 2 2 2_1

Tabela 15. Dados cristalográficos e estatísticos para N107T*Hs*FH, H180R*Hs*FH, Q185R*Hs*FH, K230R*Hs*FH, E362Q*Hs*FH, S365G*Hs*FH e N373D*Hs*FH. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses.

Processamento de dados	**N107T*Hs*FH**	**H180R*Hs*FH**	**Q185R*Hs*FH**	**K230R*Hs*FH**	**E362Q*Hs*FH**	**S365G*Hs*FH**	**N373D*Hs*FH**
Grupo espacial	P 6_5 2 2	P 6_5 2 2	P 6_5 2 2	C 1 2 1	P 6_5 2 2	P 3_2 2 1	C 2 2 2_1
Parâmetros de rede							
***a, b, c* (Å)**	188,82 188,82 114,14	189,88 189,88 115,38	190,49 190,49 115,18	148,5 125,1 142,0	188,77 188,77 115,06	189,79 189,79 117,0,8	125,47 148,69 115,05
α, β, γ (°)	90,00 90,00 120,00	90,00 90,00 120,00	90,00 90,00 120,00	90,00 115,22 90,00	90,00 90,00 120,00	90,00 90,00 120,00	90,00 90,00 90,00
Comprimento de onda (Å)	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
Resolução (Å)	93,6-2,3 (2,382-2,3)	49,3-1,9 (1,97-1,89)	94,44-1,92 (1,99-1,92)	67,17-2,05 (2,123-2,05)	49,12-2,49 (2,58-2,49)	82,18-2,9 (3,004-2,9)	45,5-1,6 (1,65-1,6)
Reflexões totais	5433509 (531646)	2136997 (203296)	19521968 (1603064)	5523360 (547798)	1857356 (169855)	182287 (18588)	614321 (57188)
Reflexões únicas	53507 (5250)	95797 (9343)	93759 (9202)	146332 (14491)	42596 (4022)	53686 (5030)	137717 (13154)
Multiplicidade	101,5 (101,2)	22,3 (218)	208,2 (174,2)	37,7 (37,8)	43,6 (42,2)	3,4 (4,5)	4,5 (4,3)
Completeza (%)	99,97 (100,0)	99,57 (98,69)	99,88 (99,64)	99,33 (99,10)	99,61 (96,31)	90,81 (93,72)	97,03 (93,44)
<I/σ(I)>	12,74 (4,33)	15,51 (0,68)	17,51 (3,40)	7,92 (2,26)	26,96 (2,50)	8,06 (2,24)	6,09 (0,80)
Wilson B-factor	21,50	38,04	21,74	17,60	57,88	46,55	20,89
R_{merge}	0,8983 (1,51)	0,1555 (3,234)	0,9241 (2,753)	0,7832 (1,915)	0,1446 (1,42)	0,1411 (0,548)	0,18 (1,872)
R_{meas}	0,903 (1,518)	0,1591 (3,31)	0,9266 (2,761)	0,7954 (1,945)	0,1463 (1,437)	0,1675 (0,6473)	0,203 92,114)
R_{pim}	0,09117 (0,1539)	0,03338 (0,6985)	0,06623 (0,2114)	0,1347 (0,3327)	0,02222 (0,216)	0,08899 (0,3404)	0,09096 (0,9518)
CC (½)	0,936 (0,834)	0,999 (0,378)	0,98 (0,466)	0,959 (0,53)	0,999 (0,754)	0,986 (0,737)	0,996 (0,52)
Refinamento parcial							
Reflexões usadas no refinamento	53506 (5251)	95797 (9344)	93750 (9203)	145835 (14485)	42596 (4018)	49119 (5029)	137717 (13137)
Reflexões usadas no R_{free}	2656 (251)	4788 (467)	4625 (468)	7297 (716)	2131 (202)	2429 (273)	6876 (655)
R_{work}	0,1502	0,1583	0,1740	0,2017	0,2406	0,2136	0,2471
R_{free}	0,1854	0,1872	0,2052	0,2480	0,3118	0,2720	0,2656
Número de átomos exceto hidrogênio	7445	7621	7666	15095	6840	13588	8106
Macromoléculas	6927	7017	7006	13896	6802	13588	7091
Ligantes	30	28	27	12			42
Solvente	488	576	633	1187	38		973
Resíduos proteicos	924	924	924	1848	924	1822	924
R.m.s d							
Ligações (Å)	0,002	0,005	0,004	0,004	0,015	0,017	0,003
Ângulos (°)	0,53	0,69	0,64	0,61	1,47	2,02	0,60
Ramachandran							
Favorecidos (%)	98,04	98,04	97,61	96,96	86,74	91,13	97,39
Permitidos (%)	1,96	1,96	2,39	3,04	11,30	6,60	2,61
***Outliers* (%)**	0,00	0,00	0,00	0,00	1,96	2,27	0,00
Rotâmeros *outliers* (%)	0,00	0,54	0,28	1,37	6,33	5,20	1,07
Clash score	1,13	1,13	0,57	1,51	15,42	31,06	2,17
Fator de temperatura médio ($Å^2$)							
Macromoléculas	29,53	47,72	30,72	24,43	76,68	41,76	24,51
Ligantes	49,15	58,78	61,26	50,43			40,43
Solvente	30,10	50,07	34,58	28,84	61,54		35,31

4.2.5.1 N107T*Hs*FH

A análise da estrutura obtida para N107T*Hs*FH confirma a presença da mutação como pode ser observado na figura 27. A estrutura foi determinada por substituição molecular contendo dois monômeros na unidade assimétrica e o tetrâmero funcional sendo formado por operações de simetria cristalográfica.

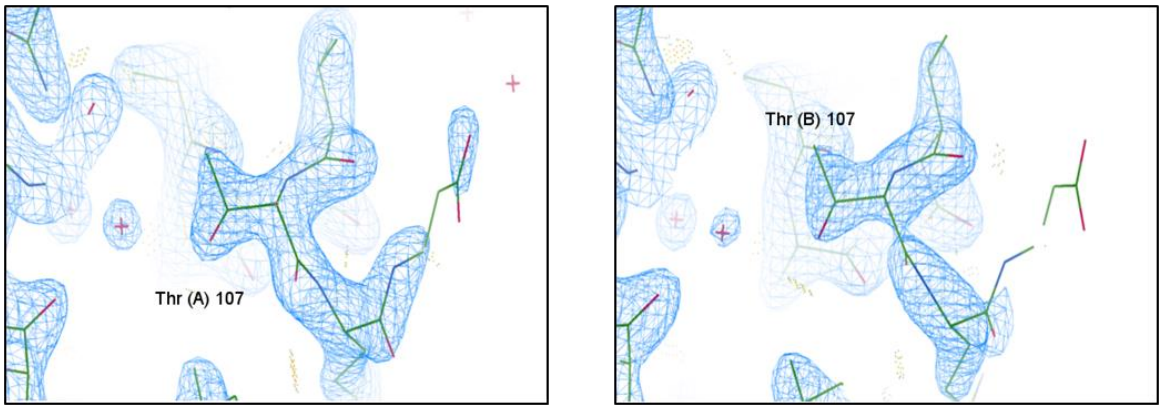

Figura 27. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,8; representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo treonina 107 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita).

Foi possível determinar o mapa de densidade eletrônica os resíduos 49-510 e uma análise do enovelamento do mutante N107*Hs*FH mostra que a mutação não interferiu na formação do tetrâmero e que diferenças maiores se encontram nas regiões que são naturalmente mais flexíveis, como a região N-terminal, os resíduos 361-374 e os resíduos 456-500, conforme mostra a figura 28.

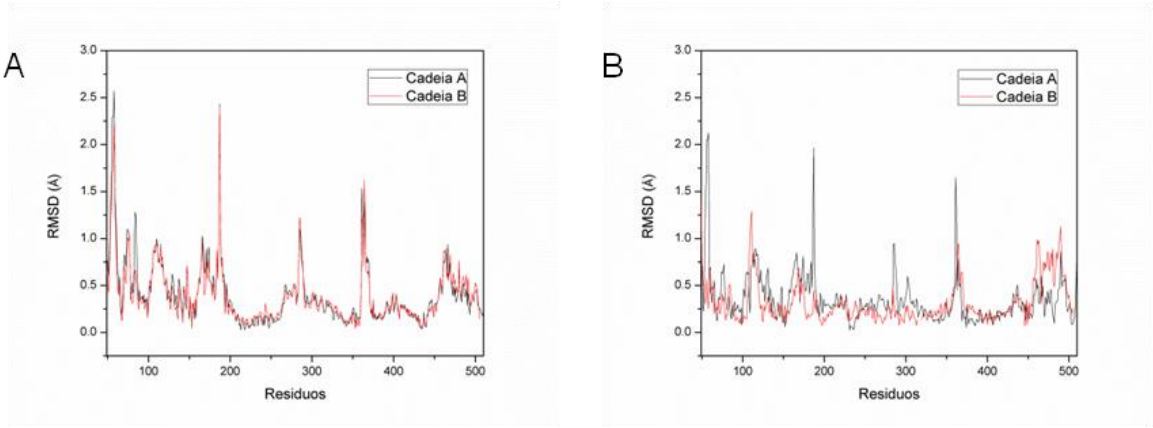

Figura 28. RMSD por resíduo entre o mutante N107T*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP.

4.2.5.2 H180R*Hs*FH

Através do mapa de densidade eletrônica foi confirmada a mutação no resíduo 180, como mostra a figura 29.

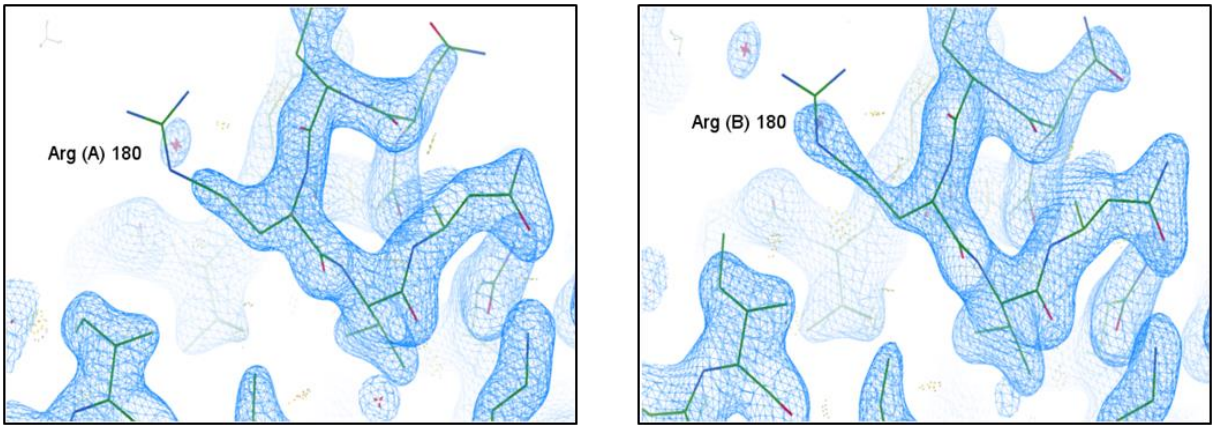

Figura 29. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,1; representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo arginina 180 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita).

A mutação no resíduo 180 não interferiu na formação do tetrâmero e o RMSD entre o mutante e a nativa apresenta picos apenas nas regiões flexíveis (Figura 30).

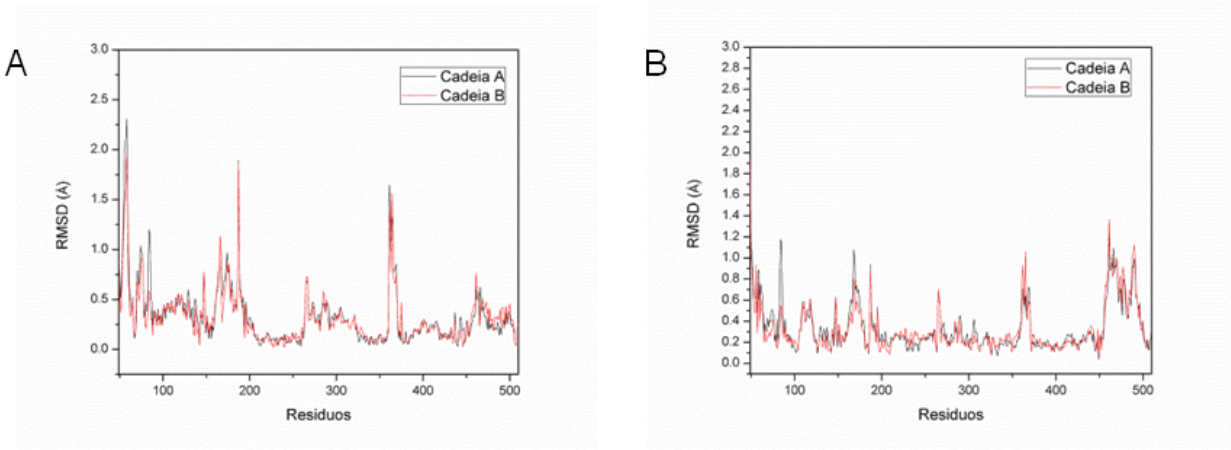

Figura 30. RMSD por resíduo entre o mutante H180R*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP

O resíduo His 180 se localiza no chamado sítio B, que foi descrito para *E. coli*, como um sítio que liga o substrato L-malato e que pode atuar como um ativador da enzima [30, 48]. Estruturalmente ele se encontra ao lado do sítio ativo e próximo ao resíduo Asn 107 (Figura 31), porém o mutante H180R*Hs*FH não apresenta atividade enquanto o mutante N107T*Hs*FH é ativo. Essa diferença pode ser explicada pelo tipo de mutação, pois a substituição de uma histidina por arginina pode alterar as interações feitas pelo resíduo e por se tratar do sítio B pode indicar uma participação desse resíduo no mecanismo de catálise.

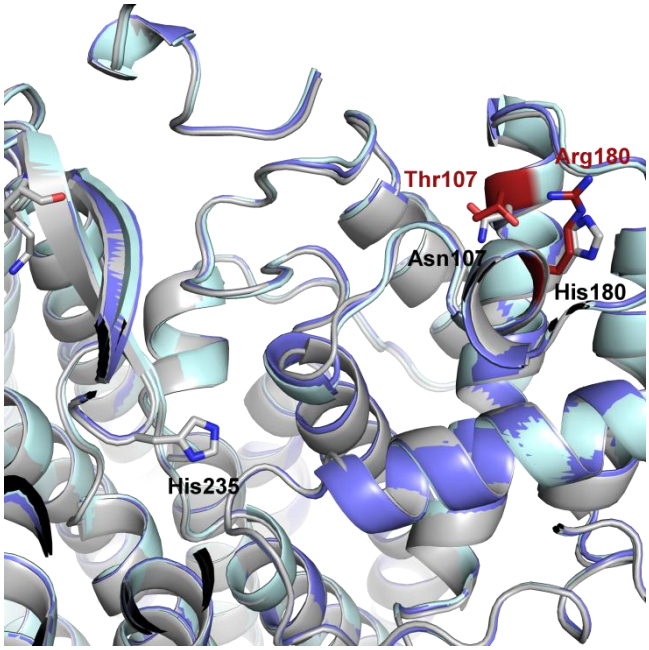

Figura 31. Representação em *cartoon* do sítio ativo e sítio B dos mutantes N107T*Hs*FH e H180R*Hs*FH sobrepostos à estrutura da enzima nativa. Em cinza estão os resíduos da *Hs*FH nativa, em vermelho os resíduos mutados.

4.2.5.3 Q185R*Hs*FH

Os dados estruturais para o mutante Q185R*Hs*FH indicam um dímero na unidade assimétrica e o tetrâmero formado por operações de simetria cristalográfica. A mutação foi confirmada pela análise do mapa de densidade eletrônica, como apresenta a figura 32.

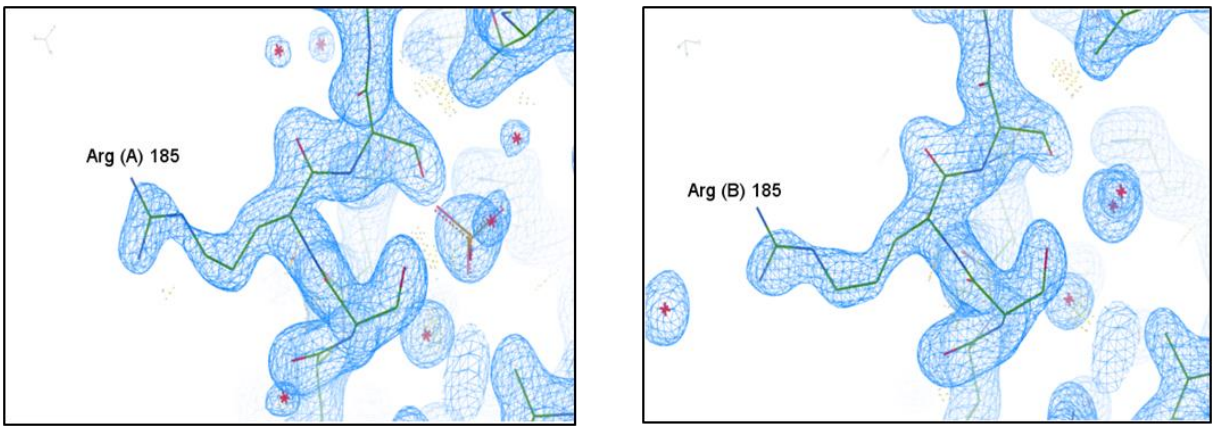

Figura 32. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,2; representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo arginina 185 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita).

Ao comparar a estrutura do mutante com a estrutura da *Hs*FH algumas diferenças importantes são observadas. A região do C-terminal da cadeia B, que envolve os resíduos do domínio 3, está deslocada em relação à nativa, porém não se encontra tão fechada como a encontrada para a estrutura de *Hs*FH depositada anteriormente no PDB (3E04), na realidade ela se encontra em uma conformação intermediária entre as duas estruturas da enzima nativa (Figura 33). Esse dado também pode ser confirmado pelos gráficos de RMSD da figura 34.

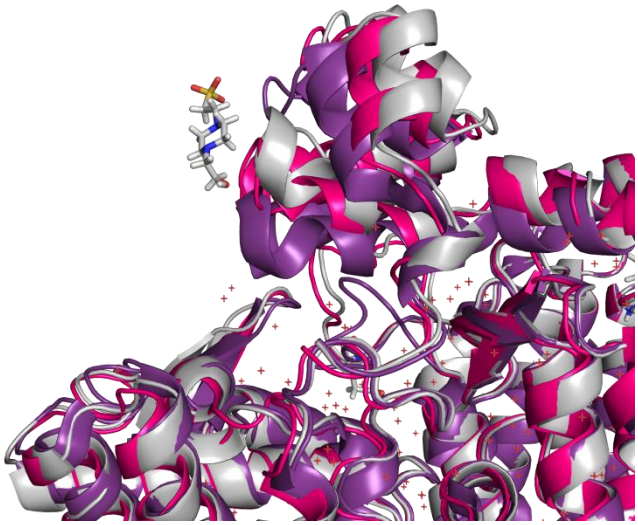

Figura 33. Representação em *cartoon* da *Hs*FH e do mutante Q185R*Hs*FH. Em cinza a estrutura 5UPP com a molécula de HEPES, em roxo 3E04 e em rosa o mutante Q185R*Hs*FH**.** Átomos de C, N, O e S estão representados em branco, azul, vermelho e amarelo, respectivamente.

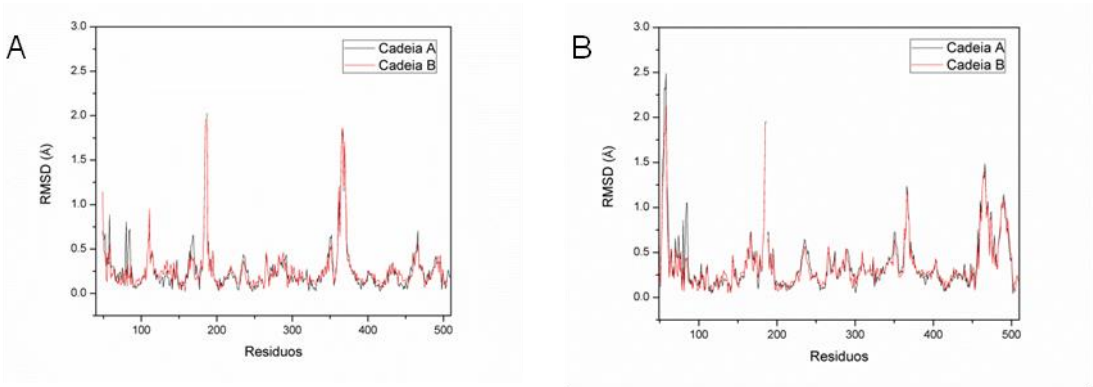

Figura 34. RMSD por resíduo entre o mutante Q185R*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP

A substituição da Arg 185 no lugar da Gln induziu uma mudança conformacional na cadeia, ou seja, as cadeias laterais da Ser 184, Arg 185 e Ser 186 se encontram na direção oposta do que se observa para a nativa (Figura 35). Por serem resíduos próximos à entrada da cavidade do sítio ativo a presença da Arg 185 interfere no acesso dos substratos aos resíduos catalíticos, podendo assim afetar a atividade enzimática.

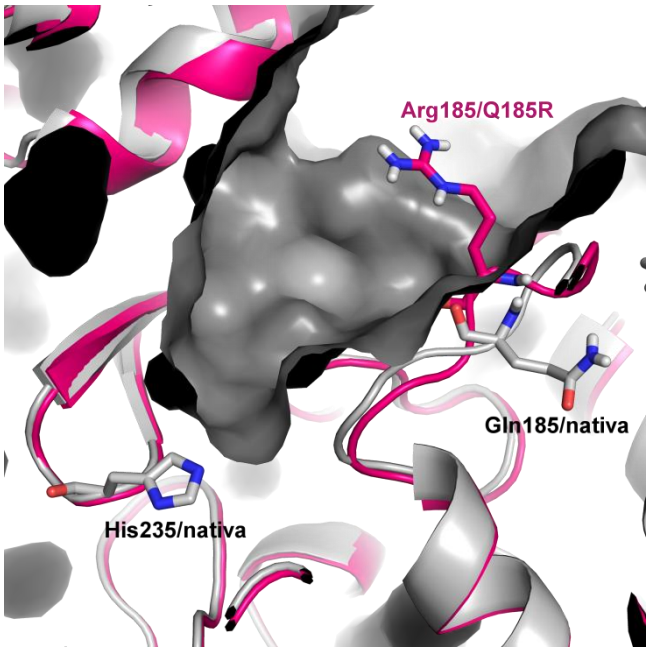

Figura 35. Alinhamento das estruturas das enzimas *Hs*FH (5UPP) representada em cinza e Q185R*Hs*FH, representada em rosa. Estão destacados o resíduo catalítico His 235, e os resíduos 185. A superfície da proteína nativa está representada em cinza escuro.

4.2.5.4 K230R*Hs*FH

A estrutura do mutante K230R*Hs*FH foi obtida no grupo espacial C 2 e possui quatro monômeros na unidade assimétrica, que estão arranjados na forma de dois dímeros distintos, e não o tetrâmero funcional. Este só é formado após a aplicação de operações de simetria cristalográfica. Na figura 36 é possível observar a unidade assimétrica em azul claro e os tetrâmeros formados pelos simétricos representados em cor mais escura.

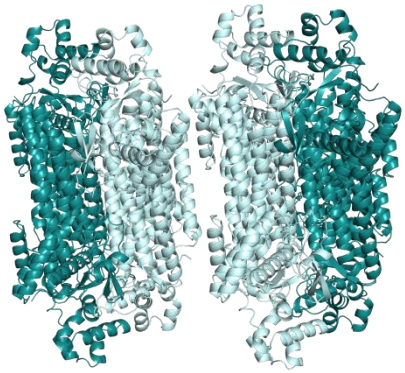

Figura 36. Representação em cartoon da estrutura do mutante K230R*Hs*FH. Em azul claro estão representados os monômeros que compõe a unidade assimétrica e em escura estão as moléculas geradas por um eixo de rotação de ordem 2 e que formam os tetrâmeros funcionais.

A análise do mapa de densidade eletrônica confirma a presença da arginina na posição 230, conforme mostrado na figura 37, em todos os monômeros. Ao ser comparada com a estrutura da proteína nativa, não há mudanças significativas na estrutura global da proteína, porém é possível observar uma mudança de conformação no resíduo Gln 185 que se apresenta voltado para o sítio ativo, como no mutante Q185R*Hs*FH (Figura 38). Os gráficos representando os valores de RMSD para o mutante em comparação com a *Hs*FH nativa (5UPP) encontram-se na figura 39.

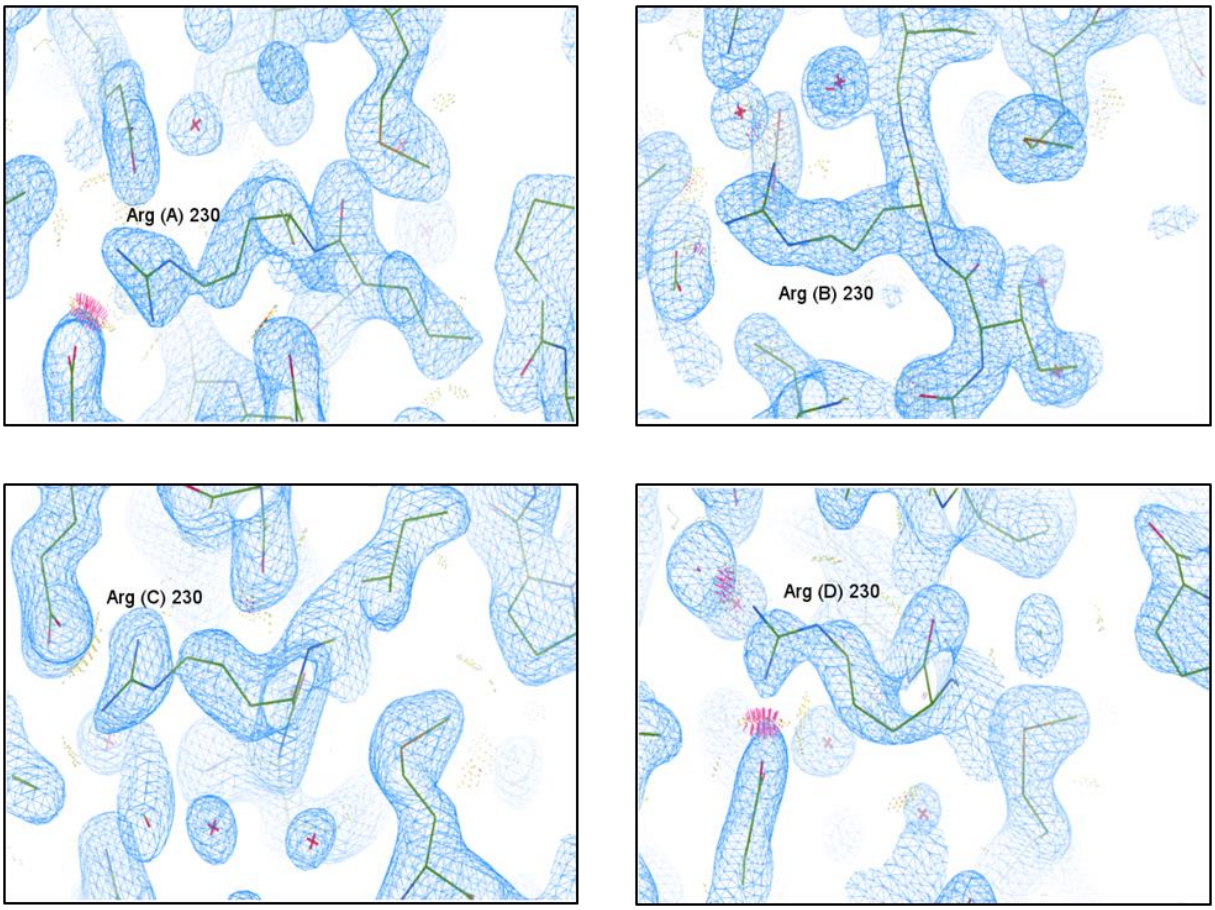

Figura 37. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,0 para cadeia A (superior esquerda), 1,6 para cadeia B (superior direita) e 1,1 para as cadeias C e D (inferior esquerda e direita, respectivamente); representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo arginina 230.

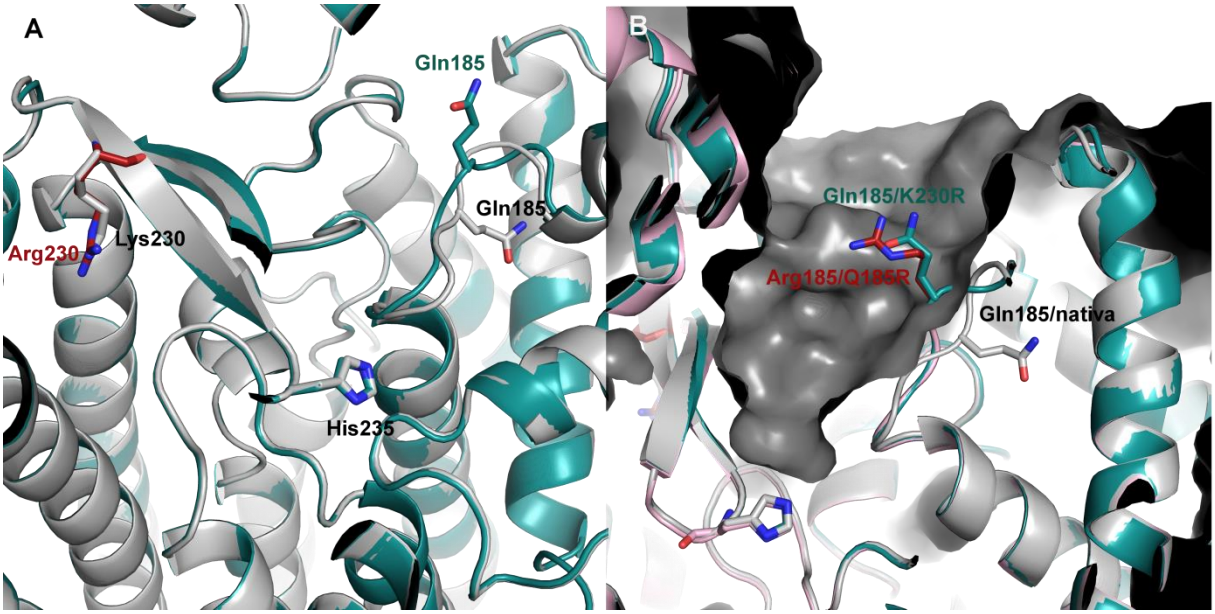

Figura 38. Representação em *cartoon* da estrutura da proteína K230R*Hs*FH. A) Sobreposição da estrutura da enzima *Hs*FH nativa em cinza e do mutante K230R*Hs*FH em verde escuro. Em destaque em vermelho o resíduo Arg 230 e os resíduos Gln 185 e His 235. B) Sobreposição das estruturas das proteínas *Hs*FH nativa em cinza, do mutante K230R*Hs*FH em verde escuro e do mutante Q185R*Hs*FH em rosa. Estão destacados os resíduos 185, em vermelho para Q185R*Hs*FH, em verde escuro para K230R*Hs*FH e em cinza para *Hs*FH nativa.

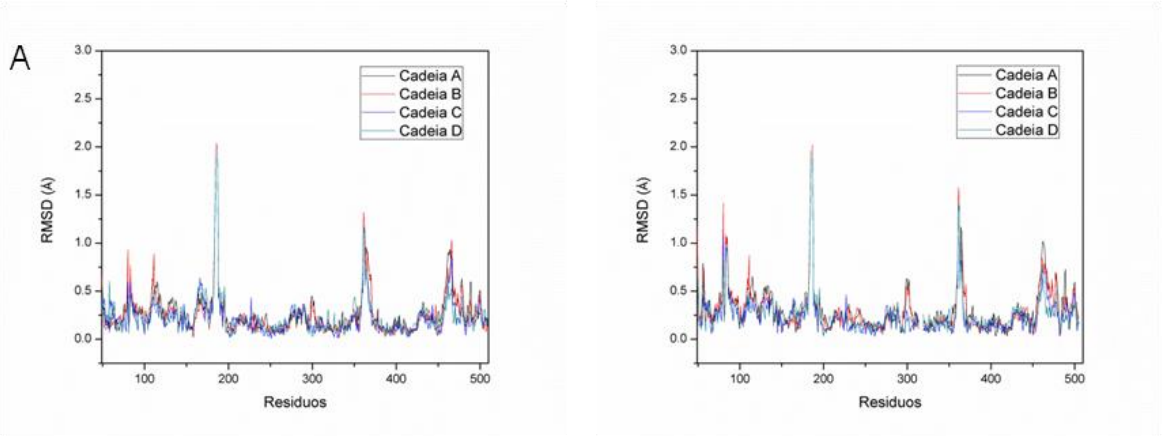

Figura 39. RMSD por resíduo entre o mutante K230R*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A da proteína nativa em relação às cadeias A, B, C e D do mutante. B) Valores da cadeia B proteína nativa em relação às cadeias A, B, C e D do mutante.

4.2.5.5 E362Q*Hs*FH

Os dados estruturais para o mutante E362Q*Hs*FH indicam um dímero na unidade assimétrica e o tetrâmero formado por operações de simetria cristalográfica. A mutação foi confirmada pela análise do mapa de densidade eletrônica, como mostra a figura 40.

A figura 41 mostra a localização da mutação no início do SS-loop e próxima à histidina 235 catalítica [30, 36, 39, 47]. Embora não haja um consenso sobre o papel de cada resíduo na catálise, podemos afirmar que a presença do glutâmico 362 próximo à His 235 é essencial, uma vez que a proteína com a substituição do resíduo ácido glutâmico pelo resíduo glutamina não possui atividade.

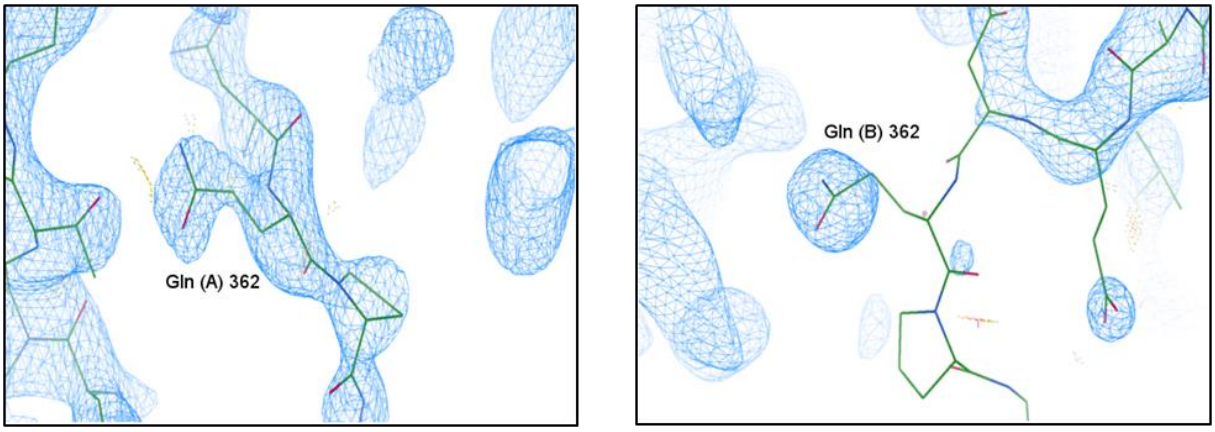

Figura 40. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,0; representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo glutamina 362 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita).

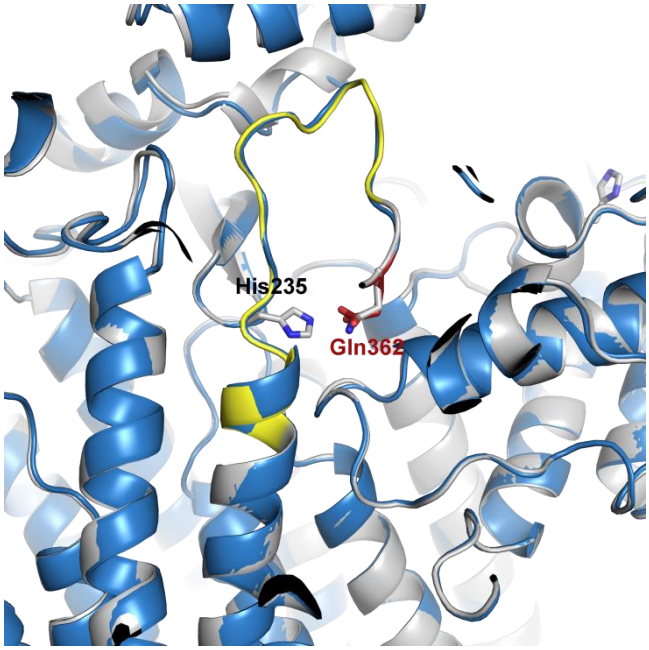

Figura 41. Sobreposição das estruturas das proteínas *Hs*FH nativa, em cinza, e E362Q*Hs*FH, em azul. Estão destacados os resíduos 362 da *Hs*FH nativa em cinza e E362Q*Hs*FH em vermelho. Em amarelo está a região do SS-loop.

Analisando globalmente a estrutura obtida, observam-se características de enovelamento semelhante à enzima nativa, como é mostrado pelos gráficos de RMSD da figura 42.

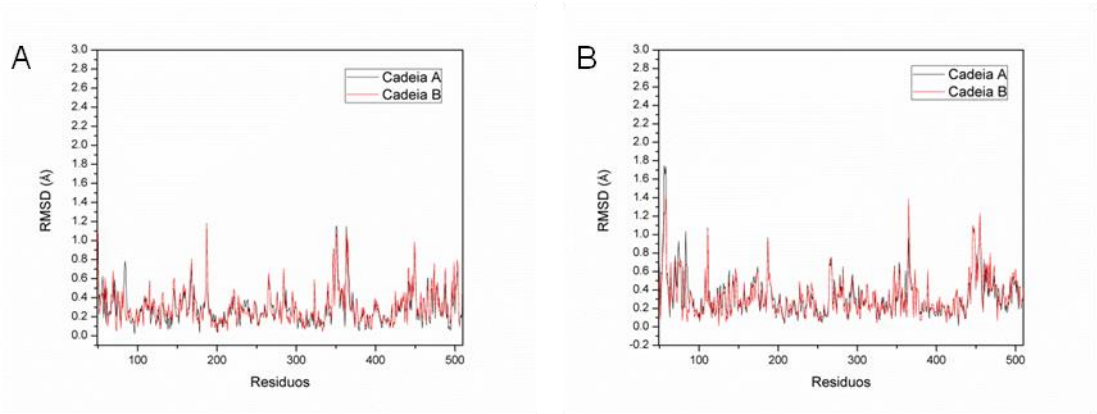

Figura 42. RMSD por resíduo entre o mutante E362Q*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP

4.2.5.6 S365G*Hs*FH

O empacotamento cristalino do mutante S362G*Hs*FH gerou um conjunto de dados que contém um tetrâmero funcional na unidade assimétrica. Nos dados obtidos não foi possível visualizar a mutação no mapa de densidade eletrônica. Por se tratar de uma região flexível não foi possível a construção do modelo baseado na densidade eletrônica para os resíduos 364-367.

Os dados de RMSD do mutante S362G*Hs*FH em comparação com a proteína nativa (5UPP) mostram diferenças conformacionais no domínio 3 (Figura 43). Uma análise da sobreposição dos dados para a proteína S362G*Hs*FH em relação às estruturas depositadas da enzima nativa (5UPP e 3E04) mostra que o domínio C-terminal (D3) encontra-se na conformação fechada, assim como 3E04, e diferente do encontrado para a nossa estrutura (5UPP) que está na conformação aberta (Figura 44). Não foram encontradas diferenças conformacionais nos sítios ativos da proteína.

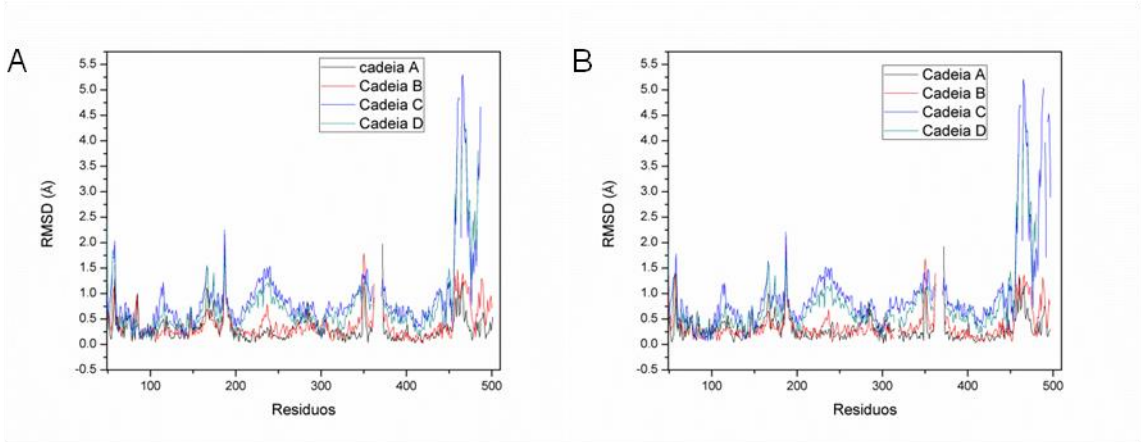

Figura 43. RMSD por resíduo entre o mutante S265G*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A da proteína nativa em relação às cadeias A, B, C e D do mutante. B) Valores da cadeia B proteína nativa em relação às cadeias A, B, C e D do mutante.

Figura 44. Sobreposição das estruturas das proteínas S365G*Hs*FH e *Hs*FH nativa (5UPP e 3E04). Em cinza está representada a cadeia B de 5UPP, em verde cadeia C do mutante S365G*Hs*FH e em roxo cadeia C da 3E04. Representação em *cartoon putty***.** Átomos de C, N, O e S estão representados em branco, azul, vermelho e amarelo, respectivamente.

4.2.5.7 N373D*Hs*FH

Através do mapa de densidade eletrônica foi confirmada a mutação no resíduo 373, como mostra a figura 45.

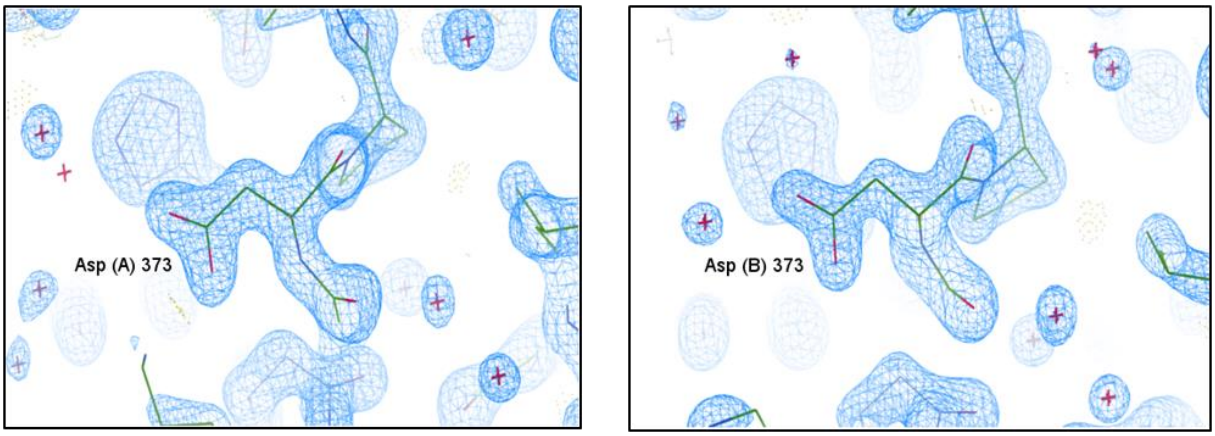

Figura 45. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 2,0; representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo ácido aspártico 373 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita).

Uma análise global da estrutura não apresenta diferenças em relação à proteína nativa, sendo que o RMSD entre elas apresenta os menores valores entre os mutantes (Figura 46). O resíduo 373 se localiza no SS-loop e é considerado importante no mecanismo de catálise da enzima. A sobreposição do mutante com enzima nativa (5UPP) mostra que não há mudanças conformacionais na região do sítio ativo e que o Asp 373 se localiza exatamente na posição da Asn 373 na nativa (Figura 45). Entretanto é possível afirmar que a carga do resíduo 373 é importante para o mecanismo catalítico.

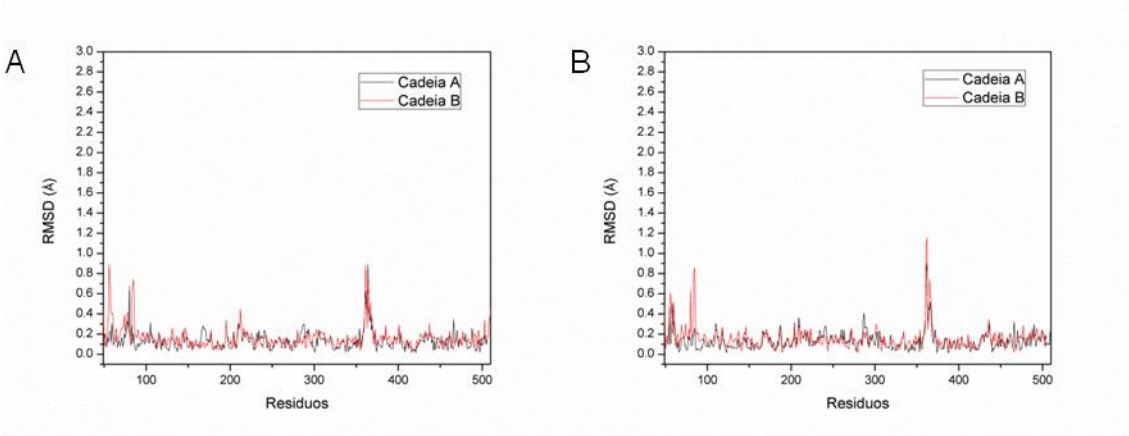

Figura 46. RMSD por resíduo entre o mutante N373D*Hs*FH e a proteína nativa (5UPP). A) Valores da cadeia A do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP. B) Valores da cadeia B do mutante em relação às cadeias A e B de 5UPP

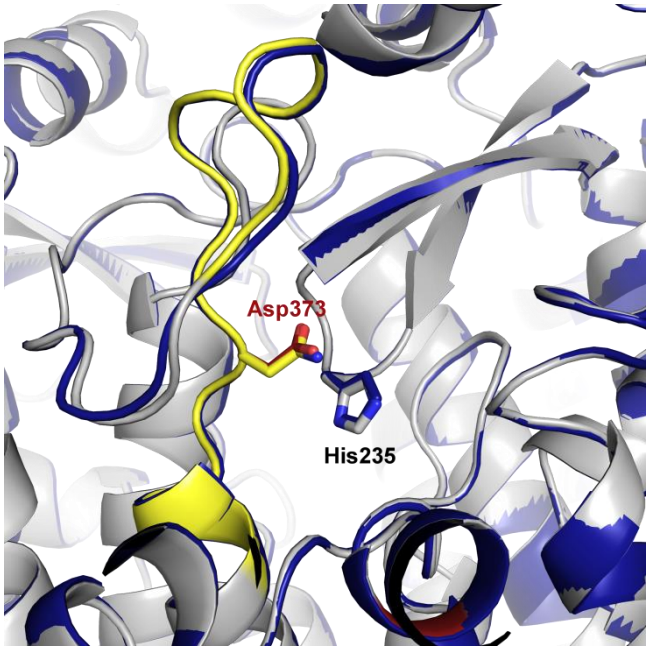

Figura 47. Alinhamento das estruturas das enzimas *Hs*FH nativa (5UPP) representada em cinza e N373D*Hs*FH, representada em azul escuro. O SS-loop está destacado em amarelo. O resíduo Asp 373 está em vermelho.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

APÊNDICES

7. APÊNDICES

Apêndice A. Resultados de ΔT_m para *Hs*FH e os mutantes N107*Hs*FH, H180R*Hs*FH, Q185R*Hs*FH, K230R*Hs*FH, E362Q*Hs*FH, S365G*Hs*FH e N373D*Hs*FH com o kit *Solubility & Stability*. Descrição dos compostos do kit *Solubility and Stability screen* (Hampton Research) utilizados no experimento de fluorimetria diferencial com os respectivos ΔT_m (°C).

		Categoria	Descrição do composto	ΔT_m (°C)							
				Nativa	**N107T**	**H180R**	**Q185R**	**K230R**	**E362Q**	**S365G**	**N373D**
1	REF	Controle em água	Referência	0	0	0	0	0	0	0	0
2	A2	Controle precipitante	15% v/v Ácido Tricloacético	-	-	-	-	-	-	-	-
3	A3	Aminoácido/Derivado	125 mM L-Arginina	-6.12	0.37	4.03	-2.75	-7.14	-4.18	-4.45	-4.45
4	A4	Aminoácido/Derivado	125 mM L-Arginina/125 mM Ácido L-Glutâmico	1.28	6.9	8.77	3.07	1.3	0.92	1.22	1.22
5	A5	Aminoácido/Derivado	250 mM Glicina	2.83	7.06	8.25	1.74	1.78	1.91	1.74	1.74
6	A6	Aminoácido/Derivado	250 mM L-Prolina	1.17	2.79	7.38	1.08	1.06	1.31	1.87	1.87
7	A7	Aminoácido/Derivado	60 mM L-Histidina	0.49	1.85	6.27	0.32	0.41	0.62	0.12	0.12
8	A8	Aminoácido/Derivado	250 mM β-Alanina	2.04	2.76	6.64	1.13	2.24	2.4	2.03	2.03
9	A9	Aminoácido/Derivado	250 mM L-Serina	1.69	-*	-*	-*	1.96	-*	-*	-*
10	A10	Aminoácido/Derivado	250 mM Éster etílico de L-Arginina	-15.14	-11.03	-5.79	-10.97	-19.18	-20.18	-16.49	-16.49
11	A11	Aminoácido/Derivado	250 mM Diidrocloreto de L-Argininamida	-9.04	-4.88	0.93	-1.46	-10.27	-10.01	-10.81	-10.81
12	A12	Aminoácido/Derivado	250 mM Ácido 6-Aminohexanóico	1.35	2.16	7.14	2.05	1.34	1.73	1.68	1.68
13	B1	Peptídeo	250 mM Gly-gly	1.12	4.15	8.92	2.22	1.06	-0.39	0.47	0.47
14	B2	Peptídeo	100 mM Gly-gly-gly	0.3	3.44	6.51	2.29	-0.5	-0.23	-0.38	-0.38
15	B3	Peptídeo	2.5 % m/v mM Triptona	-0.42	4.82	8.61	2.8	-1.76	-0.91	-0.58	-0.58
16	B4	Osmólito	1250 mM Betaína monoidratada	5.17	7.33	12.14	5.17	8.45	7.86	8.58	8.58
17	B5	Osmólito	375 mM D-(+)-Trehalose diydratado	3.16	4.59	9.52	4	3.97	3.62	4.63	4.63
18	B6	Osmólito	1000 mM Xilitol	4.35	6.53	12.29	5.42	5	4.89	2.78	2.78
19	B7	Osmólito	1000 mM D-Sorbitol	5.55	6.51	11.74	5.9	6.27	5.84	5.54	5.54
20	B8	Osmólito	1000 mM Sucrose	5.35	8.66	12.43	6.93	5.82	7.44	6.53	6.53

21	B9	Osmólito	250 mM Hidroxiectoina	1.55	-*	-*	-*	1.97	-*	-*	-*
22	B10	Osmólito	1250 mM Trimetilamina N-oxido diidratado	8.98	8.41	13.49	6.07	8.29	7.86	7.78	7.78
23	B11	Osmólito	1000 mM Metil-α-D-glucopiranosidio	4.66	7.99	12.19	6.02	5.23	4.94	3.63	3.63
24	B12	Osmólito	5% v/v Trietilenoglicol	-0.39	1.75	6.58	1.82	0.18	0.05	-0.11	-0.11
25	C1	Poliamina	250 mM Tetrahidrocloreto de espermina	0.65	3.96	8.59	6.21	-0.43	-0.15	-0.89	-0.89
26	C2	Poliamina	250 mM Espermidina	-20.4	-5.51	2.52	-3.19	-20.75	-9.95	-10.55	-10.55
27	C3	*Linker*	250 mM Ácido 5-Amino valérico	0.88	2.42	6.06	1.49	1.66	1.66	1.52	1.52
28	C4	*Linker*	250 mM Ácido Glutárico	-	-	-	-	-	-23.06	-4.3	-4.3
29	C5	*Linker*	40 mM Ácid Adípico	-	-	-	-	-	-	-8.94	-8.94
30	C6	*Linker*	250 mM Diidrocloredo de Etilenodiamina	-7.47	-1.36	2.22	-1.72	-8.53	-8.42	-14.75	-14.75
31	C7	Caotrópio	250 mM Hidrocloreto de Guanidina	-5.18	-2.43	1.56	-3.44	-6.03	-4.56	-4.55	-4.55
32	C8	Caotrópio	250 mM Ureia	-1.24	1.04	4.33	-0.2	-1.6	-0.88	-1.59	-1.59
33	C9	Caotrópio	250 mM N-Metilureia	-1.89	-*	-*	-*	-2.84	-*	-*	-*
34	C10	Caotrópio	100 mM N-Etilureia	-1.21	0.4	4.79	-0.72	-2.03	-0.61	-1.68	-1.68
35	C11	Caotrópico	15% m/v N-Metilformamida	-16.44	-4.36	0.67	-5.05	-12.49	-12.31	-11.67	-11.67
36	C12	Caotrópio	1.5% m/v Hipotaurina	0.77	2.88	6.83	3.67	0.39	0.34	-0.27	-0.27
37	D1	Agente Redutor	75 mM TCEP hidrocloreto	-	-	-	-	-	-	-	-
38	D2	Agente Redutor	10 mM GSH (L-Glutationa reduzida)/10 mM GSSG (L-Glutationa oxidada)	-	-12.16	-	-	-	-	-24.38	-24.38
39	D3	Inibidor	2.5% m/v Hidrocloreto de Benzamidina	-9.35	-9.06	-3.73	-8.88	-8.9	-8.58	-11.08	-11.08
40	D4	Quelante	25 mM Ácido etilenodiamino tetra-acético	1.64	5.77	4.21	1.81	-7.75	-1.61	-2.67	-2.67
41	D5	Metal	50 mM Cloreto de magnésio heptaidratado/50 mM Cloreto de cálcio diifratado	-3.35	-0.76	3.18	-0.8	-3.45	-2.25	-11.76	-11.76
42	D6	Metal	50 mM Cloreto de Cádmio hidratado/50 mM Cloreto de Cobalto (II) hexaidratado	-9.56	0.67	-	-	-7.59	-	-2.91	-2.91
43	D7	Não Detergente	500 mM Sulfobetaína Não Detergente 195 (NDSB-195)	2.91	4.04	8.86	2.71	3.4	3.3	3.41	3.41
44	D8	Não Detergente	500 mM Sulfobetaína Não Detergente 201 (NDSB-201)	-3.17	3.74	6.48	1.93	-10.92	-2.58	-3.54	-3.54
45	D9	Não Detergente	500 mM Sulfobetaína Não Detergente 211 (NDSB-211)	2.66	-*	-*	-*	3.68	-*	-*	-*
46	D10	Não Detergente	500 mM Sulfobetaína Não Detergente 221 (NDSB-221)	0.65	4.07	9.48	2.85	0.98	1.35	1.39	1.39

47	D11	Não Detergente	400 mM Sulfobetaína Não Detergente 256 (NDSB-256)	-3.25	2.67	6.72	1.04	-3.88	-3.61	-3.14	-3.14
48	D12	Ácido Orgânico	250 mM Taurina	0.99	4.63	6.85	3.11	1.83	1.17	0.93	0.93
49	E1	Ácido Orgânico	250 mM Acetamida	-1.25	0.8	5.04	-0.03	-1.47	-0.31	-1.27	-1.27
50	E2	Ácido Orgânico	250 mM Ácido oxálico diidratado	-	-	-	-	-	-	-7.8	-7.8
51	E3	Ácido Orgânico	250 mM Malonato de sódio pH 7.0	4.04	5.45	9.06	3.28	4.61	3.33	4.01	4.01
52	E4	Ácido Orgânico	250 mM Ácido Succínico pH 7.0	5.83	10.1	10.94	5.61	4.67	4.22	4.51	4.51
53	E5	Ácido Orgânico	2.5% v/v Tacsimato pH 7.0	2.08	5.58	8.16	2.51	1.03	0.98	-5.65	-5.65
54	E6	Líquido Iônico	12.5% m/v Brometo de Tetraetilamonio	-4.82	-0.22	6	1.01	-5.97	-4.6	1.44	1.44
55	E7	Líquido Iônico	12.5% m/v Acetato de colina	4.72	7.03	13.38	9.01	4.72	4.82	5.11	5.11
56	E8	Líquido Iônico	12.5% m/v Acetato de 1-Etil-3-metilimidazolio	1.08	5.47	10.4	6.44	-0.55	0.14	0.3	0.3
57	E9	Líquido Iônico	12.5% m/v Cloreto de 1-Butil-3-metilimidazolio	-8.94	-*	-*	-*	-10.8	-*	-*	*-
58	E10	Líquido Iônico	12.5% m/v Nitrato de Etilamônio	-9.57	-6.13	1.63	-2.67	-12.46	-11.77	-11.22	-11.22
59	E11	Sal	250 mM Sulfato de amônio	3.09	7.18	8.9	5.23	2.46	2.78	3.43	3.43
60	E12	Sal	250 mM Cloreto de amônio	-0.55	2.86	7.49	3.33	-0.25	0.03	-0.12	-0.12
61	F1	Sal	250 mM Sulfato de magnésio hidratado	-0.27	1.91	7.13	1.74	0.72	0.63	0.88	0.88
62	F2	Sal	250 mM Tiocianato de potássio	-5.62	1.26	6.39	2.31	-6.48	-5.5	-7.11	-7.11
63	F3	Sal	25 mM Cloreto de Gadolínio (III) hexaidratado	-13.77	-13.51	-12.17	-5.31	-9.32	-14.37	-11.31	-11.31
64	F4	Sal	125 mM Cloreto de césio	-0.24	1.92	6.98	1.97	0.01	0.36	0.09	0.09
65	F5	Sal	125 mM Ácido 4-Aminobutírico (GABA)	0.95	1.79	6.09	0.7	1.2	0.91	-1.9	-1.9
66	F6	Sal	250 mM Nitrato de lítio	-3.34	0.64	6.13	2.26	-3.58	-2.49	1.28	1.28
67	F7	Sal	250 mM Ácido DL-Málico pH 7.0	8.55	10.76	12.27	5.19	4.03	4.18	4.68	4.68
68	F8	Sal	250 mM Citrato de Lítio tribásico tetraidratado	3	4.32	7.1	2.68	4.26	2.95	3.22	3.22
69	F9	Sal	125 mM Acetato de amônio	0.43	-*	-*	-*	0.42	-*	-*	-*
70	F10	Sal	125 mM Benzeno sulfonato de sódio	-4.82	0.23	5.64	1.12	-6.8	-4	-4.58	-4.58
71	F11	Sal	125 mM p-Toluenosulfonato de Sódio	-8.57	-1.52	2.85	-0.55	-5.19	-7.73	-8.69	-8.69
72	F12	Sal	500 mM Cloreto de sódio	1.13	3.42	7.94	4.3	1.78	1.88	2.16	2.16
73	G1	Sal	700 mM Cloreto de potássio	1.79	2.74	8	4.43	2.59	2.59	2.46	2.46
74	G2	Sal	350 mM Fosfato de sódio monobásico	13.44	18.11	19.92	14.02	7.82	8.95	10.16	10.16

			monoidratado/650 mM Fosfato de potássio dibásico								
75	G3	Sal	500 mM Sulfato de sódio	6.92	5.33	11.1	5.12	6.47	3.59	6.3	6.3
76	G4	Sal	700 mM Cloreto de lítio	-1.7	1.85	6.11	1.23	-0.96	-0.83	-0.53	-0.53
77	G5	Sal	500 mM Brometo de sódio	-1.8	1.04	7.21	3.68	-1.28	-0.92	4.07	4.07
78	G6	Poliol e Sal	20% v/v Glicerol/200 mM Cloreto de Lítio	3.6	6.74	13.79	8.14	3.53	4.18	-1.2	-1.2
79	G7	Poliol	25% v/v Glicerol	5.54	7.11	14.7	7.36	5.7	5.91	5.82	5.82
80	G8	Poliol	5% v/v Etilenoglicol	0.09	2.22	6.45	0.75	-0.11	0.37	1.03	1.03
81	G9	Poliol	5% v/v Polietilenoglicol 200	0.08	-*	-*	-*	-0.03	-*	-*	-*
82	G10	Poliol	2.5% v/v Polietilenoglicol monometil éter 550	-0.53	1.43	6.15	0.29	0.01	-0.54	-0.56	-0.56
83	G11	Poliol	2.5% m/v Polietilenoglicol monometil éter 750	-0.43	3.18	5.71	3.2	-0.31	-0.42	-0.21	-0.21
84	G12	Poliol	25% v/v Formamida	-17.54	-10.47	-2.11	-13.36	-13.51	-	-20.34	-20.34
85	H1	Poliol	25% v/v Polipropilenoglicol P 400	-1.78	5.89	11.19	7.72	-3.15	-2.32	-6.46	-6.46
86	H2	Poliol	12.5% v/v Pentaeritritol etoxilado (15/4 EO/OH)	0.32	1.27	3.05	-0.22	0.16	0.62	0.51	0.51
87	H3	Poliol	5% m/v 1,2-Propanodiol	-1	1.32	2.45	0.37	-1.17	-0.95	-1.24	-1.24
88	H4	Polímero	1.5% m/v Polietilenoglicol monometil éter 1.900	0.15	1.65	5.66	-0.59	-0.07	0.24	0.2	0.2
89	H5	Polímero	1.5% m/v Polietilenoglico 3.350	0.23	0.58	3.64	-0.06	-0.1	0.14	0.52	0.52
90	H6	Polímero	1.5% m/v Polietilenoglicol 8.000	0.26	0.51	4.78	-0.64	-0.42	0.38	0.37	0.37
91	H7	Polímero	1% m/v Polivinilpirrolidona K15	-0.16	2.99	5.58	1.42	-0.37	0.02	-0.32	-0.32
92	H8	Ciclodextrina	50 mM 6-O-α-D-Maltosil-β-ciclodextrina	-	-	-	-	-	-	-	-
93	H9	Ciclodextrina	5 mM (2-Hidroxipropil)-β-ciclodextrina	-	-*	-*	-*	-	-*	-*	-*
94	H10	Ciclodextrina	40 mM α-Ciclodextrina	-	3.32	-	2.26	-	-	0.48	0.48
95	H11	Ciclodextrina	5 mM β-Ciclodextrina	-	-	-	1.92	-	-	-	-
96	H12	Ciclodextrina	25 mM Metil-β-ciclodextrina	-	-	-	-	-	-	-21.92	-21.92

* Experimentos não realizados.

Apêndice B. Resultados de ΔT_m para *Hs*FH e os mutantes N107*Hs*FH, H180R*Hs*FH, Q185R*Hs*FH, K230R*Hs*FH, E362Q*Hs*FH, S365G*Hs*FH e N373D*Hs*FH com o kit *Solubility & Stability* 2. Descrição dos compostos do kit *Solubility and Stability screen* (Hampton Research) utilizados no experimento de fluorimetria diferencial com os respectivos ΔT_m (°C).

		Tampão	Sal	ΔT_m (°C)							
				Nativa	**N107T**	**H180R**	**Q185R**	**K230R**	**E362Q**	**S365G**	**N373D**
1	REF	Referência	-	0	0	0	0	0	0	0	0
2	A2	50 mM Acetato de sódio triidratado pH 4.5	-	-22.42	-	-8.0	-10.98	-12.75	-21.8	-	-23.13
3	A3	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5.0	-	-	-6.3	-4.5	-10.14	-11.91	-15.6	-17.68	-17.21
4	A4	50 mM Ácido Succínico pH 5.5	-	3.8	0.8	-1.1	-0.07	-1.84	-5.7	-6.63	-4.95
5	A5	50 mM MES monohidratado pH 6.0	-	-3.97	3.0	0.0	-0.27	-2.04	-4.9	-5.48	-4.89
6	A6	50 mM BIS-TRIS pH 6.5	-	-1.88	3.0	2.8	3.36	1.59	-2.7	-3.02	-2.78
7	A7	50 mM Imidazol pH 7.0	-	-1.6	1.8	-5.1	1.59	-0.18	-2.0	-2.62	-2.52
8	A8	50 mM HEPES pH 7.5	-	0.48	2.9	1.2	3.04	1.27	0.5	0.28	-0.13
9	A9	50 mM Tris pH 8.0	-	0.04	3.9	2.4	2.74	0.97	0.6	-0.27	-0.82
10	A10	50 mM BIS-TRIS Propano pH 8.5	-	-0.15	5.1	4.8	1	-0.77	0.7	-0.02	-0.85
11	A11	50 mM AMPD pH 9.0	-	-0.67	4.4	4.3	2.91	1.14	0.5	-0.44	-1.25
12	A12	50 mM Glicina pH 9.5	-	4.71	7.0	5.1	0.73	-1.04	0.5	0.03	-0.95
13	B1	50 mM Cloreto de Sódio	50 mM Cloreto de Sódio	0.39	2.2	1.6	4.21	2.44	0.9	0.38	-0.08
14	B2	50 mM Acetato de sódio triidratado pH 4.5	50 mM Cloreto de Sódio	-22.91	-14.2	-5.3	-6.8	-8.57	-22.2	-24.13	-24.56
15	B3	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5.0	50 mM Cloreto de Sódio	5.08	-6.7	-4.7	-9.69	-11.46	-14.4	-16.76	-15.04
16	B4	50 mM Ácido Succínico pH 5.5	50 mM Cloreto de Sódio	3.18	3.5	-1.1	1.19	-0.58	-4.4	-4.93	-4.66
17	B5	50 mM MES monohidratado pH 6.0	50 mM Cloreto de Sódio	-3.09	1.8	-0.3	0.39	-1.38	-4.7	-5.26	-4.6
18	B6	50 mM BIS-TRIS pH 6.5	50 mM Cloreto de Sódio	-1.46	4.4	1.8	4.97	3.20	-2.7	-2.58	-2.85
19	B7	50 mM Imidazol pH 7.0	50 mM Cloreto de Sódio	-1.18	3.2	-1.3	3.35	1.58	-1.6	-2	-2.43
20	B8	50 mM HEPES pH 7.5	50 mM Cloreto de Sódio	0.6	4.4	4.6	5.95	4.18	0.9	0.56	-0.16
21	B9	50 mM Tris pH 8.0	50 mM Cloreto de Sódio	0.19	5.4	5.0	3.92	2.15	0.9	0.15	-0.62
22	B10	50 mM BIS-TRIS Propano pH 8.5	50 mM Cloreto de Sódio	-0.15	5.3	5.8	3.34	1.57	1.1	0.15	-0.77

23	B11	50 mM AMPD pH 9.0	50 mM Cloreto de Sódio	-0.74	5.7	5.4	1.83	0.06	0.8	0	-1.06
24	B12	50 mM Glicina pH 9.5	50 mM Cloreto de Sódio	4.02	8.1	5.4	1.52	-0.25	0.8	0.1	-1.02
25	C1	100 mM Cloreto de Sódio	100 mM Cloreto de Sódio	0.37	4.6	4.3	4.42	2.65	1.2	0.68	-0.14
26	C2	50 mM Acetato de sódio triidratado pH 4.5	100 mM Cloreto de Sódio	-22.9	-15.0	-6.6	-8.29	-10.06		-23.84	-17.48
27	C3	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5.0	100 mM Cloreto de Sódio	4.45	-4.7	-4.3	-6.53	-8.30	-12.8	-15.79	-13.46
28	C4	50 mM Ácido Succínico pH 5.5	100 mM Cloreto de Sódio	2.8	1.9	-0.7	1.71	-0.06	-4.4	-4.06	-4.6
29	C5	50 mM MES monohidratado pH 6.0	100 mM Cloreto de Sódio	-2.77	2.1	-0.5	1.17	-0.60	-4.9	-4.67	-4.84
30	C6	50 mM BIS-TRIS pH 6.5	100 mM Cloreto de Sódio	-1.1	4.1	3.0	4.96	3.19	-2.5	-2.41	-2.97
31	C7	50 mM Imidazol pH 7.0	100 mM Cloreto de Sódio	-0.93	4.5	1.7	3.63	1.86	-1.7	-1.76	-2.32
32	C8	50 mM HEPES pH 7.5	100 mM Cloreto de Sódio	0.72	6.0	5.5	6.62	4.85	1.0	0.48	-0.31
33	C9	50 mM Tris pH 8.0	100 mM Cloreto de Sódio	0.16	5.8	5.3	4.98	3.21	1.1	0.01	-0.66
34	C10	50 mM BIS-TRIS Propano pH 8.5	100 mM Cloreto de Sódio	-0.09	5.8	6.8	4	2.23	1.2	-0.04	-0.89
35	C11	50 mM AMPD pH 9.0	100 mM Cloreto de Sódio	-0.85	5.8	5.3	1.73	-0.04	0.8	-0.03	-1.08
36	C12	50 mM Glicina pH 9.5	100 mM Cloreto de Sódio	2.13	8.3	6.3	2.09	0.32	0.9	0.09	-0.9
37	D1	150 mM Cloreto de Sódio	150 mM Cloreto de Sódio	0.37	4.1	5.5	4.83	3.06	1.4	0.86	-0.16
38	D2	50 mM Acetato de sódio triidratado pH 4.5	150 mM Cloreto de Sódio	-21.94		-7.2	-9.64	-11.41	-19.6	-22.08	
39	D3	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5.0	150 mM Cloreto de Sódio	2.78	-7.5	-4.0	-5.93	-7.70	-11.5	-15.75	-11.23
40	D4	50 mM Ácido Succínico pH 5.5	150 mM Cloreto de Sódio	2.25	1.7	-0.2	3.54	1.77	-4.1	-4.14	-3.34
41	D5	50 mM MES monohidratado pH 6.0	150 mM Cloreto de Sódio	-2.49	1.9	0.4	1.65	-0.12	-4.9	-4.92	-4.77
42	D6	50 mM BIS-TRIS pH 6.5	150 mM Cloreto de Sódio	-0.79	6.5	4.6	4.99	3.22	-2.1	-2.22	-2.8
43	D7	50 mM Imidazol pH 7.0	150 mM Cloreto de Sódio	-0.82	5.2	3.5	3.47	1.70	-0.6	-1.43	-2.12
44	D8	50 mM HEPES pH 7.5	150 mM Cloreto de Sódio	0.7	6.1	6.9	7.38	5.61	1.1	0.84	-0.18
45	D9	50 mM Tris pH 8.0	150 mM Cloreto de Sódio	0.22	5.8	7.0	5.2	3.43	1.2	0.61	-0.67
46	D10	50 mM BIS-TRIS Propano pH 8.5	150 mM Cloreto de Sódio	-0.01	5.9	7.6	4.14	2.37	1.3	0.46	-0.87
47	D11	50 mM AMPD pH 9.0	150 mM Cloreto de Sódio	-0.62	6.5	6.1	2.58	0.81	1.0	0.31	-0.87
48	D12	50 mM Glicina pH 9.5	150 mM Cloreto de Sódio	1.18	8.7	6.8	1.51	-0.26	1.1	0.5	-0.73
49	E1	200 mM Cloreto de Sódio	200 mM Cloreto de Sódio	0.37	4.6	6.3	5.22	3.45	1.6	1.07	-0.03
50	E2	50 mM Acetato de sódio triidratado pH 4.5	200 mM Cloreto de Sódio	-22.4	-10.1	-6.9	-7.1	-8.87	-8.3	-23.71	

51	E3	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5.0	200 mM Cloreto de Sódio	-0.04	-7.4	-4.2	-4.76	-6.53	-10.8	-14.03	-11.22
52	E4	50 mM Ácido Succínico pH 5.5	200 mM Cloreto de Sódio	2.04	1.9	1.5	4.35	2.58	-3.6	-3.47	-3.7
53	E5	50 mM MES monohidratado pH 6.0	200 mM Cloreto de Sódio	-2.61	2.0	2.0	2.49	0.72	-4.8	-4.9	-4.88
54	E6	50 mM BIS-TRIS pH 6.5	200 mM Cloreto de Sódio	-0.65	4.6	5.8	5.25	3.48	-2.0	-2.14	-2.67
55	E7	50 mM Imidazol pH 7.0	200 mM Cloreto de Sódio	-0.6	5.1	4.6	4.05	2.28	-1.0	-0.3	-1.95
56	E8	50 mM HEPES pH 7.5	200 mM Cloreto de Sódio	0.97	6.6	7.6	7.14	5.37	1.1	1.13	-0.26
57	E9	50 mM Tris pH 8.0	200 mM Cloreto de Sódio	0.28	6.2	8.0	6.05	4.28	1.2	0.44	-0.55
58	E10	50 mM BIS-TRIS Propano pH 8.5	200 mM Cloreto de Sódio	0.27	5.9	7.9	4.78	3.01	1.5	0.58	-0.66
59	E11	50 mM AMPD pH 9.0	200 mM Cloreto de Sódio	-0.67	4.8	6.2	3.6	1.83	0.8	0.05	-1.17
60	E12	50 mM Glicina pH 9.5	200 mM Cloreto de Sódio	2.48	8.3	7.1	1.87	0.10	1.3	0.66	-0.6
61	F1	250 mM Cloreto de Sódio	250 mM Cloreto de Sódio	0.36	4.7	6.3	5.91	4.14	1.7	1.07	0.01
62	F2	50 mM Acetato de sódio triidratado pH 4.5	250 mM Cloreto de Sódio	-22.69		-6.3	-7.05	-8.82	-20.4	0.16	-9.86
63	F3	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5.0	250 mM Cloreto de Sódio	0.18	-4.3	-4.0	-4.03	-5.80	-9.9	-12.97	-9.72
64	F4	50 mM Ácido Succínico pH 5.5	250 mM Cloreto de Sódio	1.85	1.4	0.9	3.59	1.82	-3.2	-1.81	-3.55
65	F5	50 mM MES monohidratado pH 6.0	250 mM Cloreto de Sódio	-2.6	1.8	2.8	2.06	0.29	-4.6	-4.63	-4.79
66	F6	50 mM BIS-TRIS pH 6.5	250 mM Cloreto de Sódio	-0.37	4.9	5.9	5.36	3.59	-1.9	-1.77	-2.62
67	F7	50 mM Imidazol pH 7.0	250 mM Cloreto de Sódio	-0.32	5.9	5.2	4.87	3.10	-1.0	-0.98	-2.11
68	F8	50 mM HEPES pH 7.5	250 mM Cloreto de Sódio	1.23	7.2	8.0	7.7	5.93	1.2	1.22	-0.12
69	F9	50 mM Tris pH 8.0	250 mM Cloreto de Sódio	0.44	6.3	8.4	6.06	4.29	1.5	0.76	-0.55
70	F10	50 mM BIS-TRIS Propano pH 8.5	250 mM Cloreto de Sódio	0.4	6.4	8.4	5.28	3.51	1.3	0.71	-0.7
71	F11	50 mM AMPD pH 9.0	250 mM Cloreto de Sódio	-0.31	4.7	6.8	2.96	1.19	1.2	0.46	-0.97
72	F12	50 mM Glicina pH 9.5	250 mM Cloreto de Sódio	2.6	8.4	6.9	2.11	0.34	1.2	0.77	-0.71
73	G1	500 mM Cloreto de Sódio	500 mM Cloreto de Sódio	0.9	4.6	7.2	6.63	4.86	2.5	2.17	0.54
74	G2	50 mM Acetato de sódio triidratado pH 4.5	500 mM Cloreto de Sódio	-	-4.3	-3.9	-7.18	-8.95	-18.6		-16.12
75	G3	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5.0	500 mM Cloreto de Sódio	-1.76		-2.1	-2.04	-3.81	-5.4	-8.21	-5.83
76	G4	50 mM Ácido Succínico pH 5.5	500 mM Cloreto de Sódio	2.24	1.4	2.9	6.37	4.60	-1.2	-1.31	-1.46
77	G5	50 mM MES monohidratado pH 6.0	500 mM Cloreto de Sódio	-2.86	0.1	2.2	3.71	1.94	-4.1	-5.12	-4.72
78	G6	50 mM BIS-TRIS pH 6.5	500 mM Cloreto de Sódio	0.38	5.3	7.4	6.36	4.59	-0.6	-0.87	-1.97

79	G7	50 mM Imidazol pH 7.0	500 mM Cloreto de Sódio	0.7	5.7	7.3	6.72	4.95	0.3	0	-1.29
80	G8	50 mM HEPES pH 7.5	500 mM Cloreto de Sódio	2.18	8.4	9.5	9.1	7.33	2.1	2.15	0.41
81	G9	50 mM Tris pH 8.0	500 mM Cloreto de Sódio	1.54	7.0	9.5	7.39	5.62	1.9	1.77	0.05
82	G10	50 mM BIS-TRIS Propano pH 8.5	500 mM Cloreto de Sódio	1.26	6.7	8.2	5.92	4.15	2.4	1.51	0.06
83	G11	50 mM AMPD pH 9.0	500 mM Cloreto de Sódio	0.61	7.0	8.1	4.01	2.24	2.3	1.9	-0.29
84	G12	50 mM Glicina pH 9.5	500 mM Cloreto de Sódio	2.7	8.9	7.8	2.74	0.97	2.3	1.91	0.12
85	H1	1000 mM Cloreto de Sódio	1000 mM Cloreto de Sódio	3.93	5.7	9.5	7.46	5.69	4.6	4.11	2.72
86	H2	50 mM Acetato de sódio triidratado pH 4.5	1000 mM Cloreto de Sódio	-28.85		-2.7	-3.73	-5.50	-14.6	-5.29	1.47
87	H3	50 mM Citrato de Sódio tribásico diidratado pH 5.0	1000 mM Cloreto de Sódio	0.47		3.9	8.72	6.95	-0.5	-4.07	-1.95
88	H4	50 mM Ácido Succínico pH 5.5	1000 mM Cloreto de Sódio	3.33	2.3	5.8	9.15	7.38	1.6	4.28	0.24
89	H5	50 mM MES monohidratado pH 6.0	1000 mM Cloreto de Sódio	-3.34	-3.7	4.1	3.87	2.10	-4.0	-1.41	-4.61
90	H6	50 mM BIS-TRIS pH 6.5	1000 mM Cloreto de Sódio	3.13	5.8	8.3	8.03	6.26	1.7	1.36	-0.45
91	H7	50 mM Imidazol pH 7.0	1000 mM Cloreto de Sódio	2.52	8.0	8.8	7.98	6.21	2.5	2	0.29
92	H8	50 mM HEPES pH 7.5	1000 mM Cloreto de Sódio	5.19	8.3	10.8	10.38	8.61	4.1	5.02	1.73
93	H9	50 mM Tris pH 8.0	1000 mM Cloreto de Sódio	4.31	7.4	10.3	8.37	6.60	4.1	3.99	1.85
94	H10	50 mM BIS-TRIS Propano pH 8.5	1000 mM Cloreto de Sódio	3.5	7.3	9.8	7.32	5.55	4.2	3.73	1.72
95	H11	50 mM AMPD pH 9.0	1000 mM Cloreto de Sódio	3.43	10.2	8.9	5.86	4.09	4.3	3.82	1.02
96	H12	50 mM Glicina pH 9.5	1000 mM Cloreto de Sódio	4.41	9.6	9.0	4.58	2.81	4.5	4.32	1.37