

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ESTUDOS ESTRUTURAIS DA ENZIMA
FOSFORRIBOSILPIROFOSFATO SINTASE
DE CANA-DE-AÇÚCAR

Hamilton Barbosa Napolitano

Tese apresentada ao Instituto de
Física de São Carlos, da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor em Ciências na área de
concentração: Física Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva

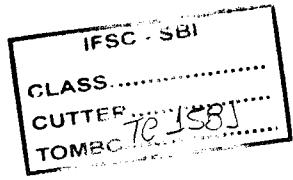
USP/IFSC/SBI

São Carlos - SP
2004



8-2-001581

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO



Napolitano, Hamilton Barbosa

“Estudos estruturais da enzima fosforribosilpirofosfato sintase de cana-de-açúcar”

Hamilton Barbosa Napolitano – São Carlos, 2004.

Tese (Doutorado) – Área de Física Aplicada da Universidade de São Paulo,
2004 - Páginas: 97

Orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva.

I. Cristalografia de macromoléculas.

I. Título



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE HAMILTON
BARBOSA NAPOLITANO APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS,
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 15-04-2004.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Glaucius Oliva (Orientador e Presidente) – IFSC/USP

Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro – UNESP

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva – UFSCar

Dra. Beatriz Gomes Guimarães – LNLS

Prof. Dr. Eduardo Ernesto Castellano – IFSC/USP

O importante não é o que foi feito do homem, mas o que ele fez daquilo que fizeram dele. O que foi feito dele são as estruturas, os conjuntos significantes estudados pelas ciências humanas. O que ele faz é a própria história, a superação real dessas estruturas numa práxis totalizadora.

SARTRE

ii

IFSC - UFSM - SERVICO DE BIBLIOTECA
PROFESSOR VAGNER

AGRADECIMENTOS

- À Deus por me sustentar ao longo desse período.
- À minha esposa Helena Cristina Napolitano pelo companheirismo e amor. Através de sua influência comprehendi o valor da família.
- Ao Prof. Glaucius Oliva pela orientação, constante apoio e amizade. Ao Prof. Otávio Thiemann pela sugestão do tema e orientação na parte biológica. Sou grato ainda pela oportunidade de ingressar-me no programa de pós-graduação do IFSC e de desenvolver o trabalho descrito na presente tese.
- Aos Profs. Eduardo Castellano e Javier Ellena pelas proveitosas discussões sobre cristalografia básica e ensinamentos concernentes à cristalografia de pequenas moléculas. Aprendi que durante o doutoramento a formação é mais importante que os resultados, ainda que ambos sejam necessários.
- À Profa. Yvonne Mascarenhas pelo incentivo na escrita de textos voltados ao Ensino de Cristalografia. Na minha compreensão essa atividade é um dever social dos pesquisadores uma vez que o conhecimento não é um direito apenas do indivíduo, mas sobretudo da sociedade.
- Aos Profs. Carlito Lariucci e Ivo Vencato, da Universidade Federal de Goiás, pelo incentivo na minha formação como profissional cristalógrafo que, *estritamente* falando, começou cinco anos atrás. Fazer o doutorado não foi para mim apenas uma questão formal, mas trouxe profundas mudanças e aperfeiçoamento no ofício de pensar, constituidor da vida acadêmica.
- Aos colegas Hannes Fischer e Stefano Trapani pelo *con-viver* acadêmico e exercício do raciocínio lógico. Algumas discussões resultaram em trabalhos teóricos não previstos no plano original de trabalho. Percebi que uma boa pergunta é meio caminho andado para o saber e/ou o conhecimento.
- Ao colega Márcio Silva pelas discussões sobre biologia molecular e ainda pelas conversas sobre empregabilidade dos pós-graduados no atual contexto sócio-econômico de nosso país.
- Às colegas Elisandra Miranda e Susana Sculaccio pela ajuda nos laboratórios de Bioquímica e Biologia Molecular.
- Ao colega João Renato pela ajuda nos alinhamentos e modelagem molecular da enzima fosforribosilpirofosfato sintase de cana-de-açúcar.

- Ao IFSC pela oportunidade de desenvolver o trabalho descrito na presente tese. A qualidade do serviço público aqui prestado através da Biblioteca, do serviço de pós-graduação e ainda da secretaria do Grupo de Cristalografia, dentre outros, facilitou o desenvolvimento do presente trabalho.
- Aos demais professores, funcionários e colegas do Grupo de Cristalografia e Biologia Estrutural pela agradável convivência.

Esse trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 01/00296-0.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
SUMÁRIO	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv

1. Introdução.....	1
1.1 Generalidades sobre o doutorado em cristalografia	1
1.2 A cana-de-açúcar	2
1.3 O projeto SUCEST	5
1.4 A enzima fosforribosilpirofosfato sintase	6
1.5 Generalidades da cristalografia	9
1.6 Referência bibliográficas	10
2. Cristalização da enzima sPRS	12
2.1 Conceitos gerais.....	12
2.2 Resultados	14
2.3 Materiais e métodos	15
2.4 Referências bibliográficas	21
3. Coleta e processamento dos dados de difração	22
3.1 Difração dos raios X por monocrstais	22
3.2 Criocristalografia	29
3.3 Coleta dos dados pelo método de rotação do cristal.....	32
3.4 Processamento e redução dos dados	34
3.5 O problema da fase	37
3.5.1 Substituição Isomorfa e Dispersão Anômala.....	38
3.5.2 Métodos Diretos	39
3.6 Resultados da coleta e processamento de dados da sPRS	40

3.7 Referências bibliográficas	44
4. Caracterização inicial da sPRS.....	47
4.1 Análise estatística das intensidades e do número de Matthews	47
4.2 Avaliação do conteúdo de solvente	53
4.3 Resultados	59
4.4 Referências bibliográficas	61
5. Modelagem molecular e obtenção das fases cristalográficas.....	63
5.1 Alinhamento seqüencial	63
5.2 Predição da estrutura secundária e alinhamento estrutural	64
5.3 Modelagem molecular	66
5.4 Validação do modelo construído	69
5.5 Obtenção das fases cristalográficas.....	72
5.5.1 O método de Substituição Molecular	72
5.5.2 Etapas da Substituição Molecular.....	74
5.5.3 Os modelos utilizados	76
5.5.4 Análise dos resultados	77
5.6 Referências bibliográficas	83
6. Conclusões e perspectivas.....	86
6.1 A estrutura quaternária.....	86
6.2 O mecanismo catalítico	89
6.3 Perspectivas.....	94
6.4 Notas finais.....	95
6.5 Referências bibliográficas	96
Apêndice A.....	A1
Apêndice B.....	A8

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Fotos de um típico canavial no estado de São Paulo. (a) imagem ilustrando aspectos anatômicos da cana-de-açúcar; (b) imagem geral de um canavial no município de Sertãozinho.....	4
Figura 1.2 Reação da síntese do PRPP catalizada pela PRPP sintase (sPRS). Adaptada da referência (Berg <i>et al.</i> , 2002).....	8
Figura 2.1 (a) Ilustração esquemática do método da difusão de vapor pela gota suspensa; (b) Foto ilustrativa dos pratos de montagem experimental. Adaptado da Hampton Research Corp.....	13
Figura 2.2 (a) Foto ilustrando o melhor cristal obtido para a PRS de cana-de-açúcar. Condição de cristalização (2.2 M do Sulfato de Amônio com 5% de Isopropanol); (b) Imagem de difração por raios X do referido cristal.....	15
Figura 2.3 Gel de poliacrilamida ilustrando o resultado obtido na purificação da sPRS. Poço M: marcador de massa molecular; poço 1: extrato bruto; poço 2: pellet do processo de clarificação por centrifugação representando a perda de proteína em corpos de inclusão; poço 3: sobrenadante clarificado; poço 4: fração entre 35 e 40% do sulfato de amônio; poço 5: void no fracionamento na coluna Ni-NTA; poço 6: fração da lavagem da coluna; poço 7: fração eluída com 260 mM de imidazol; poço 8: enzima sPRS purificada na cromatografia de exclusão.....	18
Figura 3.1 Espalhamento decorrente de uma distribuição discreta de carga. As direções dos feixes de raios X incidentes e espalhadas estão representadas pelos vetores unitários s_0 e s , respectivamente. Os átomos a_1 e a_2 ilustram dois centros espalhadores da amostra.....	24
Figura 3.2 Dependência do vetor espalhamento S em relação à s e s_0 . O diagrama demonstra o espalhamento da onda incidente para um ângulo particular 2θ . Por definição, o vetor S indica a direção que satisfaz a condição de interferência construtiva para o feixe espalhado e seu módulo $ S $ é dado por $2\sin\theta/\lambda$. P representa o plano reticular e N é a normal a esse plano reticular.....	26

Figura 3.3 Representação esquemática (fora de escala) da equação de Bragg. θ é o ângulo entre o feixe de raios X incidente e o plano difrator hkl . A diferença de caminho entre as duas ondas espalhadas por A e C é $BC + CD = 2d_{hkl}\sin\theta$. A condição de difração é verificada quando a diferença de caminho for um múltiplo inteiro do comprimento de onda λ . O módulo do vetor S_{hkl} é o inverso da distância interplanar d_{hkl}	28
Figura 3.4 Foto ilustrativa de um cristal de proteína montado no <i>loop</i> em condições criogênicas.....	31
Figura 3.5 Representação geométrica do espaço recíproco através da construção de Ewald.....	33
Figura 3.6 Representação de uma coleta de dados pelo método de rotação do cristal.....	34
Figura 3.7 Representação ORTEP (Johnson, 1965) de dois inibidores da enzima adenina-fosforribosil-transferase (APRT). Os elipsóides de deslocamento atômico estão representados com 30% de probabilidade para ambas as figuras. (a) Skimianina $C_{14}H_{13}NO_4$ (Napolitano <i>et al.</i> , 2003a); (b) Isopimpinelin $C_{13}H_{10}O_5$ (Napolitano <i>et al.</i> , 2003b).....	39
Figura 4.1 Gráfico ilustrando a correlação entre peso molecular e volume da cela unitária para um conjunto de 116 proteínas (adaptado de Matthews, 1968)..	48
Figura 4.2 Gráfico tri-dimensional comparando a distribuição estatística do V_M para 1968 e 2002. Figura adaptada de Kantardjieff & Rupp (2003).....	49
Figura 4.3 Dependência do fator de espalhamento atômico f em relação a $\sin\theta/\lambda$. $f_j(0) = Z$ corresponde ao número de elétrons do átomo. (a) Ilustração quantitativa do fator de espalhamento atômico para alguns átomos típicos em estruturas cristalinas. (b) Comportamento qualitativo para um átomo qualquer; a reta horizontal em vermelho refere-se a um átomo hipotético pontual e estacionário.....	52
Figura 4.4 Gráfico ilustrando a correlação entre a somatória das intensidades observadas e o conteúdo eletrônico da cela unitária. Diferentes cores correspondem a diferentes tipos de retículo, conforme legenda.	58

Figura 4.5 (a) Perfil cromatográfico da eluição sPRS na coluna Superdex 200 HR 10/30. (b) Gráfico ilustrando o Raio Hidrodinâmico da sPRS, cujo valor é 6,04 Å, correspondente à massa molecular de 226 kDa.....	59
Figura 5.1 Alinhamento seqüencial entre as enzimas sPRS e bPRS, obtido pelos programas CLUSTALW e BLAST	64
Figura 5.2 Predição da estrutura secundária para a enzima sPRS realizada através do programa PSIPRED.....	65
Figura 5.3 Alinhamento estrutural das enzimas sPRS e bPRS obtido pelo THREADER.....	66
Figura 5.4 Gráfico ilustrando os valores da energia para os 50 moldes da sPRS. A energia está em escala arbitrária de forma que o valor absoluto não tem significado físico.....	68
Figura 5.5 Sobreposição do monômero do melhor modelo obtido para sPRS com o molde bPRS, representados em laranja e azul, respectivamente. (a) Destaque para o sítio catalítico; (b) Destaque para o sítio alostérico.....	69
Figura 5.6 (a) Diagrama de uma cadeia polipeptídica estendida, com a indicação dos três ângulos torsionais <i>phi</i> , <i>psi</i> e <i>omega</i> associados a cada aminoácido; (b) Gráfico Ramachandram do modelo final construído para a sPRS.....	70
Figura 5.7 Gráfico do programa VERIFY 3D para o modelo sPRS.....	71
Figura 5.8 (a) Representação esquemática de quatro celas unitárias P1 com três átomos. (b) Representação do mapa de Patterson P(u) com seis picos por cela, excetuando o da origem.....	73
Figura 5.9 (a) Ilustração gráfica das principais etapas em substituição Molecular. O operador <i>R</i> rotaciona da posição X_2 para a RX_2 , e operador <i>t</i> translaciona para a posição $(RX_2 + t)$. As coordenadas X_{1R} correspondem ao refinamento de corpo rígido da posição $(RX_2 + t)$. (b) Representação esquemática dos ângulos α , β e γ no sistema Eureliano.....	74
Figura 5.10 (a) Projeção estereográfica da função de auto rotação usando os coeficientes de correlação 20, 25, 30 e 45 nos contornos para a secção polar $\kappa = 180^\circ$; (b) Representação esquemática dos ângulos ϕ , ω e κ no sistema de coordenadas polares.....	78

Figura 6.1 Enovelamento geral do monômero para o modelo sPRS. O destaque em amarelo refere-se à região catalítica.....	86
Figura 6.2 Enovelamento da estrutura quaternária para a sPRS. Cada subunidade A e seu vizinho B estão alinhados paralelamente, de forma que respectivamente os domínios N-terminal e C-terminal formam a interface. O mesmo para as subunidades C e D, e E e F.....	88
Figura 6.3 Similaridade estrutural para a região do sítio catalítico entre as enzimas sPRS e bPRS. (a) Estrutura cristalográfica da bPRS co-cristalizada com a R5F. (b) sobreposição do modelo sPRS à bPRS co-cristalizada ilustrando a similaridade estrutural na região catalítica.....	90
Figura 6.4 ilustração do íon sulfato ligado ao sítio alostérico da enzima bPRS...	91
Figura 6.5 Ilustração da diferença estrutural entre sítio regulatório para as enzimas bPRS e sPRS. (a) Envolvimento da hélice 310 N-terminal na coordenação do sulfato com o sítio alostérico para a enzima bPRS. (b) Ilustração da mesma posição para o modelo sPRS, onde a coordenação do íon sulfato fica comprometida pela diferença geométrica e estérica na região do sítio alostérico.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Experimentos realizados para refinar a condição inicial de cristalização da proteína sPRS. Todas as condições propostas foram testadas com volume do poço e volume da gota iguais a (500 μL e 6 μL) e (1000 μL e 10 μL), respectivamente. A gota era sempre equipartida entre a solução de proteína e a solução do poço.....	20
Tabela 3.1 Conjunto de dados coletados no LNLS ilustrando os parâmetros cristalográficos.....	41
Tabela 3.2 Lista das extinções ($h00$; h ímpar), ($0k0$; k ímpar) e ($00l$; l ímpar) confirmando o grupo espacial não convencional $P22_12_1$	43
Tabela 3.3 Resumo da análise qualitativa para os conjuntos de dados coletados no LNLS para a sPRS. Valores entre parênteses referem-se à faixa de resolução (3.69-3.50 \AA).....	44
Tabela 4.1 Lista dos códigos relativos às 213 estruturas escolhidas no PDB para a análise da Eq. (4.8).	58
Tabela 4.2 Alguns valores de V_M e conteúdo de solvente da sPRS, obtidos através do programa MATTHEWS_COEF.....	60
Tabela 5.1 Modelos otimizados e utilizados na obtenção da fases por Substituição Molecular.....	77
Tabela 5.2 Resultado do refinamento de corpo rígido, usando o modelo de polialaninas hexamérico 1DKR, para os melhores ângulos função de rotação após transladados. α , β e γ são os ângulos Eurelianoss, x , y e z correspondem às translações, CC é o coeficiente de correlação, Rf é o fator R e RH refere-se a um outro fator R que leva em conta a altura do pico. As soluções que seguem correspondem aos intervalos de resoluções 15-6, 15-5 e 15-4 \AA , respectivamente.....	79
Tabela 5.3 Resultado do refinamento de corpo rígido, usando o modelo hexamérico 1DKR, para os melhores ângulos função de rotação após transladados. α , β e γ são os ângulos Eurelianoss, x , y e z correspondem às translações, CC é o coeficiente de correlação, Rf é o fator R e RH refere-se a um outro fator R que leva em conta a altura do pico. As soluções que seguem correspondem aos intervalos de resoluções 15-6, 15-5 e 15-4 \AA , respectivamente.....	80
Tabela 5.4 Resultado do refinamento de corpo rígido, usando o modelo construído do MODELLER, para os melhores ângulos função de rotação após transladados. α , β e γ são os ângulos Eurelianoss, x , y e z correspondem às translações, CC é o coeficiente de correlação, Rf é o fator R e RH refere-se a um outro fator R que leva em conta a altura do pico. As soluções que seguem correspondem aos intervalos de resoluções 15-6, 15-5 e 15-4 \AA , respectivamente.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
APRT	Adenina-fosforribosil-transferase
APS	Argonne Photon Source
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bPRS	Fosforribosilpirofosfato sintetase de <i>Bacillus Subtilis</i>
CAZy	<i>Carbohydrate Active Enzyme</i>
CCP4	<i>Collaborative Computational Project Number 4</i>
CD	<i>Circular Dichroism</i>
cDNA	DNA complementar
CV	volume da coluna
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ácido etíleno diaminotetraacético
ESTs	<i>Expressed Sequence Tags</i>
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GMP	Guanosina Monofosfato
GTP	Guanosina trifosfato
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
IMP	Inosina monofosfato ou Inosinato
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósideo
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MPD	2-metil-2-4-pantanodiol
mRNA	RNA mensageiro
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
ONSA	<i>Organization Nucleotides Sequencing Analysis</i>
OPRT	Orotato-fosforribosil-transferase

ORF	<i>Open Read Frame</i>
PCR	<i>Polymerase Chain reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenoglicol
Pfan	<i>Protein Family</i>
pI	Ponto isoelétrico
PP_i	Pirofosfato
PRPP	5-fosforribosil-1-pirofosfato
PRS	Fosforribosilpirofosfato sintetase
PRTases	Fosforribosiltransferases
PSIPRED	<i>Position Specific Iterated Prediction</i>
R5F	Ribose-5-fosfato
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
SAXS	Espalhamento de raio X a baixo ângulo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecylsulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
sPRS	Fosforribosilpirofosfato sintase de cana-de-açúcar
SUCEST	<i>Sugarcane Expressed Sequence Tag</i>
Tris	Hidroxometil-metilamina, pH ajustado com HCl
USP	Universidade de São Paulo
V_M	Volume de Matthews

RESUMO

A fosforribosilpirofosfato sintase de cana-de-açúcar [sPRS] (EC: 2.7.6.1) é uma enzima de central importância em muitas vias metabólicas envolvida na produção do 5-fosforribosil-1-pirofostato [PRPP] a partir da ribose-5-fosfato [R5F]. O gene da sPRS, seqüenciado como parte do projeto SUCEST, codifica para uma proteína com 328 aminoácidos e massa molecular 36,6 KDa. Essa proteína, após expressa heterologamente em *Escherichia coli* e purificada, foi cristalizada e submetida à experimentos de difração de raios X. A partir dos métodos cristalográficos e da modelagem por homologia pôde-se construir um modelo tridimensional. Cada subunidade da unidade biológica homohexamérica da sPRS correlaciona-se simetricamente com as demais através de um eixo de ordem 2 perpendicular à outro de ordem 3, formando uma simetria pontual 32. Experimentos de atividade enzimática para a sPRS indicam independência da sua atividade catalítica ao íon fosfato. Através do estudo comparativo entre a sPRS e sua homóloga fosforribosilpirofosfato sintetase de *Bacillus subtilis* [bPRS] (fosfato dependente) pudemos identificar similaridades estruturais na região do sítio catalítico e significativas diferenças no sítio alostérico. Os resultados revelam que essas diferenças estruturais na região do sítio alostérico são consistentes com a diferença funcional observada, sendo um importante passo rumo à compreensão da correlação estrutura-atividade para a sPRS fosfato independente.

ABSTRACT

The sugarcane phosphoribosylpyrophosphate synthase [sPRS] (EC: 2.7.6.1) is an enzyme of central importance in several pathways in all cells and produce the 5-phosporybosyl-1-pyrophosphate [PRPP] from the ribose-5-phosphate [R5F]. The gene of the sPRS was sequenced as part of the SUCEST project, encodes to 328 aminoacid protein with a molecular weight of 36,6 KDa. After being expressed in *Escherichia coli* and purified, the sPRS enzyme was crystallized and diffraction experiments were undertaken. From crystallographic methods and molecular modeling the tri-dimensional model was built. Each subunit of the sPRS homo-hexameric biological unit is symmetrically connected to the others through a 2-fold axis perpendicular to another 3-fold axis forming a 32 point symmetry. The sPRS enzyme activity assay indicates its independence of the presence of the phosphate ion. Through the comparative studies between the sPRS and the homologue from *Bacillus subtilis* phosphoribosyl pyrophosphate synthetase [bPRS] (phosphate dependent) we were able to identify structural similarities on the catalytic site and insightful differences on the allosteric site. These results show that structural differences in the allosteric site are consistent with functional difference observed and are an important step toward structure-activity comprehension for sPRS phosphate independent.

1. Introdução

1.1 Generalidades sobre o doutorado em cristalografia

A universidade é, por excelência, o espaço do pensamento, da razão, da construção do saber e da busca constante da verdade e do novo conhecimento (Le Goff, 1995). Nesse contexto, a educação promove o cultivo da racionalidade e a busca do sentido e da gênese de nossas práticas e idéias, permitindo a cada um desenvolver seu modo próprio de pensar (Napolitano & Moraes, 2001). Nessa rigorosa busca pela essência (Coêlho, 1999) situam-se os cursos de doutorado, objetivando um posicionamento pessoal e lúcido sobre um dado conteúdo através da tese escrita — do grego *thesis* que pode significar posicionamento.

A cristalografia por sua vez é um ramo tradicional da ciência cujo caráter é eminentemente interdisciplinar e abrange um conteúdo extenso e diverso (Giacovazzo *et al.*, 2002). O edifício teórico desta metodologia é construído fazendo uso de métodos matemáticos avançados, dos conceitos básicos de Física Moderna, dos conhecimentos de Química Quântica e de atuais ferramentas das Ciências Computacionais. Está ainda conectada à Biologia Estrutural, sobretudo na era pós-genômica, onde os proteomas ganham importância fundamental. Dada sua abrangência, faz-se

necessário que o pesquisador cristalógrafo, a despeito do volume de informações envolvidas, a estude com profundidade e rigor, articule os pressupostos em cada nova situação e vislumbre com acuidade as implicações. O caráter experimental adiciona o desafio de pensar sobre a experiência (diferente de ter experiência) e evitar meras imitações de rotinas experimentais, às vezes necessárias e laborosas.

O tema central desta *thesis* é o estudo estrutural da enzima fosforribosilpirofosfato sintase de cana-de-açúcar [sPRS] através dos métodos cristalográficos e da modelagem molecular. Esquematicamente, esse estudo será apresentado através das seguintes etapas: introdução ao problema a ser abordado, resultados obtidos na cristalização da sPRS, coleta e processamento dos dados de difração, caracterização inicial da enzima sPRS e análise teórica para o conteúdo de solvente, resultados obtidos na modelagem molecular e na solução da estrutura cristalográfica, e discussão dos resultados estruturais da sPRS à luz do seu conhecimento bioquímico.

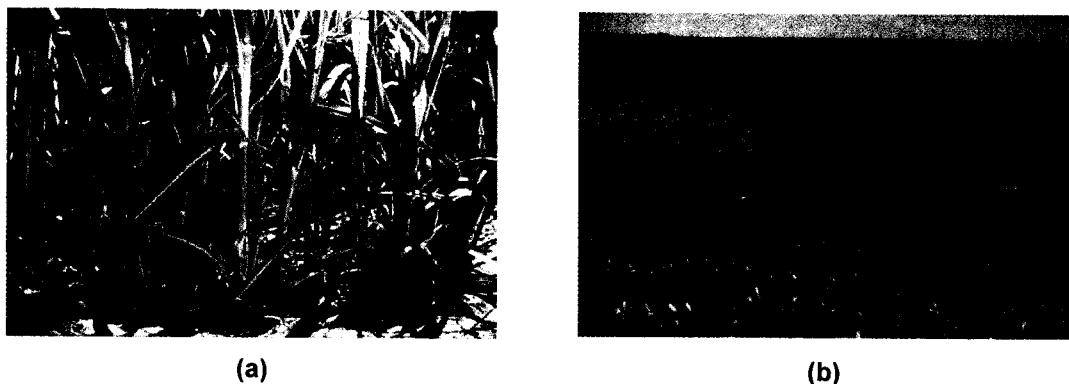
1.2 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene, pertencente ao gênero *Saccharum*, de colmo cilíndrico, externamente garbo, de coloração variável e internamente constituída por feixes vasculares totalmente primários e diversos. Esta planta é ereta e rizomatosa que forma touceiras, e possui entrenós retos ou em ziguezague. O comprimento, a espessura e as formas dessa planta são variados. As folhas são simples, alternadas e

estreito-lanceonadas, e o fruto é seco do tipo cariopse e com semente de endosperma abundante (Balastreire, 1998; Miocque & Machado, 1977). Geralmente é cultivada em áreas tropicais e subtropicais, sendo originária da Ásia e cujo nome científico é *Saccharum* sp. Pertencente à família das gramíneas, é um grupo amplamente distribuído de plantas vasculares com uma grande facilidade de adaptação. Pertence à classe das Monocotiledôneas, à ordem das Ciperales e à família das Poaceae. Seu gênero é o *Saccharum* e somam cerca de 30 espécies.

A condição climática tropical brasileira favoreceu a formação de grandes latifúndios monocultores (Balastreire, 1998), fundamentando nossa economia até os dias atuais. Em 2003 foram produzidas mais de 350 milhões de toneladas de cana-de-açúcar no Brasil numa área estimada em 18 milhões de hectares, e foram usadas principalmente na produção de açúcar e como fonte de energia¹. O Brasil é o responsável pela quarta parte da produção mundial, pois somente o estado de São Paulo contribuiu com 206 milhões de toneladas. A Fig. (1.1) ilustra um típico canavial no estado de São Paulo, no município de Sertãozinho.

¹Em http://www.unica.com.br/pages/coletivas_2003_12_15.asp. Página oficial da União da Agroindústria Canavieira de São Paulo.



(a)

(b)

Figura 1.1 Fotos de um típico canavial no estado de São Paulo. (a) Imagem ilustrando aspectos anatômicos da cana-de-açúcar; (b) Imagem geral de um canavial no município de Sertãozinho/SP.

Esta cultura representa uma importante atividade agro-industrial para o Estado de São Paulo e para o Brasil, fazendo parte tanto do consumo interno quanto das exportações. Oferece como bioproductos o açúcar, o melado, a cachaça, o álcool e a forragem animal. Pode-se ainda extrair a celulose, a partir dos resíduos dos talos, para produção do papel (Lima, 1988).

As espécies de cana-de-açúcar cultivadas comercialmente no Brasil resultam de diversos cruzamentos interespecíficos, envolvendo as espécies *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense*, e as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum*, e da manipulação humana por estudos de melhoramento genético. Apesar de naturalmente apresentar boa resistência a pragas e moléstias, esses melhoramentos visam plantas mais resistentes a períodos de secas prolongados, e menos susceptíveis ao ataque de patógenos.

1.3 O projeto SUCEST

O projeto *SugarCane Expressed Sequence Tag* [SUCEST] faz parte do consórcio *Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis* [ONSA], envolvendo 74 laboratórios de pesquisa no estado de São Paulo, fundado pela FAPESP com cerca de 200 pesquisadores, objetivando implementar o programa genoma para a cana-de-açúcar (Simpson & Perez, 1998). O principal objetivo deste projeto foi empreender um programa de *Expressed Sequence Tags* [ESTs] em larga escala, através do seqüenciamento randômico de clones oriundos de bibliotecas de DNA-complementar (cDNA). Essas bibliotecas foram preparadas a partir do calo, da raiz, do caule, das folhas estioladas, das flores e das sementes, entre outros tecidos (Vettore *et al.*, 2001), todos extraídos de 30 diferentes cultivos de cana-de-açúcar derivadas da hibridização das espécies *S. officinarum* ($2n=80$) e *S. spontaneum* ($2n=40-128$).

O SUCEST construiu um banco de dados contendo 238.000 ESTs de 26 bibliotecas de cDNA (Vettore *et al.*, 2003). Essas bibliotecas foram construídas a partir da extração do mRNA dos vários tecidos. O trabalho de análise e catalogação dos resultados obtidos, após o seqüenciamento completo do Genoma da Cana-de-açúcar, foi orientado de acordo com o tipo de pesquisa que cada grupo desenvolve. Esses resultados obtidos pelo seqüenciamento da cana-de-açúcar podem ser explorados pela comunidade científica em estudos que relacionam o uso dos genes como fonte de marcadores para características significantes da agricultura, e

também oferecem bases de estudos de crescimento e desenvolvimento da planta que, posteriormente, podem ser utilizados para analisar questões fisiológicas, bioquímicas e/ou patológicas.

O interesse particular do Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos [IFSC] da Universidade de São Paulo [USP], além de participar no seqüenciamento, identificação e catalogação dos ESTs de cana-de-açúcar, é identificar diversos clones pertencentes ao metabolismo de purino-nucleotídeos, visando mapear tanto os genes envolvidos na síntese *de novo* de purinas quanto os envolvidos na sua via de recuperação.

A identificação dos genes, que atuam na via metabólica da síntese *de novo*, permitirá um estudo mais detalhado objetivando entender o mecanismo das enzimas da cana-de-açúcar na síntese de purinas. Isto tornaria possível usá-las como alvo para o desenvolvimento de drogas específicas que possibilitem combater agentes fitopatogênicos, como tem sido aplicado a muitos parasitas e ao câncer.

1.4 A enzima fosforribosilpirofosfato sintase

Os nucleotídeos têm importantes papéis em todas as células, pois são precursores de DNA e RNA e fazem parte na biossíntese de intermediários como o ATP e o GTP (Nelson & Cox, 2000). Adicionalmente os nucleotídeos são componentes dos cofatores NAD e FAD, e são ainda reguladores metabólicos. Em eucariotos, purino-nucleotídeos podem ser obtidos por duas vias metabólicas: a via de síntese *de novo* e a via de

recuperação (Berens *et al.*, 1995; Marr, 1991). Na síntese *de novo* purino-nucleotídeos são produzidos a partir de precursores metabólicos, como: aminoácidos, ribose-5-fosfato [R5F], CO₂ e NH₃. A via de recuperação recicla as bases livres (Adenina, Guanina, Timina, Citosina e Uracil) e os nucleosídeos liberados da degradação hidrolítica dos ácidos nucléicos.

A via de biossíntese *de novo* de purinas é bastante conservada dentre os vários organismos estudados, sendo a única via identificada para a obtenção de purino-nucleotídeos em cana-de-açúcar. Trata-se de uma via central constituída por vários passos enzimáticos, divididos em dois estágios. O primeiro é a formação do 5-aminoimidazol ribonucleotídeo a partir do 5-fosforribosil-1-pirofosfato [PRPP], e o segundo é a formação da Inosina monofosfato [IMP] a partir do 5-aminoimidazol ribonucleotídeo. O IMP, depois de formado, é convertido em purino-nucleotídeos guanosina monofosfato [GMP] e Adenosina monofosfato [AMP] na via de interconversão. Para a cana-de-açúcar, a porção ribose-fosfato dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos é fornecida pela enzima sPRS.

O PRPP é um intermediário notável em muitas vias de síntese de nucleotídeos, sintetizado a partir da R5F e derivado da via pentose-fosfato numa reação catalisada pela ribose fosfato pirofosfoquinase (Nelson & Cox, 2000; Berg *et al.*, 2002). Também está presente na síntese de aminoácidos como a Histidina e o Triptofano.

A fosforibosilpirofosfato sintase de cana-de-açúcar (EC: 2.7.6.1) é uma enzima de central importância em muitas vias metabólicas (Smith &

Atkins, 2002) em todas as células, e as evidências acumuladas indicam que estas enzimas formam uma família complexa de isoenzimas com localização intracelular (mitocôndria, citoplasma e núcleo), e diferentes características de dependência de fosfato (Hager & Jones, 1967; Hoffmeyer & Neuhard, 1971). Nesta tese a denominação fosforibosilpirofosfato sintase é utilizada como sinônimo de fosforibosilpirofosfato sintetase fosfato independente. A Fig. (1.2) ilustra a reação de síntese do PRPP catalizada pela sPRS.

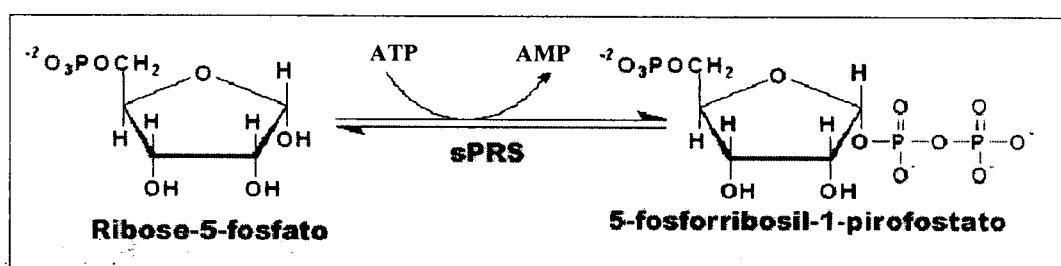


Figura 1.2 Reação da síntese do PRPP catalizada pela PRPP sintase (sPRS). Adaptada da referência (Berg et al., 2002).

No Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do IFSC a fase aberta de leitura (*Open read frame*) [ORF] do gene *prs* foi克隆ado e sua seqüência foi determinada a partir de uma biblioteca de cDNA da cana-de-açúcar identificada pelo SUCEST. O gene *prs* da cana-de-açúcar codifica para uma proteína com 328 aminoácidos de massa molecular 36,6 kDa. Esse gene foi seqüenciado e sub-clonado, e a proteína sPRS foi expressa heterologamente em *Escherichia coli* BL21 (DE3). Os protocolos de expressão e purificação foram estabelecidos por Sculaccio (2002).

1.5 Generalidades da cristalografia

Informações sobre a estrutura tridimensional podem ser obtidas por várias metodologias: difração de raios X por monocrystalais, difração de nêutrons por monocrystalais, ressonância magnética nuclear, espalhamento de raios X a baixo ângulo [SAXS] em solução, microscopia eletrônica, modelagem teórica, entre outros. Dentre essas, o método cristalográfico apresenta-se como o mais adequado devido à alta resolução com que se pode descrever a densidade eletrônica (Drenth, 1999; Giacovazzo *et al.*, 2002). O método cristalográfico tem contribuições relevantes em diversas áreas, dentre as quais pode-se citar Biologia Estrutural, Mineralogia, Geologia, Física e Química.

O trabalho de determinação da estrutura tridimensional através da cristalografia de proteínas envolve as seguintes etapas (Drenth, 1999; Giacovazzo *et al.*, 2002): purificação da proteína, cristalização, coleta de dados, processamento dos dados, resolução da estrutura, refinamento, validação e análise do modelo cristalográfico, e ainda depósito da estrutura no banco de dados apropriado. Essa última etapa é, as vezes, suprimida quando há algum valor econômico agregado à estrutura resolvida. O método difratométrico fornece o conhecimento tridimensional de estruturas moleculares – a nível atômico – para compostos no estado cristalino, proporcionando confiança nos resultados em pesquisas erigidas a partir do modelo estrutural obtido.

A abordagem moderna para o desenho racional de drogas (Blundell, 1996) fundamenta-se no princípio da interação fármaco-receptor, que se dá através de mecanismos de complementaridade estérica, química e geométrica entre o ligante e a macromolécula alvo. Uma vez conhecida a estrutura tridimensional de uma enzima como potencial alvo patogênico, estas informações se tornam valiosas na busca de possíveis inibidores. Dada a participação da enzima fosforribosilpirofosfato sintase em diversas vias metabólicas (Smith, & Atkins, 2002), seu conhecimento estrutural, além das contribuições na caracterização funcional, abre a possibilidade para o futuro desenho de drogas no combate a fitopatologias associadas à cana-de-açúcar.

1.6 Referência bibliográficas

- Balastreire, L. A. (1998). *Potencial de utilização dos conceitos de agricultura de precisão na cultura da cana-de-açúcar*. S.T.A.B. 16 (4), 22.
- Berens, R. L.; Krug, E. C. & Marr, J. J. (1995). *Purine and pyrimidine metabolism*. In: **Biochemistry of Parasitic Organisms and its Molecular Foundations**. Editores Marr, J.J. & Muller, M. Academic Press, London.
- Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2002). **Biochemistry**. 5th ed. W.H. Freeman, New York.
- Blundell, T.L. (1996) *Structure based drug design*. Nature 384, Supplement, 23.
- Coêlho, I. M. (1999). **Realidade e utopia na construção da universidade: memorial**. 2a. ed., Ed. da UFG, Goiânia.
- Drenth, J. (1999). **Principles of Protein X-ray Crystallography**. 2nd ed., Springer, New York.
- Giacovazzo, C.; Monaco, H.L.; Viterbo, D.; Scordari, F.; Gilli, G.; Zanotti, G. & Catti, M. (2002). **Fundamentals of Crystallography**. 2nd ed., IUCr e Oxford Science Publication, New York.
- Hager, S. E. & Jones, M. E. (1967). *A Glutamine-dependent Enzyme for the Synthesis of Carbamyl Phosphate for Pyrimidine Biosynthesis in Fetal Rat Liver*. J. Biol. Chem. 242, 5674.
- Hoffmeyer, J. & Neuhard, J. (1971). *Metabolism of Exogenous Purine Bases and Nucleosides by Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 106, 14.

- Lima, A. F. (1988). *Processamento da pasta celulósica. In: Celulose e Papel, Vol. 1 - Tecnologia de fabricação da pasta celulósica.* 2a. ed., IPT, São Paulo.
- Le Goff, J. (1995). **Os intelectuais na Idade Média.** 4 ed. Ed. Brasiliense, São Paulo.
- Marr, J. J. (1991). *Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis.* **J. Lab. Clin. Med.** **118**, 111.
- Miocque Jyj & Machado Gr (1977). *Review of sugarcane varieties and breeding in Brazil.* **Sugar Journal** **40** (7), 9.
- Napolitano, H. B. & Moraes, I. J. (2001). *Alguns elementos essenciais no ensino de ciências.* **Inter-Ação** **26** (1), 103.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2000). **Lehninger principle of biochemistry.** 3 ed. Worth Publishers, New York.
- Sculaccio, S. A. (2002). *Clonagem e caracterização molecular da fosforribosil pirofosfato sintase (PRPP sintase) de cana-de-açúcar.* **Dissertação de mestrado.** Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFSCar.
- Simpson, A. J. G. & Perez, J. F. (1998). *Latin America - ONSA, the Sao Paulo virtual genomics institute.* **Nat. Biotechnol** **16** (9), 795.
- Smith, P. M. C., & Atkins, C. A. (2002). *Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation.* **Plant. Physiology.** **128**, 793.
- Vettore, A. L.; Silva F.R.; Kemper E. L. and Arruda P. (2001). *The libraries that made SUCEST.* **Genetics and Mol. Biol.** **24** (1-4), 1.
- Vettore, A. L.; Silva, F. R.; Kemper, E. L.; Souza, G. M.; Silva, A. L.; Ferro, M. I. T.; Henrique-Silva, F.; Giglioti, E. A.; Lemos, M. V. F.; Coutinho, L. L.; Nobrega, M. P.; Carrer, H.; França, S. C.; Bacci, M. Jr.; Goldman, M. H. S.; Gomes, S. L.; Nunes, L. R.; Camargo, L. E. A.; Siqueira, W. J.; Sluys, M. A. V.; Thiemann, O. H.; Kuramae, E. E.; Santelli, R. V.; Marino, C. L.; Targon, M. L. P. N.; Ferro, J. A.; Silveira, H. C. S.; Marini, D. C.; Lemos, E. G. M.; Monteiro-Vitorello, C. B.; Tambor, J. H. M.; Carraro, D. M.; Roberto, P. G.; Martins, V. G.; Goldman, G. H.; Oliveira, R. C.; Truffi, D.; Colombo, C. A.; Rossi, M.; Araujo, P. A.; Sculaccio, S. A.; Angella, A.; Lima, M. M. A.; Rosa, V. E. Jr; Siviero, F.; Coscrato, V. E.; Machado, M. A.; Grivet, L.; Di Mauro, S. M. Z.; Nobrega, F. G.; Menck, C. F. M.; Braga, M D. V.; Telles, G. T.; Cara, F. A. A.; Pedrosa, G.; Meidanis, J. & Arruda, P. (2003). *Analysis and Functional Annotation of an Expressed Sequence Tag Collection for Tropical Crop Sugarcane.* **Genome Res.** **13**, 2725.

2. Cristalização da enzima sPRS

2.1 Conceitos gerais

Para a análise estrutural de proteínas através da difração de raios X deve-se necessariamente obter monocristais que apresentem um padrão de difração adequado (Giacovazzo, 2002). A obtenção de cristais de proteínas não difere muito da obtenção de cristais de pequenas moléculas, mas há mais variáveis envolvidas e, consequentemente, cuidados adicionais devem ser considerados. Na cristalização, deve-se primeiramente alcançar o ponto de supersaturação, onde os cristais são formados, e em seguida crescê-los a tamanhos suficientes para o experimento de difração (Blundell & Johnson, 1976).

Como são vários os fatores que interferem na solubilidade da proteína, sua cristalização torna-se um processo multiparamétrico. Dentre as variáveis, pode-se citar: temperatura, pH, pressão, agentes precipitantes e solventes orgânicos (Drenth, 1999; Zanotti, 2002). A pureza química e a homogeneidade estrutural são requerimentos indispensáveis, além do que a energia associada ao arranjo cristalino deve ser menor do que aquela associada ao estado amorfó.

A cristalização de proteínas envolve as três clássicas etapas: nucleação, crescimento e cessação de crescimento (Blundell & Johnson, 1976; Zanotti, 2002). O processo de cristalização é cineticamente controlável, sendo o método de cristalização um dos fatores que interferem na sua cinética. Dentre os métodos mais utilizados e viáveis pode-se citar a difusão de vapor pela gota suspensa, onde, à medida que o volume da gota diminui, aumenta-se a concentração da proteína e do agente precipitante. A Fig. (2.1) ilustra esquematicamente o método da difusão de vapor pela gota suspensa.

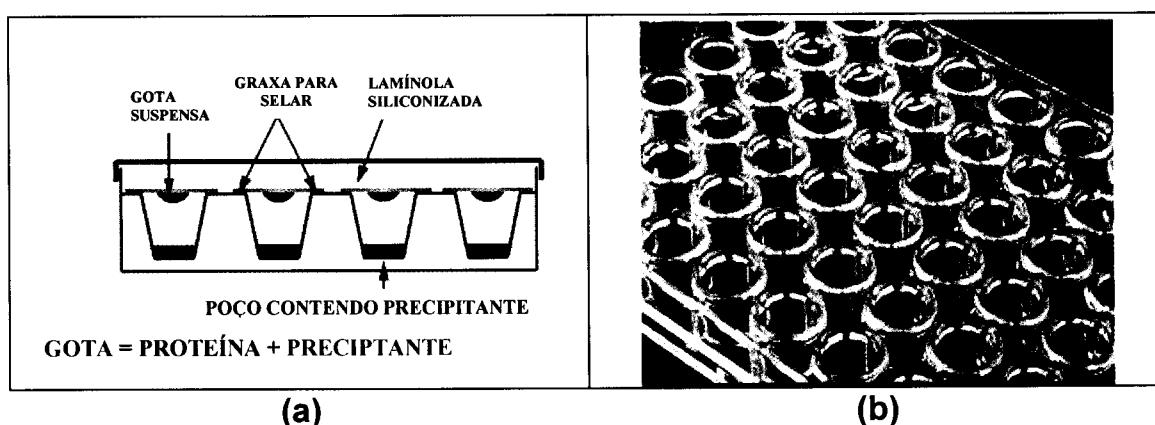


Figura 2.1 (a) Ilustração esquemática do método da difusão de vapor pela gota suspensa. (b) Foto ilustrativa dos pratos de montagem experimental. Adaptado da Hampton Research Corp.

O estado cristalino é obtido quando a concentração da proteína em solução é maior do que seu limite de solubilidade (condição termodinamicamente instável), ou seja, a proteína se encontra no estado de supersaturação. Os cristais de macromoléculas são mantidos por interações como ligações de hidrogênio, pontes salinas, interações de van der Waals e interações entre dipolos nas regiões de contato, uma vez que proteínas interagem através de uma pequena região (McPherson, 1982;

Ducruix & Giegé, 1992). A maior parte da superfície dessas moléculas, grandes e geralmente globulares, interage com o solvente (Tsai *et al.*, 1999), que preenche o volume cristalino não ocupado por elas.

Dessa forma verifica-se duas fases distintas na constituição do cristal de proteína (sólida e líquida), que os tornam frágeis ao manuseio e sensíveis ao solvente. Encontrar a estrutura se torna um trabalho interessante, uma vez que as forças que mantém a estrutura tridimensional da proteína são maiores que as forças que mantêm as moléculas próximas no estado cristalino (Abdel-Meguid *et al.*, 1996; McPherson, 1982). Dessa forma podemos usar as informações estruturais na busca de inibidores ou para justificar alguma função biológica (Carter, 1990; Rossi, 1992; Skelly & Madden, 1996).

2.2 Resultados

Os ensaios de cristalização foram iniciados após a obtenção da proteína pura a uma concentração de aproximadamente 9,0 mg/mL. Os experimentos iniciais de cristalização constituíram em avaliar o comportamento da sPRS em solução ante as condições propostas nos fatoriais incompletos da Hampton Research Corp. (Carter & Carter, 1979; Jancarik & Kim, 1991), pelo método de difusão de vapor com gota suspensa a 4 e 18°C. Após avaliação inicial, foi identificada a seguinte condição promissora a 18°C: agente precipitante — sulfato de amônio 2,0 M e aditivo — 5% v/v de Isopropanol. A proteína estava solubilizada em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 contendo 150 mM NaCl.

Com o objetivo de obter melhores cristais, planejou-se um refinamento variando combinadamente a concentração do agente precipitante (entre 1,8 e 2,2 M), e a concentração do aditivo Isopropanol (entre 2 e 5 % v/v). A Fig (2.2a) ilustra o melhor monocristal obtido para a seguinte condição refinada: temperatura – 18º C; agente precipitante – 2,2 M do sulfato de amônio; e aditivo – 5% de Isopropanol. A evidência de tratar-se de um monocristal protóico pode ser visto através da imagem de difração por raios X, demonstrada na Fig. (2.2b). Os resultados obtidos com a cristalização da sPRS podem ser vistos em Napolitano *et al.* (2004).

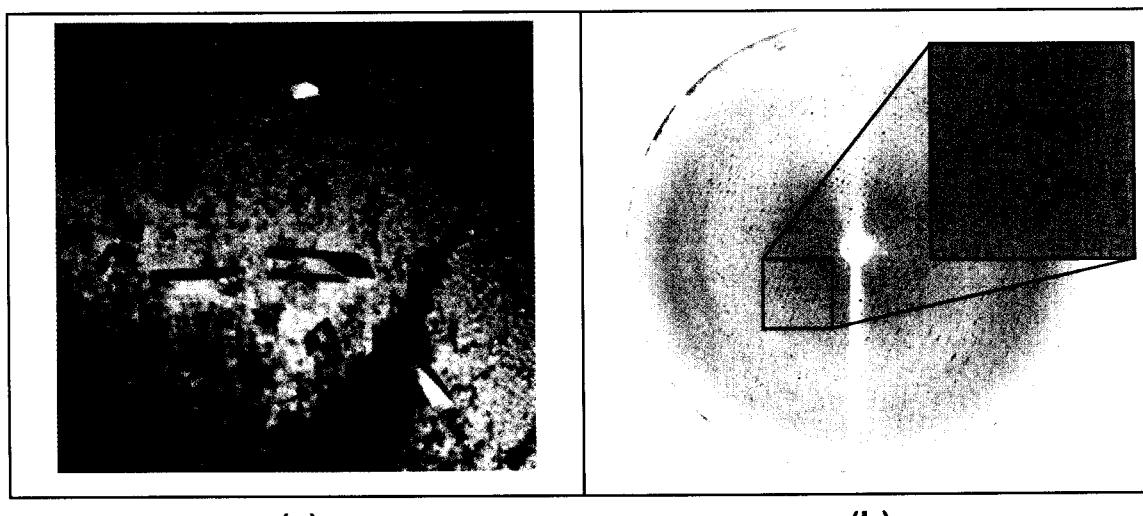


Figura 2.2 (a) Foto ilustrando o melhor cristal obtido para a PRS de cana-de-açúcar. Condição de cristalização (2,2 M do sulfato de amônio com 5% de Isopropanol); (b) Imagem de difração por raios X do referido cristal.

2.3 Materiais e métodos

Para a expressão da enzima sPRS uma colônia de *E. coli* BL21 (DE3)pLysS, contendo o plasmídeo pCRT7 TOPO NT com a fase aberta de leitura (*open read frame*) [ORF] do gene sPRS, foi inoculada em 5 mL do meio de cultura Luria-Bertani (Bactotriptona, 10 g/L; extrato de levedura, 5

g/L; NaCl, 10 g/L) [LB] adicionado de 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL cloranfenicol, concentração final. Após incubação por 12 horas a 37°C sob agitação de 250 RPM, essas culturas – pré-inóculo¹ – foram utilizadas para inocular 500 mL de meio LB suplementado de 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL cloranfenicol, ambos concentração final. Dessa forma obteve-se uma produção de sPRS em grande quantidade. As células provenientes de 500 mL de cultura foram separadas por centrifugação a 8000g por 15 min a 4°C. A seguir foram ressuspensas em 30 mL de TAMPÃO A (Fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 adicionado de NaCl 400 mM e Imidazol 10 mM). Essas células foram rompidas por sonicação, utilizando 6 exposições alternadas de 30 s (utilizando-se 50 mA de corrente). Todo esse procedimento inicial foi realizado mantendo-se as células em banho de gelo. A amostra lisada foi centrifugada a 4°C por 20 min a 20.000 g, descartando-se o precipitado.

Ao sobrenadante obtido adicionou-se inicialmente 30% de sulfato de amônio ficando sob agitação por 20 min a 4°C e, após dissolução total do sal, centrifugou-se a amostra por 15 min a 20.000g. O sobrenadante foi separado do precipitado, que por sua vez foi ressuspensido em 10 mL de TAMPÃO A.

¹ Para realizar os testes de expressão fez-se um inóculo da colônia de *E. Coli* em 10 mL LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) incubado durante a noite (16 horas) sob agitação de 250 rpm a 37°C. Após crescimento das células inoculou-se 10 mL de meio LB líquido com 500 µL do inóculo que ficou sob agitação de 250 rpm a 37°C até atingir a D.O._{600nm} de aproximadamente 0,5. A cultura foi então induzida por 5 horas com a adição de IPTG a concentração final de 1mM.

Ao sobrenadante resultante foi adicionada uma outra concentração de sulfato de amônio, aumentada de 5%, repetindo-se esse procedimento por quatro vezes até que a concentração final de sulfato de amônio fosse de 55%. O resultado da purificação parcial através de fracionamento com sulfato de amônio foi analisado em SDS-PAGE 15% mostrando que a proteína precipita a uma concentração de 35% e 40% de sulfato de amônio. Após a precipitação seletiva com o sulfato de amônio seguiu-se a cromatografia por afinidade.

O gene que expressa a proteína sPRS possui cauda de 6XHis N-terminal, com capacidade de ligação a metal divalente Ni^{2+} , favorecendo o uso da coluna de cromatografia por afinidade *Ni-NTA Superflow*. Nessa cromatografia de afinidade as proteínas são separadas por suas especificidades de ligação, sendo a cauda 6XHis a parte da macromolécula que se liga ao Níquel-Ácido Nitriloacético (Ni-NTA). Em geral, a cauda de histidina não interfere com a estrutura nem com a função das proteínas (Zanotti, 2002).

A amostra foi centrifugada por 15 min a 3000g a 4°C antes de ser aplicada à coluna de afinidade imobilizada Ni-NTA (5 mL de resina). A coluna foi equilibrada com o TAMPÃO A, com um volume 4 vezes o volume da coluna [CV], para então a amostra ser aplicada. Fez-se em seguida uma lavagem com 2 CV do TAMPÃO A, para retirar as proteínas que não se ligaram a resina. A proteína foi eluída da coluna através da aplicação de um gradiente linear de 10 a 500 mM de imidazol em TAMPÃO A sob 100

min, com um fluxo de 0,5 mL/min, monitorada a 280 nm em um detector de absorbância LKB UV. As frações eluídas foram analisadas em gel 15% SDS-PAGE, conforme ilustrado na Fig. (2.3).

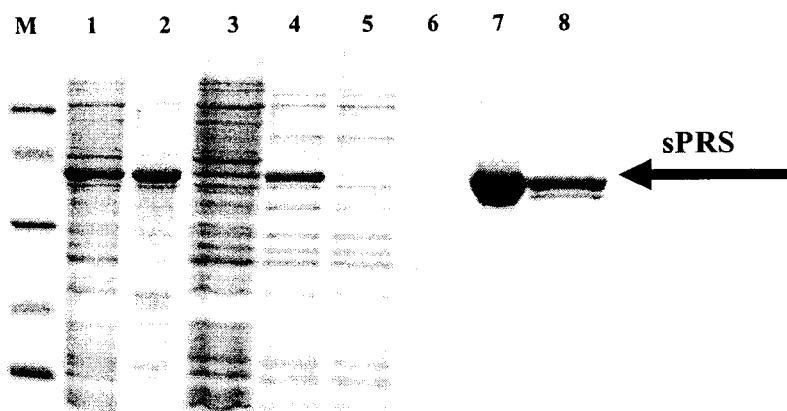


Figura 2.3 Gel de poliacrilamida ilustrando o resultado obtido na purificação da sPRS. Poço M: marcador de massa molecular; poço 1: extrato bruto; poço 2: pellet do processo de clarificação por centrifugação representando a perda de proteína em corpos de inclusão; poço 3: sobrenadante clarificado; poço 4: fração entre 35 e 40% do sulfato de amônio; poço 5: void no fracionamento na coluna Ni-NTA; poço 6: fração da lavagem da coluna; poço 7: fração eluída com 260 mM de imidazol; poço 8: enzima sPRS purificada na cromatografia de exclusão.

As frações da amostra, após eluída na coluna de níquel e contendo a proteína, foram agrupadas e dialisadas em TAMPÃO B (fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 contendo 150 mM NaCl). Após essa diálise, a amostra foi concentrada para 500 µL por ultrafiltração em centriprep e centricon 10 (Amicon), centrifugada por 10 min a 15.000g à temperatura ambiente e aplicada na coluna Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibrada com TAMPÃO B.

Após a cromatografia por afinidade seguiu-se então a cromatografia por exclusão utilizando a coluna Superdex 200 de 24 mL de volume de

coluna acoplada ao sistema automatizado de cromatografia AKTA Explorer10 (Amersham Pharmacia Biotech). Esta é uma coluna tipicamente usada para separações de proteínas com peso molecular entre 10 e 600 kDa. O fluxo de corrida utilizado foi de 0,5 mL/min e o andamento da purificação foi monitorado a 280 nm. A Fig. (2.3) ilustra o processo de purificação através do gel 15% SDS-PAGE das frações correspondentes ao pico da proteína obtido na cromatografia por exclusão. Ao término do processo de purificação (Sculaccio, 2002) obteve-se uma proteína química e estruturalmente pura, verificados através do SDS-PAGE e espalhamento dinâmico de luz [DLS], respectivamente.

A estratégia utilizada para tentar cristalizar a sPRS constituiu-se em conduzir lentamente a solução protéica a um estado de supersaturação empregando-se o método de difusão de vapor tanto pela técnica da gota suspensa quanto pela técnica da gota assentada (McPherson, 1982; Jancarik & Kim, 1991). Dessa forma a busca inicial por condições favoráveis da cristalização foi feita com a metodologia do fatorial incompleto, disponível comercialmente através da Hampton Research Corp. (Jancarik & Kim, 1991). Para a realização dos experimentos iniciais a proteína química e estruturalmente pura foi concentrada a 9,0 mg/mL.

Os experimentos de cristalização constituíram em avaliar o comportamento da sPRS em solução ante as condições propostas nos seguintes fatoriais incompletos da Hampton Research Corp. (Apêndice A): *Crystal Screen* [FATORIAL 1], *Crystal Screen 2* [FATORIAL 2] e *Grid*

Screen ($\text{NH}_4\text{}_2\text{SO}_4$). Na montagem desses experimentos de cristalização, por difusão de vapor através da gota suspensa, colocou-se no poço 500 μL de uma das soluções dos fatoriais. Da solução do poço, foram retirados 3 μL e misturados com outros 3 μL da solução da sPRS a 9 mg/mL. Com a nova solução obtida, foi montada a gota suspensa na parte superior do poço. Os experimentos de cristalização foram realizados em caixas de cristalização contendo, cada uma, 24 câmaras de troca de vapor, conforme ilustrado na Fig. (2.1b). Os experimentos foram montados em ambientes isolados com temperaturas constantes de 4°C e 18°C. Depois de montadas as câmaras de vapor foram deixadas em estrito repouso. A análise visual dessas gotas era feita sempre depois de quinze dias do experimento de cristalização.

O melhor resultado foi encontrado na condição 5 do Fatorial 2 com a cristalização através da gota suspensa a 18º C. O refinamento foi realizado variando a concentração do agente precipitante entre 1,8 e 2,2 M e a concentração do aditivo Isopropanol entre 0 e 5 % v/v. A Tabela (2.1) apresenta as condições variadas no refinamento.

- Tabela 2.1 Experimentos realizados para refinar a condição inicial de cristalização da proteína sPRS. Todas as condições propostas foram testadas com o volume do poço e o volume da gota iguais a (500 µL e 6 µL) e (1000 µL e 10 µL), respectivamente. A gota era sempre equipartida entre a solução de proteína e a solução do poço.

2.4 Referências bibliográficas

- Abdel-Meguid, S. S.; Jeruzalmi, D. & Sanderson, M. R. (1996). *Preliminary Characterization of Crystals*. In: **Crystallographic Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology**. Vol. 56. Editores: Jones, C.; Mulloy, B. & Sanderson, M. R. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Blundell, T. L. & Johnson, L. N. (1976). **Protein Crystallography**. London, Academic Press Inc.
- Carter, C. W. & Carter, C. W. (1979) *Protein Crystallization Using Incomplete Factorial Experiments*. J. Biol. Chem. 254, 12219.
- Carter, C.W. (1990) **Protein and Nucleic Acid Crystallization Methods: A Companion to Methods in Enzymology** Vol 1, No 1, August 1990. Academic Press.
- Drenth, J. (1999). **Principles of Protein X-ray Crystallography**. 2nd ed., Springer, New York.
- Ducruix, A. & Giegé, R. (1992) **Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach**, Editores. Oxford University Press, Oxford.
- Giacovazzo, C. (2002). *The difraction of X-ray by crystals*. In: **Fundamentals of Crystallography**. Editado por Giacovazzo, C. IUCr e Oxford Science Publication, New York.
- Jancarik, J. & Kim, S.H. (1991) *Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins*. J. Appl. Cryst. 24, 409.
- McPherson, A. (1982) **Preparation and Analysis of Protein Crystals**. Wiley, New York.
- Napolitano, H. B.; Sculaccio, S. A.; Thiemann, O. H. & Oliva, G. (2004) Preliminary crystallographic analysis of sugarcane phosphoribosyl-pyrophosphate synthase. *Acta Cryst. D*. Artigo submetido.
- Rossi, G.L. (1992) Biological activity in the crystalline state. *Curr. Opinion Struc. Biol.* 2, 816.
- Sculaccio, S. A. (2002). Clonagem e caracterização molecular da fosforribosil pirofosfato sintase (PRPP sintase) de cana-de-açúcar. **Dissertação de mestrado**. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. UFSCar.
- Skelly, J. V. & Madden, C. B. (1996) *Overexpression, Isolation and Crystallization of Proteins*. In **Crystallographic Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology**. Vol. 56. Editores: Jones, C. ; Mulloy, B. & Sanderson, M. R. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Tsai, J.; Taylor, R.; Chothia, C. & Gerstein, M. (1999). *The packing density in proteins: Standard radii and volumes*. J. Mol. Biol. 290, 253.
- Zanotti, G. (2002). **Protein Crystallography**. In: **Fundamentals of Crystallography**. 2nd Ed., Editado por Giacovazzo, C. IUCr e Oxford Science Publication, New York.

3. Coleta e processamento dos dados de difração

3.1 Difração dos raios X por monocristais

O raio X é uma radiação eletromagnética situada na região entre os raios gama e ultravioleta, com intervalo de comprimento de onda de particular interesse para o fenômeno da difração por cristais variando entre 0,4 e 2,0 Å. Quando um feixe de raios X atinge algum material, seus elétrons são forçados a oscilarem devido ao campo elétrico da radiação incidente, tornando-se uma nova fonte espalhadora em todas as direções, uma vez que carga acelerada emite radiação (Cullity, 1978). Devido à forte interação entre o campo elétrico e os meios materiais, quando comparada com as interações de campos magnéticos com estes meios, pode-se afirmar, numa primeira aproximação, que apenas o campo elétrico aparece na interação dos raios X com a matéria quando se analisa o espalhamento (Cullity, 1978; Stout & Jensen, 1989).

Como o comprimento de onda λ dos raios X é da ordem das distâncias entre os átomos que constituem a matéria, ocorrerá a difração desta onda espalhada, contendo informações estruturais, pelos diversos espalhadores (átomos ou elétrons) no interior da amostra. Esses espalhadores discretos são uma das consequências da atomicidade da matéria. Essa difração pode ser explicada pelo princípio de Huygens que,

qualitativamente, diz que “todos os pontos de uma frente de onda de luz podem ser considerados fontes puntiformes que produzem ondas secundárias” (Schwarzenbach, 1996). Claro que, se a disposição dos átomos na amostra for aleatória, não haverá relações fixas de fase entre as ondas espalhadas (espalhamento incoerente, portanto), e o efeito combinado das diversas ondas espalhadas será difuso. No entanto, se a distribuição dos átomos obedecer a algum padrão regular, o efeito combinado dessas ondas difratadas também obedecerá a um padrão regular, recíproco ao padrão de distribuição dos átomos.

Com o objetivo de localizar geometricamente as direções de interferência construtiva (Cullity, 1978), representa-se um cristal por uma distribuição discreta de densidade eletrônica, parcialmente representada na Fig. (3.1). Esta figura mostra um átomo a_2 posicionado em M , que está a uma distância r do átomo a_1 , posicionado na origem O . Os átomos a_1 e a_2 são dois centros espalhadores, o vetor unitário s_0 representa a direção do feixe incidente enquanto o vetor s , também unitário, representa uma direção particular do feixe espalhado. A diferença de caminho ótico entre as duas ondas espalhadas pelo conteúdo eletrônico dos átomos a_1 e a_2 é

$$\delta = \overline{OB} - \overline{AM} = \mathbf{r} \bullet (\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)$$

(Cullity, 1978; Stout & Jensen, 1989).

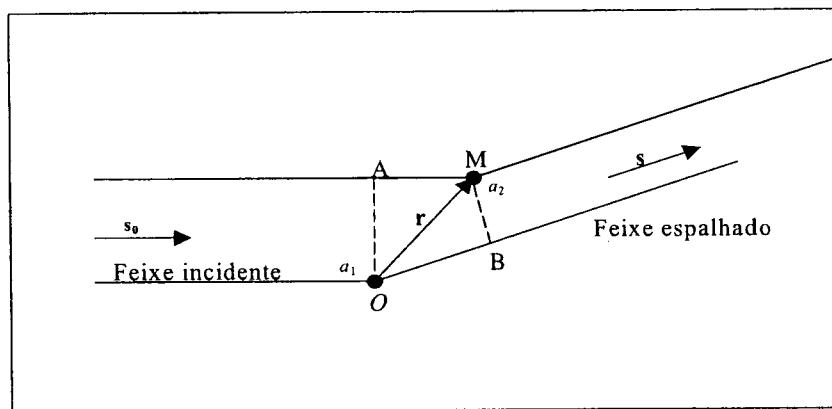


Figura 3.1 Espalhamento decorrente de uma distribuição discreta de carga. As direções dos feixes de raios X incidentes e espalhadas estão representadas pelos vetores unitários s_0 e s , respectivamente. Os átomos a_1 e a_2 ilustram dois centros espalhadores da amostra.

Considerando a radiação incidente monocromática com comprimento de onda λ , a diferença de fase entre essas duas ondas será

$$\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \delta = 2\pi r \cdot \frac{(s - s_0)}{\lambda} \equiv 2\pi r \cdot S \quad (\text{Eq. 3.1})$$

mostrando que o cálculo da interferência entre as ondas espalhadas não depende explicitamente dos três parâmetros s , s_0 e λ , mas unicamente da combinação $(s - s_0)/\lambda = S$. Para que as duas ondas espalhadas estejam em fase, é necessário que a diferença de caminho entre elas seja zero ou um número inteiro de comprimento de onda, ou seja, $r \cdot S \equiv (\text{inteiro ou zero})$.

Para o espalhamento elástico, cada feixe de raios X espalhado (na direção indicada por S) possui o mesmo comprimento de onda λ do feixe incidente, porém é uma onda que tem fase e amplitude própria. Conforme descrito na Eq. (3.1), a fase depende da mudança de direção do vetor S , e da posição r do espalhador. A amplitude do feixe espalhado depende da densidade eletrônica $\rho(r)$ dos espalhadores, ilustrado pelos átomos a_1 e a_2 .

na Fig. (3.1). O espalhamento a partir de uma região com densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$ pode ser expresso a partir da função espalhamento $F(\mathbf{S})$.

O espalhamento da radiação por um átomo na posição \mathbf{r}_j em relação à origem da cela unitária é dado por $\mathbf{f}_j = f_j \exp(2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S})$, onde f_j é o fator de espalhamento atômico do átomo a_j , que depende do número total de elétrons desse átomo e da direção do feixe espalhado. Uma forma conveniente de estudar o espalhamento por todos os átomos dentro do cristal é identificarmos o espalhamento resultante para a cela unitária (por ser o menor espaço físico que se repete por translação). A amplitude total da onda espalhada pela cela unitária, $F(\mathbf{S})$, será a soma das contribuições dos N átomos da cela unitária (Stout & Jensen, 1989)

$$F(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^N f_j^0 \times n_j \times \exp\left(-B_j \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}\right) \times \exp(2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S}) \quad (\text{Eq. 3.2})$$

onde f_j^0 é o fator de espalhamento atômico do j-ésimo átomo da cela unitária em seu estado fundamental. As quantidades n_j (onde $n_j \leq 1$) e B_j correspondem ao fator de ocupação e ao parâmetro de deslocamento atômico do j-ésimo átomo, respectivamente. θ é o ângulo de espalhamento correspondente a direção \mathbf{h} e λ é o comprimento de onda da radiação X. A quantidade $\mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S}$ na Eq. (3.2) corresponde ao produto escalar entre o vetor posição de cada átomo $\mathbf{r}_j = x_j \mathbf{a} + y_j \mathbf{b} + z_j \mathbf{c}$ e o vetor do espaço recíproco $\mathbf{S} = h \mathbf{a}^* + k \mathbf{b}^* + l \mathbf{c}^*$, onde x_j , y_j e z_j são as coordenadas fracionárias para o átomo particular j da cela unitária (Giacovazzo, 2002; Stout & Jensen, 1989).

A Fig. (3.2) ilustra a direção do vetor $\mathbf{S} = (\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)/\lambda$, que é perpendicular ao plano reticular que forma um ângulo θ com os feixes incidente e espalhado, coincidindo com a direção de \overline{ON} , que bi-secciona o ângulo formado entre \mathbf{s} e \mathbf{s}_0 (Giacovazzo, 2002). Como o ângulo entre a direção de observação e o feixe incidente é 2θ , temos que o módulo do vetor \mathbf{S} é dado por $\frac{|\mathbf{S}|}{2} = \frac{|\mathbf{s}|}{\lambda} \sin \theta$. Como $|\mathbf{s}| = 1$, por ser unitário, temos

$$S = \frac{2 \sin \theta}{\lambda} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

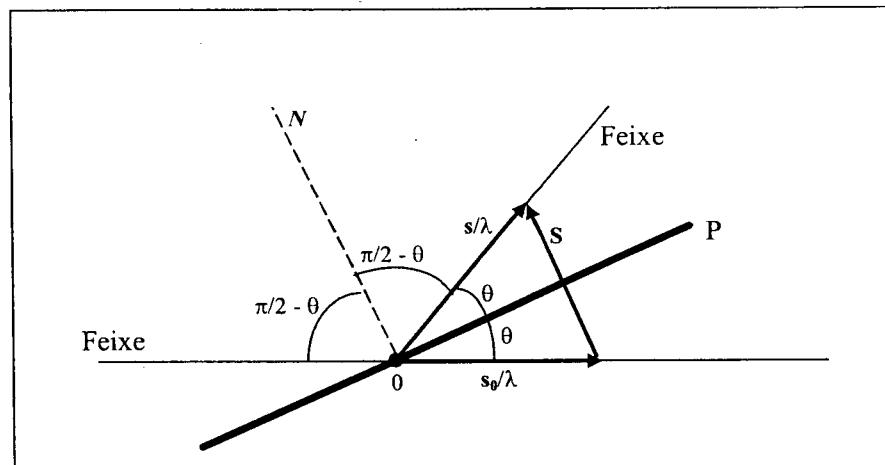


Figura 3.2 Dependência do vetor espalhamento \mathbf{S} em relação a \mathbf{s} e \mathbf{s}_0 . O diagrama demonstra o espalhamento da onda incidente para um ângulo particular 2θ . Por definição, o vetor \mathbf{S} indica a direção que satisfaz a condição de interferência construtiva para o feixe espalhado; seu módulo $|\mathbf{S}|$ é dado por $2\sin\theta/\lambda$. \mathbf{P} representa o plano reticular e \mathbf{N} é a normal a esse plano reticular.

A Eq. (3.3) nos informa qual a magnitude do vetor espalhamento \mathbf{S} . Para identificar as direções permitidas para que o vetor \mathbf{S} satisfaça a condição de interferência construtiva, considera-se o arranjo de átomos igualmente espaçado no cristal. Para isto o cristal é visto como uma rede

ideal de difração tridimensional, de forma a constituir um arranjo tridimensional infinito de pontos uniformemente espaçados ao longo de **a**, **b** e **c**. Os máximos de difração ocorrerão apenas para algumas direções particulares definida pelo vetor **S**, sendo o produto $\mathbf{r} \cdot \mathbf{S}$ nulo ou inteiro, de forma a satisfazer às condições $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h$, $\mathbf{S} \cdot \mathbf{b} = k$ e $\mathbf{S} \cdot \mathbf{c} = l$, onde h , k , e l são os índices de Miller (Giacovazzo, 2002). Essas equações satisfeitas simultaneamente estabelecem a condição de Laue para a existência de um feixe difratado na direção definida pelos índices hkl .

Uma forma de compreender estas condições de Laue é analisar o cristal como sendo constituído por um empilhamento tridimensional de celas unitárias (Drenth, 1999; Napolitano *et al.*, 2004a). Isto equivale, por exemplo, a n_1 translações na direção **a**, n_2 na direção **b** e n_3 na direção **c**. A amplitude total da onda espalhada $K(\mathbf{S})$ por esta pilha de celas unitárias será

$$K(\mathbf{S}) = F(\mathbf{S}) \times \sum_{t=0}^{n_1} \exp(2\pi it\mathbf{a} \cdot \mathbf{S}) \times \sum_{u=0}^{n_2} \exp(2\pi iu\mathbf{b} \cdot \mathbf{S}) \times \sum_{v=0}^{n_3} \exp(2\pi iv\mathbf{c} \cdot \mathbf{S}) \quad (\text{Eq. 3.4})$$

onde $F(\mathbf{S})$ é a amplitude da onda espalhada pela cela unitária, dado pela Eq. (3.2). Como o cristal é composto por uma grande quantidade dessas celas, a somatória $\sum_{t=1}^{n_1} \exp(2\pi it\mathbf{a} \cdot \mathbf{S})$ é igual a zero, a menos que o argumento da exponencial seja um número inteiro de 2π , ou seja, $\mathbf{a} \cdot \mathbf{S} \equiv \text{inteiro}$. O mesmo argumento vale para as outras duas somatórias. Dessa forma, as

únicas condições em que $K(\mathbf{S})$ é diferente de zero são as equações de Laue.

A equação fundamental $\mathbf{S} = (\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)/\lambda$ pode ser representada através de uma construção geométrica dada pela equação de Bragg, conforme representado na Fig. (3.3). O vetor recíproco \mathbf{S} é perpendicular ao plano difratador hkl . O módulo do vetor \mathbf{S} é igual ao inverso da distância interplanar d_{hkl} . Assim o módulo de $1/\mathbf{S}$ é interpretado geometricamente como a distância interplanar d_{hkl} entre planos hkl . A Eq. (3.3) fica então

$$2d_{hkl}\sin\theta = \lambda \quad (\text{Eq. 3.5})$$

que é a equação de Bragg (Napolitano *et al.*, 2004a; Napolitano *et al.*, 2004b), onde d_{hkl} corresponde à distância entre os planos hkl , θ ao ângulo de incidência, λ ao comprimento de onda do feixe incidente.

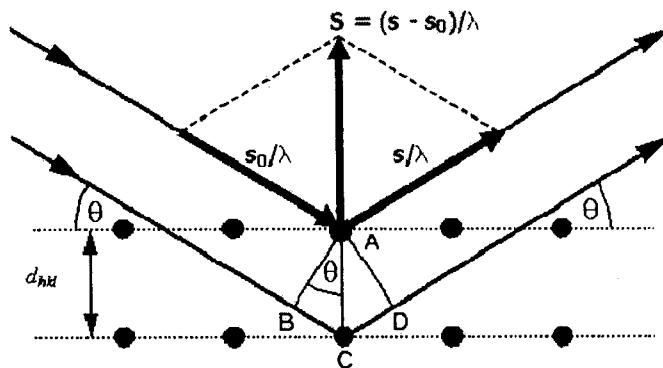


Figura 3.3 Representação esquemática (fora de escala) da equação de Bragg. θ é o ângulo entre o feixe de raios X incidente e o plano difratador hkl . A diferença de caminho entre as duas ondas espalhadas por A e C é $BC + CD = 2d_{hkl}\sin\theta$. A condição de difração é verificada quando a diferença de caminho for um múltiplo inteiro do comprimento de onda λ . O módulo do vetor \mathbf{S}_{hkl} é o inverso da distância interplanar d_{hkl} .

3.2 Criocristalografia

Criocristalografia é o conjunto de procedimentos experimentais que objetiva a proteção do cristal contra os possíveis danos causados pela radiação, através do uso de temperaturas criogênicas (em geral abaixo de 120 K). Existem vários *problemas em potencial* com uma coleta de dados de difração à temperatura ambiente (Fink, 1986; Teng, 1990). Dentre eles, pode-se citar os danos imediatos causados pela radiação, a desordem dinâmica, o uso de mais de um cristal para completar a coleta de dados, o baixo valor para a razão sinal-ruído e ainda a limitação na resolução obtida.

Além de solucionar os problemas em potencial, a crioproteção traz benefícios como: o aumento da resolução devido à redução dos parâmetros de deslocamentos atômicos associados à desordem dinâmica, o possível uso de doses mais altas de radiação, a possibilidade de trabalhar com cristais pequenos e/ou frágeis, o longo tempo de estocagem, a possibilidade de que o cristal seja utilizado em mais de uma coleta de dados e a viabilidade do estudo de estados biológicos metaestáveis.

O mecanismo pelo qual os raios X afetam o cristal depende, em geral, da dose e do tempo de exposição (Watenpaugh, 1991). No primeiro caso, a ionização provocada por fótons da radiação X causa danos imediatos às moléculas, iniciando reações químicas que destroem a ordem cristalina. Tentativas de controle por meios químicos perturbam as frágeis forças que mantêm o cristal coeso. Por ser um efeito inerente ao processo

de difração, requer-se que o cristal tenha um tamanho mínimo para resistir à coleta de dados (Dauter, 1997).

O aspecto dependente do tempo está relacionado à quantidade de solvente contida no cristal, normalmente entre 20% e 80% (o Capítulo 4 dessa tese discute em detalhes esses valores). O solvente presente no cristal, além de ser fonte de radicais livres que reagem com as macromoléculas danificando a estrutura cristalina, facilita a própria difusão dos radicais, estendendo seu campo de ação. Além disso, o aquecimento da amostra em feixes intensos de raios X acelera essa difusão e, por consequência, a velocidade de degradação do cristal, podendo alterar, inclusive, a solubilidade da macromolécula, modificando as características do cristal. A difração à baixa temperatura torna mais lenta, ou quase inexistente, a difusão desses radicais dentro do cristal. Além disso, o solvente cristalino forma uma matriz rígida, o que impede que os desarranjos locais se difundam (Fink, 1986; Watenpaugh, 1991). Desta forma, os danos causados pela radiação tornam-se muito pequenos.

Um aspecto negativo do uso de baixas temperaturas é a possibilidade de formação de gelo cristalino (cúbico ou hexagonal), pois seu padrão de difração, constituído por anéis bem definidos, provocaria a perda dos dados advindos da proteína nas camadas de resolução coincidentes com os anéis do gelo. A água pura apresenta um diagrama de fase no qual é possível, à pressão ambiente, obter-se uma forma amorfa de gelo, chamado gelo vítreo. O gelo cristalino pode ser evitado com o uso do

crioprotetor, um agente químico (glicerol, etilenoglicol e outros) capaz de reduzir a sua velocidade de formação, pois altera as propriedades físico-químicas do solvente. Desse modo, se houver um resfriamento do cristal rápido o suficiente, haverá formação apenas do gelo vítreo (Teng, 1990), cuja presença não inviabiliza o experimento.

Assim como no caso da cristalização, é necessário que condições ideais para crioproteção sejam encontradas, basicamente através da escolha do tipo e da concentração do crioprotetor (Rodgers, 1994; Rodgers, 1997). Além da ausência de gelo, espera-se que a transferência do cristal da solução-mãe da gota de crescimento para uma nova solução contendo crioprotetor não altere as propriedades do cristal, por exemplo, aumentando sua mosaicidade ou mesmo provocando trincamentos, de modo que o padrão de difração seja preservado. Uma vez encontradas as condições de crioproteção, o cristal pode ser resfriado diretamente em nitrogênio líquido (para posterior transferência para o local de coleta) ou diretamente no fluxo de nitrogênio gasoso (no próprio local de coleta). A Fig. (3.4) ilustra um cristal de proteína montado no *loop* em condições criogênicas.

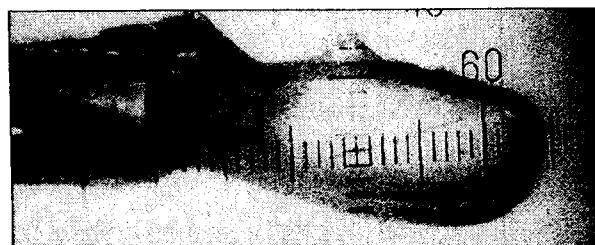


Figura 3.4 Foto ilustrativa de um cristal de proteína montado no *loop* em condições criogênicas.

Os dados de difração da sPRS foram coletados utilizando crioproteção, pela adição de 24% de etileno glicol à condição de cristalização do cristal, em fluxo de nitrogênio a 112 K (Napolitano *et al.*, 2004c).

3.3 Coleta dos dados pelo método de rotação do cristal

A Lei de Bragg dada pela Eq. (3.5) localiza as direções de interferência construtiva dos feixes difratados nos experimentos de coleta de dados. O fator de estrutura dado pela Eq. (3.2) demonstra qual seria a intensidade observada para a direção particular hkl , caso fosse possível sua medida em escala absoluta. A coleta de dados é o procedimento que objetiva obter as intensidades observáveis (Dauter, 1997; German, 1996; Giacovazzo, 2002), em escala arbitrária, para cada direção de interferência construtiva.

Tendo obtido os cristais de dimensões adequadas e, após resfriá-los à temperaturas criogênicas, pode-se montá-los em *loops* (como ilustrado na Fig. 3.4) para a coleta de dados de difração. Esta é uma etapa que requer considerável habilidade manual.

A lei de Bragg para o fenômeno da difração de raios X, vista como uma reflexão do feixe incidente nas direções de interferência construtiva, Fig. (3.3), pode ser representada no espaço recíproco por uma construção simplificada denominada esfera de Ewald (Dauter, 1997; Giacovazzo, 2002; Stout & Jensen 1989). Para isto, basta representar o fenômeno da difração de raios X por um modelo gráfico, com as direções dos feixes de onda

incidente e “refletidos” relacionados com seu comprimento de onda. Esta construção geométrica é também conhecida como esfera das reflexões (Giacovazzo, 2002). A Fig. (3.5) ilustra a geometria do espaço recíproco através da construção de Ewald.

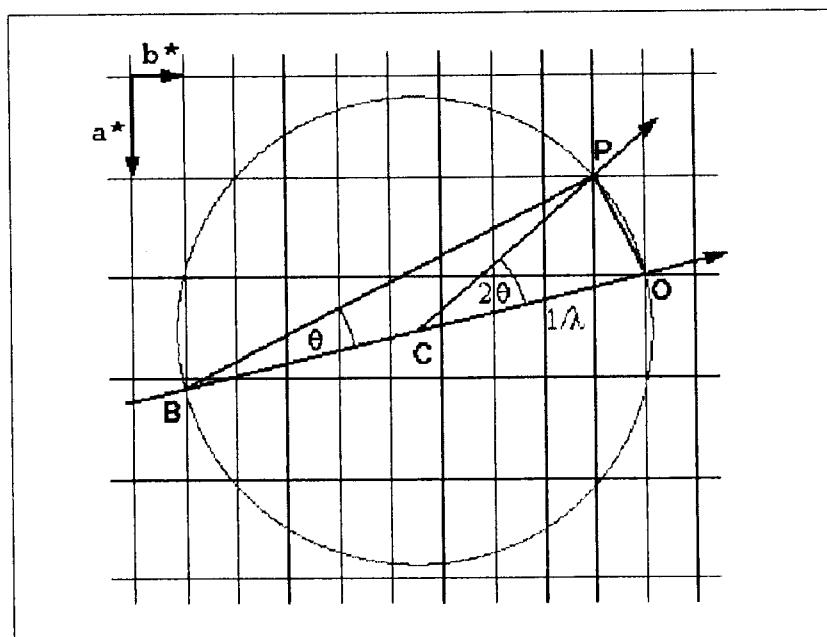


Figura 3.5 Representação geométrica do espaço recíproco através da construção de Ewald.

A construção da esfera de Ewald é feita de modo que seu raio é equivalente ao inverso do comprimento de onda dos raios X incidente no cristal, conforme mostrado na Fig. (3.5). As direções dos vetores unitários s_0 e s_1 representam as direções dos feixes incidentes e difratados, respectivamente (Stout & Jensen, 1989).

Durante a coleta de dados o cristal é rotacionado ao longo de um eixo perpendicular ao feixe incidente, como ilustrado na Fig. (3.6). À medida que o cristal rotaciona, alguns pontos recíprocos, inicialmente em condição de difração, deixam a superfície da esfera de Ewald, e outros

pontos recíprocos podem vir a tocá-la, gerando novas reflexões que serão coletadas no detector (Stout & Jensen, 1989). Dessa forma, todos os pontos observáveis que passam pela esfera de reflexão são registrados no detector e armazenados em arquivos de imagem, para serem processados (Dauter, 1997).

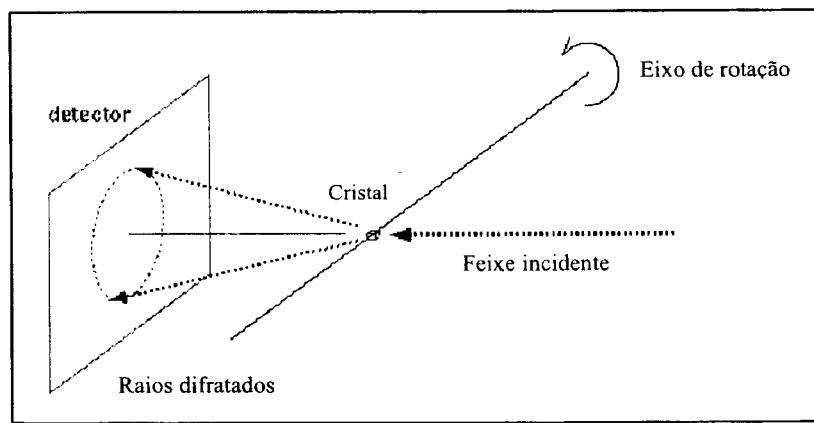


Figura 3.6 Representação de uma coleta de dados pelo método de rotação do cristal.

3.4 Processamento e redução dos dados

O método de rotação do cristal é usualmente empregado no caso de cristais de macromoléculas, de modo que o resultado experimental é um conjunto de imagens bi-dimensionais que, depois de processado, deve resultar num arquivo final contendo as intensidades observadas em escala arbitrária com os respectivos índices hkl (Dauter, 1997; Pflugrath, 1997). A este procedimento denomina-se redução de dados (Harrison *et al.*, 1985).

A estratégia de coleta a ser escolhida é particular de cada caso e leva em conta o objetivo da coleta, as qualidades do próprio cristal e os parâmetros obtidos após a indexação (Dauter, 1997). O primeiro passo é a

indexação da primeira imagem, onde os picos de difração são selecionados em uma ou mais imagens e, a partir de uma análise de suas posições, o retículo de Bravais, as dimensões da cela unitária e a orientação do cristal são determinados (Giacovazzo, 2002). Segue-se um pré-refinamento onde se executa o primeiro refinamento dos parâmetros do experimento como a distância cristal-detector e o desvio da posição do detector em relação à normal ao feixe incidente (Dauter, 1997; Harrison *et al.*, 1985). No refinamento do cristal é também levado em conta o ajuste da sua orientação e da sua mosaicidade.

Na integração das intensidades são utilizados os valores calculados com os parâmetros pré-refinados, as posições das reflexões são preditas e as intensidades correspondentes são integradas através do *profile fitting*¹. O grau de parcialidade das reflexões é calculado, os *overlaps* e *overloads*²

¹ A integração das intensidades fracas é importante no caso de macromoléculas, pois a maioria das reflexões difratadas é de baixa intensidade. *Profile fitting* corresponde ao perfil de integração obtido a partir das intensidades fortes e atribuído às fracas. Essa metodologia é usada em função da maior dificuldade de discernir entre as regiões de background e de integração para as reflexões fracas. *Profile fitting* melhora significativamente a qualidade dos dados processados.

² Quando duas ou mais reflexões têm suas regiões de integração sobrepostas ocorre o *overlap*. Quando a quantidade de fôtons que atinge a região de integração é maior do que o limite de saturação do detector ocorre o *overload*. Usualmente os *overloads* são rejeitados durante o processamento, especialmente para reflexões de baixa resolução em conjunto de dados coletados em sincrotrons.

são tratados adequadamente (Dauter, 1997; Otwinowski & Minor, 1997) e, principalmente, os erros das intensidades de cada reflexão são estimados. As reflexões são reduzidas a uma única unidade assimétrica no espaço recíproco, de acordo com a simetria de Laue previamente determinada.

O escalonamento das imagens está relacionado com fatores como o tempo de exposição e as diferentes regiões do cristal expostas que levam a imagens que se encontram em diferentes escalas de intensidade (Pflugrath, 1997; Otwinowski & Minor, 1997). Por isso, é necessário colocar todas as imagens numa única escala, determinando os fatores de escala que serão aplicados às intensidades das reflexões e aos erros associados. Em seguida, é feita a média das reflexões com os mesmos índices de Miller, já reduzidos. A detecção e as rejeição de *outliers*³ é uma parte importante desta etapa (Otwinowski & Minor, 1997).

A análise estatística inclui o processo de integração e promediação das intensidades das reflexões e envolve uma análise cuidadosa das estatísticas resultantes. Essa análise pode indicar problemas com o cristal (desordem e anisotropia) e com o aparato experimental (oscilações na intensidade do feixe e/ou problemas com o detector), erros de estratégia durante a coleta, problemas diversos (como existência de gelo ou cristal desalinhado), e ainda a indicação prematura da presença de sinal anômalo. Alguns itens importantes para essa avaliação são o comportamento do

³ Fatores de escala podem ser atribuídos somente para as reflexões com índices equivalentes, de forma que a média das intensidades para as reflexões de diferentes imagens pode ser obtida. Durante o processamento, as reflexões são reduzidas à unidade assimétrica da correspondente simetria de Laue e aquelas reflexões que violam essa simetria são denominadas *outliers* e geralmente são removidas.

número de rejeições, dos fatores de escala, R_{merge}^4 e $\langle I/\sigma(I) \rangle$ em função do número das imagens (Dauter, 1997; Otwinowski & Minor, 1997). As duas últimas estatísticas devem também ser avaliadas para cada faixa de resolução. Ao término da redução de dados obtém-se um arquivo contendo as direções e amplitudes dos fatores de estrutura observados para cada reflexão que passou pela esfera de Ewald durante a coleta de dados.

3.5 O problema da fase

Os dados obtidos através de experimentos de difração de raios-X consistem apenas na intensidade dos feixes difratados, a partir dos quais podemos obter a amplitude dos fatores de estrutura. Toda informação explícita das fases é perdida, o que torna impossível a determinação direta da estrutura a partir das intensidades medidas (Giacovazzo, 2002). Os valores máximos da densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$ determinam as posições atômicas. Essa função $\rho(\mathbf{r})$ pode ser representada por

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{S}} F(\mathbf{S}) \exp i[-2\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}] = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{S}} |F(\mathbf{S})| \exp i[-2\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{r} + \phi(\mathbf{S})] \quad (\text{Eq. 3.6})$$

Na Eq. (3.6) \mathbf{r} varia de 0 a 1 (ao longo das direções **a**, **b** e **c**) para que todo o espaço delimitado pela cela unitária seja varrido e, caso o valor de $\phi(\mathbf{S})$ fosse conhecido para cada reflexão, a estrutura seria resolvida analiticamente (Giacovazzo, 2002; Stout & Jensen, 1989). Porém o fator de

⁴ O índice estatístico R_{merge} indica a concordância entre as intensidades consideradas equivalentes, observando a simetria de Laue, durante o processamento dos dados. É definido pela seguinte expressão:

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{i \text{ (não redund.)}} \sum_{j \text{ (equiv. i)}} |I_i - \langle I_j \rangle|}{\sum_{i \text{ (não redund.)}} \sum_{j \text{ (equiv. i)}} I_i}$$

estrutura é um número complexo e composto da amplitude $F(\mathbf{S})$ e da fase $\phi(\mathbf{S})$.

O objetivo da determinação de estruturas cristalinas é localizar as posições atômicas em uma cela unitária e, através do ordenamento tridimensional dos cristais, determinar a estrutura cristalina. Em geral, a solução do problema da fase em cristalografia de proteínas é obtida por um dos seguintes métodos: Substituição Molecular, Substituição Isomorfa, Dispersão Anômala e Métodos Diretos.

3.5.1 Substituição Isomorfa e Dispersão Anômala

Quando não existem proteínas similares e/ou homólogas com estruturas conhecidas o problema da fase precisa ser resolvido de forma *ab initio*. Com esse objetivo os cristais obtidos são *derivatizados* através da introdução de um átomo pesado. Quando apenas uns poucos íons estão presentes no cristal, a sub estrutura desses átomos pesados pode ser determinada através da análise de Patterson (Ke, 1997). Se o cristal permanecer isomorfo após a introdução do átomo pesado, a técnica da Substituição Isomorfa pode explorar a estrutura do metal pesado para determinar as fases da proteína.

O método da Dispersão Anômala também resolve o problema da fase de forma *ab initio*, através da presença de espalhadores anômalos, que podem ser átomos pesados. Quando apenas uns poucos espalhadores anômalos são observáveis, sua subestrutura pode ser determinada através da análise de Patterson (Hendrickson & Ogata, 1997). Pequenas variações

nas componentes real e imaginária do fator de espalhamento atômico para um átomo que espalha anômalamente, quando o comprimento de onda do feixe incidente se aproxima da sua borda de absorção, podem ser exploradas para determinar as fases da estrutura nativa. Usualmente uma fonte de raios X síncrotron é necessária para o experimento de difração.

3.5.2 Métodos Diretos

O termo Métodos Diretos é aplicado à metodologia que objetiva resolver o problema da fase pelo uso das relações de fase baseadas nas intensidades medidas experimentalmente (Stout & Jensen, 1989; Napolitano, 2001). É um método amplamente utilizado na solução do problema da fase para moléculas pequenas e promissor para a cristalografia de proteínas. A Fig. (3.7) ilustra a representação ORTEP (Johnson, 1965) de estruturas resolvidas através dos Métodos Diretos para dois inibidores (Napolitano *et al.*, 2003a; Napolitano *et al.*, 2003b) da PRTase adenina-fosforribosil-transferase (APRT).

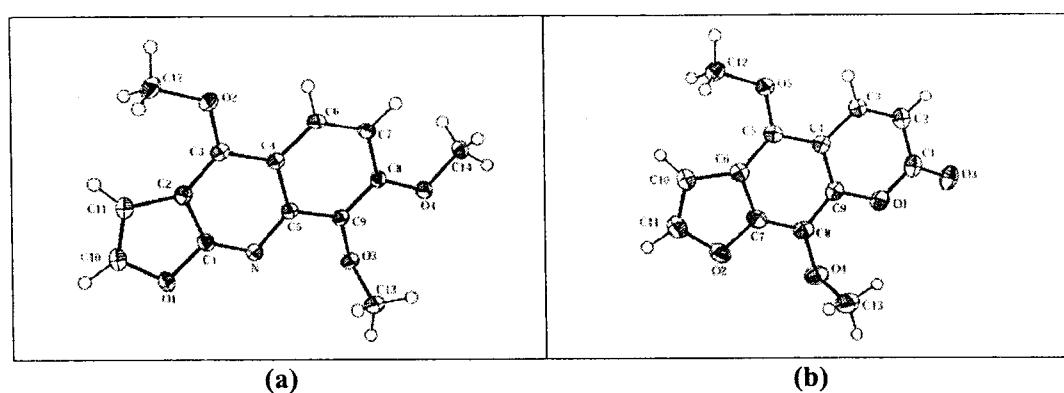


Figura 3.7 Representação ORTEP (Johnson, 1965) de dois inibidores da enzima adenina-fosforribosil-transferase (APRT). Os elipsóides de deslocamento atômico estão representados com 30% de probabilidade para ambas figuras. (a) Skimianina $C_{14}H_{13}NO_4$ (Napolitano *et al.*, 2003a); (b) Isopimpinelin $C_{13}H_{10}O_5$ (Napolitano *et al.*, 2003b).

O atual estado da arte no trabalho cristalográfico em pequenas moléculas faz com que uma alta porcentagem das estruturas seja resolvida, refinada e analisada sem maiores problemas. Porém uma pequena e significativa parte requer interferências e tomadas de decisões durante o trabalho cristalográfico. Para esse pequeno grupo a validação (Napolitano *et al.*, 2004b; Spek, 2003) se reveste de importância especial, uma vez que a interferência no processo será guiada pelos 'parâmetros suspeitos', observados antes ou durante a validação pelos olhos atentos do cristalógrafo. Essa etapa traz segurança e confiança às conclusões químicas e/ou bioquímicas obtidas sobre o modelo construído.

Apesar de alguns poucos exemplos de sucesso dos Métodos Diretos para macromoléculas (Burla *et al.*, 2003), esta teoria é fortemente limitada pelo elevado número de átomos a serem alocados na cela unitária. Adicionalmente o elevado número de intensidades fracas observadas no padrão de difração, para um cristal de proteína, diminui a confiança nas fases indicadas a partir das relações de probabilidades (Stout & Jensen, 1989).

3.6 Resultados da coleta e processamento de dados da sPRS

Quatro conjuntos de dados de difração de cristais da sPRS, crescidos em sulfato de amônio 2,2 M adicionado de 5% v/v do Isopropanol, ilustrados na Fig. (2.2a), que difrataram até 3.3 Å, foram coletados na linha de luz CPr (Polikarpov *et al.*, 1998) do Laboratório Nacional Luz Síncrotron [LNLS], Campinas, SP, Brasil. As coletas foram

feitas em fluxo de nitrogênio a 112 K através do método de rotação do cristal, utilizando comprimento de onda $\lambda = 1,431 \text{ \AA}$. Para cada conjunto de dados a auto-indexação da primeira imagem de difração foi obtida pelo programa DENZO (Otwinowski & Minor, 1997), e os valores aproximados dos parâmetros de cela e da orientação do cristal foram encontrados e assim estabelecida a estratégia da coleta de dados (Dauter, 1997). A estrutura cristalina é ortorrômbica primitiva, com simetria *mmm* para o grupo de Laue e simetria 222 para o grupo pontual (Stout & Jensen, 1989).

Os dados coletados foram processados e promediados utilizando tanto o programa MOSFILM (Leslie, 1992) quanto o programa SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997). A integração das imagens de difração e o refinamento das previsões das reflexões foram conduzidos incluindo, na função de refinamento e no cálculo dos perfis de integração, dados com $I/\sigma(I) > 2,5$, até a resolução máxima de 3.3 \AA . A comparação entre os quatro conjunto de dados obtidos revelam um polimorfismo na estrutura cristalina, conforme pode ser visto na Tabela (3.1).

Tabela 3.1 Conjunto de dados coletados no LNLS ilustrando os parâmetros cristalográficos.

Conjunto	Imagens coletadas	Mosaicidade	Resolução (Å)	$R_{\text{merge}} (\%)$	$\langle I/\sigma(I) \rangle$	Parâmetros cristalográficos (Å)		
						<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
1	174	0,47	3,3	14,2	8,5	149,32	152,28	212,23
2	132	0,54	3,3	18,7	6,2	150,67	150,67	220,36
3	78	0,62	3,3	16,7	6,1	150,75	150,75	221,26
4	139	0,48	3,3	10,3	9,5	149,35	152,65	213,19

Objetivando dados coletados numa linha de alta brilhança, de forma que resultasse em um conjunto de melhor qualidade do que aqueles

obtidos no LNLS, outro conjunto de dados foi coletado na linha 42 (*Industrial Macromolecular Crystallography Association - Collaborative Access Team*) do *Argonne Photon Source [APS]* situado no *Argonne National Laboratory*, Argonne, IL, USA. Foram coletadas 180 imagens de um cristal sPRS que difratou à mesma resolução (3,3 Å) a 100 K, também pelo método de rotação do cristal, utilizando comprimento de onda $\lambda = 0,900 \text{ \AA}$.

O processamento desses dados obtidos no APS apresenta seguintes parâmetros cristalográficos: $a = 149.54 \text{ \AA}$, $b = 151.82 \text{ \AA}$, $c = 221.09 \text{ \AA}$, $R_{\text{merge}} = 14,9 \%$, completeza igual a 85,9 % com $I/\sigma(I) > 3$ e mosaicidade igual a 0,59°. Os dados confirmam o polimorfismo quando comparados com a Tabela (3.1), porém os resultados melhores continuaram sendo do conjunto denominado **4**, coletado no LNLS, de forma que o trabalho cristalográfico foi levado a adiante com os dados do conjunto **4**.

A Tabela (3.2) mostra as extinções sistemáticas do arquivo final, obtido com o SCALEPACK, revelando que o grupo espacial é o $P22_1$, (que foi rotacionado para o grupo convencional $P2_12_12$). A Tabela (3.3) mostra alguns parâmetros cristalográficos obtidos a partir da coleta de dados, bem como as estatísticas que qualificam o processamento.

Tabela 3.2 Lista das extinções ($h00$; h ímpar), ($0k0$; k ímpar) e ($00l$; l ímpar) confirmando o grupo espacial não convencional $P22_{1,2}$.

h	k	l	Intensidade	Sigma	l/Σ
0	0	43	5.8	59.5	0.1
0	0	45	56.7	89.7	0.6
0	0	47	-76.5	80.1	-1
0	0	49	-87.6	93.2	-0.9
0	0	51	-9.6	59.4	-0.2
0	0	53	31.9	130.1	0.2
0	0	55	288.9	222.1	1.3
0	0	57	-93.9	130.5	-0.7
0	0	59	31.8	181.3	0.2
0	3	0	-1.2	2.2	-0.6
0	5	0	1.1	3	0.4
0	7	0	0.1	9.7	0
0	9	0	-1.1	8.7	-0.1
0	11	0	-10.7	12	-0.9
0	13	0	11.8	12.4	0.9
0	15	0	13.3	13.9	1
0	17	0	-10	17	-0.6
0	19	0	-7.2	16.7	-0.4
0	21	0	-4.9	17.8	-0.3
0	23	0	-13.7	18.7	-0.7
0	25	0	-0.9	26	0
0	27	0	3.2	27.1	0.1
0	29	0	13	26	0.5
0	31	0	-8.1	32.5	-0.2
0	33	0	-25.6	37.2	-0.7
0	35	0	3.8	34.1	0.1
0	37	0	-25.1	52.6	-0.5
0	39	0	54.3	42.5	1.3
0	41	0	-17.9	41.3	-0.4
0	43	0	22	47.1	0.5
3	0	0	-4.3	5.1	-0.8
5	0	0	3	4.3	0.7
7	0	0	720.9	207.2	3.5
9	0	0	138.5	41.3	3.4
11	0	0	5.3	18.1	0.3
13	0	0	1476.1	419.5	3.5
15	0	0	5124.5	1454.6	3.5
17	0	0	81.8	36.2	2.3
19	0	0	170.3	54.9	3.1
21	0	0	114.4	44.5	2.6
23	0	0	8.2	23.3	0.4
25	0	0	25.2	39.7	0.6
27	0	0	36.3	37.1	1
29	0	0	346.6	82.7	4.2
31	0	0	527.6	124.2	4.2
33	0	0	83.2	39.3	2.1
35	0	0	133.2	63.9	2.1
37	0	0	170.6	57.9	2.9
39	0	0	823.6	162.8	5.1
41	0	0	72	71.4	1

Tabela 3.3 Resumo da análise qualitativa para os conjuntos de dados coletados no LNLS para a sPRS. Valores entre parênteses referem-se à faixa de resolução (3.69-3.50Å).

Grupo espacial	<i>P2₁2₁2</i>
Cela unitária (Å)	<i>a</i> = 213.2, <i>b</i> = 152.6 & <i>c</i> = 149.3
Resolução (Å)	40 - 3.5
Rotação por imagem (°)	1.0
Tempo de exposição (s)	300
Temperatura (K)	115
Reflexões medidas	850219
Reflexões independentes	69287
Mosaicidade (°)	0.36
Completeza (%)	99.7 (99.7)
Multiplicidade	5.3 (5.3)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	3.9 (1.6)
R_{merge} (%)	10.3 (43.2)

3.7 Referências bibliográficas

- Burla, M. C.; Carrozzini, B.; Cascarano, G. L.; Caro, L.; Giacovazzo, C. & Polidoria, G. (2003). *Ab initio protein phasing at 1.4 Å resolution*. **Acta Cryst.** **A59**, 245.
- Cullity, B. D. (1978). **Elements of X-ray diffraction**. Addison-Wesley Publishing Company, Inc. Massachusetts.
- Dauter, Z. (1997). *Data Collection Strategy*. In **Methods in Enzymology, Vol. 276. Macromolecular Crystallography Part A**. C.W. Carter and R.M. Sweet ed. Academic Press, San Diego, 326.
- Drenth, J. (1999). **Principles of Protein X-ray Crystallography**. 2nd ed., Springer, New York.
- Fink, A.L. (1986). *Effects of cryoprotectants on enzyme structure*. **Cryobiology** **23**, 28.
- Garman, E.F. (1996). Modern Methods for Rapid X-Ray Diffraction Data Collection from Crystals of Macromolecules. In **Crystallographic Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology**. Vol. 56. C. Jones, B. Mulloy, and M.R. Sanderson (ed.) Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Giacovazzo, C. (2002). *The diffraction of X-ray by crystals*. In: **Fundamentals of Crystallography, 2nd Ed.** Editado por Giacovazzo, C. IUCr e Oxford Science Publication, New York.

- Harrison, S.C., Winkler, F.K., Schutt, C.E. and Durbin, R.M. (1985). Oscillation Method with Large Unit Cells. In **Methods in Enzymology, Vol. 114. Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A.** H.W. Wyckoff, C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff ed. Academic Press, Orlando, 452.
- Henderson, R. (1990). Cryoprotection of protein crystals against radiation damage in electron and x-ray diffraction. **Proc. R. Soc. Lond. B** **241**, 6.
- Hendrickson, W.A. & Ogata, C.M. (1997) Phase Determination from Multiwavelength Anomalous Diffraction Measurements. In **Methods in Enzymology, Vol. 276. Macromolecular Crystallography Part A.** C.W. Carter and R.M. Sweet ed. Academic Press, San Diego, 494.
- Johnson, C. K. (1965). ORTEP. **Report ORNL-3794.** Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA, 1965.
- Ke, H. (1997). Overview of Isomorphous Replacement Phasing. In **Methods in Enzymology, Vol. 276. Macromolecular Crystallography Part A.** C.W. Carter and R.M. Sweet ed. Academic Press, San Diego, 448.
- Leslie, A. (1992). *Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data.* Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography, 26, no page numbers.
- Napolitano, H. B. (2001). Determinação por Difração de Raios-X das Estruturas Cristalinas de Enaminonas e N-Benzoi-Guanidina com Potencial Atividade Anticonvulsivante. **Dissertação de mestrado.** Instituto de Física, UFG.
- Napolitano, H. B.; Silva, M.; Ellena, J.; Rocha, W. C.; Vieira, P. C.; Thiemann, O. H. & Oliva, G. (2003a). Redetermination of skimmianine: a new inhibitor against the Leishmania APRT enzyme. **Acta Cryst. E59**, 1503.
- Napolitano, H. B.; Silva, M.; Ellena, J.; Rocha, W. C.; Vieira, P. C.; Thiemann, O. H. & Oliva, G. (2003b). Redetermination and comparative structural study of isopimpinellin: a new inhibitor against the Leishmania APRT enzyme. **Acta Cryst. E59**, 1506.
- Napolitano, H. B.; Vencato, I.; Lariucci, C. & Mascarenhas, Y. P. (2004a). *Difração de raios X e a lei de Bragg. Monografia de Ensino.* Sociedade Brasileira de Cristalografia. Aceito para publicação.
- Napolitano, H. B.; Ellena, J. & Cunha, S. (2004b). *Cristalografia de pequenas moléculas — Quo vadis? Química Nova.* Artigo Submetido.
- Napolitano, H. B.; Sculaccio, S. A.; Thiemann, O. H. & Oliva, G. (2004c). Preliminary crystallographic analysis of sugarcane phosphoribosyl-pyrophosphate synthase. **Acta Cryst. D.** Artigo submetido.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-Ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. In: **Methods in Enzymology, Vol. 276. Macromolecular Crystallography Part A.** C.W. Carter and R.M. Sweet ed. Academic Press, San Diego, 307.
- Pflugrath, J.W. (1997). Diffraction-Data Processing for Electronic Detectors: Theory and Practice. In **Methods in Enzymology, Vol. 276. Macromolecular Crystallography Part A.** C.W. Carter and R.M. Sweet ed. Academic Press, San Diego, 286.

- Polikarpov, I., Perles, L. A., de Oliveira, R.T., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt, R. & Craievich, A. (1998). Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. *J. Synch. Rad.* **5**, 72.
- Rodgers, D.W. (1994). Cryocrystallography, *Structure* **2**, 1135.
- Rodgers, D.W. (1997). Practical Cryocrystallography. In **Methods in Enzymology, Vol. 276. Macromolecular Crystallography Part A.** C.W. Carter and R.M. Sweet ed. Academic Press, San Diego, 183.
- Schwarzenbach, D. (1996). **Crystallography**. John Wiley e Sons. Chichester.
- Spek, A. L. (2003). *Single-crystal structure validation with the program PLATON.* *J. Appl. Cryst.* **36**, 7.
- Stout, G. & Jensen, L. H. (1989). **X-ray structure determination – A practical guide.** 2nd ed, The Macmillan Company. London.
- Teng, T.Y. (1990) Mounting of crystals for macromolecular crystallography in a freestanding thin film. *J. Appl. Crystallogr.* **23**, 387.
- Watenpaugh, K.D. (1991) Macromolecular crystallography at cryogenic temperatures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 1012.

4. Caracterização inicial da sPRS

4.1 Análise estatística das intensidades e do número de Matthews

Um dos primeiros passos no trabalho de determinação da estrutura cristalográfica de proteínas é a análise do conteúdo do solvente existente no cristal (McPherson, 2003; Carter & Sweet, 1997). Essa informação é necessária, por exemplo, na estratégia escolhida para faseamento por Substituição Molecular ou no procedimento de *solvent flattening* (Carter & Xiang, 1997). O cálculo dessa fração do cristal ocupada por solvente é usualmente baseado no volume de Matthews [V_M] que, em seguida, é comparada à distribuição estatística experimental, obtida primeiramente por B. W. Matthews, em seu trabalho clássico (Matthews, 1968).

A Fig. (4.1) apresenta o gráfico obtido por Matthews para 116 estruturas cristalinas de proteínas ilustrando a largura da distribuição. Ele observou que os coeficientes angulares das retas V_M , que incluíam todos os dados analisados da Fig. (4.1), eram 1,68 e 3,53 $\text{\AA}^3/\text{Da}$ para os limites inferior e superior, respectivamente. Esses valores para o V_M correspondem às frações 27 e 78% do cristal ocupado por solvente (sendo 43% o valor mais comum).

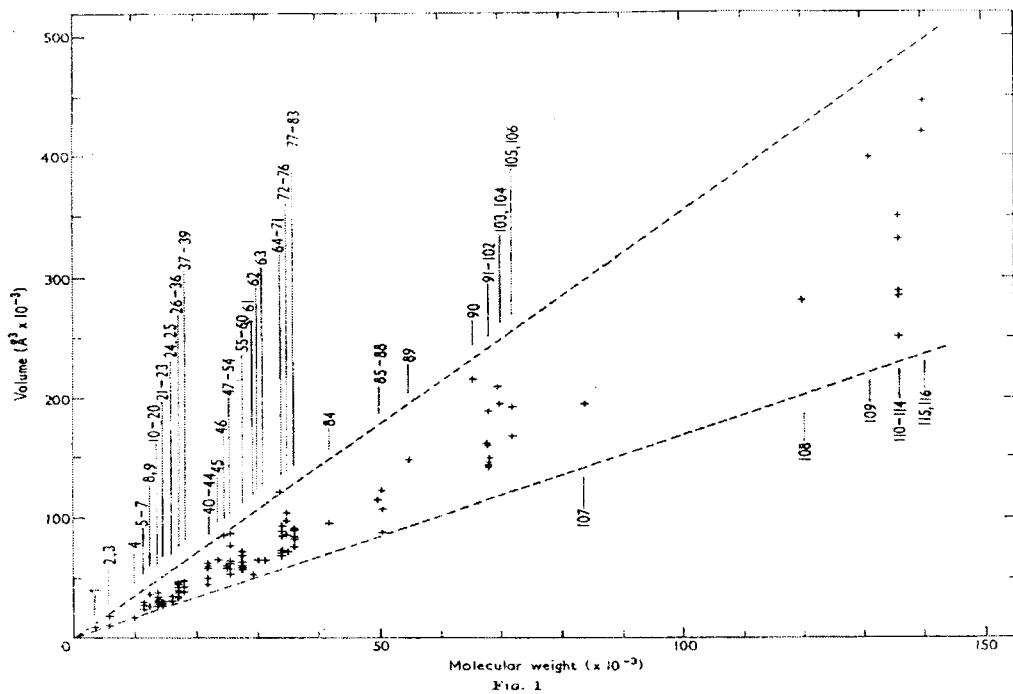


Figura 4.1 Gráfico ilustrando a correlação entre peso molecular e volume da cela unitária para um conjunto de 116 proteínas (adaptado de Matthews, 1968).

Kantardjieff & Rupp (2003) fizeram uma análise mais atual da distribuição para o V_M baseada num conjunto de 10.471 estruturas disponíveis no *Protein Data Bank* [PDB] (Berman *et al.*, 2000). Essa freqüência da distribuição do V_M obtida é comparada com aquela obtida por Matthews em 1968, como pode ser visto na Fig. (4.2). O intervalo da distribuição é ampliado e o valor de V_M mais provável corresponde a 47% do volume do cristal ocupado por solvente. Kantardjieff & Rupp observaram ainda que os cristais que difratavam a alta resolução possuíam, em geral, pequena fração do seu volume ocupado por solvente, indicando que cristais com elevado grau de empacotamento difratam melhor do que aqueles com baixo empacotamento. A resolução é assim implementada

como uma informação adicional objetivando maior precisão no cálculo do V_M , de forma a diminuir ambigüidades para a fração do cristal ocupada por solvente.

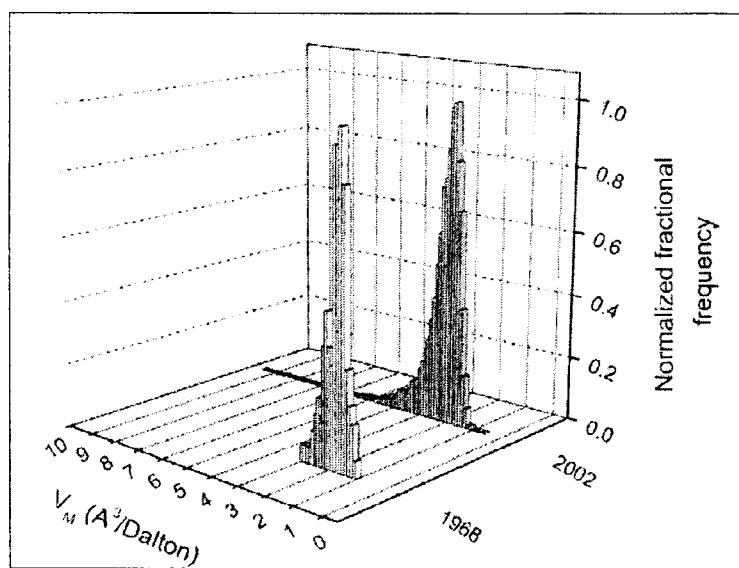


Figura 4.2 Gráfico tri-dimensional comparando a distribuição estatística do V_M para 1968 e 2002. Figura adaptada de Kantardjieff & Rupp (2003).

Andersson & Hovmöller (1999) apresentaram uma análise estatística alternativa para o conteúdo de solvente, explorando teoricamente a correlação entre o intervalo esperado para V_M e o grupo espacial. Assim, grupos espaciais com alto coeficiente de empacotamento (Giacovazzo, 2002), como $P2_{1}2_{1}2_{1}$ ou C2, devem apresentar uma largura de distribuição mais estreita do que as esperadas para grupos com baixo índice de empacotamento, como P222 ou P422. Os resultados obtidos sugerem portanto uma dependência do intervalo esperado para V_M em relação ao grupo espacial. Contudo, o valor utilizado para a densidade volumétrica média ($1,22 \text{ g/cm}^3$) foi fortemente combatido por Quillin & Matthews (2000),

argumentando a favor de um valor mais próximo do valor clássico (1,37 g/cm³).

Ambos trabalhos (Andersson & Hovmöller, 1999; Kantardjieff & Rupp, 2003) objetivam facilitar o cálculo da fração de solvente presente nos cristais protéicos, através do estreitamento do intervalo de V_M em suas distribuições estatísticas. Todavia, em muitos casos, sobretudo naqueles envolvendo macromoléculas multi-oligoméricas, permanece a ambigüidade na análise do conteúdo de solvente. Nesse contexto, uma análise teórica do trabalho original de Matthews (1968) abre a possibilidade para a descrição de um método alternativo de determinação da fração de solvente, presente em cristais de proteínas, a partir da análise das intensidades difratadas (Napolitano *et al.*, 2003a).

O fator de estrutura definido na Eq. (3.2) corresponde à soma das ondas difratadas por uma cela unitária do cristal para uma dada direção. Expressa a soma do poder de espalhamento de todos os átomos da cela unitária em relação a um plano hkl (Stout & Jensen, 1989). Está relacionada, portanto, à distribuição dos átomos da cela unitária e, a partir do conhecimento da sua distribuição eletrônica, pode-se calcular os fatores de estrutura correspondentes. A função $F(\mathbf{S})$ é não nula nos nodos do retículo cristalino recíproco (Giacovazzo, 2002; Stout & Jensen, 1989), sendo a transformada de Fourier da densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$ dada pela da Eq. (3.6).

A intensidade de cada reflexão é sempre medida em escala arbitrária, e depende de vários fatores, como (Drenth, 1999): volume da cela, volume do cristal, tempo de exposição ao feixe dos raios X, distância do cristal em relação ao detector, corrente e tensão do gerador do difratômetro. A formulação especial dos fatores de estrutura, denominada fator de estrutura normalizado, normaliza esta escala arbitrária das intensidades. É definido de forma que o valor quadrático médio seja igual à unidade, qualquer que seja o conjunto de intensidades coletadas (para os vetores recíprocos \mathbf{S}), sobre as quais a média é calculada. Sua definição é dada por (Drenth, 1999; Giacovazzo, 2002)

$$E(\mathbf{S}) = \frac{F(\mathbf{S})}{\left(\varepsilon \sum_{j=1}^N f_j^2 \right)^{\frac{1}{2}}} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

onde ε é um número inteiro que leva em conta o efeito da simetria do grupo espacial sobre as intensidades, e a quantidade entre parênteses no denominador é a intensidade média esperada. Enquanto os fatores de estrutura 'medidos experimentalmente' correspondem a N átomos distintos com dimensão finita que vibram termicamente, os fatores de estrutura normalizados correspondem a um modelo com N átomos iguais, puntiformes e sem vibração térmica, além de não levarem em conta o ângulo de espalhamento θ (Cullity, 1978; Schwarzenbach, 1996). A Fig. (4.3) apresenta o comportamento do fator de espalhamento atômico, ilustrando em vermelho (Fig. 4.3b) o comportamento do átomo puntiforme em repouso.

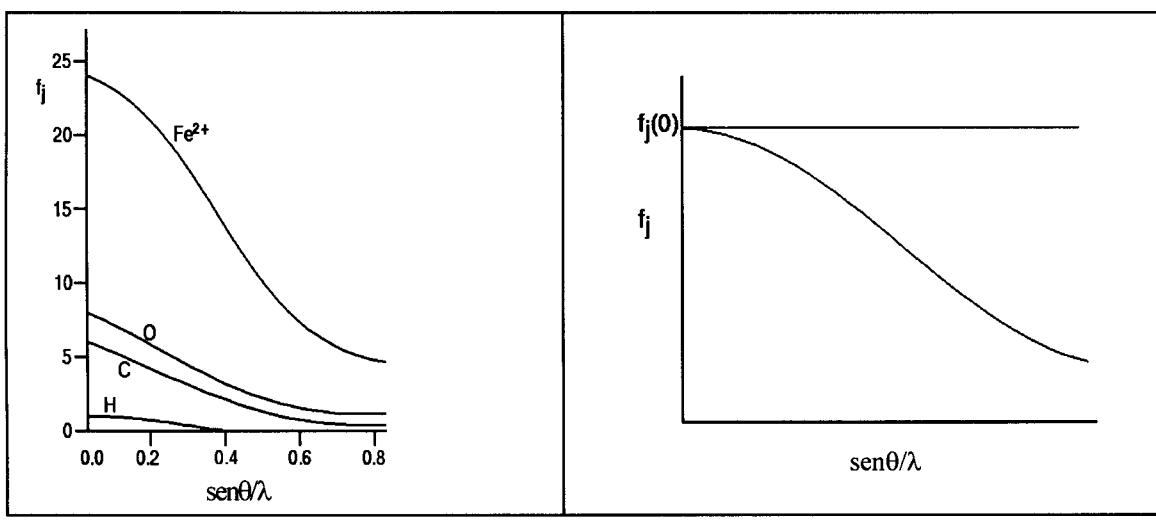


Figura 4.3 Dependência do fator de espalhamento atômico f em relação a $\sin\theta/\lambda$. $f_j(0) = Z$ corresponde ao número de elétrons do átomo. (a) Ilustração quantitativa do fator de espalhamento atômico para alguns átomos típicos em estruturas cristalinas; (b) Comportamento qualitativo para um átomo qualquer; a reta horizontal em vermelho refere-se a um átomo hipotético pontual e estacionário.

O valor médio da distribuição dos fatores de estrutura normalizados é dado por (Giacovazzo, 2002; Stout & Jensen, 1989)

$$\langle |E(S)|^2 \rangle = \frac{\sum |E(S)|^2}{N_{ref}} = 1 \quad (\text{Eq. 4.2})$$

onde N_{ref} é o número total de reflexões. Verifica-se a partir da Eq. (4.2) que a somatória sobre o número total de reflexões (numerador da Eq. 4.2) é igual a N_{ref} . Como a quantidade total de reflexões N_{ref} é diretamente proporcional ao volume da cela unitária (Ladd & Palmer, 1994), o trabalho de Matthews (1968) corresponde a uma análise da distribuição estatística dos fatores de estrutura normalizados avaliados *versus* o peso molecular das proteínas. Essa identificação nos motivou a buscar outras formas de distribuições estatísticas que fossem úteis na análise do conteúdo de

solvente, especialmente para o caso da sPRS constituída de um homohexâmero de 252 KDa.

4.2 Avaliação do conteúdo de solvente

O cálculo do V_M exige *a priori* o conhecimento do peso molecular da proteína e do volume da cela unitária (Drenth, 1999; Matthews, 1968). Adicionalmente, o número de proteínas contidas na cela unitária é uma informação necessária. Nem sempre o resultado obtido leva a uma única escolha do número de moléculas na cela, particularmente quando este número é relativamente grande. Isso ocorre devido à largura da distribuição de Matthews, conforme apresentado na Fig. (4.1), que, às vezes, leva a ambigüidades no número de unidades protéicas, especialmente se a proteína apresenta estrutura quaternária multimonomérica.

Uma forma alternativa, baseada no teorema de Parseval para a transformada de Fourier (Brigham, 1974) e na análise estatística das intensidades feita por Wilson (Stout & Jensen, 1989; Wilson, 1950), é desenvolvida, objetivando estimar o conteúdo de solvente de um dado cristal. Wilson mostrou que a intensidade média de uma reflexão geral é

$$\langle I(S) \rangle = \sum_{j=1}^N f_j^2 \quad (\text{Wilson, 1950}). \quad \text{Partindo desse resultado, ele analisou a}$$

distribuição estatística das intensidades chegando a expressão

$$\ln \frac{\langle I_{\text{exp}} \rangle}{\sum_j (f_j^0)^2} = \ln \left[K \exp \left(\frac{-2B \sin^2 \theta}{\lambda^2} \right) \right] = \ln K - 2B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

onde f_j^0 corresponde ao fator de espalhamento do átomo em repouso, λ ao comprimento de onda da radiação X, B ao parâmetro de deslocamento atômico (Castellano & Main, 1985) e K à constante arbitrária que leva as intensidades coletadas $I_{exp}(\mathbf{S})$ à escala absoluta, devendo satisfazer a relação $\langle I_{exp}(\mathbf{S}) \rangle = K \langle I_{abs}(\mathbf{S}) \rangle$. A Eq. (4.3) contém três variáveis desconhecidas: K , B e $\sum_j (f_j^0)^2$, de forma que a utilidade prática de levar o conjunto coletado da escala arbitrária para escala absoluta fica limitada ao conhecimento, *a priori*, da quantidade de elétrons dentro da cela unitária. Dada a existência do solvente nos cristais de proteínas que, conforme citado anteriormente, ocupam entre 20 e 80% do volume, esta avaliação se torna prejudicada.

Representando cada átomo protéico por um átomo hipotético de número atômico médio igual à Z_M , obtém-se $\sum_j (f_j^0)^2 = N_{at} (Z_M \bar{f}^0)^2$, onde \bar{f}^0 corresponde à curva padrão do espalhamento atômico (Giacovazzo, 2002; Stout & Jensen, 1989). Uma hipótese similar é amplamente utilizada, com sucesso, na teoria dos Métodos Diretos (Napolitano, 2001; Viterbo, 2002), para a solução de estruturas cristalográficas de moléculas pequenas. Esta sugestão surge da constatação que as moléculas de proteínas são constituídas por átomos de composição atômica pouco variável.

Assim pode-se re-escrever o gráfico de Wilson (Drenth, 1999), Eq. (4.3), da seguinte forma

$$\ln \frac{\langle I_{\text{exp}} \rangle}{\left(Z_M f^0 \right)^2} = \ln(KN_{\text{at}}) - 2B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

A Eq. (4.4) contém somente duas incógnitas, KN_{at} e B , tendo em vista que, em geral, macromoléculas possuem um único valor de Z_M e que proteínas possuem a mesma densidade eletrônica (Quillin & Matthews, 2000). O valor de Z_M pode assim ser obtido por alguma análise estatística do conjunto de estruturas já depositadas em banco de dados como o PDB (Berman *et al.*, 2000). A quantidade (KN_{at}) guarda conjuntamente as informações do fator de escala K e da quantidade de átomos ordenados dentro da cela unitária, e pode ser obtida a partir da aplicação experimental do teorema de Parseval, demonstrado por (Brigham, 1974)

$$\int_{-\infty}^{\infty} |F(\mathbf{S})|^2 d\mathbf{S} = \int_{\text{cela}} |\rho(\mathbf{r})|^2 dr \quad (\text{Eq. 4.5})$$

A Eq. (4.5) diz que a soma das intensidades difratadas (em escala absoluta) sobre todo o espaço recíproco é numericamente igual a integral da densidade eletrônica sobre toda a cela unitária. A idéia central é que a quantidade total de energia, difratada por uma cela, está diretamente relacionada com a quantidade de átomos espalhadores presentes na cela unitária. O primeiro termo (somatório sobre todas as intensidades

difratadas para o estado cristalino) e o segundo (integral da densidade eletrônica elevada ao quadrado) da Eq. (4.5) são respectivamente iguais a

$$\int_{-\infty}^{\infty} |F(\mathbf{S})|^2 d\mathbf{S} \approx \sum_{\mathbf{S} \neq 0} I_{abs} + I_{abs}(000) = \sum_{\mathbf{S} \neq 0} I_{abs} + (N_{at} Z_M)^2 \quad (\text{Eq. 4.6})$$

$$\int_{cela} |\rho(\mathbf{r})|^2 d\mathbf{r} \approx N Z_M \left\langle \int \rho_M^2(\mathbf{r} - \mathbf{r}_M) d\mathbf{r} \right\rangle = N_{at} Z_M \xi \quad (\text{Eq. 4.7})$$

onde $\rho_M^2(\mathbf{r} - \mathbf{r}_M)$ é o quadrado da densidade eletrônica média no domínio da cela unitária e ξ é o valor médio da integral do quadrado da densidade eletrônica, para o átomo hipotético com número atômico Z_M , sendo igual a $\xi \equiv \left\langle \int \rho_{at}^2(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \right\rangle$. Aplicando as duas equações acima na Eq. (4.5) chega-se à relação aproximada

$$\sum_{\mathbf{S} \neq 0} \left(\frac{I_{exp}}{KV N_{at}} \right) \approx \xi Z_M - \frac{N}{V} (Z_M)^2 \quad (\text{Eq. 4.8})$$

onde V é o volume da cela unitária. A viabilidade prática e genérica da Eq. (4.8) precisa levar em conta contribuições relevantes como o parâmetro de deslocamento atômico B (particular de cada cristal) e o espalhamento advindo do solvente desordenado. Adicionalmente, parâmetros como completeza, resolução e presença de átomos pesados, dentre outros, precisam ser considerados. Contudo, a Eq. (4.8) mostra que existe uma relação útil entre a soma das intensidades difratadas (em escala arbitrária) e o conteúdo eletrônico ordenado. A quantidade KN_{at} para uma estrutura desconhecida pode ser obtida a partir da Eq. (4.4), fazendo uso somente

do conjunto de dados reduzidos. O valor médio Z_M pode ser obtido através do coeficiente angular dessa curva.

O gráfico da Fig. (4.4) ilustra a consistência da previsão teórica da Eq. (4.8) para o conjunto das 213 estruturas cristalográficas, extraídas do PDB, apresentado na Tabela (4.1). A seleção dessas estruturas foi realizada através do mecanismo de busca do PDB, de forma a descartar estruturas de carboidratos, ácidos nucléicos e seus complexos com proteínas (retendo apenas estruturas de proteínas), e a descartar ainda proteínas que apresentassem um grau de homologia maior que 90% com outro item do mesmo grupo, evitando a presença de itens redundantes no conjunto final. Entre os itens homólogos, o critério de escolha foi baseado na resolução máxima dos correspondentes dados de difração. O peso molecular do conteúdo da cela variou entre 4,6 e 306 kDa.

Os dados apresentados na Fig. (4.4) correspondem aos fatores de estrutura calculados em vez dos observados, obtidos através do programa SFALL do pacote de programas *Collaborative Computational Project Number 4* [CCP4] (CCP4, 1994), evitando assim ajustes com a resolução, a completeza, a presença de átomo pesado e a contribuição do solvente desordenado, entre outras.

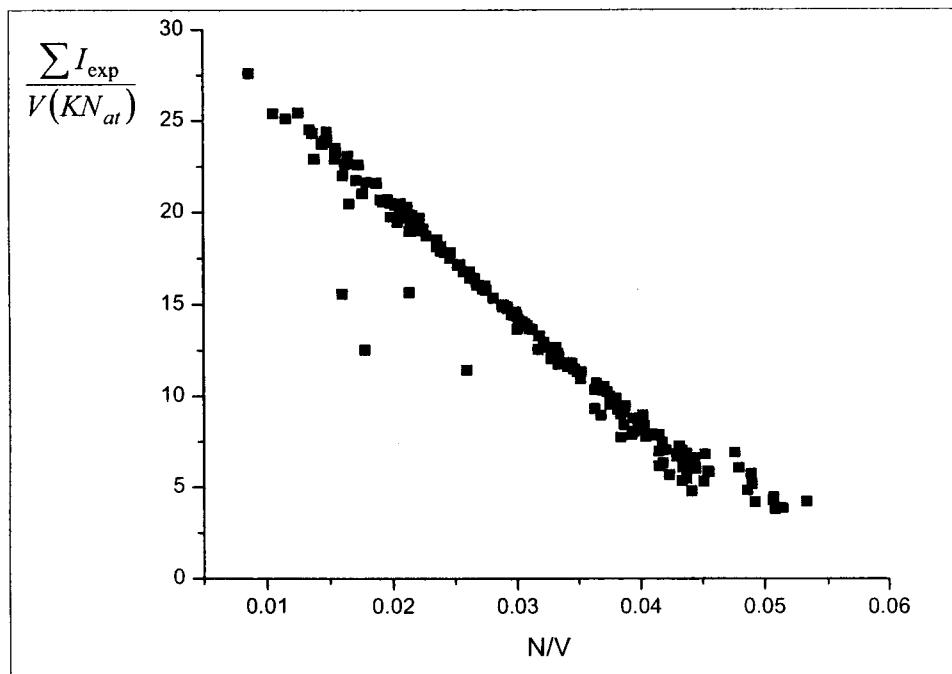


Figura 4.4 Gráfico ilustrando a correlação entre a somatória das intensidades observadas e o conteúdo eletrônico da cela unitária.

Tabela 4.1 Lista dos códigos relativos às 213 estruturas escolhidas no PDB para a análise da Eq. (4.8).

1a2p	1byz	1e9w	1fw9	1hbz	1jks	1kth	1mn8	2ae2	1gk8	1jec
1a3g	1bzp	1eaq	1fxo	1hfx	1jpu	1ktz	1n40	2tps	1gkp	1n21
1a69	1bzy	1eay	1g2p	1hg7	1jpz	1kw3	1naw	2ucz	1jz8	1qhx
1a6m	1c0p	1eb8	1g6x	1hix	1jr0	1kwn	1ney	2ush	1ko7	2occ
1a7y	1c4x	1ed9	1g7a	1hiz	1jsf	1ky3	1nks	3all	1moq	1be3
1a7z	1c5u	1ejg	1g7b	1hj6	1jvb	1kyc	1o61	3lzt	1obr	1ck7
1a8u	1c75	1ek6	1ga6	1hq8	1jxu	1i3f	1o7j	3pyp	1ryp	1dwv
1a9y	1cjc	1en2	1gjn	1i40	1k05	1i6r	1pig	3std	2xat	1f2j
1aqm	1cru	1ewy	1gkz	1i4u	1k2a	1i71	1qq0	4lzt	1az9	4csm
1avz	1ctq	1f4b	1gnx	1i6w	1k3i	1i91	1qi9	4pga	1b7y	1f49
1b0y	1dgc	1f98	1go3	1i8o	1k6u	1leh	1qip	4ubp	1bcc	1k47
1b12	1dhp	1fd3	1gq6	1ie7	1kb0	1lni	1qjc	5eau	1ft1	1qo5
1b6r	1djr	1fdy	1gtv	1in1	1kf3	1ls9	1qke	1a9x	1gxd	1jky
1be4	1duc	1fhe	1gtz	1iu4	1kfc	1lu0	1qow	1avq	1h5q	
1bez	1dvj	1fj2	1gwc	1j16	1kgs	1lz8	1qq5	1b3o	1jaw	
1bgy	1dxm	1flm	1gyo	1j8q	1kjq	1mlq	1qqf	1bj4	1k7h	
1b15	1dxy	1fm8	1gzu	1j9b	1kmv	1m24	1rdr	1civ	1pys	
1bn5	1dy5	1fo8	1h05	1jgl	1koi	1m40	1shk	1cp9	1tr1	
1bn7	1e4c	1fsf	1h2j	1jh6	1kp4	1m7g	1ush	1elo	3bta	
1brt	1e93	1fsg	1h6r	1jig	1ks8	1m17	1vns	1e4i	1ftr	

A correlação entre as intensidades espalhadas e o conteúdo eletrônico espalhador dá as diretrizes para um possível método alternativo na análise do conteúdo de solvente para cristais de proteína. Quando essa correlação é aplicada para a interação dos raios X com a matéria no estado amorfo, ou seja, é aplicada ao espalhamento a baixos ângulos [SAXS], a informação obtida será o peso molecular da unidade biológica monodispersa em solução (Fischer *et al.*, 2004; Napolitano *et al.*, 2003b).

4.3 Resultados

Os dados preliminares, obtidos por cromatografia de exclusão e espalhamento dinâmico de luz [DLS], sugerem que a unidade biológica da sPRS possui estrutura quaternária homo-hexamérica, como pode ser visto na Fig. (4.5). Os dados de difração indicam que a estrutura cristalina possui retículo de Bravais primitivo e pertence ao grupo espacial $P2_12_12$, conforme apresentado na Tabela (3.3). Esse grupo é composto por quatro unidades assimétricas, de forma tal a possuir um eixo não helicoidal na direção [001].

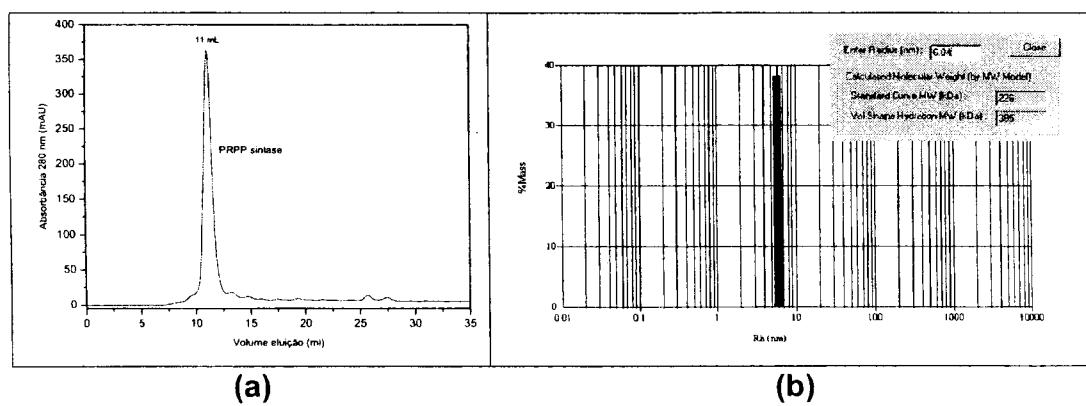


Figura 4.5 (a) Perfil cromatográfico da eluição sPRS na coluna Superdex 200 HR 10/30; (b) Gráfico ilustrando o Raio Hidrodinâmico da sPRS, cujo valor é 60,4 Å, correspondente à massa molecular de 226 kDa.

O cálculo do V_M , utilizando o programa MATTHEWS_COEF do pacote de programas CCP4 (CCP4, 1994), sugere a possibilidade de 6, 9, 12, 15 e 18 monômeros de 42 KDa da sPRS na unidade assimétrica, conforme pode ser visto na Tabela (4.2). Para apenas um hexâmero na unidade assimétrica, o conteúdo de solvente estaria próximo do limite máximo (74,3%) e, para três hexâmeros, o conteúdo de solvente estaria próximo do limite mínimo (23,0%). As hipóteses de 1,5 e 2,5 hexâmeros na unidade assimétrica não foram descartadas, uma vez que o eixo de ordem 2 do grupo espacial $P2_{1}2_{1}2$ poderia coincidir com a simetria pontual da estrutura quaternária da unidade biológica. Essas hipóteses são reforçadas com a simetria pontual 32 (Branden & Tooze, 1991) de outras PRS's homólogas depositadas no PDB (Eriksen *et al.*, 2000).

Tabela 4.2 Alguns valores de V_M e conteúdo de solvente da sPRS, obtidos através do programa MATTHEWS_COEF.

Monômeros por unidade assimétrica	V_M ($\text{\AA}^3/\text{Da}$)	Conteúdo de solvente (%)
6	4,8	74,3
9	3,2	61,5
12	2,4	48,7
15	1,9	35,8
18	1,6	23,0

A análise do conteúdo de solvente pelo método de Matthews não levou, de forma conclusiva, ao conhecimento do número de moléculas da enzima sPRS presentes na cela unitária, conforme apresentado na Tabela (4.2). As tentativas de aplicação do método teórico, descrito na secção 4.2, também falharam, uma vez que não foi possível discriminar os seguintes aspectos práticos: espalhamento do solvente desordenado, quantificação

do solvente ordenado, fator B, resolução e completeza. Dessa forma, a escolha de uma estratégia para o faseamento por Substituição Molecular ficou dificultada em função das ambigüidades encontradas no cálculo do conteúdo de solvente.

4.4 Referências bibliográficas

- Andersson, K. M. & Hovmöller, S. (1999). *The protein content in crystals and packing coefficients in different space groups*. *Acta Cryst. D56*, 789.
- Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). *The Protein Data Bank*. *Nucleic Acids Research*, 28 pp. 235.
- Branden, C. & Tooze, J. (1991). *Introduction to Protein Structure*. Garland Publishing, New York.
- Brigham, E. O. (1974). *The Fast Fourier Transform*. Englewood Cliff, New Jersey.
- Carter, C. W. & Sweet, R. M. (1997). **Methods in Enzymology, Vol. 276. Macromolecular Crystallography Part A**. ed. Academic Press, San Diego, 326.
- Carter, C.W. & Xiang, S. (1997). *Phase Improvement Using Conditional Probability Methods: Maximum Entropy Solvent Flattening and Phase Permutation*. In **Methods in Enzymology, Vol. 277. Macromolecular Crystallography Part B**. C.W. Carter & R.M. Sweet ed. Academic Press, San Diego, 79.
- Castellano, E. E. & Main, P. (1985). *On the classical interpretation of thermal probability ellipsoids and the Debye-Waller factor*. *Acta Cryst. A41*, 156.
- CCP4 (1994). *The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography*. *Acta Cryst. D50*, 760.
- Cullity, B. D. (1978). *Elements of X-ray Diffraction*, 2nd ed. Addison-Wesley Publishing Company, Inc. Massachusetts.
- Drenth, J. (1999). *Principles of Protein X-ray Crystallography*, 2nd ed. Springer, New York.
- Eriksen, T. A.; Kadziola, A.; Bentsen, A.-K.; Harlow, K. W. & Larsen, S. (2000). *Structural Basis for the Function of *Bacillus Subtilis* Phosphoribosyl-Pyrophosphate Synthetase*. *Nat. Struct. Biol.* 7, 303.
- Fischer, H.; Napolitano, H. B.; Oliva, G. & Craievich, A. F. (2004). *Protein molecular weight determination on an arbitrary scale by SAXS*. *Journal of Applied Crystallography*. Artigo em preparação.
- Giacovazzo, C. (2002). *The Diffraction of X-ray by Crystals*. In: **Fundamentals of Crystallography**, 2nd ed. Editado por Giacovazzo, C. IUCr e Oxford Science Publication, New York.

- Kantardjieff, K. A. & Rupp, B. (2003). *Matthews coefficient probabilities: improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals*. **Protein Science**, **12**, 1865.
- Ladd, M. F. C. & Palmer, R. A. (1994). **Structure Determination by X-Ray Crystallography**, 2nd Ed. Kluwer Academic Pub, London.
- Matthews, B. W. (1968). *Solvent Content of Protein Crystals*. **J. Mol. Biol.** **33**, 491.
- McPherson, A. (2003). **Introduction to Macromolecular Crystallography**. John Wiley, New Jersey.
- Napolitano, H. B. (2001). Determinação por Difração de Raios-X das Estruturas Cristalinas de Enaminonas e N-Benzoi-Guanidina com Potencial Atividade Anticonvulsivante. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Física, UFG.
- Napolitano, H. B.; Trapani, S.; Fischer, H.; Craievich, A. F. & Oliva, G. (2003a). *Is it possible to determine the solvent content of the protein crystals from diffraction intensities analysis?* In: **Livro de Resumos da XVI SBCr**. Editado por Napolitano, H. B. & Mascarenhas, Y. P. SBCr, São Carlos, 17.
- Napolitano, H. B.; Oliva, G.; Fischer, H.; Craievich, A. F. (2003b). *Molecular weight determination on an arbitrary scale by SAXS*. In: **ACA 2003 Annual Meeting: program and abstract book**. SBCr, Covington.
- Quillin, M. & Matthews, B. W. (2000). *Accurate calculation of the density of proteins*. **Acta Cryst. D56**, 791.
- Schwarzenbach, D. (1996). **Crystallography**. John Wiley e Sons. Chichester.
- Stout, G. & Jensen, L. H. (1989). **X-ray Structure Determination – a practical guide**, 2nd ed. The Macmillan Company. London.
- Viterbo, D. (2002). *Solution and Refinement of Crystal Structure*. In: **Fundamentals of Crystallography**, 2nd ed. Editado por Giacovazzo, C. IUCr e Oxford Science Publication, New York.
- Wilson, A. J. C. (1950). *The probability distributions of X ray intensities*. **Acta Crystallogr.** **3**, 397.

5. Modelagem molecular e obtenção das fases cristalográficas

5.1 Alinhamento seqüencial

O alinhamento é uma ferramenta da bioinformática utilizada para a comparação seqüencial de DNA e/ou proteínas, um importante passo na busca por informações estruturais. Isso decorre da tendência em conservar o sítio catalítico para proteínas pertencentes à mesma família (Barton, 1996). O alinhamento seqüencial determina a identidade e a similaridade entre as seqüências de aminoácidos utilizando uma matriz de valores para cada substituição, de forma que permite a permutação entre os resíduos (Needleman & Wunsch, 1970). O melhor alinhamento entre a seqüência de aminoácidos para diferentes proteínas é aquele que apresenta o maior valor de identidade e similaridade.

O *Basic Local Alignment Search Tool* [BLAST] (Altschul *et al.*, 1990) e o CLUSTALW (Higgins *et al.*, 1994) são programas utilizados para alinhamentos. Enquanto o BLAST utiliza um método heurístico para encontrar o melhor alinhamento entre uma dada seqüência protéica e uma contida no banco de dados, o CLUSTALW alinha seqüências de proteínas previamente escolhidas. Ambos algoritmos usam estatísticas de

alinhamentos seqüenciais sem vacâncias e procuram eliminar estatisticamente homólogos casuais (Karlin & Altschul, 1990).

Através do alinhamento seqüencial da enzima sPRS com o BLAST, utilizando os bancos de dados *Protein Family* [Pfan] (Bateman *et al.*, 2002) e *Carbohydrate Active Enzyme* [CAZy], verificou-se que a enzima fosforibosilpirofosfato sintetase de *Bacillus Subtilis* [bPRS] apresenta a mais alta identidade seqüencial. A estrutura cristalográfica da proteína sPRS está depositada no PDB sob o código 1DKU. O mesmo alinhamento, com a mesma identidade seqüencial (17,67% para seqüência completa), foi obtido localmente utilizando o CLUSTALW. A Fig. (3.1) ilustra esse alinhamento entre as enzimas sPRS e bPRS.

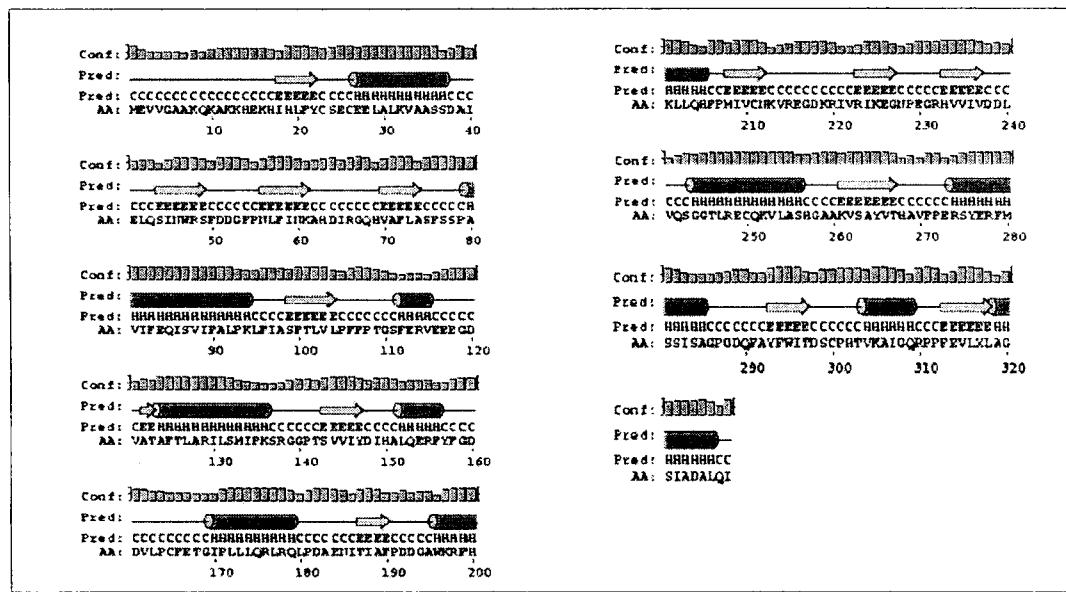
bPRS	-----MSNQYGDKNLKKIESLNSNEELAKEIADIVGVQLGKCSVTRFSDG---EVOINIEESIRGCCDC	59
sPRS	MEVVGAAKQAKKHEKSHHIFYCSECEELALKVASSDAIELOSINWSEDDOGFPNLIFINKAHDIRGQHV	70
bPRS	YIIQSTSDPVNEHTMELLINVDALKRASAKTINIVIPYYGYARQDRKARSREPITAKLFANILETAGATR	129
sPRS	AFLASESSSPA--VILEQTSWIFALPKLFIASFTIVIPPFEPPTGSFERVEEGDVATAFTLARIILSMIPKSR	138
bPRS	-----VIALDISHAPOIOGPR--DIPIDHLMGVPHIGEYFECK-NLEDIVIVSPDHHGGVTRARKLADRILKA	191
sPRS	GGPTSVWIVYDHALOERFXEGDDVLPCTETGIPILQLRLQLPDAENITIAFPDDG--AWKLFHKLLQHF	206
bPRS	PIAJIIDKRRPRPMVAEVNNIVGNIEGKTAIIIDDIIDTAGITTLAANALVENGAKEVYACCTTHEVLSGP	261
sPRS	PNIIVCNKVRE-GDKRIVRIKEGNPEGHRVVIVDDDEVQSGGILRECQKVLAASHGAAKVSAVTHAVFPERS	275
bPRS	VERINNSTIKELVVVTNSIKLPEEKKIERFKQLSVCELLAEAIIRVHEQQSVSYLF	317
sPRS	YERFMSSISAGPGDQFAYFWITDSCPHTVKAIQQRPPFEVLXLAGSIADAQI---	328

Figura 5.1 Alinhamento seqüencial entre as enzimas sPRS e bPRS, obtido pelos programas CLUSTALW e BLAST.

5.2 Predição da estrutura secundária e alinhamento estrutural

O estudo da estrutura secundária de proteínas pode ser obtido a partir da sua seqüência de aminoácidos. Esse conhecimento, além de auxiliar no entendimento do enovelamento protéico, permite o alinhamento estrutural e a construção do possível modelo tridimensional. Esse estudo

pode ser realizado através do programa *Position Specific Iterated Prediction* [PSIPRED] (Jones, 1999), que utiliza tanto métodos estatísticos quanto redes neurais na predição da estrutura secundária (McGuffin & Jones, 2002). A Fig. (5.2) ilustra a predição da estrutura secundária, obtida pelo programa PSIPRED, realizada pela comparação entre a seqüência de aminoácidos da sPRS com seqüências contidas em um banco de dados de estruturas estabelecidos experimentalmente. A predição das estruturas secundárias informou a presença 11 hélices-alfa e 14 folhas-beta no monômero, correspondendo a 52% da estrutura primária.



- Figura 5.2 Predição da estrutura secundária para a enzima sPRS realizada através do programa PSIPRED.

O programa THREADER (Albrecht *et al.*, 2002; McGuffin & Jones, 2003) também realiza a predição de estruturas secundárias pela comparação com enovelamentos conhecidos. A base desta metodologia é a mesma do PSIPRED, ou seja, está baseada no fato em que duas proteínas podem apresentar enovelamentos semelhantes, ainda que não

apresentem elevado grau de identidade seqüencial (McGuffin & Jones, 2002). Com o alinhamento estrutural obtido pelo THREADER, a identidade entre a sPRS e a bPRS aumentou para 24,1% considerando seqüência completa (com exceção dos oito primeiros aminoácidos da região N-terminal para sPRS), conforme pode ser visto na Fig. (5.3).

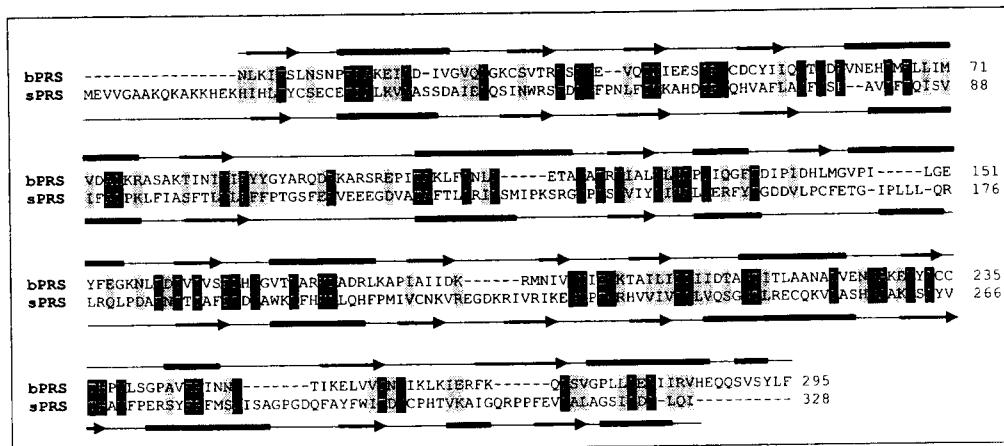


Figura 5.3 Alinhamento estrutural das enzimas sPRS e bPRS obtido pelo THREADER.

5.3 Modelagem molecular

A modelagem molecular agiliza a obtenção de estruturas tridimensionais relacionadas, sendo um procedimento alternativo no estudo estrutural de macromoléculas. A modelagem por homologia baseia-se no princípio de que a similaridade seqüencial implica em similaridade estrutural, e prediz estruturas protéicas enfatizando a semelhança seqüencial de aminoácidos em relação a uma outra proteína de estrutura tridimensional conhecida (Sali & Blundell, 1993).

O aspecto positivo do método cristalográfico está na precisão e confiança das informações estruturais obtidas. Sua limitação reside na

necessidade de obtenção de monocrystalis que difratem com qualidade. O aspecto positivo da modelagem por homologia está na obtenção rápida das informações estruturais. Sua limitação está na precisão das informações estruturais, exigindo um cuidado adicional para conclusões prosseguidas.

O programa MODELLER (Sali & Blundell, 1993) executa modelagens moleculares comparativas baseadas em restrições espaciais, de forma a otimizar distâncias geométricas a partir das restrições obtidas de uma estrutura homóloga conhecida. O alinhamento entre as moléculas alvo (sPRS) e o molde (bPRS), conhecendo as coordenadas tridimensionais do molde, é a informação na implementação do cálculo das restrições para a seqüência alvo (Sali & Blundell, 1993; Sanchez & Sali, 1998).

Tendo o THREADER gerado o alinhamento estrutural, seguiu-se a construção do modelo, através da modelagem molecular por homologia, usando o programa MODELLER 6.0a. O alinhamento estrutural apresentado na Fig. (5.3) e as coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica da enzima bPRS (código PDB: 1DKU) foram as informações iniciais utilizadas para construção do modelo sPRS. A identidade do alinhamento era 24,1% e as coordenadas do molde utilizadas foram aquelas pertencentes ao monômero, após remover as moléculas de água e os ligantes.

O MODELLER gerou 50 possíveis modelos para a proteína sPRS, sendo escolhido aquele com menor energia (Sali & Blundell, 1993). A Fig. (5.4) apresenta os valores da energia, em escala arbitrária, para os 50

moldes gerados, sendo inspecionados visualmente os cinco melhores e escolhido aquele que apresentasse os melhores valores no processo de validação, correspondendo àquele com menor energia.

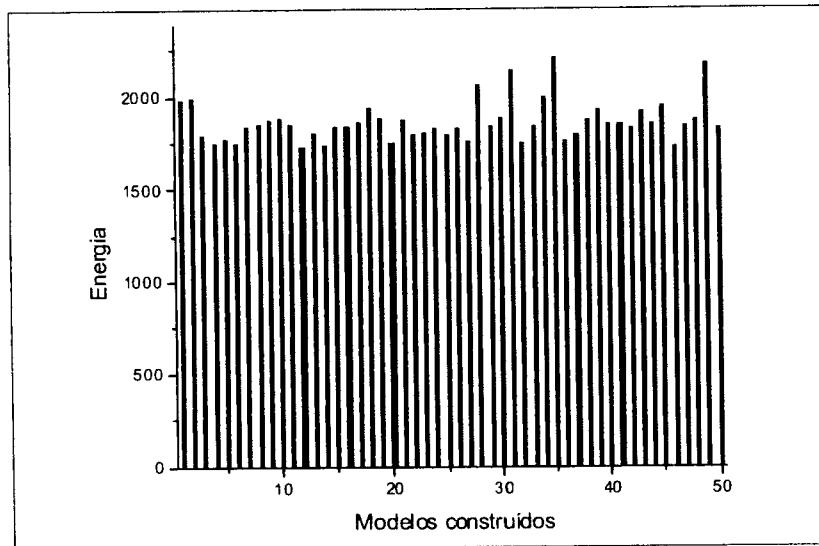


Figura 5.4 Gráfico ilustrando os valores da energia para os 50 moldes da sPRS. A energia está em escala arbitrária de forma que o valor absoluto não tem significado físico.

A Fig. (5.5) apresenta uma sobreposição do melhor modelo obtido para sPRS com o molde bPRS que, em geral, apresenta convergência e conservação global do enovelamento. O destaque da Fig. (5.5a) corresponde à região catalítica preenchida pelo modelo e ausente na estrutura cristalográfica. Na Fig. (5.5b) o destaque ilustra uma hélice 3_{10} C-terminal presente na enzima bPRS e ausente em sPRS. Esta diferença estrutural faz parte do sítio alostérico, sendo consistente com a diferença funcional observada entre elas, discutida em detalhes no Capítulo 6.

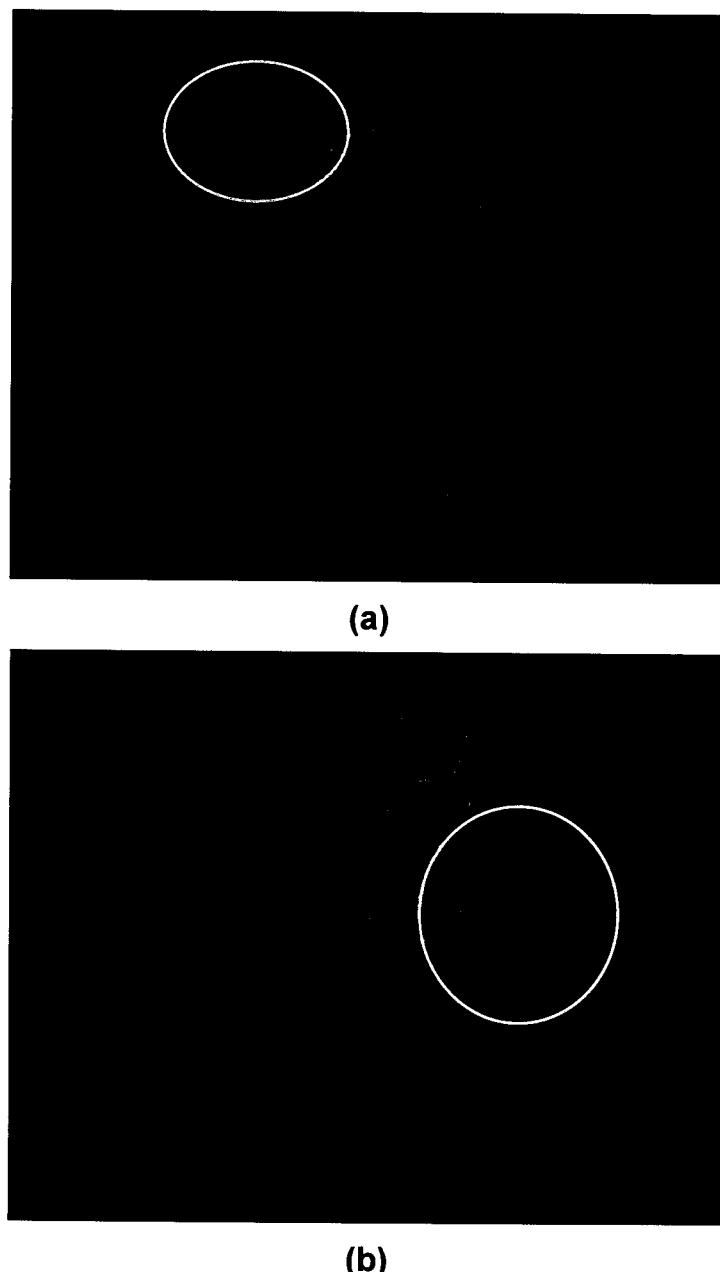


Figura 5.5 Sobreposição do monômero do melhor modelo obtido para sPRS com o molde bPRS, representados em laranja e azul, respectivamente. (a) Destaque para o sítio catalítico; (b) Destaque para o sítio alostérico.

5.4 Validação do modelo construído

Avaliar a qualidade do modelo construído é fundamental para a confiança das conclusões dele extraídas. Como o modelo foi construído através da modelagem por homologia, sua qualidade será proporcional à

qualidade da estrutura molde, ou seja, a qualidade do modelo sPRS estará vinculada geometricamente à qualidade da estrutura bPRS (código PDB: 1DKU).

A validação estereoquímica verifica parâmetros como comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedrais, quiralidade, planaridade das ligações peptídicas, entre outros. Programas como o PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1998) e o WHATIF (Vriend, 1990; Hooft *et al.*, 1996), de amplo uso entre os cristalógrafos, fazem esse tipo de análise do modelo. O programa WHATIF preza particularmente pelos contatos atômicos. A Fig. (5.6) ilustra o diagrama de Ramachandram (Ramachandran *et al.*, 1963) para a sPRS modelada, obtido pelo PROCHECK.

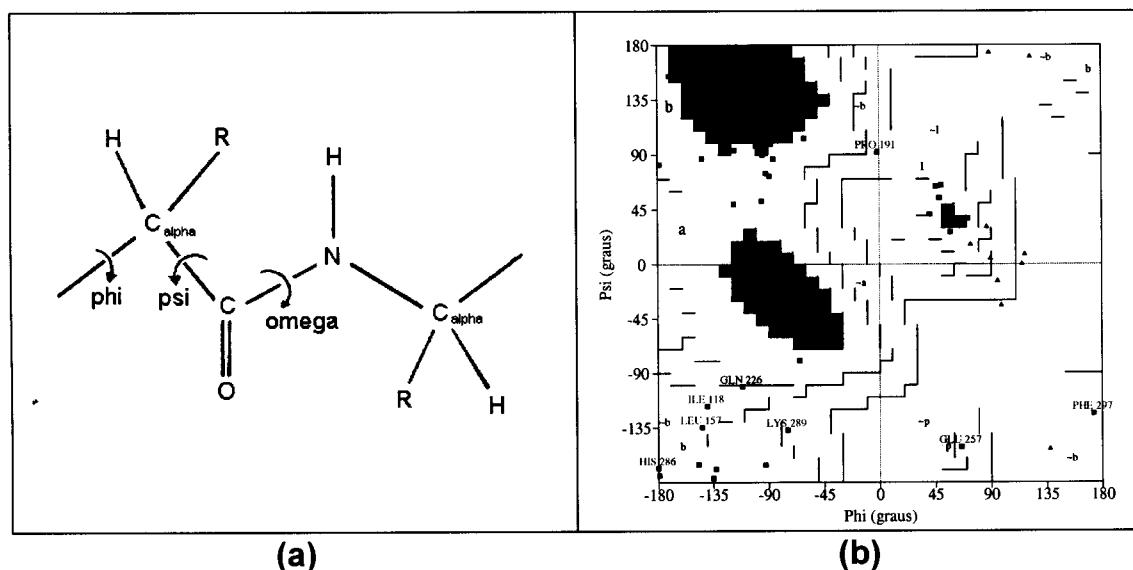


Figura 5.6 (a) Diagrama de uma cadeia polipeptídica estendida, com a indicação dos três ângulos torsionais *phi*, *psi* e *omega* associados a cada aminoácido; (b) Gráfico Ramachandram do modelo final construído para a sPRS.

O diagrama de Ramachandram mostra que 89,4% dos resíduos encontram-se nas regiões mais favoráveis, 8,1% na região adicional permitida, 2,2% na região generosamente permitida e 0,4% se encontra na

região não permitida. Os parâmetros estéreo-químicos, verificados pelo PROCHECK, indicam uma confiança no valor esperado igual ou superior a 92,0%. O enovelamento da estrutura predita para a sPRS mantém os aspectos gerais da estrutura terciária da bPRS.

O VERIFY 3D (Luthy *et al.*, 1992) realiza comparações do ambiente químico entre o modelo construído e aqueles obtidos por difração de raios X à alta resolução. Todos os aminoácidos do modelo, excetuando-se os dez primeiros do C-terminal e N-terminal, foram verificados pelo VERIFY 3D, conforme pode ser visto na Fig. (5.7). Foram encontradas duas regiões abaixo da linha do zero, correspondendo a aminoácidos em ambientes desfavoráveis.

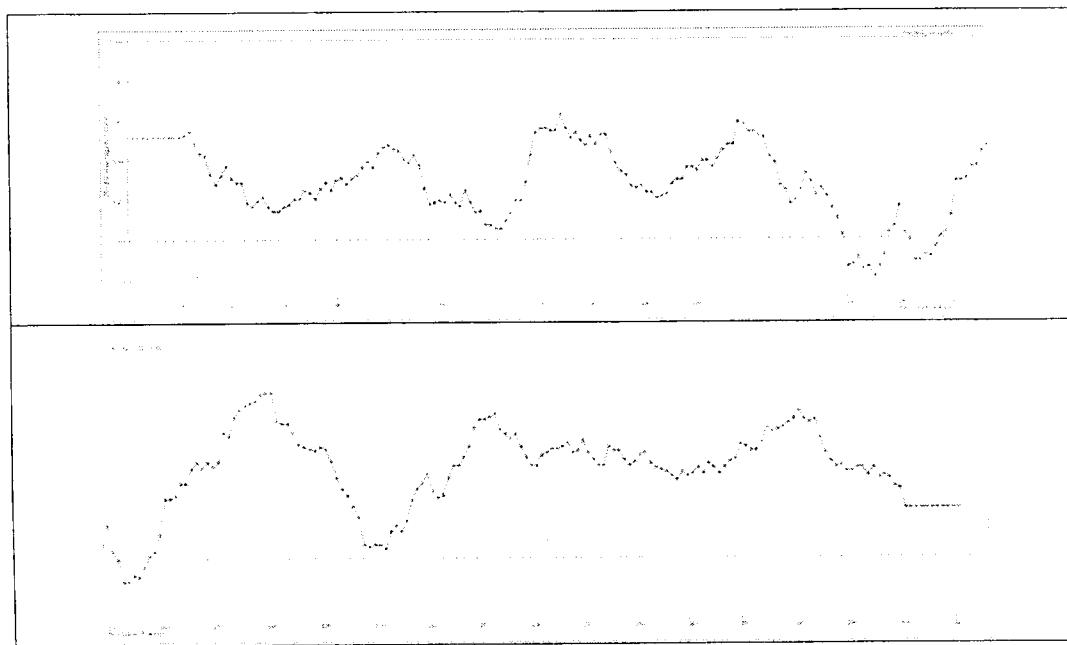


Figura 5.7 Gráfico do programa VERIFY 3D para o modelo sPRS.

Os detalhes da construção e descrição do modelo obtido, assim como a correlação entre as informações estruturais e a atividade enzimática, podem ser vistos em Sculaccio *et al.* (2004).

5.5 Obtenção das fases cristalográficas

5.5.1 O método de Substituição Molecular

Conforme descrito na Eq. (3.6), o conhecimento da densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$ para a cela unitária depende tanto das fases quanto das amplitudes dos fatores de estrutura. Esses podem ser obtidos pelo experimento de difração dos raios X enquanto aqueles precisam ser obtidos por alguma maneira não-analítica. A solução desse problema da fase pelo método de Substituição Molecular (Driesssen & Tickle, 1996; Dodson *et al.*, 1992) baseia-se na hipótese de que estruturas similares apresentam um padrão de difração similar, independente do ambiente cristalográfico (Navaza, 1994).

Esse método baseia-se na comparação do mapa de Patterson (Brünger, 1990) da estrutura desconhecida (alvo), que pode ser obtido sem o conhecimento das fases, com o mapa de Patterson da estrutura conhecida (modelo). A função de Patterson $P(\mathbf{u})$ é definida como a convolução da densidade eletrônica do cristal $\rho(\mathbf{r})$ com a sua transformada centrossimétrica $\rho(-\mathbf{r})$, dada pela seguinte expressão

$$P(\mathbf{u}) = \int_{cela} \rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r} + \mathbf{u})d\mathbf{r} = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{S}} |F(\mathbf{S})|^2 \exp[-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{u}] \quad (\text{Eq. 5.1})$$

onde o vetor tridimensional $\mathbf{u} = u\mathbf{a} + v\mathbf{b} + w\mathbf{c}$ pode assumir todos os valores no espaço real. A função de $P(\mathbf{u})$ apresenta máximos em cada ponto \mathbf{u} , correspondente a um vetor de distância entre dois átomos da estrutura cristalina, conforme ilustrado na Fig. (5.8).

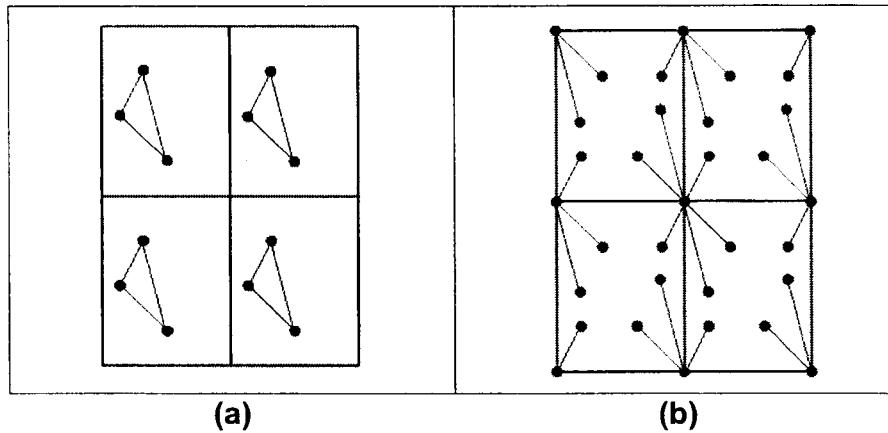


Figura 5.8 (a) Representação esquemática de quatro celas unitárias P1 com três átomos; (b) Representação do mapa de Patterson $P(\mathbf{u})$ com seis picos por cela, excetuando o da origem.

O grupo espacial do mapa de Patterson contém todos os elementos de simetria do grupo espacial do relativo cristal, excetuando-se os elementos translacionais. O mapa é sempre centrossimétrico e o retículo é preservado. O número de picos observáveis é igual a $N^2 - N$, onde N é o número de átomos da cela unitária.

Assim, a função de Patterson $P(\mathbf{u})$ é constituída da sobreposição de todos os vetores interatômicos da cela unitária pesados pela densidade eletrônica dos átomos correspondentes. A comparação entre os mapas de Patterson das estruturas alvo e modelo é constituída de três etapas: rotação, translação e refinamento de corpo rígido, conforme ilustrado na

Fig. (5.9a). A função de rotação normalmente é calculada transformando o sistema cristalográfico em coordenadas cartesianas, que posteriormente é convertido para um sistema angular, usualmente o sistema Eureliano (Fig. 5.9b).

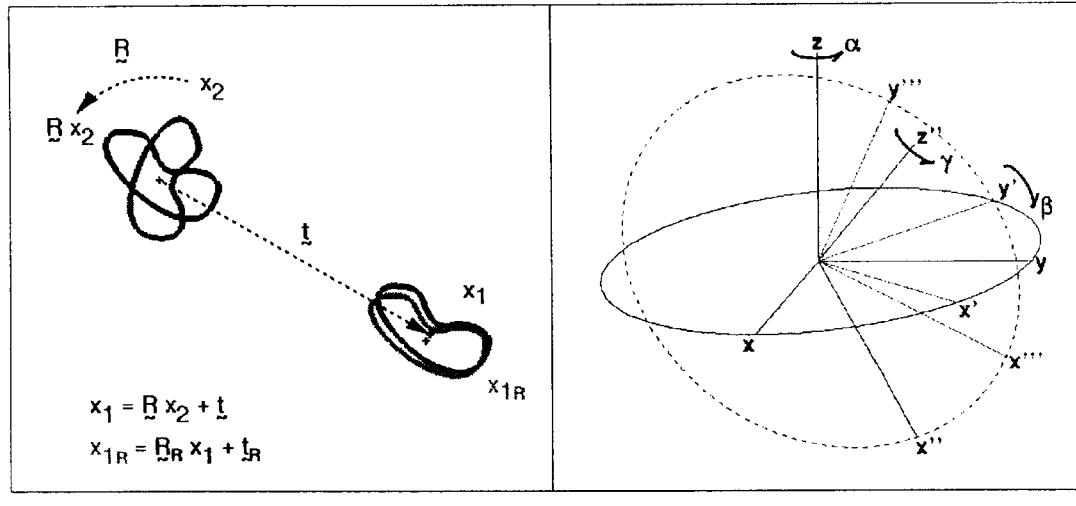


Figura 5.9 (a) Ilustração gráfica das principais etapas em Substituição Molecular. O operador R rotaciona da posição X_2 para a RX_2 , e o operador t translaciona para a posição $(RX_2 + t)$. As coordenadas X_{1R} correspondem ao refinamento de corpo rígido da posição $(RX_2 + t)$; (b) Representação esquemática dos ângulos α , β e γ no sistema Eureliano.

5.5.2 Etapas da Substituição Molecular

O trabalho cristalográfico de solução do problema da fase pela Substituição Molecular, no contexto das macromoléculas, pode ser classificado nas seguintes etapas (Navaza, 1994; Driessen & Tickle, 1996):

- 1. Coleta de dados e cálculo dos fatores de estrutura para a estrutura alvo.** Essa etapa inclui o experimento de difração, a integração e o processamento das imagens, e o cálculo dos fatores de estrutura. Obtém-se ao final um arquivo contendo as direções hkl e

o fator de estrutura $F(hkl)$ para cada reflexão difratada da estrutura desconhecida (no nosso caso particular a sPRS).

2. **Otimização do modelo utilizado** (Kleywegt, 1996). Os modelos utilizados são geralmente escolhidos, dentre as estruturas disponíveis, com base na similaridade das seqüências de aminoácidos. Isto se fundamenta no postulado de que a estrutura terciária das proteínas é determinada pela estrutura primária (Dodson *et al.*, 1992; Dodson, 1985). Proteínas com seqüências similares devem, portanto, possuir enovelamentos similares. Uma identidade seqüencial maior que 20% é, geralmente, indicativo de certa homologia estrutural entre as macromoléculas, e constitui uma significativa probabilidade de que as estruturas terciárias sejam parecidas (Driessen & Tickle, 1996).
3. **Calculo dos fatores de estruturas para a estrutura modelo.** Como as coordenadas atômicas do modelo são levadas para outra cela, torna-se necessário o cálculo dos fatores de estrutura em relação à nova cela, que serão utilizados no cálculo do mapa de Patterson.
4. **Cálculo e aplicação da função de rotação** (Driessen & Tickle, 1994; Moss, 1985; Navaza, 1987; Rossmann & Blow, 1962). Nessa etapa o mapa de Patterson do modelo conhecido é rotacionado sobre o mapa de Patterson da estrutura desconhecida. O resultado é um modelo corretamente orientado.

5. **Cálculo e aplicação da função de translação** (Crowther, & Blow, 1967; Tickle, 1992). O mapa de Patterson do modelo corretamente orientado é transladado sobre o mapa de Patterson da estrutura desconhecida. O resultado é um modelo corretamente orientado e posicionado.
6. **Refinamento de Corpo Rígido** (Navaza, 1994). Esta etapa objetiva otimizar tanto os três parâmetros rotacionais quanto os três parâmetros translacionais obtidos nas etapas anteriores.
7. **Validação** (Dodson *et al.*, 1992). Esse procedimento baseia-se em índices estatísticos, como o índice de correlação e o R_{factor} , e ainda na inspeção visual da estrutura obtida. O refinamento da estrutura é o critério final da validação da solução obtida (Driessen & Tickle, 1996).

5.5.3 Os modelos utilizados

A busca por modelos para a sPRS baseou-se nos alinhamentos anteriormente descritos. Encontraram-se duas estruturas cristalográficas da enzima bPRS disponíveis no PDB sob os códigos 1DKR e 1DKU, diferindo apenas no tipo ligante co-cristalizado. Como a estrutura quaternária da homóloga bPRS é hexamérica com simetria pontual 32, construiu-se os modelos monomérico, dimérico e hexamérico. Para cada um deles omitiram-se as cadeias laterais dos aminoácidos, de forma tal que se obteve seis modelos: três formados por polialaninas e três formados por poliglicinas. Adicionalmente utilizamos o modelo obtido da modelagem

molecular otimizado pelos mesmos critérios. A Tabela (5.1) apresenta os quinze modelos otimizados e utilizados na tentativa de obtenção das fases.

Tabela 5.1 Modelos otimizados e utilizados na obtenção da fases por Substituição Molecular.

Estrutura primária	Estrutura quaternária		
	Monomérica	Dimérica	Hexamérica
Seqüência original	Modelo	Modelo	Modelo
Polialanina	Modelo e 1DKR	Modelo e 1DKR	Modelo e 1DKR
Poliglicina	Modelo e 1DKR	Modelo e 1DKR	Modelo e 1DKR

5.5.4 Análise dos resultados

A partir dos dados de difração do cristal da sPRS, cuja estatística foi apresentada na Tabela (3.3), fez-se a procura por simetria não cristalográfica através do cálculo da função de auto rotação. Para tanto, utilizou-se o programa POLARRFN do pacote de programa CCP4 (CCP4, 1994). Essa informação é útil no cálculo do conteúdo de solvente e na estratégia escolhida no cálculo das fases por Substituição Molecular.

Utilizaram-se dados de difração dentro da faixa de resolução entre 15 e 3,5 Å, com raio de integração 20 Å. No mapa de auto rotação, apresentado na Fig. (5.10a), três picos significativos foram encontrados. Os dois picos mais intensos (coeficiente de correlação 100%) estão ao longo das direções [100] e [010] e são consequência da simetria do grupo pontual 222. O pico menos intenso (coeficiente de correlação 36%) correspondente à presença do eixo não cristalográficos de ordem 2 (ângulo polar κ igual a 180°). A discussão das simetrias cristalográfica e não-cristalográfica correspondente à sPRS estão em Napolitano *et al.* (2004). A Fig. (5.10b) ilustra os ângulos ϕ , ω e κ do sistema de coordenadas polares.

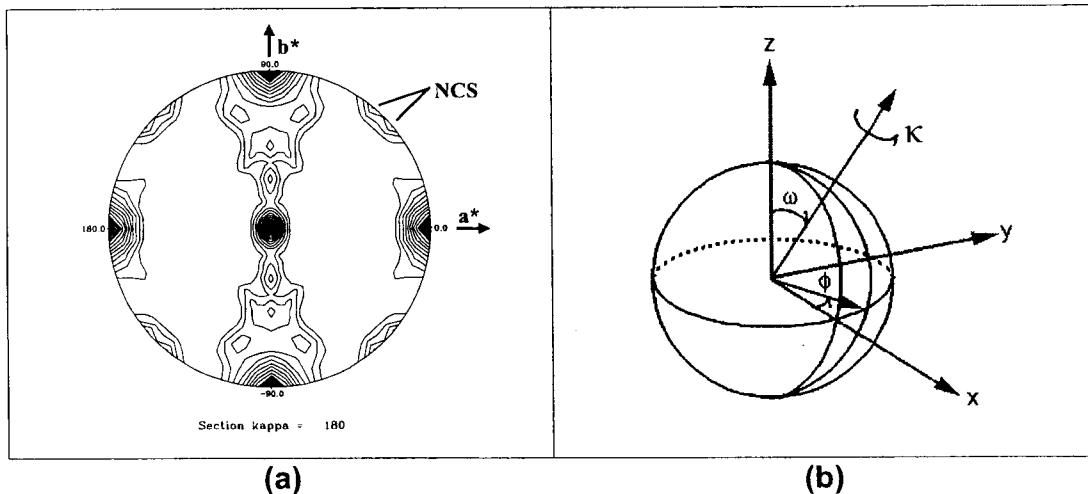


Figura 5.10 (a) Projeção estereográfica da função de auto rotação usando os coeficientes de correlação 20, 25, 30 e 45 nos contornos para a secção polar $\kappa = 180^\circ$; (b) Representação esquemática dos ângulos ϕ , ω e κ no sistema de coordenadas polares.

Após muitos esforços na resolução da estrutura cristalográfica da sPRS, a partir dos dados de difração da Tabela (3.3), nenhum resultado promissor foi obtido. Para todas as várias tentativas realizadas, não se conseguiu distinguir alguma solução, que apresentasse convergência no refinamento, a partir da análise das funções de rotação e translação através do programa AMoRe (Driessen & Tickle, 1996; Navaza, 1990; Navaza, 1992; Navaza, 1994).

Dentre os resultados obtidos através das diversas tentativas apresentadas na Tabela (5.1), os melhores valores para as funções de rotação e translação na Substituição Molecular são aqueles utilizando como modelo as estruturas 1DKR, 1DKR reduzido a polialaninas e o alvo construído pelo MODELLER. As Tabelas (5.2), (5.3) e (5.4) apresentam respectivamente esses resultados, após o refinamento de corpo rígido, para as seguintes faixas de resolução: 15 - 6, 15 - 5 e 15 - 4 Å.

Tabela 5.2 Resultado do refinamento de corpo rígido, usando o modelo de polialaninas hexamérico 1DKR, para os melhores ângulos função de rotação após transladados. α , β e γ são os ângulos Eurelianos, x , y e z correspondem às translações, CC é o coeficiente de correlação, Rf é o fator R e RH refere-se a um outro fator R que leva em conta a altura do pico. As soluções que se seguem correspondem aos intervalos de resoluções 15-6, 15-5 e 15-4Å, respectivamente.

		α	β	γ	x	y	z	CC	Rf	RH	
SOLUTIONF1_1	1	126.94	90.22	95.67	0.4843	0.0260	0.2700	39.8	55.6	33.1	1
SOLUTIONF2_1	1	126.84	90.43	335.60	0.4849	0.0259	0.2699	40.0	55.6	33.1	2
SOLUTIONF3_1	1	126.86	90.46	215.61	0.4848	0.0263	0.2700	40.0	55.5	33.1	3
SOLUTIONF4_1	1	6.53	70.27	34.31	0.2034	0.4275	0.4808	36.4	55.3	32.4	4
SOLUTIONF5_1	1	6.62	70.17	274.24	0.2037	0.4273	0.4806	36.4	55.3	32.3	5
SOLUTIONF6_1	1	57.81	62.48	126.45	0.9977	0.4133	0.1376	36.8	54.9	32.5	6
SOLUTIONF7_1	1	57.91	62.41	6.41	0.9977	0.4133	0.1378	36.9	54.9	32.4	7
SOLUTIONF8_1	1	111.86	27.70	71.67	0.1772	0.4285	0.3555	36.6	54.9	31.7	8
SOLUTIONF9_1	1	57.97	62.37	246.42	0.9979	0.4134	0.1377	36.9	54.9	32.5	9
SOLUTIONF10_1	1	42.07	72.03	300.86	0.3656	0.2064	0.2113	37.1	54.8	32.7	10
SOLUTIONF11_1	1	53.06	86.36	36.94	0.0184	0.0124	0.1953	38.5	55.2	32.0	11
SOLUTIONF12_1	1	42.10	71.99	60.81	0.3656	0.2064	0.2116	37.1	54.8	32.6	12
SOLUTIONF13_1	1	52.81	86.73	156.17	0.0208	0.0142	0.1577	37.8	55.4	31.3	13
SOLUTIONF14_1	1	52.82	86.75	276.15	0.0208	0.0140	0.1578	37.8	55.4	31.3	14
SOLUTIONF15_1	1	110.89	28.04	312.22	0.0191	0.3420	0.1720	37.0	55.1	32.3	15
SOLUTIONF16_1	1	42.04	72.08	180.75	0.3655	0.2062	0.2117	37.0	54.9	32.7	16
SOLUTIONF17_1	1	111.15	28.58	191.88	0.3605	0.3815	0.2454	36.4	55.0	32.4	17
SOLUTIONF18_1	1	90.26	72.66	297.98	0.3746	0.1922	0.2321	35.4	55.2	30.4	18
SOLUTIONF19_1	1	89.33	72.86	58.26	0.4341	0.4535	0.0094	36.0	55.8	30.8	19
SOLUTIONF20_1	1	89.29	72.93	178.29	0.4341	0.4535	0.0095	36.0	55.8	30.8	20
<hr/>											
		α	β	γ	x	y	z	CC	Rf	RH	
SOLUTIONF1_1	1	126.63	90.12	95.67	0.4845	0.0252	0.2699	38.4	55.9	35.2	1
SOLUTIONF2_1	1	126.67	90.06	215.60	0.4844	0.0256	0.2700	38.3	55.9	35.2	2
SOLUTIONF3_1	1	57.43	63.07	127.34	0.0934	0.3838	0.1233	37.2	55.1	36.4	3
SOLUTIONF4_1	1	58.09	62.96	7.03	0.2166	0.1486	0.4912	37.3	55.1	35.9	4
SOLUTIONF5_1	1	8.19	68.04	34.17	0.0646	0.4725	0.0411	38.1	55.1	36.2	5
SOLUTIONF6_1	1	126.60	90.26	335.59	0.4846	0.0247	0.2699	38.5	55.9	35.3	6
SOLUTIONF7_1	1	123.37	63.56	231.99	0.4120	0.0861	0.3077	37.2	55.2	36.1	7
SOLUTIONF8_1	1	122.98	63.55	352.13	0.4123	0.0861	0.3076	37.4	55.2	36.1	8
SOLUTIONF9_1	1	123.20	63.56	112.17	0.4120	0.0859	0.3075	37.3	55.2	36.1	9
SOLUTIONF10_1	1	110.29	28.08	72.52	0.0200	0.3439	0.1722	37.5	55.2	35.3	10
SOLUTIONF11_1	1	52.78	86.70	156.72	0.0186	0.0120	0.1954	38.5	55.2	34.7	11
SOLUTIONF12_1	1	57.48	63.01	247.27	0.0934	0.3839	0.1233	37.1	55.2	36.3	12
SOLUTIONF13_1	1	42.05	71.88	59.96	0.1479	0.3830	0.2518	37.4	54.9	36.3	13
SOLUTIONF14_1	1	42.24	72.00	179.81	0.1479	0.3829	0.2519	37.3	54.9	36.2	14
SOLUTIONF15_1	1	109.82	28.04	312.86	0.0201	0.3445	0.1721	37.5	55.2	35.3	15
SOLUTIONF16_1	1	52.79	86.62	276.72	0.0187	0.0120	0.1954	38.5	55.2	34.7	16
SOLUTIONF17_1	1	52.82	86.73	36.79	0.0187	0.0120	0.1955	38.6	55.2	34.7	17
SOLUTIONF18_1	1	109.50	27.84	192.70	0.0202	0.3451	0.1723	37.6	55.1	35.3	18
SOLUTIONF19_1	1	42.14	72.33	300.51	0.3666	0.2054	0.2984	37.5	55.0	36.1	19
SOLUTIONF20_1	1	89.83	73.22	58.26	0.4555	0.0403	0.4072	37.1	55.6	32.6	20
<hr/>											
		α	β	γ	x	y	z	CC	Rf	RH	
SOLUTIONF1_1	1	52.97	87.30	276.71	0.0195	0.0125	0.1943	36.9	55.2	36.6	1
SOLUTIONF2_1	1	52.93	87.28	36.83	0.0196	0.0125	0.1946	37.0	55.2	36.6	2
SOLUTIONF3_1	1	52.97	87.29	156.74	0.0195	0.0125	0.1943	36.9	55.2	36.6	3
SOLUTIONF4_1	1	6.73	71.48	34.93	0.2026	0.4323	0.4813	35.5	55.2	36.7	4
SOLUTIONF5_1	1	6.68	71.49	274.93	0.2026	0.4326	0.4811	35.5	55.2	36.6	5
SOLUTIONF6_1	1	137.22	71.87	300.16	0.4206	0.4940	0.2524	35.7	55.3	37.2	6
SOLUTIONF7_1	1	137.26	71.93	180.15	0.4205	0.4938	0.2524	35.7	55.3	37.2	7
SOLUTIONF8_1	1	137.14	71.89	59.90	0.4204	0.4939	0.2524	35.7	55.2	37.2	8
SOLUTIONF9_1	1	57.50	63.06	246.27	0.3486	0.3197	0.2443	35.2	55.2	37.6	9
SOLUTIONF10_1	1	126.28	90.09	216.26	0.4857	0.0256	0.2699	36.1	55.8	36.5	10
SOLUTIONF11_1	1	122.88	63.32	112.34	0.3816	0.1031	0.0766	34.9	55.1	38.4	11
SOLUTIONF12_1	1	126.36	90.13	96.09	0.4853	0.0253	0.2694	36.2	55.8	36.7	12
SOLUTIONF13_1	1	126.29	90.09	336.09	0.4853	0.0253	0.2695	36.2	55.8	36.6	13
SOLUTIONF14_1	1	57.30	63.49	126.70	0.0941	0.3842	0.1234	35.2	55.3	38.2	14
SOLUTIONF15_1	1	57.78	63.23	6.54	0.3477	0.0877	0.2480	35.1	55.1	37.9	15
SOLUTIONF16_1	1	123.27	63.57	231.96	0.4634	0.0836	0.4940	35.2	55.2	36.4	16
SOLUTIONF17_1	1	110.45	28.50	70.98	0.4954	0.0303	0.1629	36.2	55.4	36.2	17
SOLUTIONF18_1	1	84.26	22.55	124.86	0.4603	0.4373	0.4392	35.1	55.5	35.9	18
SOLUTIONF19_1	1	83.71	22.65	245.58	0.4609	0.4376	0.4390	35.1	55.5	35.9	19
SOLUTIONF20_1	1	83.94	22.56	5.25	0.4606	0.4375	0.4392	35.1	55.5	35.9	20

Tabela 5.3 Resultado do refinamento de corpo rígido, usando o modelo hexamérico 1DKR, para os melhores ângulos função de rotação após transladados. α , β e γ são os ângulos Eurelianos, x , y e z correspondem às translações, CC é o coeficiente de correlação, Rf é o fator R e RH refere-se a um outro fator R que leva em conta a altura do pico. As soluções que se seguem correspondem aos intervalos de resoluções 15-6, 15-5 e 15-4Å, respectivamente.

		α	β	γ	x	y	z	CC	Rf	RH	
SOLUTIONF1_1	1	58.79	62.05	137.41	0.1363	0.4445	0.3697	25.4	55.4	25.0	1
SOLUTIONF2_1	1	39.63	74.15	192.65	0.3849	0.2463	0.4604	25.1	55.8	25.3	2
SOLUTIONF3_1	1	7.20	78.04	46.88	0.4269	0.0109	0.4695	25.8	55.2	24.5	3
SOLUTIONF4_1	1	7.23	78.08	166.98	0.4267	0.0107	0.4695	25.8	55.3	24.5	4
SOLUTIONF5_1	1	7.48	78.25	286.59	0.2425	0.1910	0.4641	25.7	55.2	24.1	5
SOLUTIONF6_1	1	58.83	62.09	257.42	0.1364	0.4445	0.3697	25.4	55.4	24.9	6
SOLUTIONF7_1	1	58.82	62.15	17.38	0.1364	0.4445	0.3697	25.4	55.4	24.9	7
SOLUTIONF8_1	1	39.58	74.34	312.87	0.3853	0.2466	0.4606	25.1	55.7	25.2	8
SOLUTIONF9_1	1	39.44	74.34	72.85	0.3853	0.2465	0.4606	25.1	55.7	25.3	9
SOLUTIONF10_1	1	72.24	27.71	168.91	0.4831	0.4058	0.0053	25.3	55.4	25.2	10
SOLUTIONF11_1	1	73.65	27.81	47.38	0.4876	0.3738	0.0951	25.4	55.5	24.5	11
SOLUTIONF12_1	1	72.35	27.70	288.77	0.4831	0.4058	0.0055	25.2	55.4	25.2	12
SOLUTIONF13_1	1	121.09	62.51	121.17	0.1397	0.0545	0.1224	25.2	55.4	24.9	13
SOLUTIONF14_1	1	121.18	62.34	241.08	0.1397	0.0544	0.1227	25.1	55.5	24.8	14
SOLUTIONF15_1	1	120.98	62.38	1.25	0.1397	0.0543	0.1228	25.1	55.5	24.8	15
SOLUTIONF16_1	1	11.55	56.35	150.05	0.9969	0.3862	0.1004	25.7	55.8	25.1	16
SOLUTIONF17_1	1	91.29	73.53	306.63	0.4352	0.3693	0.4596	24.9	55.6	25.1	17
SOLUTIONF18_1	1	91.29	73.54	186.61	0.4351	0.3691	0.4595	24.9	55.6	25.1	18
SOLUTIONF19_1	1	91.31	73.56	66.66	0.4352	0.3692	0.4596	24.8	55.6	25.0	19
SOLUTIONF20_1	1	166.42	89.21	219.85	0.0022	0.9991	0.3624	24.2	55.7	23.1	20
<hr/>											
		α	β	γ	x	y	z	CC	Rf	RH	
SOLUTIONF1_1	1	7.95	79.45	166.11	0.2408	0.1908	0.4630	19.9	55.4	22.1	1
SOLUTIONF2_1	1	7.89	79.52	285.64	0.2407	0.1911	0.4627	19.9	55.4	22.0	2
SOLUTIONF3_1	1	8.05	79.54	45.73	0.2405	0.1920	0.4631	20.0	55.4	22.0	3
SOLUTIONF4_1	1	12.57	58.99	23.67	0.0329	0.0712	0.0919	20.0	55.6	22.7	4
SOLUTIONF5_1	1	12.62	58.63	144.27	0.0329	0.0720	0.0919	20.0	55.6	22.9	5
SOLUTIONF6_1	1	12.32	58.36	264.75	0.4803	0.4721	0.1815	20.1	55.3	22.4	6
SOLUTIONF7_1	1	41.24	72.45	190.25	0.3948	0.0528	0.0794	20.2	55.4	23.4	7
SOLUTIONF8_1	1	58.94	62.15	137.38	0.1365	0.4433	0.3695	19.6	55.5	22.3	8
SOLUTIONF9_1	1	58.99	62.09	257.34	0.1367	0.4435	0.3694	19.6	55.5	22.3	9
SOLUTIONF10_1	1	40.80	72.68	310.70	0.3953	0.0527	0.0799	20.0	55.5	23.4	10
SOLUTIONF11_1	1	40.90	72.81	70.69	0.3952	0.0527	0.0798	20.0	55.5	23.4	11
SOLUTIONF12_1	1	59.02	62.20	17.27	0.1365	0.4431	0.3697	19.6	55.6	22.3	12
SOLUTIONF13_1	1	167.69	60.33	237.35	0.0688	0.0839	0.4830	20.2	55.4	21.7	13
SOLUTIONF14_1	1	167.48	59.71	357.24	0.0666	0.0822	0.3957	20.0	55.6	21.4	14
SOLUTIONF15_1	1	167.64	59.75	117.28	0.0665	0.0823	0.3960	20.0	55.7	21.4	15
SOLUTIONF16_1	1	61.35	59.45	121.72	0.4402	0.4283	0.1154	19.6	55.9	22.7	16
SOLUTIONF17_1	1	61.35	59.40	1.87	0.4406	0.4283	0.1153	19.7	55.9	22.7	17
SOLUTIONF18_1	1	74.27	27.80	166.59	0.0799	0.4830	0.4211	19.4	55.5	22.1	18
SOLUTIONF19_1	1	74.00	27.61	46.80	0.0799	0.4831	0.4217	19.4	55.6	22.1	19
SOLUTIONF20_1	1	74.20	27.54	286.52	0.0798	0.4830	0.4217	19.4	55.5	22.2	20
<hr/>											
		α	β	γ	x	y	z	CC	Rf	RH	
SOLUTIONF1_1	1	114.87	56.95	23.58	0.4170	0.4090	0.2970	15.9	55.2	19.9	1
SOLUTIONF2_1	1	114.86	56.88	263.60	0.4170	0.4088	0.2971	15.9	55.2	19.9	2
SOLUTIONF3_1	1	114.82	56.94	143.65	0.4170	0.4090	0.2973	15.9	55.2	19.9	3
SOLUTIONF4_1	1	62.39	58.83	239.05	0.0253	0.4434	0.1193	16.5	55.3	20.3	4
SOLUTIONF5_1	1	62.43	58.79	359.09	0.0252	0.4434	0.1193	16.5	55.3	20.3	5
SOLUTIONF6_1	1	62.46	58.76	119.02	0.0254	0.4435	0.1193	16.5	55.3	20.3	6
SOLUTIONF7_1	1	8.86	81.79	164.61	0.1545	0.1136	0.4564	15.5	55.1	19.4	7
SOLUTIONF8_1	1	167.59	58.38	237.31	0.0350	0.4282	0.4480	15.6	55.1	19.7	8
SOLUTIONF9_1	1	167.63	58.26	357.26	0.0350	0.4281	0.4478	15.6	55.1	19.7	9
SOLUTIONF10_1	1	167.55	58.40	117.31	0.0350	0.4283	0.4480	15.5	55.1	19.7	10
SOLUTIONF11_1	1	57.04	62.99	138.61	0.1504	0.4811	0.4845	15.2	55.2	19.9	11
SOLUTIONF12_1	1	56.94	62.95	258.46	0.1504	0.4812	0.4844	15.2	55.2	20.0	12
SOLUTIONF13_1	1	43.39	74.05	188.63	0.3961	0.0494	0.0798	15.6	55.3	20.2	13
SOLUTIONF14_1	1	136.38	72.38	190.24	0.4182	0.4929	0.2503	15.3	55.4	19.8	14
SOLUTIONF15_1	1	136.15	72.76	70.12	0.4655	0.0677	0.0421	15.7	55.3	20.2	15
SOLUTIONF16_1	1	57.01	62.99	18.34	0.1504	0.4812	0.4843	15.2	55.2	19.9	16
SOLUTIONF17_1	1	13.22	57.87	257.66	0.0224	0.4473	0.4931	15.9	55.4	19.2	17
SOLUTIONF18_1	1	136.19	72.70	310.13	0.4654	0.0677	0.0421	15.7	55.3	20.2	18
SOLUTIONF19_1	1	13.19	58.03	138.00	0.0228	0.4476	0.4932	16.0	55.5	19.3	19
SOLUTIONF20_1	1	13.14	57.95	17.73	0.0225	0.4473	0.4930	15.9	55.4	19.2	20

Tabela 5.4 Resultado do refinamento de corpo rígido, usando o modelo construído do MODELLER, para os melhores ângulos função de rotação após transladados. α , β e γ são os ângulos Eurelianoss, x, y e z correspondem às translações, CC é o coeficiente de correlação, Rf é o fator R e RH refere-se a um outro fator R que leva em conta a altura do pico. As soluções que se seguem correspondem aos intervalos de resoluções 15-6, 15-5 e 15-4Å, respectivamente.

		α	β	γ	x	y	z	CC	Rf	RH	
SOLUTIONF1_1	1	139.66	73.45	310.29	0.1066	0.1830	0.4145	43.0	55.3	39.2	1
SOLUTIONF2_1	1	139.77	73.35	190.65	0.1065	0.1833	0.4145	43.0	55.3	39.1	2
SOLUTIONF3_1	1	139.65	73.42	70.19	0.1067	0.1828	0.4146	43.0	55.3	39.2	3
SOLUTIONF4_1	1	61.41	61.66	241.47	0.0789	0.3151	0.3749	42.9	55.3	38.5	4
SOLUTIONF5_1	1	61.40	61.66	1.88	0.0787	0.3149	0.3746	43.0	55.3	38.5	5
SOLUTIONF6_1	1	119.54	62.11	142.34	0.0225	0.4365	0.4329	43.5	55.4	39.6	6
SOLUTIONF7_1	1	13.17	58.54	319.30	0.4832	0.2294	0.1297	43.3	55.3	38.9	7
SOLUTIONF8_1	1	119.62	61.90	21.47	0.2132	0.4378	0.4325	42.7	55.6	39.7	8
SOLUTIONF9_1	1	119.23	61.66	260.78	0.2122	0.4381	0.4327	42.6	55.5	39.5	9
SOLUTIONF10_1	1	39.83	74.07	313.48	0.4314	0.0470	0.2099	42.8	55.5	39.0	10
SOLUTIONF11_1	1	39.61	74.15	73.48	0.4315	0.0469	0.2098	42.7	55.5	38.9	11
SOLUTIONF12_1	1	39.67	74.23	193.44	0.4315	0.0471	0.2097	42.7	55.5	38.9	12
SOLUTIONF13_1	1	73.72	26.58	66.28	0.0852	0.4182	0.2573	42.8	55.4	39.6	13
SOLUTIONF14_1	1	73.79	26.31	305.59	0.0840	0.4183	0.2570	42.6	55.4	39.3	14
SOLUTIONF15_1	1	61.82	61.16	121.46	0.4430	0.4322	0.1722	42.5	55.5	38.3	15
SOLUTIONF16_1	1	51.24	65.43	263.69	0.0663	0.3971	0.4931	43.1	55.4	38.8	16
SOLUTIONF17_1	1	51.38	65.81	143.31	0.0831	0.9967	0.4038	42.7	55.6	38.7	17
SOLUTIONF18_1	1	-0.18	75.29	313.77	0.0232	0.0021	0.1684	41.6	56.2	35.5	18
SOLUTIONF19_1	1	0.27	75.32	193.60	0.0232	0.0021	0.1683	41.6	56.2	35.5	19
SOLUTIONF20_1	1	-0.85	75.03	73.71	0.4740	0.0021	0.4014	41.9	56.0	35.9	20
<hr/>											
		α	β	γ	x	y	z	CC	Rf	RH	
SOLUTIONF1_1	1	39.37	74.46	313.47	0.4302	0.0474	0.4916	34.9	55.5	33.4	1
SOLUTIONF2_1	1	39.20	74.52	73.45	0.4303	0.0478	0.4917	34.9	55.5	33.4	2
SOLUTIONF3_1	1	39.32	74.55	193.51	0.4303	0.0476	0.4917	34.9	55.5	33.5	3
SOLUTIONF4_1	1	73.78	26.41	306.01	0.0850	0.4180	0.2571	34.3	55.5	33.3	4
SOLUTIONF5_1	1	108.50	27.20	313.61	0.4249	0.4636	0.3260	35.3	55.5	33.2	5
SOLUTIONF6_1	1	108.02	27.01	193.95	0.4249	0.4641	0.3263	35.3	55.5	33.3	6
SOLUTIONF7_1	1	61.92	62.28	1.01	0.4722	0.1127	0.0475	34.6	55.3	32.3	7
SOLUTIONF8_1	1	107.73	26.71	74.74	0.0872	0.0841	0.2434	34.6	55.5	33.4	8
SOLUTIONF9_1	1	73.59	26.50	65.99	0.0848	0.4178	0.2573	34.3	55.4	33.1	9
SOLUTIONF10_1	1	140.26	74.38	310.49	0.4314	0.4515	0.0120	34.7	55.4	33.4	10
SOLUTIONF11_1	1	140.59	74.17	191.01	0.4312	0.4505	0.0130	34.5	55.3	33.1	11
SOLUTIONF12_1	1	139.75	73.81	70.30	0.4621	0.4374	0.0455	35.2	55.6	33.2	12
SOLUTIONF13_1	1	73.67	26.65	185.93	0.0845	0.4185	0.2569	34.2	55.4	33.0	13
SOLUTIONF14_1	1	118.55	61.81	142.17	0.0220	0.4369	0.4327	34.6	55.3	33.0	14
SOLUTIONF15_1	1	85.33	73.62	191.98	0.4329	0.0480	0.0138	34.5	55.7	31.8	15
SOLUTIONF16_1	1	85.33	73.63	72.26	0.4330	0.0478	0.0144	34.4	55.7	31.6	16
SOLUTIONF17_1	1	51.26	65.45	143.75	0.0666	0.3971	0.4924	34.0	55.4	32.0	17
SOLUTIONF18_1	1	51.33	65.46	23.73	0.0666	0.3972	0.4924	34.0	55.4	32.0	18
SOLUTIONF19_1	1	51.44	65.39	263.61	0.0665	0.3973	0.4926	34.0	55.4	32.0	19
SOLUTIONF20_1	1	94.66	73.85	71.38	0.3954	0.0266	0.2910	34.3	55.8	32.2	20
<hr/>											
		α	β	γ	x	y	z	CC	Rf	RH	
SOLUTIONF1_1	1	74.72	26.30	305.01	0.0656	0.3451	0.1357	32.7	55.4	29.9	1
SOLUTIONF2_1	1	74.16	26.34	65.59	0.0656	0.3451	0.1356	32.7	55.4	29.7	2
SOLUTIONF3_1	1	60.40	63.47	119.82	0.2169	0.4215	0.3843	33.0	54.9	29.9	3
SOLUTIONF4_1	1	74.32	26.28	185.42	0.0657	0.3450	0.1356	32.7	55.4	29.8	4
SOLUTIONF5_1	1	140.92	74.41	191.44	0.4301	0.4478	0.0152	33.2	55.2	30.1	5
SOLUTIONF6_1	1	118.27	61.41	20.99	0.1364	0.3717	0.1257	32.6	55.0	28.2	6
SOLUTIONF7_1	1	108.29	26.48	194.48	0.0861	0.0831	0.2411	32.6	55.5	29.7	7
SOLUTIONF8_1	1	108.28	26.36	74.59	0.0858	0.0831	0.2411	32.7	55.5	29.8	8
SOLUTIONF9_1	1	58.47	62.73	239.56	0.0209	0.0654	0.0675	33.3	55.3	30.4	9
SOLUTIONF10_1	1	140.85	74.83	311.08	0.4307	0.4490	0.0148	33.3	55.2	30.3	10
SOLUTIONF11_1	1	108.69	26.61	314.22	0.0856	0.0825	0.2410	32.6	55.4	29.6	11
SOLUTIONF12_1	1	38.98	75.41	192.96	0.4308	0.0501	0.4891	33.3	55.4	30.0	12
SOLUTIONF13_1	1	140.67	74.84	70.87	0.4310	0.4496	0.0141	33.3	55.2	30.3	13
SOLUTIONF14_1	1	38.93	75.33	312.96	0.4308	0.0500	0.4891	33.4	55.4	30.1	14
SOLUTIONF15_1	1	61.81	60.72	2.16	0.4022	0.1260	0.2683	32.3	55.2	28.6	15
SOLUTIONF16_1	1	38.87	75.36	72.85	0.4310	0.0501	0.4891	33.3	55.4	30.0	16
SOLUTIONF17_1	1	51.58	65.79	143.44	0.0442	0.4270	0.2716	32.3	55.5	28.4	17
SOLUTIONF18_1	1	85.08	73.55	192.03	0.0543	0.3902	0.2882	31.6	55.7	28.2	18
SOLUTIONF19_1	1	51.67	65.77	263.33	0.0442	0.4271	0.2716	32.3	55.5	28.4	19
SOLUTIONF20_1	1	85.11	73.57	72.06	0.0544	0.3902	0.2883	31.6	55.7	28.2	20

Para todos esses resultados apresentados, os modelos construídos eram uma unidade hexamérica, uma vez que as tentativas usando monômeros ou dímeros apresentaram resultados piores. Os resultados obtidos para 1,5 ou 2 hexâmeros na unidade assimétrica, para todos modelos, também apresentaram resultados desanimadores.

Como é de se esperar, à medida que se reduz o intervalo de resolução diminui-se o número de reflexões e aumentam-se o índice de correlação CC e o fator R. Os piores valores para esses índices ocorrem com o modelo 1DKR hexamérico de *Bacillus*, onde todas as cadeias laterais foram preservadas, evidenciando que é preferível a ausência de algum átomo a tê-lo em posição errada nos cálculos das funções de rotação e translação. Em todos os resultados é visível o eixo de ordem 3 da simetria pontual da unidade biológica através da diferença de 120° em γ para cada três posições de uma mesma solução encontrada.

Em geral, os valores encontrados para o fator R (em torno de 55%), ao lado do relativo nivelamento para os coeficientes de correlação CC, dificultam a distinção de alguma solução proeminente. Contudo, o refinamento de corpo rígido para a solução (Tabela 5.2): $\alpha = 126.94$, $\beta = 90.22$, $\gamma = 95.67$, $x = 0.4843$, $y = 0.0260$, $z = 0.2700$, CC = 39.8 e Rf = 55.6 apresenta modesto destaque, motivando nossa análise detalhada (sem sucesso) tanto no empacotamento cristalino quanto no refinamento através do programa REFMAC5 do CCP4.

5.6 Referências bibliográficas

- Albrecht, M.; Hanisch, D.; Zimmer, R. & Lengauer, T. (2002). *Improving fold recognition of protein threading by experimental distance constraints.* In: **Silico Biology**, 2(3), 325.
- Altschul, S. F. (1991). *Amino Acid Substitution Matrices from an Information Theoretic Perspective.* **J. Mol. Biol.**, 219, 555.
- Barton, G. J. (1996). **Protein Structure Prediction – a practical approach.** Oxford University Press.
- Bateman, A.; Birney, E.; Cerruti, L.; Durbin, R.; Etwigger, L.; Eddy, S. R.; Griffiths-Jones, S.; Howe, K. L.; Marshall, M. & Sonnhammer, E. L. (2002). *The Pfam Protein Families Database.* **Nucleic Acids Research**, 30, 276.
- Brünger, A. T. (1990). *Extension of molecular replacement: a new search strategy based on Patterson correlation refinement.* **Acta Cryst.** A46, 46.
- CCP4 (1994). *The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography.* **Acta Cryst.** D50, 760.
- Crowther, R. A. & Blow, D. M. (1967). *A method of positioning a known molecule in an unknown crystal structure.* **Acta Cryst.** 23, 544.
- Dodson, E. J. (1985). *Molecular replacement: the method and its problems.* In **Molecular Replacement. Proceedings of the Daresbury Study Weekend, 15-16 February 1985.** Editado por Machin, P. A., SERC, Daresbury Laboratory, Daresbury, 33.
- Dodson, E. J.; Gover, S. & Wolf, W. (1992). **Molecular Replacement. Proceedings of the CCP4 Study Weekend, 31 January - 1 February 1992.** Science and Engineering Research Council, Daresbury Laboratory, Daresbury.
- Driessens, H. P. C. & Tickle, I. J. (1994). *The Use of Normalised Amplitudes in the Rotation Function.* **Joint CCP4 and ESFEACBM Newsletter on Protein Crystallography** 30, 13.
- Driessens, H. P. C. & Tickle, I. J. (1996) Molecular Replacement using known structural information. In **Methods in Molecular Biology: Crystallographic Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.** Vol. 56., C. Jones, B. Mulloy, M.R. Sanderson, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Higgins, D.; Thompson, J.; Gibson, T.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.* **Nucleic Acids Res.** 22, 4673.
- Hooft, R. W.; Sander, C. & Vriend, G. (1996). *Positioning hydrogen atoms by optimizing hydrogen-bond networks in protein structures.* **Proteins**, 26, 363.
- Jones, D.T. (1999). *Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices.* **J. Mol. Biol.**, 292, 195.

- Karlin, S. & Altschul, S. F. (1990). *Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**, 2264.
- Kleywegt, G.J. (1996). *Making the most of your search model. Joint CCP4 and ESFEACBM Newsletter on Protein Crystallography* **32**, 32.
- Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W. & Thornton, J. M. (1998). *Validation of protein models derived from experiment.* **Curr. Opin. Struct. Biol.**, **8**, 631.
- Luthy, R.; Bowie, J. U. & Eisenberg, D. (1992). *Assessment of protein models with three-dimensional profiles.* **Nature**, **356**, 83.
- McGuffin L. J.; Bryson K. & Jones, D. T. (2000). *The PSIPRED protein structure prediction server.* **Bioinformatics**, **16**, 404.
- McGuffin, L. J. & Jones, D. T. (2002). *Targeting novel folds for structural genomics.* **Proteins**, **48**, 44.
- McGuffin, L. J. & Jones D. T. (2003). *Improvement of the GenTHREADER method for genomic fold recognition.* **Bioinformatics**, **19**, 874.
- Moss, D.S. (1985). *The symmetry of the rotation function.* **Acta Cryst. A41**, 470.
- Napolitano, H. B.; Sculaccio, S. A.; Thiemann, O. H. & Oliva, G. (2004) Preliminary crystallographic analysis of sugarcane phosphoribosyl-pyrophosphate synthase. **Acta Cryst. D.** Artigo submetido.
- Navaza, J. (1987). *On the fast rotation function.* **Acta Cryst. A43**, 645.
- Navaza, J. (1990). *Accurate computation of the rotation matrices.* **Acta Cryst. A46**, 619.
- Navaza, J. (1992) AMoRe: A new package for molecular replacement. In: **Molecular Replacement. Proceedings of the CCP4 Study Weekend, 31 January - 1 February 1992.** Editado por Dodson, E. J.; Gover, S. & Wolf, W., SERC, Daresbury Laboratory, Daresbury, 87.
- Navaza, J. (1994). *AMoRe: An Automated Package for Molecular Replacement.* **Acta Cryst. A50**, 157.
- Needleman, S. B. & Wunsch, C. D. (1970). *A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins.* **J. Mol. Biol.**, **48**, 443.
- Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C. & Sasisekharan, V. (1963). *Stereochemistry of polypeptide chain configurations.* **J. Mol. Biol.** **7**, 95.
- Rossmann, M. G. & Blow, D. M. (1962). *The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit.* **Acta Cryst.** **15**, 24.
- Sali, A. & Blundell, T. L. (1993). *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints.* **J. Mol. Biol.**, **234**, 779.
- Sanchez, R. & Sali, A. (1998). *Large-scale protein structure modeling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome.* **Proc. Natl. Sci. USA**, **95**, 13597.
- Sculaccio, S. A.; Pinto, A. P. A.; Napolitano, H. B.; Beltramini, L. M.; Oliva, G.; Carrilho, E. & Thiemann, O. H. (1994). *Molecular and evolutionary characterization of the sugarcane Phosphoribosylpyrophosphate synthase*

- (sPRS). **Biochemical and Biophysical Research Communication.** Artigo em preparação.
- Tickle, I.J. (1992). *Fast Fourier Transform Translation Functions*. In: **Molecular Replacement. Proceedings of the CCP4 Study Weekend, 31 January - 1 February 1992**. Editado por Dodson, E. J.; Gover, S. & Wolf, W., SERC, Daresbury Laboratory, Daresbury, 20.
- Vriend, G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.*, 8, 52.

6. Conclusões e perspectivas

6.1 A estrutura quaternária

A estrutura tridimensional monomérica do modelo sPRS é composta por dois domínios bem definidos, relacionados por um pseudo-eixo de simetria de ordem 2, como pode ser visto através da Fig. (6.1). Cada domínio do monômero é composto por 5 folhas- β paralelas envoltas por 4 hélice- α . A seqüência característica que se liga ao substrato R5F vai do Asp237 à Thr245, conforme identificado no alinhamento da Fig. (5.3). A estrutura tridimensional desse *loop* foi identificado a partir da estrutura cristalográfica da bPRS (Eriksen *et al.*, 2000), e está em destaque com círculo amarelo na Fig. (6.1).

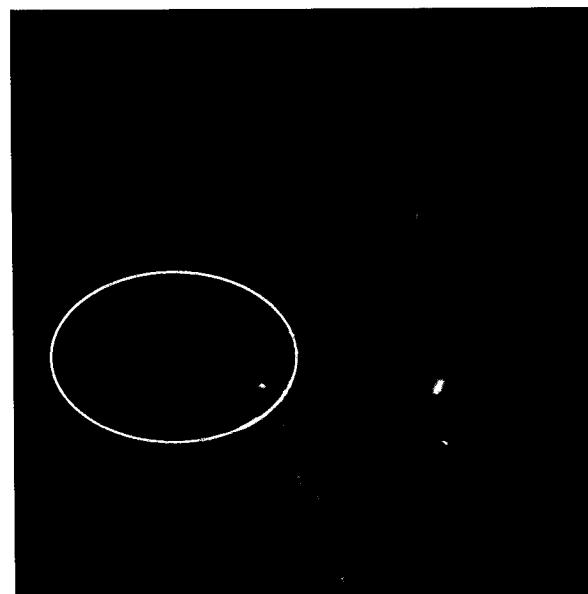


Figura 6.1 Enovelamento geral do monômero para o modelo sPRS. O destaque em amarelo refere-se à região catalítica.

A estrutura quaternária do modelo sPRS foi construída de acordo com a simetria da bPRS, de forma que cada subunidade correlaciona-se simetricamente com as demais através de um eixo de ordem 2 perpendicular à outro de ordem 3, formando uma simetria pontual 32. Os seis monômeros estão arranjados de forma que seus domínios N-terminais ficam o mais próximo do eixo de ordem 3 da simetria pontual, fazendo com que cada subunidade esteja o mais próximo possível de seus vizinhos por ambos lados. Ao todo, 4200 Å² (30% da superfície de cada subunidade) estão envolvidos com a formação do hexâmero.

A região da hélice α3N (Ile82 à Val88), de alta conservação de resíduos, fica próxima à região Leu127 à Leu131 da hélice α4N da outra subunidade, favorecendo a estabilização da forma hexamérica para a unidade biológica. Os aspectos estruturais mais importantes descritos para a bPRS, incluindo os motivos característicos da R5F, do PRPP e do grupo fosfato, estão conservados no modelo sPRS construído. A Fig. (6.2) ilustra a estrutura quaternária da sPRS, onde cada subunidade A e seu vizinho B estão alinhados paralelamente, de forma que, respectivamente, os domínios N-terminal e C-terminal formam a interface. O mesmo para as subunidades C e D, e E e F.

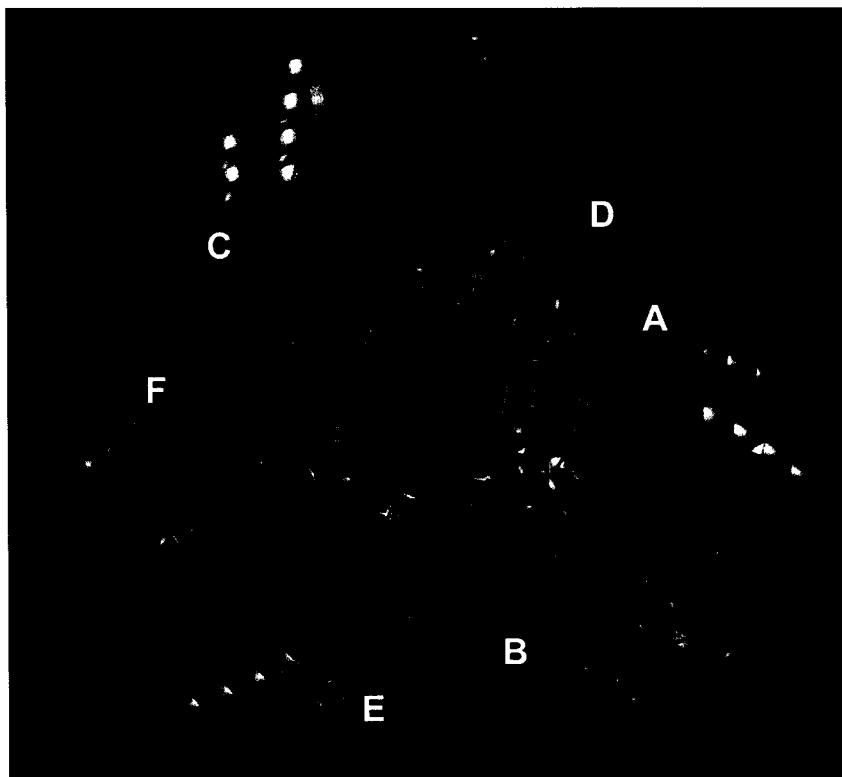


Figura 6.2 Enovelamento da estrutura quaternária para a sPRS. Cada subunidade A e seu vizinho B estão alinhados paralelamente, de forma que os domínios N-terminal e C-terminal formam respectivamente a interface. O mesmo para as subunidades C e D, e E e F.

A simetria 32 para a estrutura hexamérica do modelo sPRS é consistente com os valores do peso molecular para a unidade biológica, obtida por cromatografia de exclusão molecular (Fig. 4.5a) e espalhamento dinâmico de luz (Fig. 4.5b). Adicionalmente a simetria espacial $P2_{1}2_{1}2$ da estrutura cristalina, em vez do grupo espacial com empacotamento mais favorável $P2_{1}2_{1}2_1$ (Tsai *et al.*, 1999), é consistente com a simetria pontual do enovelamento da unidade biológica, dando lugar às possibilidades 1,5 e 2,5 hexâmeros na unidade assimétrica. Os detalhes estruturais do modelo construído estão descritos em Sculaccio *et al.* (2004).

6.2 O mecanismo catalítico

Conforme apresentado na Fig. (1.2), a enzima sPRS produz o PRPP e o AMP a partir dos substratos R5F e ATP. A enzima bPRS e outras PRS (a humana, por exemplo) possuem um sítio alostérico, que se liga ao íon fosfato, afastado do sítio ativo de ligação aos substratos. A atividade enzimática dessas enzimas é assim regulada pelas alterações conformacionais oriundas da ligação ao íon. Uma atenção especial centralizada na independência da atividade catalítica ao íon fosfato, para a sPRS, norteou nossa análise.

A estrutura hexamérica da enzima fosforribosilpirofosfato sintetase de *Bacillus subtilis* está discutida em detalhes em Erikson *et al.* (2000). O monômero é constituído por dois domínios constituídos por 5 folhas- β paralelas e 4 hélices- α descritas para o modelo sPRS, porém uma hélice- β_{10} adicional no domínio N-terminal é observada. A Fig. (6.3) ilustra o sítio catalítico entre as enzimas bPRS e sPRS. A estrutura tridimensional da região do sítio catalítico é conservada estérica, química e geometricamente, de forma que os motivos de ligação à R5F e ao PRPP são altamente conservados.

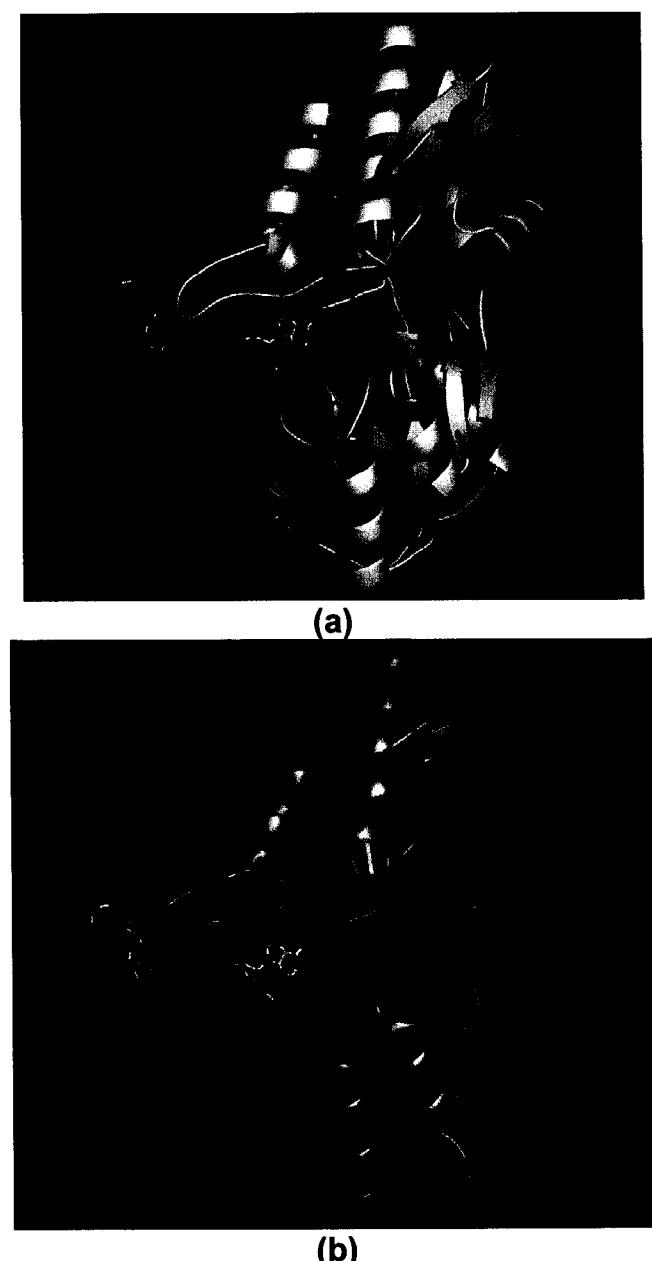


Figura 6.3 Similaridade estrutural para a região do sítio catalítico entre as enzimas sPRS e bPRS. (a) Estrutura cristalográfica da bPRS com a R5F; (b) Sobreposição do modelo sPRS à bPRS co-cristalizada ilustrando a similaridade estrutural na região catalítica.

Os testes de atividade enzimática para a sPRS apresentam os mesmos valores tanto na presença quanto na ausência do íon fosfato. Esse resultado evidencia que a sPRS é uma *sintase*, em vez de *sintetase*, como é o caso das enzimas bPRS e PRS humana (Sonoda *et al.*, 1991; Tatibana *et al.*, 1995).

Além do sítio catalítico, a estrutura da enzima bPRS revela a presença de um sítio alostérico, que regula a atividade enzimática pela presença do íon fosfato (ou sulfato). A hélice-3₁₀ está envolvida tanto na estabilização do hexâmero quanto na formação do sítio alostérico, podendo ligar-se aos íons fosfato e sulfato. A Fig. (6.4) ilustra o sítio alostérico da bPRS ligado ao íon sulfato.



Figura 6.4 Ilustração do íon sulfato ligado ao sítio alostérico da enzima bPRS.

O alinhamento estrutural da Fig. (5.3) ilustra algumas diferenças entre o modelo obtido para sPRS e a estrutura cristalográfica da bPRS. Dentre essas diferenças está a presença da hélice-3₁₀ N-terminal, na bPRS e ausente na sPRS. A Fig. (6.5) ilustra a diferença estrutural para essa região do sítio regulatório.

A hélice-3₁₀ N-terminal, envolvida na coordenação do fosfato (ou do sulfato) com o sítio alostérico da enzima bPRS, pode ser vista na Fig (6.5a). A mesma posição é ilustrada para o modelo sPRS na Fig. (6.5b), onde a coordenação do íon sulfato fica comprometida pela diferença geométrica e estérica na região do sítio alostérico, sugerindo que, na região

identificada como regulatória para a bPRS, falta a hélice-3₁₀ para a sPRS. Esse dado é consistente com os experimentos de atividade enzimática da sPRS, que indicam a independência da sua atividade enzimática à presença do íon fosfato (ou do sulfato). Os outros sulfatos indicados na Fig. (6.5) apenas ilustram a localização do sítio catalítico.

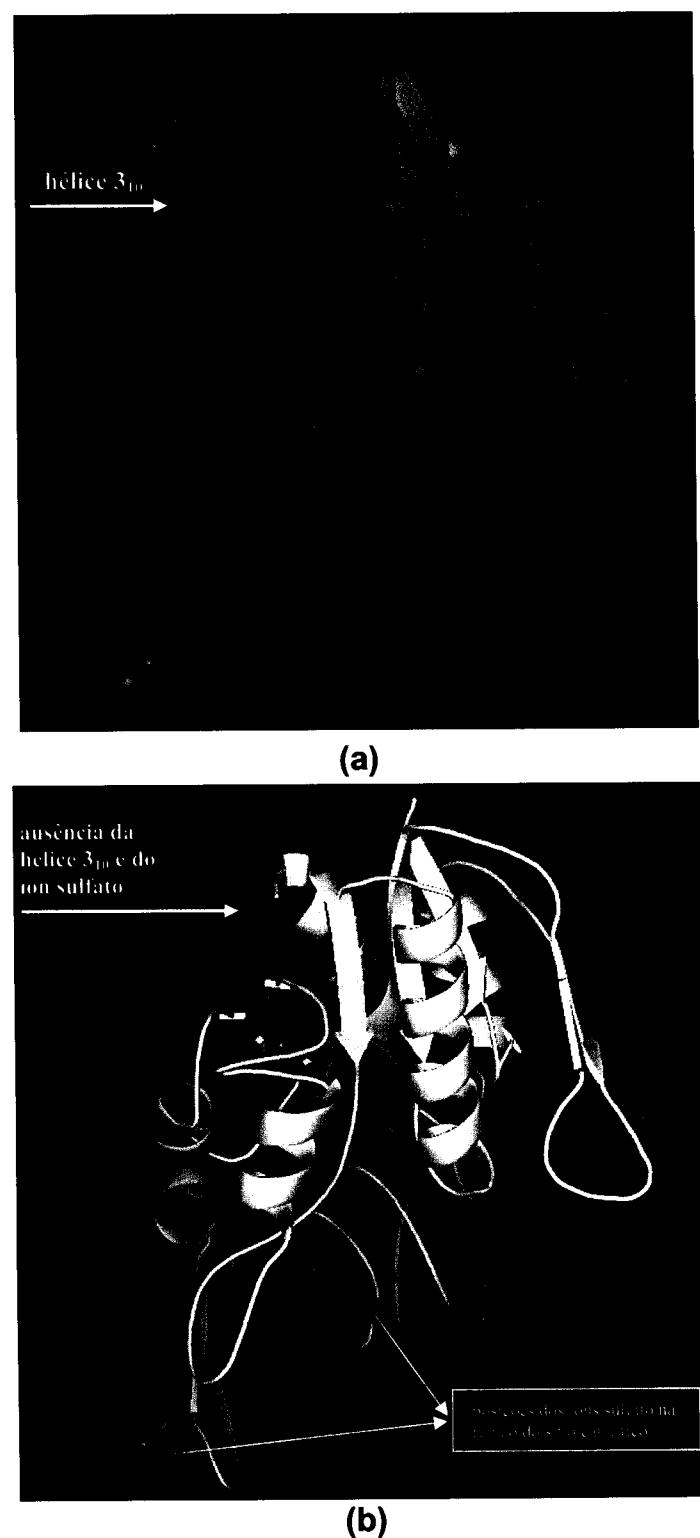


Figura 6.5 Ilustração da diferença estrutural entre sítio regulatório para as enzimas bPRS e sPRS. (a) Envolvimento da hélice-3₁₀ N-terminal na coordenação do sulfato com o sítio alostérico para a enzima bPRS; (b) Ilustração da mesma posição para o modelo sPRS, onde a coordenação do íon sulfato fica comprometida pela diferença geométrica e estérica na região do sítio alostérico.

As similaridades estruturais entre as enzimas bPRS e sPRS são coerentes com a síntese do PRPP a partir do R5F, conforme apresentado na Fig. (1.2) e observado nos experimentos bioquímicos da sPRS. As diferenças estruturais observadas entre a estrutura cristalográfica da bPRS e o modelo construído para a sPRS são consistentes com a diferença funcional observada, sugerindo a ausência do grupo alostérico que se liga ao íon fosfato (ou do sulfato) para a enzima sPRS. Em outras palavras, a diferença estrutural é coerente com diferença funcional entre uma PRS sintetase e uma PRS sintase.

A enzima bPRS, como descrita, é regulada diretamente por alterações estruturais não-covalentes e tem sua afinidade da ligação enzima-substrato regulada pela presença do íon fosfato, que se liga ao sítio alostérico (distante do sítio ativo). Diferentemente, a enzima sPRS não apresenta regulação da atividade enzimática pelo íon fosfato e os dados descritos nessa tese revelam a consistência entre a estrutura tridimensional e sua atividade catalítica fosfato-independente, sugerindo a ausência de uma regulação catalítica pelo íon sulfato.

6.3 Perspectivas

Na presente tese foi descrita o trabalho teórico-experimental que nos levou ao conhecimento da estrutura tridimensional da enzima sPRS, sendo um importante passo para se compreender a correlação estrutura-atividade. Adicionalmente, os fundamentos de um método alternativo para determinação do conteúdo de solvente em cristais de proteínas foram

descritos. Os resultados obtidos representam um adequado ponto de partida para os seguintes trabalhos:

1. **Otimização das condições de cristalização** da enzima sPRS objetivando um conjunto de dados de difração a uma resolução mais alta. Essa etapa inclui experimentos de clivagem da cauda hexahistidina N-terminal.
2. **Refinamento da estrutura cristalográfica** da enzima sPRS objetivando um modelo tridimensional via métodos cristalográficos.
3. **Desenvolvimento de um método alternativo para determinação do conteúdo de solvente** a partir das intensidades medidas experimentalmente. A base teórica apresentada na secção 4.2 tem implicações tanto em dados cristalográficos quanto em dados de SAXS, podendo ser analisados o conteúdo de solvente e o peso molecular, respectivamente.

6.4 Notas finais

O trabalho de doutoramento apresentado nessa tese resultou nos manuscritos '*Preliminary crystallographic analysis of sugarcane phosphoribosyl-pyrophosphate synthase*' (Napolitano *et al.*, 2004a) e '*Molecular and evolutionary characterization of the sugarcane Phosphoribosylpyrophosphate synthase (sPRS)*' a ser submetido para a revista **Biochemical and Biophysical Research Communication**.

Houve também a colaboração com o estudante de doutorado Márcio Silva, orientado pelos Profs. Glaucius Oliva e Otávio Thiemann, do IFSC da

USP, na solução da estrutura cristalográfica de inibidores da enzima APRT. Dessa colaboração resultaram as publicações Silva *et al.* (2003), Napolitano *et al.* (2003a) e Napolitano *et al.* (2003b) e ainda a submissão do artigo Napolitano *et al.* (2004b).

O manuscrito que descreve a determinação do conteúdo de solvente a partir das intensidades difratadas está sendo finalizado e intencionamos submetê-lo para o periódico **Acta Crystallographica section D**. Porém os resultados já foram discutidos com cientistas experientes em vários encontros científicos, conforme pode ser visto em Napolitano *et al.* (2003c), Napolitano *et al.* (2003d), Napolitano *et al.* (2003e) e Fischer *et al.* (2003).

6.5 Referências bibliográficas

- Eriksen, T. A.; Kadziola, A.; Bentsen, A.-K.; Harlow, K. W. & Larsen, S. (2000). *Structural basis for the function of bacillus subtilis phosphoribosyl-pyrophosphate synthetase*. **Nat. Struct. Biol.** 7, 303.
- Fischer, H.; Craievich, A. F.; Napolitano, H. B.; Oliva, G. (2003). *Determinação do peso molecular de proteínas por SAXS em escala arbitrária*. In: **Livro de Resumos do XXVI ENFMC**. Caxambu.
- Napolitano, H. B.; Silva, M.; Ellena, J.; Rocha, W. C.; Vieira, P. C.; Thiemann, O. H. & Oliva, G. (2003a). *Redetermination and comparative structural study of isopimpinellin: a new inhibitor against the Leishmania APRT enzyme*. **Acta Cryst. E59**, 1506.
- Napolitano, H. B.; Silva, M.; Ellena, J.; Rocha, W. C.; Vieira, P. C.; Thiemann, O. H. & Oliva, G. (2003b). *Redetermination of skimmianine: a new inhibitor against the Leishmania APRT enzyme*. **Acta Cryst. E59**, pp. 1503.
- Napolitano, H. B.; Trapani, S.; Fischer, H.; Craievich, A. F. & Oliva, G. (2003c). *Is it possible to determine the solvent content of the protein crystals from diffraction intensities analysis?* In: **Livro de Resumos da XVI SBCr**. Editado por Napolitano, H. B. & Mascarenhas, Y. P. SBCr, São Carlos, 17.
- Napolitano, H. B. & Oliva, G. (2003d). *Determination of the Solvent Content in Protein Crystals from the Analysis of the Diffraction Intensities*. In: **Anais do VII WPOS**. São Carlos.
- Napolitano, H. B.; Oliva, G.; Fischer, H.; Craievich, A. F. (2003e). *Molecular weight determination on an arbitrary scale by SAXS*. In: **ACA 2003 Annual Meeting: program and abstract book**. Covington.

- Napolitano, H. B.; Sculaccio, S. A.; Thiemann, O. H. & Oliva, G. (2004a). Preliminary crystallographic analysis of sugarcane phosphoribosyl-pyrophosphate synthase. *Acta Cryst. D.* Artigo submetido.
- Napolitano, H. B.; Silva, M.; Ellena, J.; Rodrigues, B. D. G.; Almeida, A. L. C.; Vieira, P. C.; Oliva, G. & Thiemann, O. H. (2004b). A novel coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* Artigo em preparação.
- Sculaccio, S. A.; Pinto, A. P. A.; Napolitano, H. B.; Beltramini, L. M.; Oliva, G.; Carrilho, E. & Thiemann, O. H. (2004). Molecular and evolutionary characterization of the sugarcane Phosphoribosylpyrophosphate synthase (sPRS). Artigo em preparação a ser submetido para *Biochemical and Biophysical Research Communication.*
- Silva, M.; Napolitano, H. B.; Ellena, J.; Rocha, W. C.; Vieira, P. C.; Oliva, G. & Thiemann, O. H. (2003). 3-(5,7-Dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-benzo[b]pyran-6-yl) propionic acid: a potential inhibitor against *Leishmania*. *Acta Cryst. E59*, 1575.
- Sonoda, T.; Taira, M.; Ishijima, S.; Ishizuka, T.; Iizasa, T. & Tatibana, M. (1991). Complete nucleotide sequence of human phosphoribosyl pyrophosphate synthetase subunit I (PRS I) cDNA and a comparison with human and rat PRPS gene families. *J. Biochem. (Tokyo)* **109**, 361.
- Tatibana, M.; Kita, K.; Taira, M.; Ishijima, S.; Sonoda, T.; Ishizuka, T.; Iizasa, T. & Ahmad, I. (1995). Mammalian phosphoribosyl-pyrophosphate synthetase. *Adv. Enzyme Regul.* **35** pp. 229.
- Tsai, J.; Taylor, C.; Chothia, C. & Gerstein, M. (1999). The packing density in proteins: Standard radii and volumes. *J. Mol. Biol.* **290**, 253.

Apêndice A

Composição química das condições de cristalização para os fatoriais incompletos da **Hampton Research Corp.**: *Crystal Screen* [FATORIAL 1], *Crystal Screen 2* [FATORIAL 2] e *Grid Screen* $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pela ordem. Adicionalmente segue um guia de utilização desses *kits* experimentais.

Crystal Screen**Reagent Formulation**

Tube Number	Salt	Tube Number	Buffer [†]	Tube Number	Precipitant
1.	0.02 M Calcium Chloride dihydrate	1.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	1.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
2.	None	2.	None	2.	0.4 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate
3.	None	3.	None	3.	0.4 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
4.	None	4.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	4.	2.0 M Ammonium Sulfate
5.	0.2 M In-Sodium Citrate dihydrate	5.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	5.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
6.	0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	6.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	6.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
7.	None	7.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	7.	1.4 M Sodium Acetate trihydrate
8.	0.2 M In-Sodium Citrate dihydrate	8.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	8.	30% v/v Iso-Propanol
9.	0.2 M Ammonium Acetate	9.	0.1 M In-Sodium Citrate dihydrate pH 4.6	9.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
10.	0.2 M Ammonium Acetate	10.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	10.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
11.	None	11.	0.1 M In-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	11.	1.0 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
12.	0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	12.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	12.	30% v/v Iso-Propanol
13.	0.2 M In-Sodium Citrate dihydrate	13.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	13.	30% w/v Polyethylene Glycol 400
14.	0.2 M Calcium Chloride dihydrate	14.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	14.	2.8% w/v Polyethylene Glycol 400
15.	0.2 M Ammonium Sulfate	15.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	15.	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
16.	None	16.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	16.	1.5 M Lithium Sulfate monohydrate
17.	0.2 M Lithium Sulfate monohydrate	17.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	17.	30% Polyethylene Glycol 4000
18.	0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	18.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	18.	2.0% Polyethylene Glycol 8000
19.	0.2 M Ammonium Acetate	19.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	19.	30% w/v Iso-Propanol
20.	0.2 M Ammonium Sulfate	20.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	20.	25% w/v Polyethylene Glycol 4000
21.	0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	21.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	21.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
22.	0.2 M Sodium Acetate trihydrate	22.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	22.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
23.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	23.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	23.	30% w/v Polyethylene Glycol 400
24.	0.2 M Calcium Chloride dihydrate	24.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	24.	20% w/v Iso-Propanol
25.	None	25.	0.1 M Imidazole pH 6.5	25.	1.0 M Sodium Acetate trihydrate
26.	0.2 M Ammonium Acetate	26.	0.1 M In-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	26.	30% w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
27.	0.2 M In-Sodium Citrate dihydrate	27.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	27.	20% w/v Iso-Propanol
28.	0.2 M Sodium Acetate trihydrate	28.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	28.	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
29.	None	29.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	29.	0.8 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate
30.	0.2 M Ammonium Sulfate	30.	None	30.	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
31.	0.2 M Ammonium Sulfate	31.	None	31.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
32.	None	32.	None	32.	2.0 M Ammonium Sulfate
33.	None	33.	None	33.	4.0 M Sodium Formate
34.	None	34.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	34.	2.0 M Sodium Formate
35.	None	35.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	35.	0.8 M mono-Sodium dihydrogen phosphate 0.8 M mono-Potassium dihydrogen phosphate
36.	None	36.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	36.	8% w/v Polyethylene Glycol 8000
37.	None	37.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	37.	8% w/v Polyethylene Glycol 4000
38.	None	38.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	38.	1.4 M In-Sodium Citrate dihydrate
39.	None	39.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	39.	2% w/v Polyethylene Glycol 400, 2.0 M Ammonium Sulfate
40.	None	40.	0.1 M In-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	40.	20% w/v Iso-Propanol, 20% w/v Polyethylene Glycol 4000
41.	None	41.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	41.	10% w/v Iso-Propanol, 20% w/v Polyethylene Glycol 4000
42.	0.05 M mono-Potassium dihydrogen Phosphate	42.	None	42.	20% w/v Polyethylene Glycol 8000
43.	None	43.	None	43.	30% w/v Polyethylene Glycol 1500
44.	None	44.	None	44.	0.2 M Magnesium Formate
45.	0.2 M Zinc Acetate dihydrate	45.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	45.	18% w/v Polyethylene Glycol 8000
46.	0.2 M Calcium Acetate dihydrate	46.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	46.	18% w/v Polyethylene Glycol 8000
47.	None	47.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	47.	2.0 M Ammonium Sulfate
48.	None	48.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	48.	2.0 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
49.	1.0 M Lithium Sulfate monohydrate	49.	None	49.	2% w/v Polyethylene Glycol 8000
50.	0.5 M Lithium Sulfate monohydrate	50.	None	50.	15% w/v Polyethylene Glycol 8000

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

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

34 Journey
Aliso Viejo, CA 92656-3317 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
e-mail: tech@hmrmail.com
Website: www.hamptonresearch.com

HAMPTON
RESEARCH

Solutions for Crystal Growth

© 2000-2003 Hampton Research Corp. All rights reserved.
Printed in the United States of America. This guide or
parts thereof may not be reproduced in any form without
the written permission of the publisher.

Crystal Screen 2**Reagent Formulation**

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

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

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

34 Journey
Aliso Viejo, CA 92656-3317 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
e-mail: tech@hampton.com
Website: www.hamptonresearch.com

HAMPTON
RESEARCH
Solutions for Crystal Growth

© 2000-2003 Hampton Research Corp. all rights reserved
Printed in the United States of America. This guide or
parts thereof may not be reproduced in any form without
the written permission of the publisher.

Grid Screen Ammonium Sulfate™**Reagent Formulation and Specification Data Sheet**

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

Chemical Analysis**Ammonium Sulfate**M_r 132.14 (NH₄)₂SO₄ ≥ 99.5% Purity

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

Citric Acid anhydrousM_r 192.43 C₆H₈O₇

Cl	<0.0005%	Oxalate	<0.05%	PO ₄	<0.0005%	SO ₄	<0.002%	Tartrate	<0.2%	Ca	<0.005%
Cr	<0.0005%	Co	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Fe	<0.00005%	Ni	<0.00005%	Pb	<0.0005%
Zn	<0.0005%										

MESM_r 195.25 C₆H₁₃NO₃S ≥ 99.5% Purity

Co	<0.0005%	Mo	<0.0005%	SO ₄	<0.0005%	Cr	<0.0005%	Cl	<0.005%	Ag	<0.00002%
Al	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Ni	<0.0002%	As	<0.00001%	Fe	<0.00005%	Pb	<0.00002%
Ba	<0.0005%	K	<0.01%	Sr	<0.0005%	Bi	<0.0005%	Li	<0.0005%	Zn	<0.0005%
Ca	<0.002%	Mg	<0.0005%	Cd	<0.0005%	Mn	<0.0005%	PO ₄	<0.002%	Hg	<0.00001%

HEPESM_r 238.31 C₈H₁₃N₂O₃S ≥ 99.5% Purity

Co	<0.0005%	Mo	<0.0005%	Cr	<0.0005%	Cl	<0.0005%	Ag	<0.00002%	Pb	<0.00002%
Al	<0.0005%	Cu	<0.0005%	Ni	<0.0002%	As	<0.00001%	Fe	<0.00005%	Zn	<0.0005%
Ba	<0.0005%	K	<0.01%	Sr	<0.0005%	Bi	<0.0005%	Li	<0.0005%	Hg	<0.00001%
Ca	<0.001%	Mg	<0.0005%	Cd	<0.0005%	Mn	<0.0005%	PO ₄	<0.002%		



Solutions for Crystal Growth

© 2000-2003 Hampton Research Corp. all rights reserved.
Printed in the United States of America. This guide or
parts thereof may not be reproduced in any form without
the written permission of the publisher.

34 Journey

Aliso Viejo, CA 92656-3317 U.S.A.

Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611

e-mail: tech@hampton.com

Website: www.hamptonresearch.com

Reagent Formulation and Specification Data Sheet

Tria	M_r 121.14	NH₂C(CH₂OH)₃	≥ 99.8% Purity
Co	<0.0005%	Mn	<0.0005%
SO ₄	<0.0005%	Cr	<0.0005%
Al	<0.0005%	Cu	<0.0005%
Ni	<0.0002%	As	<0.0001%
Ba	<0.0005%	K	<0.01%
Si	<0.0005%	Bi	<0.0005%
Ca	<0.001%	Mg	<0.0005%
CD	<0.0005%	Mn	<0.0005%
PO ₄	<0.0005%	Cl	<0.0005%
		Ag	<0.00002%
		Pb	<0.00002%
		Zn	<0.0005%
		Hg	<0.00001%

Bicine	M_r 163.18	C₆H₁₃NO₄	≥ 99.5% Purity
Co	<0.0005%	Mn	<0.0005%
SO ₄	<0.0005%	Cr	<0.0005%
Al	<0.0005%	Cu	<0.0005%
Ni	<0.0002%	As	<0.0001%
Ba	<0.0005%	K	<0.01%
Si	<0.0005%	Bi	<0.0005%
Ca	<0.001%	Mg	<0.0005%
CD	<0.0005%	Mn	<0.0005%
PO ₄	<0.0005%	Cl	<0.0005%
		Ag	<0.00002%
		Pb	<0.00002%
		Zn	<0.0005%
		Hg	<0.00001%

34 Journey
Aliso Viejo, CA 92656-3317 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
e-mail: tech@hmrmail.com
Website: www.hamptonresearch.com



Solutions for Crystal Growth

© 2000-2003 Hampton Research Corp. all rights reserved.
Printed in the United States of America. This guide or
parts thereof may not be reproduced in any form without
the written permission of the publisher.

Crystal Screen



Instruments for Crystallization

User Guide

HR2-110

Crystal Screen™ is a complete reagent kit designed to provide a rapid screening method for the crystallization of biological macromolecules. Crystal Screen is a straightforward, effective, and practical kit for determining preliminary crystallization conditions. Crystal Screen is also effective in determining the solubility of a macromolecule in a wide range of precipitants and pH.

Crystal Screen is a sparse matrix of trial crystallization reagent conditions based upon the original Jancarik and Kim screen (3). The primary screen variables are salt, pH, and precipitant (salts, polymers, volatile organics, and non-volatile organics).

Sample Preparation

The macromolecular sample should be homogenous, as pure as is practically possible (>99%) and free of amorphous and particulate material. Remove amorphous material by centrifugation or micro-filtration prior to use (1, 2, 4).

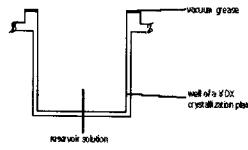
The recommended sample concentration is 5 to 25 mg/ml in water. Initially, the sample should be free of any unnecessary additives in order to observe the effect of the Crystal Screen variables. Ideally, the initial screen should be performed with a sample which has been dialyzed against water although ligands, ions, reducing agents, or other additives may be present as required by the sample for solubility, stability, or activity.

Performing The Screen

Since it is the most frequently reported method of crystallization, the following procedure describes the use of Crystal Screen with the Hanging Drop Vapor Diffusion method. Crystal Screen is also very compatible with the Sitting Drop, Sandwich Drop, MicroBatch, and Microdialysis methods. A complete description of the Hanging, Sitting, Sandwich Drop, Dialysis and other crystallization methods are available from the Hampton Research Crystal Growth 101 Library.

1. Prepare a VDX Plate (HR3-140) for Hanging Drop Vapor Diffusion by applying a thin bead of cover slide sealant to the upper edge of each of the 24 reservoirs. One may also use a Greased VDX Plate (HR3-170). Fifty reservoirs are to be prepared for a complete Crystal Screen. See figure 1.

Figure 1
Cross section of a reservoir in the VDX plate



2. Using a clean pipet tip, pipet 1 ml of Crystal Screen reagent 1 into reservoir A1. Discard the pipet tip, add a new pipet tip and pipet 1 ml of Crystal Screen reagent 2 into reservoir A2. Repeat the procedure for the remaining 48 Crystal Screen reagents using a clean pipet tip for each reagent so as to avoid reagent contamination and carry over.

3. Pipet 2 µl of the sample to the center of a clean, siliconized 22 mm diameter circle or square cover slide. See figure 2.

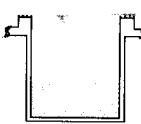
Figure 2



4. Pipet 2 µl of Crystal Screen reagent 1 from reservoir A1 into the sample droplet and mix by aspirating and dispensing the droplet several times, keeping the tip in the drop during mixing to avoid foaming. See figure 2.

5. Working quickly to minimize evaporation, invert the cover slide and droplet over reservoir A1 and seal the cover slide onto the edge of the reservoir. See figure 3.

Figure 3
Inverted siliconized cover slip placed over the reservoir



6. Repeat operations 3 through 5 for the remaining 49 Crystal Screen reagents.

7. If the quantity of sample permits, perform Crystal Screen in duplicate and incubate one set of plates at 4°C and the second set at room temperature. Incubate and store the crystallization plates in a stable temperature environment free of vibration.

Examine The Drop

Carefully examine the drops under a stereo microscope (10 to 100x magnification) immediately after setting up the screen. Record all observations and be particularly careful to scan the focal plane for small crystals. Observe the drops once each day for the first week, then once a week thereafter. Records should indicate whether the drop is clear, contains precipitate, and/or crystals. It is helpful to describe the drop contents using descriptive terms. Adding magnitude is also helpful. Example 4+ yellow/brown fine precipitate, 2+ small bipyramidal crystals, clear drop, 3+ needle shaped crystals in 1+ white precipitate. One may also employ a standard numerical scoring scheme (Clear = 0, Precipitate = 1, Crystal = 10, etc.). Figure 4 (on page 2) shows typical examples of what one might observe in a crystallization experiment.

Interpreting Crystal Screen

Clear drops indicate that either the relative supersaturation of the sample and reagent is too low or the drop has not yet completed equilibration. If the drop remains clear after 3 to 4 weeks consider repeating the Crystal Screen condition and doubling the sample concentration. If more than 35 of the 50 Crystal Screen drops are clear consider doubling the sample concentration and repeating the entire screen.

Drops containing precipitate indicate that either the relative supersaturation of the sample and reagent is too high, the sample has denatured, or the sample is heterogeneous. To reduce the relative supersaturation, dilute the sample twofold and repeat the Crystal Screen condition. If more than 35 of the 50 Crystal Screen drops contain precipitate and no crystals are present, consider diluting the sample concentration in half and repeating the entire screen. If sample denaturation is suspect, take measures to stabilize the sample (add reducing agent, ligands, glycerol, salt, or other stabilizing agents). If the sample is impure, aggregated, or heterogeneous take measures to pursue homogeneity. It is possible to obtain crystals from precipitate so do not

Crystal Screen™

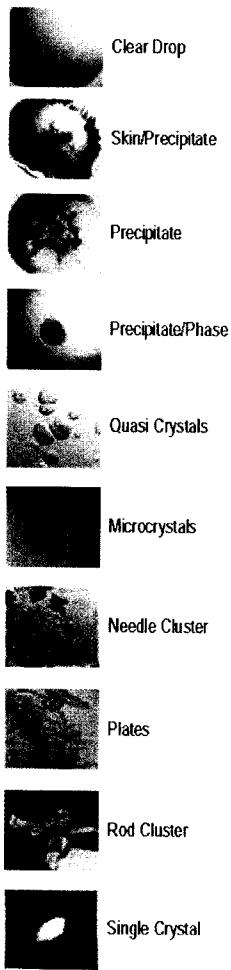


Solutions for Crystal Growth

User Guide

2

Figure 4
Typical observations in a
crystallization experiment.



discard nor ignore a drop containing precipitate. If possible, examine drops containing precipitate under polarizing optics to differentiate precipitate from microcrystalline material.

If the drop contains a macromolecular crystal the relative supersaturation of the sample and reagent is good. The next step is to optimize the preliminary conditions (pH, salt type, salt concentration, precipitant type, precipitant concentration, sample concentration, temperature, additives, and other crystallization variables) which produced the crystal in order to improve crystal size and quality.

Compare the observations between the 4°C and room temperature incubation to determine the effect of temperature on sample solubility. Different results in the same drops at different temperatures indicate that sample solubility is temperature dependent and that one should include temperature as a variable in subsequent screens and optimization experiments.

Retain and observe plates until the drops are dried out. Crystal growth can occur within 15 minutes or one year.

Crystal Screen Formulation

Crystal Screen reagents are formulated using the highest purity chemicals, ultrapure water (182 Megohm-cm, 5 ppb TOC) and are sterile filtered using 0.22 micron filters into sterile containers (no preservatives added).

Crystal Screen reagents are readily reproduced using Hampton Research Optimize™ stock solutions of salts, polymers and buffers. Optimize stock reagents make reproducing Crystal Screen reagents fast, convenient and easy. Dilutions can be performed directly into the crystallization plate using Optimize stock reagents.

Crystal Screen reagents containing buffers are formulated by creating a 1.0 M stock buffer, titrated to the desired pH using hydrochloric acid or sodium hydroxide. The buffer is then diluted with the other reagent components and water. No further pH adjustment is required.

Crystal Screen reagents are stable at room temperature and are best used before the "Best If Used By" date on the kit tubes. To enhance reagent stability it is strongly recommended that Crystal Screen be stored at 4°C or -20°C. Avoid ultraviolet light to preserve reagent stability.

If the sample contains phosphate, borate, or carbonate buffers it is possible to obtain inorganic crystals (false positives) when using Crystal Screen reagents containing divalent cations such as magnesium, calcium, or zinc. To avoid false positives use phosphate, borate, or carbonate buffers at concentrations of 10 mM or less or exchange the phosphate, borate, or carbonate buffer with a more soluble buffer that does not complex with

divalent cations.

References and Readings

1. Crystallization of nucleic acids and proteins, Edited by A. Durzinx and R. Giege, The Practical Approach Series, Oxford Univ. Press, 1992.
2. Current approaches to macromolecular crystallization. McPherson, A. *Bio. J. Biochem.* 189, 1-23, 1990.
3. Sparse Matrix Sampling: a screening method for crystallization of proteins. Jančarik, J. and Kim, S.H. *J. Appl. Cryst.* 24, 403-411, 1991.
4. Protein and Nucleic Acid Crystallization. Methods, A Companion to Methods in Enzymology, Academic Press, Volume 1, Number 1, August 1990.

Technical Support

Inquiries regarding Crystal Screen reagent formulation, interpretation of screen results, optimization strategies and general inquiries regarding crystallization are welcome. Please e-mail, fax, or telephone your request to Hampton Research. Fax and e-mail Technical Support are available 24 hours a day. Telephone technical support is available 8:00 am to 5:00 pm USA Pacific Standard Time.

Hampton Research

34 Journey

Aliso Viejo, CA 92656-3317 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611

Technical Support e-mail: tech@hrmail.com

Website: www.hamptonresearch.com

© 2000-2003 Hampton Research Corp. all rights reserved
Printed in the United States of America. This guide or
part thereof may not be reproduced in any form without
the written permission of the publisher.

Apêndice B

Trabalhos científicos publicados e/ou submetidos durante o período de doutoramento. Adicionalmente foi incluído o manuscrito em preparação referente ao trabalho bioquímico com a enzima sPRS.

- 1 SILVA, M.; NAPOLITANO, H. B.; ELLENA, J.; ROCHA, W. C.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G.; THIEMANN, O. H. 3-(5,7-Dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-benzo[b]pyran-6-yl)propionic acid: a potential inhibitor against Leishmania. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports*, Londres, v. 59, n. 10, p. 1575-1577, 2003.
Palavras-chave: Inhibition; Leishmania.
<http://journals.iucr.org/e/issues/2003/10/00/issconts.html>; ISSN/ISBN: 16005368.
- 2 CUNHA, S. D.; SILVA, V. C.; NAPOLITANO, H. B.; LARIUCCI, C.; VENCATO, I. Reaction of Acyclic Enaminones with Methoxymethylene Meldrum's Acid. Synthetic and Structural Implications. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, v. 14, n. 1, p. 107-112, 2003.
Referências adicionais: Brasil/Inglês; Meio de divulgação: Impresso; Homepage: http://jbc.sbp.org.br/jbc/2003/v14_n1/index.htm; ISSN/ISBN: 01035053.
- 3 NAPOLITANO, H. B.; SILVA, M.; ELLENA, J.; ROCHA, W. C.; VIEIRA, P. C.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G. Redetermination and comparative structural study of isopimpinellin: a new inhibitor against the Leishmania APRT enzyme. *Acta Crystallographica Section E Structural Reports*, Londres, v. 59, n. 10, p. 1506-1508, 2003.
Palavras-chave: Moléculas pequenas; Inibidores contra Leishmania.
<http://journals.iucr.org/e/issues/2003/10/00/issconts.html>; ISSN/ISBN: 16005368.
- 4 NAPOLITANO, H. B.; SILVA, M.; ELLENA, J.; ROCHA, W. C.; VIEIRA, P. C.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G. Redetermination of skimmianine: a new inhibitor against the Leishmania APRT enzyme. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports*, Londres - Inglaterra, v. 59, n. 10, p. 1503-1505, 2003.
Palavras-chave: Pequenas Moléculas; Leishmania.
<http://journals.iucr.org/e/issues/2003/10/00/issconts.html>; ISSN/ISBN: 16005368.
- 5 NAPOLITANO, H. B.; LARIUCCI, C.; MORAES, I. J. Ênfase Cognitivista no Uso de Experimentos para o Ensino de Ciências. In: *Anais do XI ENDIPE*. 2002, Goiânia. 12p.
Palavras-chave: Ensino de Ciências; Aprendizagem Significativa; Teoria de Ausubel.
<http://www.endipe.com.br>; ISSN/ISBN: 85-86392-07-3
- 6 NAPOLITANO, H. B.; LARIUCCI, C.; MORAES, I. J. Prática Docente do professor de Física: Elementos Essenciais. In: *Anais VIII EPEF*. 2002, Águas de Lindóia. 9p.
Palavras-chave: Ensino de Física; Prática Docente no Ensino de Ciências.
http://www.sbf1.if.usp.br/eventos/epef/viii/PDFs/PA1_06.pdf; ISSN/ISBN: 85-89064-0.
- 7 NAPOLITANO, H. B.; MORAES, I. J. Alguns elementos essenciais no ensino de Ciências. *Revista Inter-ção*, v. 27, n. 1, p. 103-116, 2001.
Palavras-chave: Ensino de Ciência; Prática docente.
<http://www.fe.ufg.br/index2.html>; ISSN/ISBN: 0101-7136.
- 8 NAPOLITANO, H. B.; LARIUCCI, C. Alternativas para o Ensino da Cinemática. *Revista Inter-Ação*, v. 27, n. 2, p. 119-130, 2001.
Palavras-chave: Aprendizagem significativa, Teoria de Ausubel.
<http://www.fe.ufg.br/index2.html>; ISSN/ISBN: 0101-7136.
- 9 CUNHA, S. D.; COSTA, M.; NAPOLITANO, H. B.; LARIUCCI, C.; VENCATO, I. Study of N-Benzoyl-activation in the $HgCl_2$ promoted guanylation reaction of thioureas. *Synthesis and structural analysis of N-benzoyl-guanidines*. *Tetrahedron*, v. 57, p. 1671-1675, 2001.
Palavras-chave: Difração de Raios X, Cristalografia de pequenas moléculas.
<http://www.sciedirect.com/science>; ISSN/ISBN: 00404020.
- 10 NAPOLITANO, H. B.; MASCARENHAS, Y.; VENCATO, I. & LARIUCCI, C. Difração de raios X e a lei de Bragg. *Monografia de Ensino da Sociedade Brasileira de Cristalografia*. Aceito para publicação. 2003.
Palavras-chave: Difração de Raios X, Ensino de Cristalografia.

- 11 **NAPOLITANO, H. B.; ELLENA, J. & CUNHA, S.** Cristalografia de pequenas moléculas — Quo vadis? Química Nova. Artigo submetido.
Palavras-chave: Difração de Raios X, Ensino de Cristalografia.
<http://quimicanova.sbjq.org.br/quimicanova.htm>; ISSN/ISBN: 0100-4042.
- 12 **NAPOLITANO, H. B.; SILVA, M.; ELLENA, J.; RODRIGUES, B. D. G.; ALMEIDA, A. L. C.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G. & THIEMANN, O. H.** A novel coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Artigo submetido.
Palavras-chave: Pequenas Moléculas; *Leishmania*.
<http://www.scielo.br/revistas/bjmbri/instruc.htm>. ISSN/ISBN: 0100-879X.
- 13 **NAPOLITANO, H. B.; SCULACCIO, S. A.; THIEMANN, O. H. & OLIVA, G.** Crystallization and preliminary crystallographic analysis of sugarcane PRPP synthetase. Acta Crystallographica - Section D. Artigo submetido.
Palavras-chave: Cristalização de proteínas, PRPP synthetase.
<http://journals.iucr.org/d/journalhomepage.html>; ISSN/ISBN: 0907-4449.
- 14 **SCULACCIO, S. A.; PINTO, A. P. A.; NAPOLITANO, H. B.; BELTRAMINI, L. M.; OLIVA, G.; CARRILHO, E. & THIEMANN, O. H.** Molecular and evolutionary characterization of the sugarcane Phosphoribosyl-pyrophosphate synthase (sPRS). Biochemical and Biophysical Research Communication. Artigo em preparação.