



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Estudo estrutural de Tiosulfato  
Desidrogenase envolvida no metabolismo  
do enxofre em *Campylobacter jejuni***

**Maria Margarida Alexandre Cordeiro**

Orientação: Doutora Margarida Archer  
Doutor José A. Brito

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2017





**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Estudo estrutural de Tiosulfato  
Desidrogenase envolvida no metabolismo  
do enxofre em *Campylobacter jejuni***

**Maria Margarida Alexandre Cordeiro**

Orientação: Doutora Margarida Archer  
Doutor José A. Brito

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2017



## **Agradecimentos**

*“Nenhum dever é mais importante do que a gratidão.”*

*Cícero*

Na caminhada em busca do saber nunca o poderemos fazer sozinhos, certamente, serão poucas as palavras para exprimir os meus sinceros agradecimentos às pessoas que, direta ou indiretamente me ajudaram a calcorrear mais uma etapa da minha vida académica. Sem o seu incentivo e dedicação nada seria possível.

Em primeiro lugar, expresso o meu profundo agradecimento à Chefe de Laboratório, Professora Margarida Archer, pelo facto de me ter proporcionado as condições necessárias à elaboração da minha Tese, integrando-me no Grupo de Investigação de Cristalografia de Proteínas Membranares, na Unidade de Cristalografia Macromolecular no ITQB-UNL. Além das condições físicas, as suas palavras sábias, apoio incondicional e orientação permitiram elevar os meus conhecimentos e muito estimularam o meu desejo de querer, sempre, saber.

Ao co-orientador José Brito, com quem tive o privilégio de trabalhar, agradeço todo o suporte, profissionalismo, "paciência" e partilha de saberes, contributos indispensáveis para a realização deste projeto. Toda a confiança e incentivo tornaram tudo mais fácil de concretizar, permitindo-me trabalhar e enriquecer, numa área até então desconhecida, contudo, bastante estimulante.

Toda a Unidade de Cristalografia Macromolecular merece também o meu muito obrigado, pela disponibilidade e assistência prestada em algumas ocasiões.

Quero agradecer à Muy Nobre e Ilustre Universidade de Évora, e a todos os meus professores, pelos ensinamentos e experiencias enriquecedoras, dando-me condições e o conhecimento para atingir o meu objetivo, o Mestrado em Bioquímica.

Às minhas amigas e colegas Inês Mavioso e Catarina Grazina, e todas as que privaram comigo, o meu muito obrigado pela amizade e companheirismo, sobretudo nos momentos mais difíceis.

Aos colegas Diogo Athayde, Márcia Alves e José Rodrigues, com quem vivi um ambiente de verdadeira aprendizagem o meu muito obrigado.

O meu sincero reconhecimento aos meus colegas de Mestrado, pela simpatia, amizade e camaradagem nas alturas de maior aflição e que, de forma desinteressada, tornaram tudo mais fácil.

Aos amigos de uma vida, não cito nomes pois a lista é enorme, agradeço os momentos partilhados, assim como incentivo que me dedicaram.

Estendo ainda os meus agradecimentos ao Manuel pelo apoio, sendo sempre um companheiro e ouvinte atento das minhas inquietações, retribuindo sempre com palavras doces e meigas carregadas de confiança e estímulo, que renovavam a minha confiança e coragem para alcançar os objetivos que tanto ambicionava.

A ti avô, a estrelinha mais brilhante, sei que estarás feliz e a sorrir, a tua querida netinha conseguiu. Sempre nos ensinaste que, nesta vida, tudo se consegue, desde que nós queiramos sendo preciso trabalho, perseverança e dedicação.

Não poderia estar a escrever estas simples, mas sentidas palavras de agradecimento se não fosse a educação e os valores transmitidos pela família, especialmente pelos Meus Pais. O seu suporte emocional, carinho e amparo foram cruciais, nesta longa jornada, não medindo esforços para que eu chegasse até aqui. Nos momentos de desespero, angustia e fragilidade houve sempre uma palavra, um sorriso que me ajudaram a erguer e seguir em frente. Quero ainda partilhar a alegria de ter à minha volta um irmão generoso que, ao longo destes anos, tão bem me soube ajudar. A sua determinação e empenho serviram de alavanca para fazer mais e melhor.

Obrigado Pai e Mãe por, muitas vezes, se esquecerem dos vossos sonhos para que eu conseguisse realizar o meu. Aos dois dedico a alegria deste momento, pois foram e serão sempre o meu porto de abrigo, tanto nos dias de bonança como nos dias de grandes intempéries.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

*Chico Xavier*

## Resumo

As enzimas da família da tiosulfato desidrogenase (TsdA) são, usualmente, citocromos *c* di-hémicos podendo ter actividade bifuncional de tiosulfato desidrogenase/reductase de tetrionato dependendo das necessidades metabólicas do organismo em que se encontram. Em *Campylobacter jejuni*, um patogénico microaerófilo da mucosa intestinal, a TsdA\_Cj funciona como reductase de tetrionato, reduzindo tetrionato a tiosulfato. Esta dissertação focou-se no estudo estrutural dos mutantes K252G e N254G de *C. jejuni* por cristalografia de raios-X tendo-se obtido a sua estrutura tridimensional às resoluções de 1,94 (incubação com tiosulfato), 1,86 (incubação com ascorbato) e 1,78 Å.

Este estudo revelou que em TsdA\_Cj o ligando proximal do hemo 1 (catalítico) é His<sup>99</sup> e o ligando distal é Cys<sup>138</sup>, tal como His<sup>207</sup> e Met<sup>255</sup> para o hemo 2 (centro de transferência de electrões). O local de ligação ao centro ativo é através da Cys<sup>138</sup> que, tal como a Met<sup>255</sup>, é indispensável para a função enzimática da proteína.

**Palavras-chave:** Biologia estrutural, cristalografia, enzimas, estrutura 3D



## **Abstract – Structural study on thiosulfate dehydrogenase from *Campylobacter jejuni***

Proteins of the thiosulfate dehydrogenase (TsdA) family are bifunctional dihem cytochromes *c* having thiosulfate dehydrogenase / tetrathionate reductase activities. These different catalytic activities are intimately related with the metabolic needs of the organism in which they are present. In *Campylobacter jejuni*, TsdA functions as a tetrathionate reductase, reducing tetrathionate to thiosulfate.

This dissertation focused on the structural study of some *C. jejuni* variants, namely K252G and N254G mutants, by X-ray crystallography. Recurring to synchrotron radiation, we could obtain the crystallographic structures with 1.94 Å (incubation with thiosulphate), 1.86 Å (incubation with ascorbate) and 1.78 Å.

This study uncovered that His<sup>99</sup> serves as the proximal ligand of heme 1 (catalytic) and Cys<sup>138</sup> as the distal ligand. His<sup>207</sup> and Met<sup>255</sup> serve as proximal and distal ligands, respectively, for heme 2 (the electron transfer center). The binding site lies in a cleft close to amino acid Cys<sup>138</sup> with this residue being essential for catalysis.

**Keywords:** Structural biology, crystallography, enzymes, 3D structural



## Índice

|  |     |
|--|-----|
| Agradecimentos .....   | i   |
| Resumo .....   | iii |
| Abstract .....   | v   |
| Abreviaturas e convenções .....  | xiv |
| 1. Tema em estudo: Introdução geral .....  | 1   |
| 2. Objetivos .....   | 3   |
| 2.1. Objetivos gerais .....  | 3   |
| 3. Introdução teórica.....   | 5   |
| 3.1. Relevância do enxofre nos sistemas biológicos.....                            | 5   |
| 3.1.1. Ciclo e metabolismo de enxofre em procariotas .....                         | 6   |
| 3.2. Caracterização da Bactéria <i>Campylobacter jejuni</i> .....                  | 8   |
| 3.2.1. Patogeneidade da Bactéria <i>Campylobacter jejuni</i> .....                 | 10  |
| 3.3. Tiosulfato desidrogenase (TsdA) da bactéria <i>Campylobacter jejuni</i> ..... | 11  |
| 4. Cristalografia de raios-X .....   | 16  |
| 4.1. Cristalização de proteínas .....  | 16  |
| 4.1.1. Teoria da Cristalização de proteínas do Diagrama de Fases .....             | 18  |
| 4.2. Métodos de cristalização de proteínas .....                                   | 22  |
| 4.2.1. Técnica de Difusão de Vapor .....   | 22  |
| 4.2.2. Técnicas de <i>seeding</i> .....  | 24  |
| 4.3. Raios – X .....   | 25  |
| 4.4. Difração e resolução da estrutura da proteína.....                            | 26  |
| 4.4.1. Recolha de dados e análise de difração de raios-X .....                     | 28  |
| 4.4.2. Determinação de fases .....   | 29  |
| 4.4.3. Refinamento e validação .....   | 29  |
| 5. Detalhes experimentais .....  | 32  |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| 5.1.        | Materiais e reagentes .....   | 33 |
| 5.2.        | Ensaio de cristalização .....   | 34 |
| 5.3.        | Crio-cristalografia, incubação, e recolha de dados .....  | 35 |
| 5.4.        | Determinação das estruturas e refinamento .....   | 37 |
| 6.          | Resultados .....  | 39 |
| 6.1.        | Ensaio de cristalização dos cinco variantes em estudo .....   | 39 |
| 6.1.1.      | Resultados do <i>screening</i> inicial de cristalização da <i>wild type</i> e dos quatro mutantes de TsdA_Cj .....                                      | 39 |
| 6.1.2.      | Resultados da otimização manual da cristalização da <i>wild type</i> e dos quatro mutantes de TsdA_Cj .....   | 43 |
| 6.2.        | Dados obtidos da difração de raios-X, refinamento e resolução da estrutura.....   | 49 |
| 6.2.1.      | <i>Overall Fold</i> da estrutura da proteína TsdA de <i>C. jejuni</i> e comparação estrutural com a proteína TsdA de <i>A. vinosum</i> .....            | 53 |
| 6.2.2.      | Coordenação dos hemo dos mutantes K252G e N254G da proteína TsdA_Cj   | 55 |
| 7.          | Discussão.....  | 62 |
| 8.          | Conclusão .....   | 67 |
| 8.1.        | Perspetivas futuras .....   | 67 |
| 9.          | Bibliografia.....   | 69 |
| Anexos..... |   | 75 |
| ➤           | Organizações internas do cristal .....  | 75 |
| ➤           | Agentes crio-protetores.....  | 76 |
| ➤           | Soluções precipitantes de screen comercial Stura FootPrint (Molecular Dimensions para os ensaios de cristalização dos cinco variantes em estudo.....    | 77 |
| ➤           | Soluções precipitantes de screen comercial JCSG- <i>plus</i> (Molecular Dimensions para os ensaios de cristalização dos cinco variantes em estudo ..... | 83 |



## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Ilustração simplificada do ciclo do enxofre. ....   | 7  |
| Figura 2: Visão geral do ciclo do enxofre com ênfase nos organismos fototróficos. ....  | 8  |
| Figura 3: Imagem microscópica de <i>C. jejuni</i> .....   | 9  |
| Figura 4: Possíveis vias de transmissão da <i>C. jejuni</i> .....   | 11 |
| Figura 5: Sequência clonada da proteína Tioissulfato desidrogenase (TsdA) de <i>Campylobacter jejuni</i> . ....               | 13 |
| Figura 6: Visão geral esquemática dos ambientes em torno do hemo 1 e do hemo 2 das proteínas TsdBA_Mp, TsdA_AV e TsdA_Cj..... | 14 |
| Figura 7: Representação da rede cristalina de um cristal. ....  | 17 |
| Figura 8: Ilustração da célula unitária de um cristal.....  | 18 |
| Figura 9: Diagrama de fases do crescimento de cristais.....   | 19 |
| Figura 10: Diferença entre as amostras em solução e sob a forma de cristal.....   | 22 |
| Figura 11: Representação esquemática do método de cristalização <i>hanging drop</i> . ....                                    | 23 |
| Figura 12; Representação esquemática do método de e cristalização <i>sitting drop</i> . ....                                  | 24 |
| Figura 13: Representação esquemática da técnica <i>streak seeding</i> de Cristalização.....                                   | 25 |
| Figura 14: Ilustração dos raios-X no espectro eletromagnético.....  | 26 |
| Figura 15: Colheita do cristal e transferência para solução crio-protetora.....   | 27 |
| Figura 16: Ilustração da recolha de dados de cristalografia de raios-X.....   | 28 |
| Figura 17: Visualização do mapa de densidade eletrónica a diferentes resoluções.....  | 29 |
| Figura 18: Exemplo dos ângulos $\phi$ e $\psi$ e o diagrama de Ramachandran. ....   | 31 |
| Figura 19: Imagem do Gel de Tricina-SDS-PAGE a oito por cento.....  | 32 |
| Figura 20: Ligandos utilizados nas incubações dos cinco variantes da TsdA_Cj em estudo...37                                   |    |
| Figura 21: Padrão de difracção de um cristal da TsdA_Cj obtido.....   | 49 |
| Figura 22: Ilustração da densidade electrónica de um dos hemos de TsdA_Cj. ....   | 51 |
| Figura 23: Comparação da estrutura da proteína TsdA de <i>C. jejuni</i> e da proteína TsdA de <i>A. vinosum</i> . ....        | 54 |
| Figura 24: Representação ampliada dos hemos de TsdA_Cj.....   | 55 |
| Figura 25: Potencial de superfície eledostática da proteína TsdA_Cj.....  | 56 |
| Figura 26: Coordenação dos hemos do mutante K252G de TsdA_Cj com ascorbato. ....  | 58 |
| Figura 27: Coordenação dos hemos do mutante K252G de TsdA_Cj com tioissulfato.....  | 59 |
| Figura 28: Coordenação dos hemos do mutante N254G, da proteína TsdA_Cj. ....  | 61 |

Figura 29: Modelo de transferência de elétrons bi-direcional *in vivo* entre o tetrionato e tiosulfato. .... 63

## Índice de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Importantes compostos inorgânicos de enxofre e seus estados de oxidação.....  | 6  |
| Tabela 2: Parâmetros cinéticos dos ensaios oxidativos e redutores dos cinco variantes da TsdA_Cj em estudo .....                              | 15 |
| Tabela 3: Legenda descritiva do diagrama de fases de crescimento de cristais .....  | 20 |
| Tabela 4: Parâmetros que podem interferir na cristalização de proteínas .....   | 21 |
| Tabela 5: Reagentes e Materiais que foram utilizados no decorrer deste projeto. ....  | 33 |
| Tabela 6: Concentrações do cinco variantes da TsdA_Cj em estudo.....  | 34 |
| Tabela 7: Condições dos ensaios de cristalização dos cinco variantes da enzima TsdA_Cj. ...   | 35 |
| Tabela 8: Resultados obtidos e condições de cristalização do <i>screening</i> inicial da <i>wild type</i> e do mutante C138G de TsdA_Cj. .... | 40 |
| Tabela 9: Resultados obtidos e condições de cristalização do <i>screening</i> inicial dos mutantes K252G e N254G de TsdA_Cj. ....             | 41 |
| Tabela 10: Resultados obtidos e condições de cristalização do <i>screening</i> inicial do mutante M255G de TsdA_Cj. ....                      | 42 |
| Tabela 11: Condições de otimização da cristalização da <i>wild type</i> e dos quatro mutantes de TsdA_Cj. ....                                | 47 |
| Tabela 12: Estatísticas e refinamento dos dados recolhidos das estruturas da TsdA de <i>C. jejuni</i> . ....                                  | 50 |
| Tabela 13: Classificação da estrutura espacial dos sistemas cristalinos.....  | 75 |
| Tabela 14: Exemplos de Agentes crio-protetores utilizados na crio-proteção de cristais. ....  | 76 |
| Tabela 15: Várias soluções precipitantes de screen comercial de Stura FootPrintCombination (Molecular Dimensions).....                        | 77 |
| Tabela 16: Continuação das várias soluções precipitantes de screen comercial de Stura FootPrint Combination (Molecular Dimensions). ....      | 79 |
| Tabela 17: Várias soluções precipitantes de screen comercial de JCSG- <i>plus</i> (Molecular Dimensions).....                                 | 83 |



## Abreviaturas e convenções

- $|F_{calc}|$ : Amplitude do fator de estrutura calculado
- $|F_{obs}|$ : Amplitude do fator de estrutura observado
- $2F_{obs}-F_{cal}$ :  $2|F_{observado}| - |F_{calculado}|$ : onde F são fatores de estrutura
- **A. vinosum**: *Allochromatium vinosum*
- **Ala/A**: Alanina
- **Asn/N**: Asparagina
- **C. jejuni**: *Campylobacter jejuni*
- **Cys/C**: Cisteína
- **E. coli**: *Escherichia coli*
- **F<sub>cal</sub>**: Fator de estrutura calculado
- **F<sub>obs</sub>**: Fator de estrutura observado
- **Gly/G**: Glicina
- **His/H**: Histidina
- **I<sub>hkl</sub>**: Intensidade da reflexão
- **Lys/K**: Lisina
- **Mpb**: Milhares de pares de bases
- **Met/M**: Metionina
- **PDB**: (Sigla inglesa: *Protein Data Bank*) é uma base de dados onde se encontram depositados os modelos tridimensionais de todas as macromoléculas determinados até hoje e que são domínio público.
- **PEG**: Polietilenoglicol (normalmente a este polímero está associado a sua massa molar. Por exemplo, PEG 400 tem uma massa molar média de 400 g/mol).
- **TdsA**: Tioissulfato desidrogenase.
- **TsdA\_Av**: Enzima tioissulfato desidrogenase de *Allochromatium vinosum*
- **TdsA\_Cj**: Enzima tioissulfato desidrogenase de *Campylobacter jejuni*
- **TsdA\_Cj wild type**: Enzima tioissulfato desidrogenase de *Campylobacter jejuni* sem mutação
- **TsdA\_Cj C138G**: Enzima tioissulfato desidrogenase de *Campylobacter jejuni* com uma mutação na cisteína 138 para glicina
- **TsdA\_Cj K252G**: Enzima tioissulfato desidrogenase de *Campylobacter jejuni* com uma mutação na lisina 252 para glicina

- **TsdA\_Cj N254G:** Enzima tioissulfato desidrogenase de *Campylobacter jejuni* com uma mutação na asparagina 254 para glicina.
- **TsdA\_Cj M255G:** Enzima tioissulfato desidrogenase de *Campylobacter jejuni* com uma mutação na metionina 255 para glicina
- **TsdBA\_Mp:** Enzima tioissulfato desidrogenase de *Marichromatium purpuratum*
- **$\Phi$ :** Ângulo em torno da ligação N-C $\alpha$  da cadeia polipeptídica
- **$\Psi$ :** Ângulo em torno da ligação C-C $\alpha$  da cadeia polipeptídica

## 1. Tema em estudo: Introdução geral

As enzimas da família da TsdA caracterizadas até à data (TsdA de *Allochromatium* (*A.*) *vinosum*, TsdA de *Campylobacter* (*C.*) *jejuni* e TsdAB de *Marichromatium* (*M.*) *purpuratum*) catalisam tanto a oxidação de tioissulfato ( $2S_2O_3^{2-} \rightarrow S_4O_6^{2-} + 2e^-$ ) como a redução de tetrionato ( $S_4O_6^{2-} + 2e^- \rightarrow 2S_2O_3^{2-}$ ) (1), sendo que estas são funções amplamente difundidas entre os organismos procariotas (2).

Apesar da ocorrência generalizada da formação de tetrionato e a sua relevância no ciclo do enxofre estar bem documentada, a informação estrutural sobre as enzimas que catalisam a condensação oxidativa de dois aniões de tioissulfato a tetrionato é escassa (2). Para se tentar preencher esta lacuna, iniciou-se anteriormente no Laboratório de Cristalografia de Proteínas Membranares do ITQB NOVA, um estudo estrutural e bioquímico das enzimas TsdA de *A. vinosum* e TsdAB de *M. purpuratum*. Tendo o gene que as codifica sido expressado recombinantemente, e a proteína purificada e caracterizada cinética e espectroscopicamente. Além disso, determinaram-se as estruturas cristalográficas destas enzimas em vários estados redox e em complexo com vários ligandos (2; 3). Estas bactérias sulfurosas rosas (*A. vinosum* e *M. purpuratum*) necessitam da proteína TsdA para a sua sobrevivência, e crescem com a oxidação de compostos de enxofre reduzidos.

Dada a distribuição generalizada de TsdAs, tal como a *C. jejuni*, muitas outras bactérias sulfurosas apresentam maior capacidade de crescimento em tetrionato. Esta capacidade pode servir como uma vantagem ao longo da evolução para se adaptar rapidamente às mudanças ambientais e à disponibilidade do substrato (2). Outro fator interessante é que *C. jejuni* é um agente patogénico microaerófilo alimentar da mucosa intestinal, que na maioria dos casos é responsável por gastroenterite bacteriana (campilobacteriase). Esta doença provoca uma diarreia sanguínea aguda, podendo também causar paralisia neuromuscular e até mesmo a morte (1). Causa um maior número de infeções humanas transmitidas pelos alimentos, sendo mais prevalente que a *Salmonella*. Por outro lado, sabe-se que o tetrionato pode ser produzido na mucosa intestinal de vertebrados, a partir da oxidação de tioissulfato por espécies reativas de oxigénio durante os processos inflamatórios, e a capacidade de reduzir o tetrionato possibilita o crescimento desta bactéria no intestino do hospedeiro (4; 5). Ou seja, esta patologia pode estar intimamente ligada à enzima TsdA e à sua capacidade de formar tetrionato tendo, uma vez que a proteína TsdA é essencial para a sobrevivência deste

microrganismo. Por isso, há um enorme interesse no estudo da TsdA\_Cj, para possível desenvolvimento de inibidores que possam vir a inibir a proteína e consequentemente este microrganismo.

Estas enzimas exibem propriedades catalíticas muito diferentes, dependendo do organismo de onde provêm tendo demonstrado diferenças relativamente à direccionalidade da reação (1).

Neste projeto científico, decidiu-se determinar a estrutura cristalográfica da enzima TsdA de *C. jejuni*, uma tetrionato redutase/tiosulfato desidrogenase bifuncional (4), que apresenta uma clara preferência para a redução de tetrionato em detrimento da oxidação de tiosulfato (1). A enzima TsdA de *C.jejuni* é uma enzima homóloga à TsdA de *A. vinosum* (que neste caso é essencialmente tiosulfato desidrogenase), que após estudos cinéticos foi também possível confirmar a sua bifuncionalidade (4). Estas proteínas homólogas são constituídas por dois domínios, cada um contendo um hemo hexacoordenado. Deste modo, pretendeu-se aprofundar o conhecimento da sua estrutura, o seu mecanismo catalítico e fluxo de eletrões ao longo dos hemos da proteína TsdA\_Cj, comparando-os com os resultados e conclusões obtidos no estudo anterior da TsdA\_Av.

Deste modo, por Cristalografia de raios-X procedeu-se à obtenção da estrutura tridimensional da “*as isolated*” e de alguns mutantes de resíduos específicos da TsdA de *C. jejuni* em diversos estados de oxidação-redução, em complexo com substrato e produto. Estudos complementares e a decorrer no laboratório permitirão de futuro propor um mecanismo para a atividade catalítica da enzima.

## **2. Objetivos**

O principal objetivo deste projeto consiste no estudo estrutural da enzima tioissulfato desidrogenase (TsdA) envolvida no metabolismo de enxofre em *Campylobacter jejuni*.

### **2.1. Objetivos gerais**

- Ter conhecimento dos conceitos e metodologias relacionados no processo de cristalização, para a obtenção de modelos tridimensionais de variantes da enzima TsdA\_Cj, comparando-as entre si e com outras enzimas homólogas que se encontram no PDB.
- Realização de ensaios de cristalização da enzima TsdA já purificada;
- Otimização das condições de cristalização iniciais, para se obter cristais de boa qualidade e que difratem a radiação de raios-X,
- Execução da medição e análise de dados de difração de raios-X dos cristais obtidos, e posterior determinação da estrutura tridimensional de TsdA por Cristalografia de raios-X;
- Caracterização e análise da estrutura tridimensional de TsdA em diversos estados de oxidação-redução, em conjunto com ligandos de alguns mutantes de resíduos específicos, com o intuito de compreender este importante processo bioquímico e propor um mecanismo.



### **3. Introdução teórica**

Os genomas bacterianos codificam uma vasta gama de enzimas que são fundamentais para a vida da célula e em especial na respiração celular. Estas possibilitam o bom funcionamento da cadeia transportadora de elétrons e permitem a sobrevivência destes microrganismos à diversidade ecológica. Deste modo, estes seres procariotas têm a capacidade de facilitar o seu crescimento, através de várias oxidações e reduções de substratos, em condições de anaerobiose e aerobiose (6).

Ao longo das últimas décadas, a importância do conhecimento ao nível estrutural, a sua compreensão, a base química e o mecanismo de funcionamento de uma determinada proteína tornou-se evidente. Neste sentido, a cristalografia de proteínas desempenha um papel crucial nesta demanda de conhecimento, tendo sofrido uma enorme expansão e desenvolvimento (7).

#### **3.1. Relevância do enxofre nos sistemas biológicos**

O interesse no estudo das diversas funções em processos envolvendo o elemento químico enxofre (símbolo químico “S”) tem crescido ao longo dos últimos anos, nomeadamente na biologia molecular e celular, bioquímica e ecologia (8). O enxofre encontra-se distribuído pela natureza, é um elemento muito versátil, tem uma complexidade ao nível bioquímico que lhe permite ter diversos estados de oxidação, podendo variar de -2 (em sulfureto) a +6 (em sulfato), e manifesta uma elevada reatividade nas suas formas reduzidas (ver Tabela 1) (8).

O enxofre, enquanto elemento químico, depende da atividade microbiana para a sua distribuição ambiental e suas transformações (9), estando envolvido na constituição de moléculas biológicas (compostos orgânicos de enxofre primários), como aminoácidos (cisteína e metionina), coenzimas (biotina, ácido lipóico, tiamina e coenzima A), metabolitos (glutathiona) bem como nas macromoléculas derivadas destes (10; 8; 11). Por outro lado, o enxofre pode ser sintetizado por plantas formando compostos de enxofre secundários de grande heterogeneidade química e restrição taxonómica. Estes compostos podem funcionar na defesa da planta contra agentes patogénicos, insetos e outros herbívoros (8).

**Tabela 1: Importantes compostos inorgânicos de enxofre e seus estados de oxidação.** Adaptada de (8).

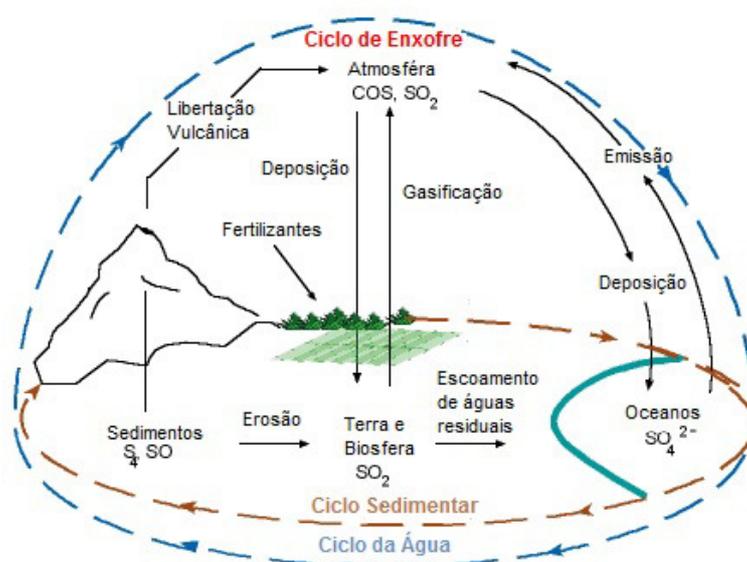
| Composto          | Fórmula química  | Estado de oxidação do enxofre          |
|-------------------|--|--|
| Sulfato           | $\text{SO}_4^{2-}$   | +6                                     |
| Tioissulfato      | $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  | +5 (sulfona S) / - 1 (sulfano S)       |
| Politionato       | $^-\text{O}_3\text{S}(\text{S})_n\text{SO}_3^-$                            | +5 (sulfona S) / $\pm 0$ (interior S)  |
| Sulfito           | $\text{SO}_3^{2-}$   | +4                                     |
| Enxofre elementar | $\text{S}_n$ (S anéis), $\text{S}_\mu$ ou $\text{S}_\infty$ (S polimérico) | 0                                      |
| Polisulfureto     | $\text{S}_n^{2-}$  | -1 (terminal S) / $\pm 0$ (interior S) |
| Sulfureto         | $\text{HS}^-/\text{S}^{2-}$  | -2                                     |

Este elemento químico encontra-se disponível na maioria dos sistemas biológicos, principalmente na forma de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) ou sulfureto ( $\text{HS}^-/\text{S}^{2-}$ ), na água e solo, mas também como dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) na atmosfera. Por outro lado, existem outros compostos que desempenham um pequeno mas muito importante papel, tais como o tioissulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ), os politionatos ( $\text{S}_n\text{O}_6^{2-}$ ), os sulfóxidos ( $\text{R-S(=O)-R}'$ ) e o enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ) (8). De salientar que os compostos de enxofre de oxidação intermédia (tais como o sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) e o polisulfureto ( $\text{S}_n^{2-}$ )) podem ser utilizados como doadores ou recetores de eletrões, em processos redox (8). O enxofre tem também tendência a formar uma enorme diversidade de cadeias de anéis, preferencialmente com estado de oxidação 0, como é o caso do enxofre elementar. Por outro lado, em diferentes condições ambientais de pressão e temperatura, o enxofre surge com anéis de tamanhos diferentes ( $\text{S}_n$ ) ou cadeias poliméricas de elevada massa molecular ( $\text{S}_\mu$  ou  $\text{S}_\infty$ ) (8). Os compostos de enxofre inorgânicos apresentam uma relevância biológica (Tabela 1) como se verifica do ciclo biológico do enxofre (8).

### 3.1.1. Ciclo e metabolismo de enxofre em procariontas

O enxofre é um nutriente essencial para todos os organismos (12). Este elemento foi inicialmente utilizado por organismos primitivos em sistemas de transferência de eletrões. Hoje em dia, os aglomerados de ferro/enxofre são considerados uma base indispensável em processos que geram a energia da vida (8; 11).

O ciclo de enxofre (Figura 1) é um dos principais ciclos biológicos na Natureza. Este é constituído por uma série de reações de redução que envolve a formação de sulfuretos, e de reações redox que produzem o sulfato a partir de formas reduzidas de enxofre. O sulfato é a forma mais oxidada do enxofre, sendo utilizado como nutriente por diversos microrganismos (8; 10). O ciclo de enxofre é extremamente complexo uma vez que este elemento se encontra em diferentes estados redox e as suas reações são catalisadas por diversas enzimas. Deste modo, o ciclo envolve vias metabólicas sequenciais, mediadas por diversos agentes biológicos (8; 13).

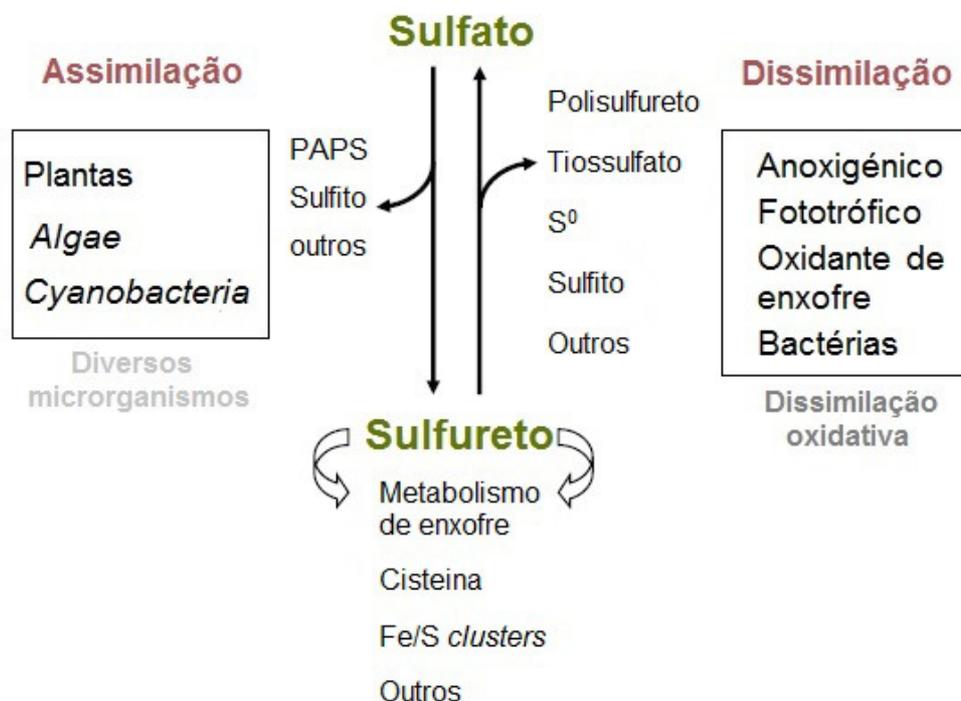


**Figura 1: Ilustração simplificada do ciclo do enxofre.**

O enxofre encontra-se na sua grande maioria na crosta terrestre e sedimentos, mas em menor quantidade na atmosfera, podendo ser encontrado em diversos estados de oxidação nos compostos orgânicos e inorgânicos. Uma vez que não pode ser utilizado na sua forma elementar por organismos superiores, o enxofre tem de ser catalisado. Sendo que, muitos microrganismos catalisam a sua oxidação e / ou redução, estabelecendo um ciclo. Adaptado de (14).

Este ciclo biogeoquímico (Figura 1) é impulsionado por processos microbianos, e apresenta duas vias complementares fundamentais (Figura 2) (15; 8): a mais predominante é a redução dissimilatória de sulfato por microrganismos marinhos, restrita a procariotas (15; 8). Esta via tem como finalidade o fornecimento de energia onde os compostos de enxofre são dadores ou aceitadores de eletrões, de acordo com o rendimento energético (8; 10). A segunda via, menos predominante, é a de assimilação (Figura 2). Neste processo os compostos de enxofre auxiliam a biossíntese de

constituintes celulares que contenham enxofre. É realizada por muitos organismos procariotas e eucariotas, e abrange a maioria dos grupos taxonómicos (15; 8).



**Figura 2: Visão geral do ciclo do enxofre com ênfase nos organismos fototróficos.**

O ciclo de enxofre inclui a generalização dos processos de assimilação e dissimilação. Bactérias quimiolitotróficas aeróbias e anaeróbias têm a capacidade de dissimilar o sulfureto para produção de energia. Por outro lado, procariotas marinhos têm a capacidade de realizar a dissimilação metabólica e ativar o sulfato a 3'-5'-fosfoadenosina fosfossulfato (PAPS), sem reduzir e assimilar sulfato. São omissos os processos geoquímicos e atmosféricos. Adaptado de (8).

### 3.2. Caracterização da Bactéria *Campylobacter jejuni*

A *Campylobacter* (*C.*) *jejuni* é um bacilo Gram negativo não esporulado, que apresenta uma forma curvada ou espiral (Figura 3) (16; 17). O seu tamanho varia entre 0,2-0,5 µm de largura e 0,5–5 µm de comprimento e é uma bactéria móvel devido à presença de flagelos unipolares ou bipolares. O seu movimento pode ser condicionado mediante a quantidade de oxigénio a que está exposta. Esta bactéria é quimiorganotrófica, e é incapaz de utilizar açúcares, quer por oxidação quer por fermentação (18; 16). A espécie *C. jejuni*, pertence ao género *Campylobacter*, que

constitui a família da *Campylobacteraceae*, classe *Epsilonproteobacteria*, filo *Proteobacteria*, reino *Monera* e domínio *Bacteria* (19).



Figura 3: Imagem microscópica de *C. jejuni* (82).

Esta bactéria é considerada um agente patogénico muito versátil, é metabolicamente ativa e apresenta uma atividade positiva para as enzimas catalase e oxidase (17; 18). É um microrganismo microaerófilo (os níveis de oxigénio deverão ser de 5-7 % (v/v) e de dióxido de carbono de 5-10 % (v/v)) (17), tem um genoma relativamente pequeno (1,7 Mpb), possui um sistema de transporte de eletrões complexo, e respiração anaeróbia e aeróbia devido à sua cadeia respiratória ramificada (17; 4). É também considerada como termotolerante, crescendo lentamente a uma temperatura entre 42-45 °C, sendo o seu crescimento inibido a uma temperatura inferior a 30 °C ou superior a 47 °C (16; 18). Em estudos a algumas estirpes de *C. jejuni*, observou-se que estas são capazes de reduzir tetrionato (respiração), permitindo-lhes uma maior facilidade no seu crescimento na mucosa intestinal humana em condições limitadas de oxigénio (1). Esta capacidade de respirar tetrionato é importante para a compreensão da patogenicidade do organismo (1). Também ocorre transferência de eletrões, a partir dos dadores de baixo potencial redox de menaquinona a uma das duas oxidases terminais, diretamente para a via de translocação de protões pelo complexo do citocromo *bc1* ao citocromo *c* oxidase (4).

Este patogénico tem carência no sistema de transporte relativo à aquisição de aminoácidos essenciais, determinados nutrientes e iões a partir do exterior. Tudo ocorre devido à sua capacidade limitada de biossíntese.

### 3.2.1. Patogeneidade da Bactéria *Campylobacter jejuni*

Diversas doenças podem ser veiculadas a partir de diversos alimentos. Embora a maior parte das infecções sejam de origem bacteriana, as vias de infecção viral, fúngica ou intoxicações por toxinas provenientes do metabolismo microbiológico desempenham também um papel importante neste tipo de enfermidades (18). Em países industrializados, é muito frequente diagnosticar-se uma doença gastrointestinal humana, designada por campilobacteriase (20). Esta bactéria em cerca de 95 % dos casos provoca diarreia, cólicas abdominais e febre nos humanos (21; 16). Em casos raros, numa pequena percentagem (cerca de 0,1 %), podem surgir algumas complicações após a infecção de *C. jejuni*, o que poderá levar à manifestação do Síndrome de Guillain-Barré, causar paralisia muscular e, em alguns casos, a morte (4; 16).

Este microrganismo é transmitido ao homem através do consumo de carne de origem aviária, do contato com animais de estimação (por exemplo cães e gatos) e também através da água contaminada (Figura 4). A transmissão de *C. jejuni* também representa um enorme risco quando são ingeridos alimentos que não são preparados com as devidas condições de higiene ou que não estão devidamente pasteurizados. Por outro lado, esta bactéria pode ser facilmente destruída pela desidratação de alimentos e sua correta confeção (20; 16; 21). Determinadas suscetibilidades clínicas individuais (como por exemplo a reduzida acidez gástrica devido à utilização de inibidores de bombas de prótons) também influenciam esta transmissão. As viagens ao estrangeiro, sobretudo a países com baixos níveis de higiene sanitária (principalmente no mundo ocidental), têm também sido indicadas como um fator de risco importante na contaminação deste agente patogénico (22; 23). Na Figura 4, são representadas algumas das possíveis vias de infecção do Homem por *C. jejuni*. A campilobacteriase a nível epidemiológico é pouco relevante, mas pode ocorrer uma infecção cruzada entre indivíduos (24). Esta transmissão surge uma vez que o animal hospedeiro é utilizado como um reservatório natural do agente patogénico na mucosa intestinal, culminando com a sua colonização. Após contaminação, a bactéria reside na camada epitelial da via gastrointestinal humana podendo, deste modo, causar danos e consequentemente perturbar a absorção intestinal e secreção (25).

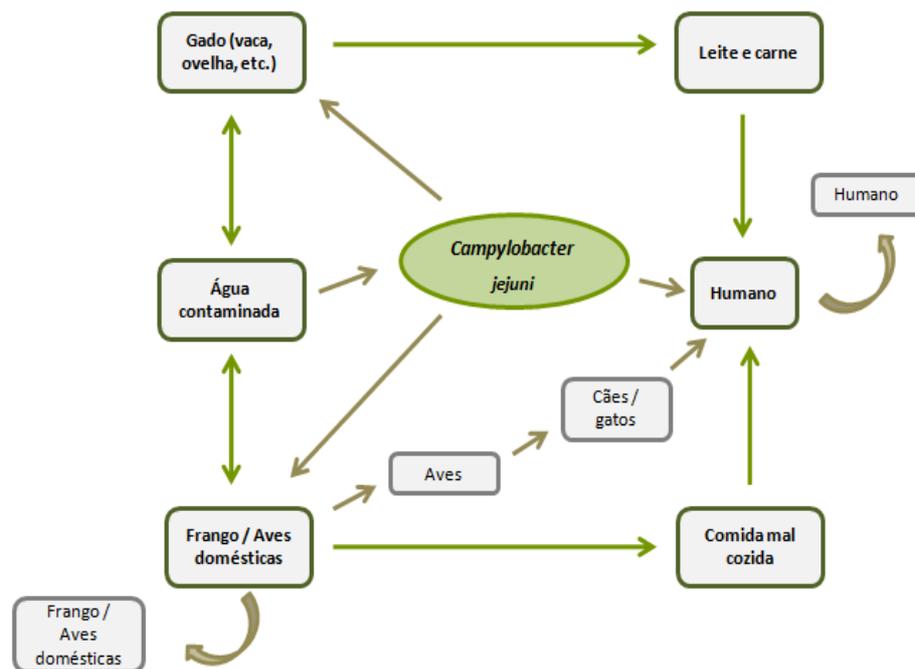


Figura 4: Possíveis vias de transmissão da *C. jejuni*, adaptado de (24).

### 3.3. Tioissulfato desidrogenase (TsdA) da bactéria *Campylobacter jejuni*

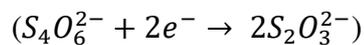
Muitos microrganismos procariontes têm a capacidade de executar uma simples oxidação de duas moléculas de tioissulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) a tetrionato ( $S_4O_6^{2-}$ ), com a concomitante libertação de dois elétrons muito importante para o ciclo de enxofre (26):



Esta reação é catalisada reversivelmente pela enzima TsdA e ocorre nas enzimas TsdA de *A. vinosum* e TsdA de *M. purpuratum*. Estas duas proteínas são fundamentais para a sobrevivência das bactérias de enxofre rosa em que se encontram. No caso da TsdA<sub>Av</sub>, esta é uma proteína di-hémica e utiliza o tioissulfato como um doador de elétrons, necessitando de um parceiro redox na célula, para este ser o receptor e possibilitando a realização do fluxo de elétrons (26). Por outro lado, a TsdBA<sub>Mp</sub> é uma proteína com 4 hemo, surgindo da fusão da TsdA com a TsdB. Esta proteína apresenta um fluxo de elétrons completo, não necessita do auxílio de um par redox, tendo a TsdB como receptor de elétrons. Apesar desta diferença muito interessante, que

veio facultar muita informação sobre o funcionamento do fluxo de electrões, ambas crescem com a oxidação de compostos de enxofre reduzidos (26; 3).

Deste modo, foram realizados anteriormente estudos estruturais e espectroscópicos UV-vis aos variantes destas enzimas, TsdA\_Av e TsdBA\_Mp. Porém, como ainda existem algumas lacunas significativas no conhecimento, relativamente aos papéis fisiológicos e as propriedades bioquímicas na família das proteínas TsdA, neste projeto irá ser abordado um estudo estrutural à TsdA\_Cj, semelhante ao já realizado em TdsA\_Av (1). Por outro lado, sabe-se que muitas bactérias sulfurosas, que é o caso da *C. jejuni*, necessitam recorrer à redução de dois eletrões de tetrionato em tioissulfato, com a finalidade de lhes facilitar o seu crescimento em condições anaeróbias, realizando-se, uma reação inversa (4):



A proteína TsdA pode não ter o mesmo papel no funcionamento em diferentes bactérias, mas é otimizada para a oxidação de tioissulfato ou redução de tetrionato, de acordo com os requisitos fisiológicos e estilo de vida das bactérias específicas em causa (26).

A TsdA de *C. jejuni* é uma enzima homóloga à TsdA de *A. vinosum* (apresentam propriedades semelhantes) (1), e após a realização de diversos estudos cinéticos, foi possível confirmar a sua bi-funcionalidade (4). Esta enzima apresentou uma maior afinidade para a redução do tetrionato (reductase), em relação à oxidação de tioissulfato (desidrogenase) (1). Ou seja, no caso da TsdA\_Cj, o tetrionato é utilizado pelo organismo como um aceitador de eletrões alternativo para a respiração anaeróbia (3), mas noutras duas proteínas da mesma família (TsdA\_Av e TsdAB em *M. purpuratum*) há a utilização de tioissulfato como doador de eletrões na respiração ou na fotossíntese destes microrganismos (1).

A TsdA\_Cj está relacionada com a campilobacteriase, uma patologia humana (27) e a bactéria *C. jejuni* apresenta uma maior vantagem de crescimento em relação a outras bactérias na flora comensal, que lhe permite a utilização de tetrionato como aceitador terminal de eletrões. Em condições de oxigénio limitado na mucosa intestinal, o crescimento deste patogénico microaerófilo é estimulado por tetrionato, embora haja uma ausência de sequências do genoma de qualquer tipo conhecido por tetrionato reductase (4).

|                        |            |            |            |            |
|------------------------|------------|------------|------------|------------|
|                        |            | 10         | 20         | 30         |
| MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA | MASWSHPQFE | KGAGSLDPNL | EKTKSATGID |            |
| 40                     | 50         | 60         | 70         | 80         |
| LPTAKWNLPK             | ALNEDGTIDE | TKMPKNSEYS | KMVILGNKIL | NETSKYVGPQ |
| 90                     | 100        | 110        | 120        | 130        |
| AKDPKKRFAG             | NNLSCSSCHA | NGGSVQNQSG | FVGIWARFPQ | YNARGDKVIT |
| 140                    | 150        | 160        | 170        | 180        |
| LADRINGCFE             | RSMNGKRMPS | DTPMKAMLT  | YMQWLSQGVP | VGAKIEGQGL |
| 190                    | 200        | 210        | 220        | 230        |
| KKIDFISRAA             | DPKKGKAIYM | DKCAVCHQEN | GLGLKNEDSA | GAYLYLPPLW |
| 240                    | 250        | 260        | 270        | 280        |
| GDDSYNTGAG             | MYRLIKAASY | IKENMPQGAP | DLSLEDAYDV | AAYMNSQARP |
| 290                    | 300        | 310        | 320        |            |
| IKANRDKDFP             | DRKVKPLDMD | VGPYDDSFST | TQHRYGPYTN | MIKK       |

**Figura 5: Sequência clonada da proteína Tioissulfato desidrogenase (TsdA) de *Campylobacter jejuni*.**

Nesta sequência estão identificados as mutações feitas aos possíveis ligandos distais dos dois hemos. Relativamente ao hemo 1, a mutação foi no resíduo da Cys<sup>138</sup> (ligando distal) que está indicada a rosa-claro e o motivo da ligação proximal (CXXCH) a rosa-escuro. Para o hemo 2 foram feitas mutações aos resíduos Lys<sup>252</sup>, Asn<sup>254</sup> e Met<sup>255</sup> (possíveis ligandos distais do hemo 2) que estão assinaladas a verde-claro e o motivo proximal a verde-escuro. Também está ilustrado o sinal do péptido (vermelho) e o Strep-Tag (azul).

A numeração dos aminoácidos da TsdA\_Cj é sem o sinal do péptido, mas inclui a marca Strep-Tag (28).

As enzimas da família de TsdA são citocromos *c* di-hémicos, no caso da TsdA\_Cj é periplasmática e monomérica com um peso molecular de 37 kDa (mais propriamente de 37103 Da, não incluindo o sinal do péptido) (1). A sua sequência (Figura 5) é constituída por 324 aminoácidos (28). Esta enzima tem dois locais de ligação aos hemos *c*, que estão ligados covalentemente à proteína por cisteínas do motivo CXXCH (cada hemo tem um peso molecular de 616,51 Da) (26). Comparando-se as características estruturais entre TsdA\_Av e TsdA\_Cj (através da sobreposição de estruturas), foi permitido obter uma melhor percepção relativamente à ligação dos domínios e dos hemos (ver Figura 6) (3). Este estudo abrange quatro mutantes por substituição da Cys<sup>138</sup>, Lys<sup>252</sup>, Asn<sup>254</sup>, Met<sup>255</sup> por Gly, mutações que afetam as ligações tanto no hemo 1 como no hemo 2, com o intuito de complementar os testes cinéticos e espectroscópicos realizados em parceria com o grupo de investigação da Professora

Christiane Dahl, Universidade de Bonn, Alemanha É importante saber se a natureza dos resíduos de ligação aos hemo pode ou não alterar as propriedades catalíticas da enzima (ambas as direções da reação são afetadas ou só uma delas) (1).

No hemo 1 os resíduos His<sup>99</sup> e Cys<sup>138</sup> são suscetíveis a terem uma ligação axial ao átomo de Ferro central (1). O estudo cinético relativo à substituição de Cys<sup>138</sup> por um Gly demonstrada em Kurth, *et. al.*, (1) indicou que este resíduo não tem capacidade de coordenar o ferro do hemo 1, tendo uma baixa intensidade a nível de caracterização espectral (cerca de 622 nm) (1). Houve uma diminuição drástica da atividade enzimática comparativamente com a *wild-type*, e também afetou a redução do tetrionato e a oxidação do tioissulfato, como indicado na Tabela 2. Deste modo, a ligação da Cys<sup>138</sup> ao hemo 1 é essencial para a atividade enzimática da TsdA\_Cj, o que tornou interessante verificar a influência da proteína produzindo este mutante (4). A ligação axial His/Cys parece ser rara em citocromos do tipo *c* em procarionotas, o que pode evidenciar uma importância especial na acumulação de energia no metabolismo de enxofre (26).

|                         | <b>Hemo 1</b>  |                            | <b>Hemo 2</b>    |                            |
|-------------------------|----------------|----------------------------|------------------|----------------------------|
| <b>Ligandos axiais</b>  | <i>MpTsdBA</i> | 287 QTCAGCHLD              | <i>MpTsdBA</i>   | 402 EHCALCHGA              |
|                         | <i>AvTsdA</i>  | 47 LACRHCHPG               | <i>AvTsdA</i>    | 158 ARCLACHGA              |
|                         | <i>CjTsdA</i>  | 93 LSCSSCHAN               | <i>CjTsdA</i>    | 201 DKCAVCHQE              |
| <b>Ligandos distais</b> | <i>MpTsdBA</i> | 328 RIQGC <sup>•</sup> FRY | <i>MpTsdBA</i>   | 448 IAANM <sup>•</sup> PLL |
|                         | <i>AvTsdA</i>  | 92 RIGDC <sup>•</sup> FER  | <i>AvTsdA</i>    | 205 IKHKM <sup>•</sup> PLG |
|                         | <i>CjTsdA</i>  | 134 RINGC <sup>•</sup> FER | <i>CjTsdA</i>    | 251 IKENM <sup>•</sup> PQG |
|                         |                |                            | Local de mutação |                            |
|                         |                |                            |                  |                            |

Figura 6: Visão geral esquemática dos ambientes em torno do hemo 1 e do hemo 2 das proteínas TsdBA\_Mp, TsdA\_AV e TsdA\_Cj, adaptado de (1).

Relativamente ao hemo 2 o ligando distal é claramente a Met<sup>255</sup>, como também foi demonstrado em Kurth, *et. al.*, (1). Por outro lado, comparativamente à estrutura da TsdA\_Av, a coordenação axial no estado de oxidação é His/Lys e há um *ligand-switch* entre o resíduo Lys<sup>208</sup> e o resíduo vizinho Met<sup>209</sup>, quando há uma redução da enzima (1). A metionina é conservada em todas as sequências de TsdA (no caso da TsdA\_Cj é Met<sup>255</sup>, ver na Figura 6), há uma aparente variação da localização da lisina, que se situa

próxima do terminal N (em TsdA\_Cj é a Asn<sup>254</sup>, ver na Figura 6) (1). Ou seja, estes resíduos estão próximos do ferro do hemo 2, sendo potenciais ligandos ao hemo (1), por isso realizou-se a substituição destes resíduos por glicinas. Na mutação da Met<sup>255</sup> houve um efeito dramático na catálise de oxidação de tioissulfato, comparativamente com a *wild-type*, sendo muito mais prejudicada do que a redução do tetrionato (Tabela 2) (1). Os estudos cinéticos aos restantes mutantes em estudo da TsdA\_Cj, apresentaram algumas alterações relacionadas com a atividade enzimática, nomeadamente no mutante K252G as direções catalíticas com uma melhoria significativamente na direção oxidante (Tabela 2) (1). Por outro lado o mutante N254G apresentou uma atividade muito mais baixa na direção oxidante (Tabela 2), o que demonstra ser esta mais adaptada para catalisar a direção redutora (1).

**Tabela 2:** Parâmetros cinéticos dos ensaios oxidativos e redutores dos cinco variantes da TsdA\_Cj em estudo (1).

|               | <b>TsdA</b>          | <b>Oxidação de tioissulfato<br/>(V<sub>max</sub> (units/mg))</b> | <b>Redução de tetrionato<br/>(V<sub>max</sub> (units/mg))</b> |
|---------------|----------------------|--|---|
|               | <i>Wild-type</i>     | 1265 ± 70  | 2328 ± 273  |
| <b>Hemo 1</b> | <b>Mutante C138G</b> | 2,1 ± 0,3  | 3,7 ± 0,5   |
| <b>Hemo 2</b> | <b>Mutante K252G</b> | 2782 ± 275   | 3823 ± 528  |
|               | <b>Mutante N254G</b> | 469 ± 29   | 3284 ± 457  |
|               | <b>Mutante M255G</b> | 0,7 ± 0,0  | 88 ± 13   |

## 4. Cristalografia de raios-X

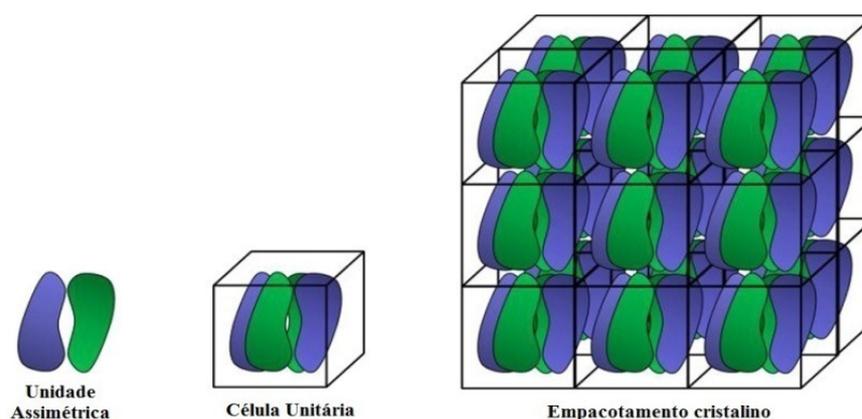
Durante milénios, os cristais despertaram um enorme interesse no homem, embora este não possuísse informação sobre a sua natureza, propriedade e utilização (29). A cristalografia surgiu na segunda metade do séc. XX, e desde a primeira estrutura de proteína determinada a 6.0 Å, a da mioglobina por Sir John Cowdery Kendrew que lhe valeu o Prémio Nobel da Química em 1962, muitas outras surgiram caracterizadas por cristalografia de raios-X. Nesta técnica, muitos foram os pioneiros na difração, incluindo Max Von Laue e os Bragg (pai e filho) (30; 31).

Com o passar do tempo, tomou-se consciência que o conhecimento estrutural é uma ferramenta imprescindível na compreensão do mecanismo molecular da função da proteína. Deste modo, houve uma enorme expansão no campo de cristalografia de proteínas (7). Ocorreu uma melhoria significativa na produção e cristalização de macromoléculas, assim como nas fontes de raios-X, configuração experimental e processamento de dados de difração. Outros aperfeiçoamentos foram os ensaios de cristalização, que passaram a ser realizados automaticamente, com o auxílio de um robot especializado e com condições pré-estabelecidas (32). Verificou-se também um aumento de estruturas de dados de difração de raios-X no *Protein Data Bank* (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb>) (7). Hoje em dia, a cristalografia de raios-X é considerada um método com o intuito de se poder obter a informação estrutural de macromoléculas biológicas com elevada resolução (32).

### 4.1. Cristalização de proteínas

A cristalização é um processo de obtenção de condições muito complexo e moroso, e possibilita o estudo da estrutura tridimensional de uma determinada proteína. Pretende-se com este método um conhecimento detalhado da posição dos átomos, interações atómicas específicas, a sua mobilidade e flexibilidade da molécula, assim como o local do centro ativo e o mecanismo de reação da enzima, as alterações conformacionais que surgem após a ligação de um determinado ligando e as repercussões na sua função (33; 34). A bioquímica estrutural tem sido influenciada pela técnica da cristalografia de raios-X, com a finalidade de obter a estrutura tridimensional a partir de um cristal de proteína (33; 35; 36).

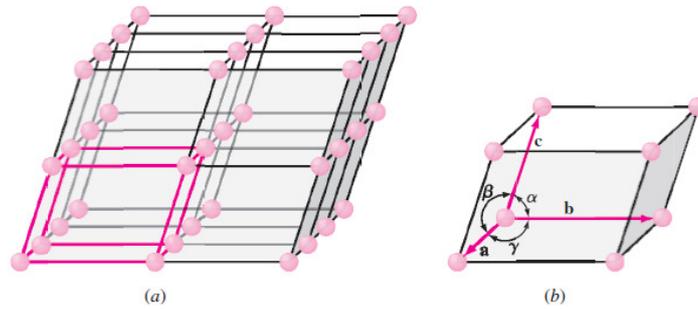
Um cristal é um arranjo periódico e tridimensional de moléculas, que estão empacotadas e ordenadas simetricamente, por meio de interações não covalentes (Figura 7). (37; 33). A unidade mais pequena de um cristal é designada por unidade assimétrica, que contém toda a informação estrutural e está relacionada por operações de simetria (Figura 7). Esta encontra-se disposta numa célula unitária (elemento volumétrico) através da aplicação de diferentes combinações de elementos de simetria, e repete-se ao longo de uma malha (ingl., *lattice*) tridimensional com operações de translação associadas, o que define a estrutura e simetria do cristal. Cada célula unitária de um cristal é descrita por seis valores que definem os comprimentos das suas arestas ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) e os ângulos entre as arestas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) (36; 37). As células unitárias repetem-se ao longo das três dimensões do espaço, definidas pelos ângulos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e cada uma delas é separada na rede cristalina, por intervalos iguais  $a$ ,  $b$  e  $c$  (Figura 8) (37).



**Figura 7: Representação da rede cristalina de um cristal.**

Composta por várias células unitárias. A rede cristalina resulta de operações de translação da célula unitária. Esta é gerada pela unidade assimétrica através de operações de simetria cristalográfica. Adaptado de (33).

Em 1848, August J. Bravais demonstrou ser possível a construção geométrica de sete sistemas cristalinos básicos (Tabela 13, em anexo), que representam diferentes organizações internas do cristal, devido à variabilidade dos parâmetros da célula unitária (38; 39). As operações de simetria cristalina da proteína só incluem a translação e rotação, devido à molécula ser quiral (38; 39). Por outro lado, as principais forças que mantêm a integridade dos cristais de proteínas são pontos de hidrogénio entre os átomos à superfície da molécula, muitas vezes mediadas por moléculas de água (36).



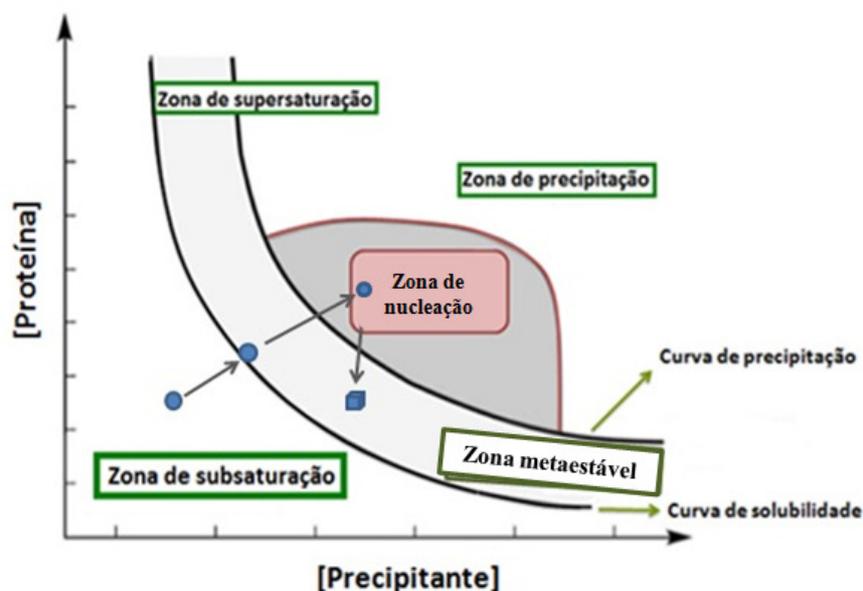
**Figura 8: Ilustração da célula unitária de um cristal.**

A) Estrutura interna tridimensionalmente ordenada e empacotada de um cristal. B) Apresentação da célula unitária da rede cristalina, com as dimensões das arestas (a, b, c) e os ângulos entre as arestas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) (36).

#### 4.1.1. Teoria da Cristalização de proteínas do Diagrama de Fases

O processo de cristalização é sempre uma incógnita para o cristalógrafo, pois este não tem qualquer informação sobre as condições em que surge a nucleação de cristais e o seu crescimento. Este processo pode ser ilustrado através de um diagrama de fases (Figura 9) que possibilita o conhecimento de diferentes estados físicos (líquido, cristalino, ou sólido amorfo) (40). É possível obter estas informações, através da curva de solubilidade de uma proteína em função da concentração da mesma (40; 41). Este diagrama divide-se em duas zonas: uma de subsaturação e outra de sobressaturação. Esta última subdivide-se em três zonas fundamentais: a zona metaestável, a zona de nucleação e a zona de precipitação (40).

Para que o processo de cristalização ocorra com sucesso, inicialmente, a amostra deverá encontrar-se sob forma de solução subsaturada (zona de subsaturação), para uma possível formação de núcleos. Neste caso, as moléculas mantêm-se dissolvidas em solução com uma concentração maior do que a solubilidade em condições normais (34). A formação de núcleos de cristais e o seu crescimento requer que a solução atinja lentamente um estado de solubilidade mínima, até alcançar um estado de supersaturação, a fim de garantir cristais de forma e tamanho desejado (36; 34). Na Tabela 3 encontra-se descrito o que ocorre em cada uma das zonas do diagrama de fases de crescimento de cristais.



**Figura 9: Diagrama de fases do crescimento de cristais.**

Mostra a evolução de solubilidade de uma proteína em função da concentração de um agente precipitante. Para este processo ter sucesso, deverá iniciar-se a partir de uma solução saturada (ponto 0), passando lentamente a curva de solubilidade (ponto 1), até atingir a zona de nucleação (ponto 2). Deste ponto retorna para a zona metaestável (ponto 3), onde ocorre o crescimento de núcleos de cristalização, formados na zona anterior. Adaptado de (40).

Este diagrama (Figura 9) é um mapa complexo e multi-variante, que representa o estado de um material em função de determinadas condições. É considerado uma ferramenta fundamental (42). Na realização dos ensaios de cristalização, o investigador deve alterar as condições de cristalização da proteína, em busca das interações intramoleculares favoráveis para a formação de cristais (7). É importante realizar *screenings* de proteínas solúveis em diferentes concentrações, precipitantes, tampões ou aditivos, facultando assim, ao cristalógrafo dados necessários para se traçar a curva de solubilidade do diagrama de fases de cristalografia de proteínas (7).

Tabela 3: Legenda descritiva do diagrama de fases de crescimento de cristais (43); (40); (34).

| <b>Descrição da solubilidade bidimensional de cristalização de proteína</b> |  |   |
|---|--|---|
| <b>Zona de Subsaturação</b>   | Zona onde a proteína se encontra em solução e não ocorrerá cristalização.                                |   |
| <b>Curva de solubilidade</b>  | Esta curva divide o espaço em duas zonas (subsaturação e de supersaturação) de concentrações diferentes. |   |
| <b>Zona de Supersaturação</b>   | <b>Zona metaestável</b>  | Zona de menor supersaturação, logo abaixo da zona de nucleação, onde os cristais são estáveis e podem crescer, mas não ocorre a nucleação. Esta zona é maior quando a solubilidade da proteína é muito baixa, o que torna extremamente difícil controlar a velocidade de nucleação.   |
|   | <b>Zona de nucleação</b>   | Zona de supersaturação moderada, onde ocorre a nucleação espontânea, onde se podem formar cristais de tamanho e forma adequada.<br><br>A velocidade de nucleação é definida pelo número de núcleos formados por unidade de volume e unidade de tempo. É necessário ter em atenção que esta formação pode ser impedida pelo crescimento rápido, surgindo cristais irregulares. |
|   | <b>Zona de precipitação</b>  | Zona de alta supersaturação, onde a proteína irá precipitar formando-se um agregado amorfo.   |

• **Parâmetros que influenciam o crescimento de cristais**

Muitos são os fatores que podem influir no processo de cristalização de macromoléculas, entre os quais a probabilidade de nucleação e a sua taxa de crescimento. A Tabela 4 apresenta outros parâmetros que podem influenciar a cristalização (44). A maioria destes são fundamentais para manter a proteína num estado único, homogêneo e invariável (44).

**Tabela 4: Parâmetros que podem interferir na cristalização de proteínas.** Adaptado de (44).

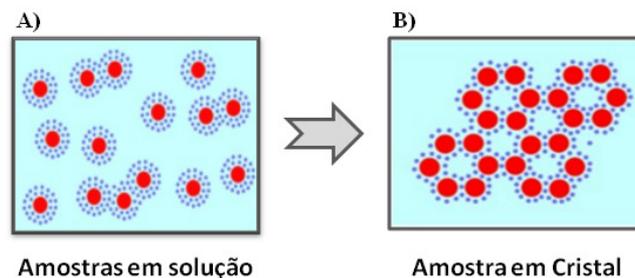
| <b>Parâmetros Físicos</b>                       | <b>Parâmetros Químicos</b>     | <b>Parâmetros Bioquímicos</b>                         |
|---|--------------------------------|---|
| Temperatura                                     | pH                             | Ligandos  |
| Superfícies                                     | Tipo de precipitantes          | Aditivos específicos                                  |
| Atingir o equilíbrio                            | Iões metálicos                 | Tampão da amostra                                     |
| Gravidade                                       | Concentração da macromolécula  | Estabilidade da proteína                              |
| Pressão   | Força iónica da solução        | Sensibilidade das conformações aos parâmetros físicos |
| Tempo   | Espécies iónicas               | Precipitantes: tipos de concentração e sais           |
| Volume e geometria das amostras e reservatórios | Grau de sobressaturação        | Ponto isoelétrico                                     |
| Grau de equilíbrio                              | Impurezas não-moleculares      | Origem da macromolécula                               |
| Densidade e viscosidade                         | Detergentes                    | Modificações químicas ou genéticas                    |
| Difusão e convecção                             | Ambiente redutor ou oxidativo  | Estado de agregação da macromolécula                  |
| <b>Pureza</b>                                   | Contaminantes macromoleculares |   |
|   | Heterogeneidade conformacional |   |
|   | Monodispersão                  |   |

## 4.2. Métodos de cristalização de proteínas

Como já foi referido anteriormente, na formação de cristais de proteínas a amostra em estudo deve estar em solução. É necessário diminuir a sua solubilidade, de modo a que esta se encontre num estado de sobressaturação, para tal, recorre-se a alguns métodos de cristalização (45; 46).

### 4.2.1. Técnica de Difusão de Vapor

A técnica que tem sido mais utilizada na cristalização de proteínas, é a de difusão de vapor (45). Nesta técnica são preparadas soluções contendo um tampão e um agente de precipitação, o que se denomina solução de cristalização com um volume de 100-500  $\mu\text{L}$ , a partir da qual os cristais vão crescer (46). Neste caso, ocorre uma mistura de uma gota da solução da proteína, normalmente de 2-10  $\mu\text{L}$ , com uma gota de volume semelhante de solução de cristalização numa lamela selando o sistema, de modo, a que ocorra um equilíbrio por difusão de vapor (45). Devido à diferença de concentração entre a gota e o reservatório, esta técnica de difusão de vapor utiliza a evaporação e difusão de água da gota para o reservatório. Pretende-se atingir um estado de supersaturação da proteína, o que faz surgir um aumento da concentração do agente precipitante e uma diminuição da solubilidade da proteína. Em condições favoráveis, esta combinação de eventos permite que a proteína passe de uma solução desordenada, para uma fase sólida, altamente ordenada, nomeadamente um cristal (Figura 10) (34; 46).



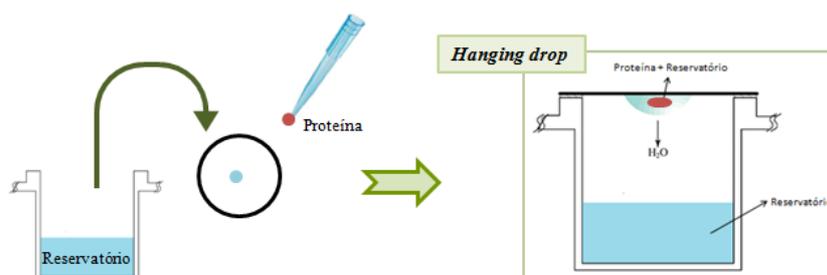
**Figura 10: Diferença entre as amostras em solução e sob a forma de cristal.**

A) Quando as condições de cristalização são devidamente favoráveis, a proteína encontra-se em solução com as suas moléculas desordenadas. B) A amostra da proteína passa para uma solução sólida, ordenada, denominado cristal (47).

Esta técnica de vapor de difusão apresenta vários métodos, sendo os mais comuns denominados de gota suspensa (*hanging drop*) e gota assente (*sitting drop*) (46).

- **Gota suspensa (*hanging drop*)**

Neste método de cristalização, *hanging drop* (Figura 11), as gotas contêm uma solução proteína-precipitante e são colocadas numa lamela de vidro silanizada, para evitar o espalhamento da gota (45; 48). A gota fica assim suspensa na lamela e fecha-se o poço com o auxílio de silicone, de modo a formar um sistema fechado. A concentração da proteína e do precipitante na gota ocorre gradual e lentamente, para favorecer a cristalização (49; 48). É muito importante a forma da gota, uma vez, que esta influencia o número de locais de nucleação e o tamanho do cristal (45).

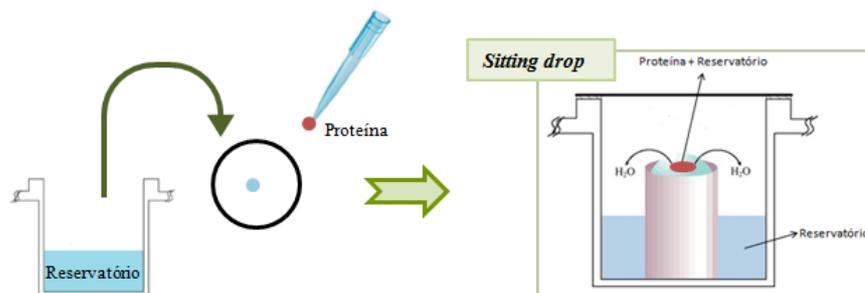


**Figura 11: Representação esquemática do método de cristalização *hanging drop*.**

Está indicado como funciona o sistema fechado no método de difusão de vapor por *hanging drop*, as setas evidenciam o sentido da difusão do solvente que ocorre quando há uma diferença de concentração de precipitante entre a gota e o poço. Enquanto ocorre difusão de vapor a concentração de proteína e precipitante na gota aumentam, podendo ocorrer cristalização. Adaptado de (33).

- **Gota assente (*sitting drop*)**

Outro método usado na cristalização é o sistema de *sitting drop* (Figura 12), onde se podem utilizar volumes de aproximadamente 1  $\mu\text{L}$ , ou superiores a 20  $\mu\text{L}$ , e/ou na presença de aditivos que reduzem a tensão superficial das gotas (por exemplo, detergentes ou solventes orgânicos). Utiliza-se também como alternativa a *hanging drop* na maioria dos casos (45). Neste caso, a mistura da solução da proteína e do precipitante combina-se num suporte no poço da placa de cristalização. O poço é fechado com uma lamela de vidro não siliconizada e com a ajuda de silicone, forma-se um sistema fechado (48; 45).



**Figura 12; Representação esquemática do método de e cristalização *sitting drop*.**

Está elucidado o método de difusão de vapor por *sitting drop* num sistema fechado, as setas evidenciam o sentido da difusão do solvente que ocorre quando há uma diferença de concentração de precipitante entre a gota e o poço. Enquanto ocorre difusão de vapor a concentração de proteína e precipitante na gota aumentam, podendo ocorrer cristalização. Adaptado de (33).

#### 4.2.2. Técnicas de *seeding*

As técnicas de *seeding* possibilitam a separação entre a nucleação e o crescimento do cristal, o que permite uma agregação das moléculas de forma lenta e ordenada e geralmente encontram-se num estado de baixa subresaturação, impedindo a nucleação espontânea (33; 50). Esta técnica apresenta três tipos de métodos, o *microseeding*; *macroseeding* e *streak seeding* (50). No *microseeding*, é feita uma solução *stock* contendo alguns fragmentos de cristais e são preparadas algumas diluições a partir da solução inicial. Por outro lado, *macroseeding* envolve a transferência de um único cristal bem formado para uma nova gota de cristalização (de condição similar onde foi originalmente cultivada) após lavá-lo várias vezes (33). A técnica *streak seeding* foi utilizada neste estudo estrutural da enzima TsdA\_Cj:

- ***Streak seeding***

Este método tem como finalidade a introdução de núcleos de um cristal já formado, numa outra gota. Assim, é possível controlar a nucleação e alterar a forma de como o cristal poderá crescer (51). Ao recorrer-se a este método, as condições básicas em que os cristais crescem normalmente modificam-se ligeiramente (51).

O método *streak seeding* é efetuado com um bigode de gato ou cavalo, ou artificial (*whisker*). O cristalógrafo toca suavemente no cristal formado arrastando alguns núcleos e transfere-os para outra gota com condições de precipitação diferentes, posteriormente efetua-se um *seed* ao longo de uma linha (Figura 13). No *whisker* vai-se acumular algum precipitante, o que faz aumentar consequentemente a concentração do

agente precipitante junto à linha, o que pode vir a estimular o crescimento dos núcleos. É possível repetir o *seed* ao longo de três a seis gotas diferentes, em que a primeira recebe mais núcleos que as gotas sucessivas (52).

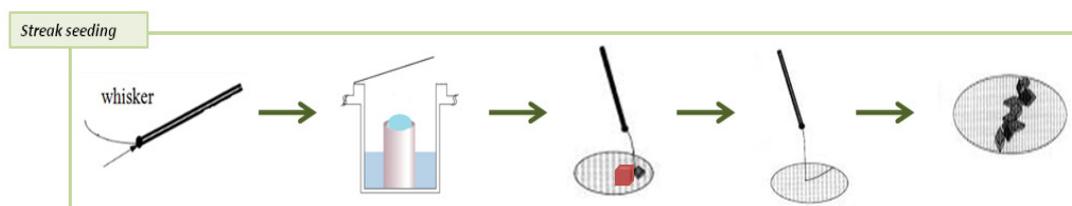


Figura 13: Representação esquemática da técnica *streak seeding* de Cristalização. Adaptado de (52).

### 4.3. Raios – X

Os raios-X foram descobertos por Röntgen, um físico Alemão, em 1895 (53). São ondas eletromagnéticas com um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de  $10^{-9}$  m, e no espectro eletromagnético situam-se entre a luz ultravioleta e raios gama (Figura 14). É possível ver as distâncias interatômicas (mesmo as ligações covalentes) e tem resolução suficiente para observar os átomos, o que faz com que os raios-X sejam adequados para o estudo dos átomos e ligações (53; 36).

Pequenas partículas podem difratar a radiação, devido ao comprimento de raios-X ser de  $0,5 \text{ \AA}$  a  $2,5 \text{ \AA}$ . Para esta difração ser possível, é necessário que o comprimento de onda da radiação seja menor que o objeto em causa (54; 38). Os raios-X não podem ser focados por lentes comuns, como é possível com a luz visível, e também não se observa diretamente os objetos por meio de instrumentos, como é o caso da microscopia ótica ou eletrônica. O índice de refração dos raios-X é muito perto de 1, para um  $\lambda = 2 \text{ \AA}$  e para materiais de alta densidade a diferença de unidade é na ordem de  $10^{-4}$ , mas na maioria dos casos é de  $10^{-5}$ . Os feixes difratados pelo cristal de proteína possuem uma intensidade detetável e quantificável, podendo permitir a identificação dos átomos que a constituem (54).

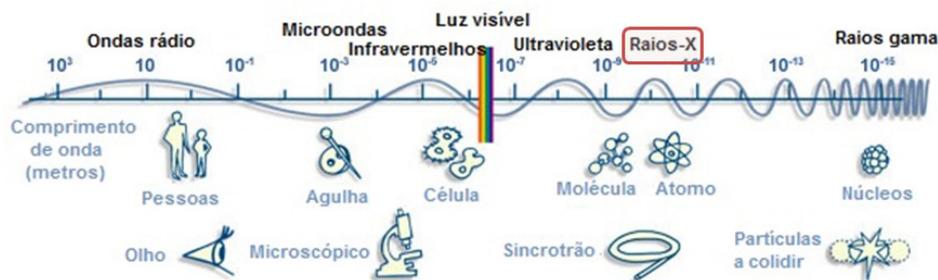


Figura 14: Ilustração dos raios-X no espectro eletromagnético. Adaptado de (53).

Um síncrotrão é uma fonte de raio-X muito poderosa, originada pela produção de elétrons altamente energizados. Os elétrons são acelerados até atingirem uma velocidade elevada, através de uma série de aceleradores de partículas, que se deslocam num grande círculo no síncrotrão (53; 55). As fontes de radiação de síncrotrão proporcionam feixes de raios-X com alta intensidade (aumenta o sinal de dados), baixa divergência (reduz a sobreposição entre reflexos adjacentes) e uma ampla gama de energia (permite a seleção de comprimento de onda específico) (33).

#### 4.4. Difração e resolução da estrutura da proteína

Com a obtenção de cristais é fundamental preservá-los na presença de agentes crio-protetores, este processo é designado por crio-cristalografia (Figura 15), é uma técnica indispensável na recolha de difração de raios-X, e tem tido um enorme impacto na qualidade de estruturas que se consegue obter. Nesta técnica, ocorre um *flash-cooling* de um cristal de proteína obtido, para uma temperatura de cerca de 100 K, com a finalidade de atenuar os danos causados pela radiação (56; 57).

O processo de crio-cristalografia tem como objetivo assegurar o prolongamento do “tempo de vida do cristal” que normalmente resulta na melhor qualidade e maior resolução de dados (58). Nesta técnica recorre-se à utilização de agentes crio-protetores, que minimizam a difusão de radicais que se formam após incidência dos raios-X diminuindo assim os estragos nos cristais (59). Os cristais de proteínas solúveis geralmente têm um teor de solvente de 30 a 50 %, podendo atingir um teor de 70 – 80 % nas proteínas membranares. Também é necessária a substituição de moléculas de água por soluções crio-protetoras, que contêm por ex. glicerol, glicose e outros açúcares, impedindo a formação de cristais de gelo na superfície do cristal de proteína e a perturbação concludentemente na ordem estrutural do cristal da macromolécula (38;

59). No processamento de dados, as reflexões que são mais afetados pelos anéis de gelo são geralmente excluídos (59).



**Figura 15: Colheita do cristal e transferência para solução crio-protetora.**

A) Os cristais são capturados da gota de cristalização (amarela) e posteriormente submersos numa solução crio-protetora (azul) com auxílio de instrumentos apropriados. Estes são novamente capturados e, então, transferidos para o azoto líquido onde ficam armazenados até o momento da recolha de dados. Neste processo podem ser adicionados ligandos da proteína no cristal, com o objetivo de se ter conhecimento do local do centro ativo, e o mecanismo de reação da enzima. Mas é necessário ter-se cuidado com a adição de ligando, pois podem introduzir mudanças conformacionais da proteína quando ocorre a ligação, levando à destruição do cristal (60).

B) Acessórios utilizados para a crio-cristalização: Pinças; Luvas; *Loop*; *Basket* e outros (57).

O fenómeno de difração de raios-X foi explicado por William L. Bragg e William H. Bragg, em 1913 na Universidade de Cambridge, que demonstraram o comprimento de onda que incide num cristal e permite saber o efeito de difração desta interação. Ou seja, mostrou que um conjunto de planos paralelos pelos índices de Miller ( $hkl$ ) e o espaçamento intraplano produz um feixe difratado. Foi desenvolvida uma expressão matemática,  $n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta$ , que descreve a relação entre os ângulos de difração ( $\theta$ ), o comprimento de onda dos raios-X ( $\lambda$ ) e os espaçamentos intraplano ( $d$ ) na rede cristalina (36; 38; 29). Esta é conhecida pela Lei de Bragg.

#### 4.4.1. Recolha de dados e análise de difração de raios-X

Após a cristalização e a crio-proteção do cristal, o passo seguinte é expor o cristal a um feixe de raios-X e medir o seu sinal de difração. O feixe de raios-X vai interagir com as nuvens de elétrons dos átomos no cristal, o que dá origem a um sistema complexo de feixes difratados (padrão de difração), registados por um detetor como pontos (Figura 16). Com este padrão, é possível ter-se um registo das direções e intensidades de todos os feixes de raios-X difratados por um cristal. (33). Os feixes difratados são caracterizados por uma amplitude  $|F_{hkl}|$  (relacionada com o número de átomos) e uma fase  $\alpha_{hkl}$  (derivada da posição do átomo dentro da célula unitária) (33).

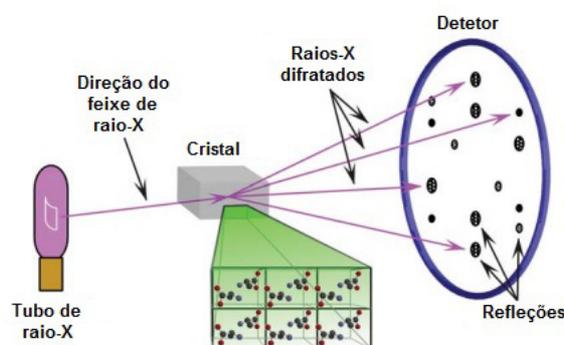


Figura 16: Ilustração da recolha de dados de cristalografia de raios-X.

Com a incidência de um feixe de raios-X, o cristal difrata em vários feixes discretos, que cada um produz uma mancha distinta (reflexão). Cada reflexão presente no padrão de difração é caracterizada pelos Índices de Miller ( $hkl$ ) e pertencem ao espaço recíproco. As posições e intensidades destas reflexões contêm a informação necessária para determinar estruturas moleculares (38).

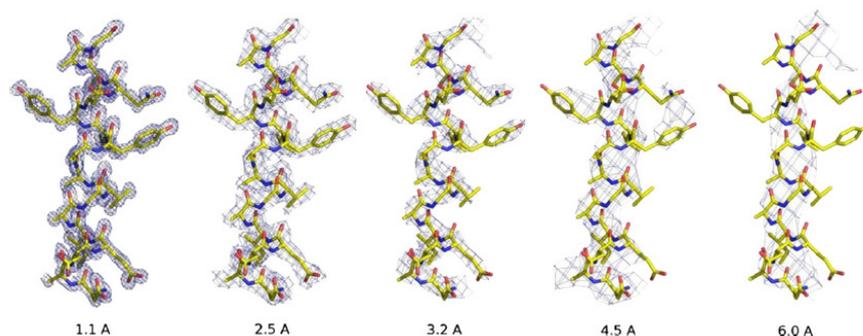
Com o uso de programas computacionais é possível realizar o processamento de dados a partir do conjunto de índices de Milles ( $hkl$ ) das imagens de difração recolhidas, com as suas intensidades associadas e estimativa dos parâmetros da célula unitária do cristal (61; 62). Em todo este processo é necessário executar várias etapas fundamentais, nomeadamente a análise de dados; observar corretamente os pontos de difração nas imagens; indexação; a análise inicial da qualidade da difração e dos parâmetros do detetor; o refinamento de parâmetros iniciais da célula unitária, a orientação e mosaicidade; determinação do grupo espacial mais provável; integração de todas as imagens, *scaling* e mergir a integridade das intensidades (63).

#### 4.4.2. Determinação de fases

No cálculo destas intensidades, perde-se a informação sobre as fases, conhecido como o "problema de fase" (64). Este problema precisa ser resolvido, pois as fases são cruciais para o cálculo da densidade eletrónica, que é definida por  $\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| \exp(i\alpha_{hkl}) \exp[-2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)]$  (64). Para a resolução do problema recorre-se a diferentes metodologias que permitem determinar as fases, nomeadamente o método de Substituição Molecular (MR - Molecular Replacement), a Substituição Isomórfica Múltipla (MIR - Multiple Isomorphous Replacement) ou Dispersão Anómala Múltipla ou Simples (MAD ou SAD – Multiple/Single Wavelength Anomalous Dispersion) (64).

#### 4.4.3. Refinamento e validação

Com a resolução do problema de fases, obtêm-se um mapa de densidade eletrónica, que é interpretado pelo cristalógrafo de modo a construir-se o modelo (65). Este primeiro modelo contém erros e necessita ser refinado para serem removidos. Deste modo, vão-se formar vários ciclos de otimização automática (ajuste de parâmetros matemáticos) e correções manuais, para minimizar as diferenças entre as amplitudes observadas  $|F_{obs}|$  e as amplitudes calculadas  $|F_{cal}|$ , e melhorar a definição do mapa de densidade eletrónica (Figura 17) (65).



**Figura 17: Visualização do mapa de densidade eletrónica a diferentes resoluções**

O aumento da resolução é proporcional ao aumento de detalhe da densidade eletrónica. Por exemplo, a 1,1 Å a densidade eletrónica encaixa perfeitamente no modelo construído incluindo, as cadeias laterais, o que já não acontece no caso da resolução mais baixa. A 6 Å de resolução a densidade eletrónica só é visível na cadeia principal da  $\alpha$ -hélice e as cadeias laterais não estão claramente definidas (33).

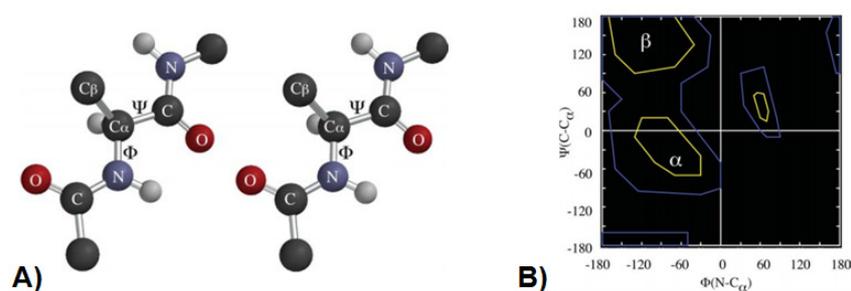
O progresso de refinamento é monitorizado por diversos parâmetros estatísticos. A resolução (Å) determina o nível de detalhe do mapa de densidade eletrônica e a *Completeness* está relacionada com a relação entre as reflexões medidas e o número total de reflexões previstas. Este parâmetro deve ser o mais alto possível (geralmente com o objetivo de 100 % (33)). Em relação à redundância (ou multiplicidade), é calculada pela razão entre o número total de reflexões medidas e o número de reflexões únicas presentes. Este cálculo dá o número médio de medições independentes para cada reflexão. No que diz respeito à relação sinal/ruído ( $I/\sigma(I)$ ), indica o número de vezes que foram medidas as acima do ruído (33). Um outro parâmetro de avaliação é o  $R_{merge}$ , também conhecido como  $R_{sym}$ , que mede o acordo entre as múltiplas observações independentes da mesma reflexão (33). Um bom conjunto de dados deve apresentar um  $R_{merge}$  baixo (valores altos podem indicar uma qualidade de dados sub-ótimo ou problemas com o processamento de dados). Na camada de resolução mais alta,  $R_{merge}$  pode ser tão alta quanto 30-40 %, embora valores na ordem de 60-70 % sejam ainda razoáveis para grupos de espaço de alta simetria (33).

Relativamente ao fator  $R$ , ou  $R_{work}$  é o mais importante na avaliação da qualidade do refinamento. Este parâmetro reflete a concordância entre o modelo construído e os dados observados ( $R = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$ ) (65; 38). Ou seja, o fator  $R$  mede o grau entre as amplitudes observadas e deverá ter o menor valor possível. Caso o valor de  $R$  seja maior que 0,25, é indício que poderá existir erros importantes no modelo, pelo contrário se o valor de  $R$  for menor a 0,2 só deverão existir erros locais (36).

Nesta etapa da validação do modelo, também é importante ser analisado o  $R_{free}$ . Este é calculado de forma análoga ao fator  $R_{work}$ , mas são selecionadas apenas 5-10 % das reflexões não utilizadas no processo de refinamento. Deve-se fazer uma análise comparativa entre este parâmetro e o fator  $R$ , em que a diferença entre eles não deverá exceder os 5 %. Deste modo, também é possível avaliar a concordância entre o modelo calculado e os dados observados (65; 66). Também para a detecção de erros no modelo é necessário ter em conta os valores do fator  $B$ , que variam entre  $\sim 2 \text{ \AA}^2$  e  $\sim 100 \text{ \AA}^2$  (38). Com o fator  $B$  (parâmetro de deslocamento) é possível ter conhecimento da oscilação dinâmica de um átomo numa dada posição (66).

Durante o refinamento também se deve analisar os valores de RMSD (*Root-mean-square deviation*). Este parâmetro permite avaliar os desvios dos parâmetros geométricos do modelo referentes a comprimentos e ângulos de ligação e conformações

do modelo. Para um modelo estar bem refinado, deve ter valores de RMSD de aproximadamente 0,02 Å para comprimentos de ligação, e para os ângulos de ligação deve ter valores próximos de 4° (38; 65). Por último, para analisar e validar o modelo do ponto de vista estereoquímico, recorre-se ao Ramachandran (Figura 18). Este diagrama permite verificar todas as conformações dos ângulos diedros em torno do C $\alpha$ ,  $\psi$  e  $\phi$  (Figura 18) nos aminoácidos, que contribuem para a conformação da estrutura da proteína (65). Algumas conformações não são possíveis devido a impedimentos estereoquímicos (por exemplo, por coalescência das nuvens eletrónicas dos átomos de valência).



**Figura 18: Exemplo dos ângulos  $\phi$  e  $\psi$  na ligação peptídica e diagrama de Ramachandran.**

A) Os ângulos formados entre a ligação do azoto (N) ao do C $\alpha$  ( $\phi$ ) e a ligação entre o carbono (C) e C $\alpha$  ( $\psi$ ) são variáveis. Os ângulos  $\phi$  e  $\psi$  constituem graus de liberdade que permitem que a cadeia principal se enrole, determinam a conformação da estrutura da proteína.

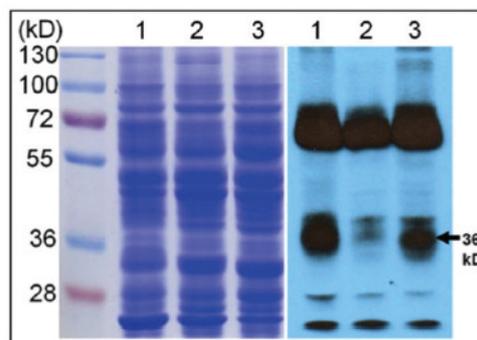
B) Através do diagrama de Ramachandran, é possível visualizar todas as combinações possíveis dos ângulos  $\phi$  e  $\psi$  nos aminoácidos de um polipeptídeo, e que contribuem para a conformação das estruturas das proteínas. Neste diagrama estão identificadas as letras  $\alpha$  e  $\beta$ , que correspondem à conformação dos ângulos na hélice  $\alpha$  e na folha  $\beta$  de resíduos na estrutura. Embora as diferenças sejam relativamente pequenas, as formas das regiões permitidas são ligeiramente diferentes para cada um dos 20 aminoácidos comuns (38).

## 5. Detalhes experimentais

Este projeto foi realizado em colaboração com o laboratório da Professora Doutora Christiane Dahl da Universidade de Bona (Alemanha). A proteína foi produzida nesse laboratório e enviada para o laboratório de Cristalografia de Proteínas Membranares (Laboratório Archer), para cristalização e análise estrutural.

O protocolo de expressão e purificação encontra-se descrito em Lui *et. al* (4). Em suma, o gene da TsdA de *C. jejuni* que codifica a proteína (sem inclusão do péptido-sinal), foi amplificado e clonado. O gene foi expresso recombinantemente em *Escherichia (E.) coli* BL21 (DE3). Mutações pontuais (C138G, K252G, N254G e M255G), foram introduzidas por extensão de sobreposição, recorrendo à técnica do PCR (4).

Colónias individuais de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pET-N-Strep-TsdACj ou um dos plasmídeos de expressão das variantes da TsdA em adição ao plasmídeo pEC86 (para promover a síntese do citocromo) (4), foram inoculados em meio Luria Broth (LB) com ampicilina e clorofenicol, seguida de uma incubação a 37 °C. Todas os variantes da TsdA foram purificadas por cromatografia de afinidade com cauda de Strep-Tactina, numa coluna StrepTrap HP de 5 ml (GE Healthcare), seguida de uma cromatografia de filtração em gel numa coluna HiLoad 16/60 Superdex 75 pg (GE Healthcare) (4). A proteína foi armazenada em tampão BisTris 20 mM, pH 6,5 e 0,5 mM TCEP, a -80 ° C. Determinou-se a concentração de proteína purificada recorrendo-se ao BCA-Kitde Pierce (Rockford, USA). A pureza da proteína obtida foi avaliada através da técnica de SDS/PAGE, como descrita em Dahl *et. al* (67). Os hemos foram detectados em géis de acrilamida recorrendo à coloração de *Coomassie* (Figura 19). O teor hémico de cada preparação foi determinado pelo método de hemocromo de piridina (4).



**Figura 19: Imagem do Gel de Tricina-SDS-PAGE a oito por cento**, adaptado de (4). Está indicado o peso molecular da proteína TsdA\_Cj, 36kDa.

## 5.1. Materiais e reagentes

Tabela 5: Reagentes e Materiais que foram utilizados no decorrer deste projeto.

| Reagentes  | Material  |
|--|---|
| - Ácido Málico ( <i>Molecular Dimensions</i> )   | - Balança analítica (KERN)  |
| - Borato de sódio ( <i>Molecular Dimensions</i> )  | - <i>Cartesian robot dispensing</i> (Mini-Bee, Genomic Solutions) |
| - Citrato de sódio ( <i>Hampton Research</i> )   | - <i>CrysChem Plates</i> ( <i>Hampton Research</i> )              |
| - Cloreto de Amónio ( <i>Molecular Dimensions</i> )  | - Estereomicroscópio Leica MZ16                                   |
| - CryoMix2 do CryoProtX ( <i>Molecular Dimensions</i> )  | - Medidor de pH <i>Sartorius</i>                                  |
| - Tampão fosfato/citrato ( <i>Molecular Dimensions</i> )   | - <i>Mount loop</i> (MiTeGen)                                     |
| - Imidazol ( <i>Molecular Dimensions</i> )   | - Placas de 96 poços de fundo plano ( <i>Greiner Bio-One</i> )    |
| - PEG 400 (50% (v / v) ( <i>Molecular Dimensions</i> )   |   |
| -PEG 600 (100% (v / v) - <i>Molecular Dimensions</i> )   |   |
| - PEG 3350 (50% (v / v) ( <i>Molecular Dimensions</i> )  |   |
| -PEG 1000 (50% (v / v) - <i>Molecular Dimensions</i> )   |   |
| -PEG 4000 (50% (v / v) - <i>Molecular Dimensions</i> )   |   |
| - <i>Screens</i> comerciais de cristalização: <i>Stura Footprint Combination</i> ( <i>Molecular Dimensions</i> ) |   |
| - <i>Screens</i> comerciais de cristalização: <i>JCSG-Plus™</i> (código: MD1-37) ( <i>Molecular Dimensions</i> ) |   |
| - Sulfato de Lítio ( <i>Molecular Dimensions</i> )   |   |
| - Tris- Ácido clorídrico, > 99% de pureza ( <i>Sigma-Aldrich</i> )   |   |

## 5.2. Ensaio de cristalização

O processo de cristalização pode ser dividido em duas etapas fundamentais, o *screening* e a fase de otimização (68). Como ponto de partida, utilizaram-se *sparse matrix screens* comerciais e solução da proteína pura, com recurso a um *robot* de nano-cristalização e efetuou-se um *screening* inicial, fazendo-se um rastreio de aproximadamente 200 condições de cristalização, com uma quantidade de 24  $\mu\text{L}$  proteína TsdA\_Cj. O *screening* completo foi realizado para a *wild type* e os quatro mutantes de resíduos específicos da TdsA com diferentes concentrações (Tabela 6).

Tabela 6: Concentrações do cinco variantes da TsdA\_Cj em estudo.

| Variantes da TdsA em estudo | Concentração (mg/mL) | Tampão                              |
|-----------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| TsdA_Cj wild type           | 5,6                  | 20 mM Bis-Tris pH 6,5 e 0,5 mM TCEP |
| TsdA_Cj C138G               | 3,3                  |                                     |
| TsdA_Cj K252G               | 3,0                  |                                     |
| TsdA_Cj N254G               | 7,5                  |                                     |
| TsdA_Cj M255G               | 5,0                  |                                     |

Primeiramente foram preparadas amostras para um *screen* inicial, que é um passo muito importante na triagem da cristalização. Realizou-se *screening* das condições de cristalização de amostras puras da enzima TdsA da *C. jejuni*, num ambiente climatizado (aproximadamente 20 °C). Recorreu-se ao método de difusão de vapor em gota assente num sistema de *Cartesian robot dispensing* (Mini-Bee, Genomic Solutions). Utilizaram-se 2 *screens* comerciais de cristalização, *Stura Footprint* (Tabela 15 e Tabela 16 em anexo) e JCSG-Plus pela *Molecular Dimensions* (Tabela 17 em anexo) (69; 70), em placas de 96 poços de fundo plano (Greiner Bio-One). O reservatório tem um volume de 40  $\mu\text{L}$  das soluções precipitantes e as gotas 200 nL (rácio 1:1 de proteína e de solução precipitante). Obtiveram-se cerca de 200 condições de cristalização e utilizou-se, na sua maioria, como agente precipitante o polietileno glicol (PEG) com massas molares diferentes (600-8000), com variados pH e tampões.

Com os *screenings* concluídos, o segundo objetivo foi otimizar as condições de cristalização onde se obtiveram *hits* iniciais – observação de material cristalino nas gotas. Neste processo de otimização, recorreu-se à informação derivada das experiências do *screening*, com a finalidade de se obter cristais com boa qualidade de

difração (68). São alteradas variáveis ambientais (como a temperatura) e as variáveis químicas (tipo e concentração de produtos químicos e o pH da solução) (68). Recorreu-se a duas técnicas baseadas no princípio da difusão de vapor (*hanging drop* e *sitting drop*). Foram feitos ensaios de otimização também às variantes da enzima TsdA com as concentrações indicadas na Figura 5, e realizadas algumas em condições comuns (Tabela 7).

Tabela 7: Condições dos ensaios de cristalização dos cinco variantes da enzima TsdA\_Cj.

|  |  |
|--|--|
| <b>Composição do tampão de proteína:</b> | 20 mM Bis-Tris pH 6,5, com 0,5 mM TCEP           |
| <b>Temperatura (°C)</b>                  | 4, ~20, 30                                       |
| <b>Caixas de cristalização</b>           | <i>Crys Chem Plates</i>                          |
| <b>Métodos de cristalização</b>          | Difusão de vapor (gota assente ou gota suspense) |

Prepararam-se as soluções de cristalização de acordo com os resultados obtidos no *screening* inicial para a execução dos ensaios de otimização. Descongelou-se as amostras que estavam armazenadas a -80 °C e foram feitas gotas da mistura (proteína + precipitante), nas placas *Crys Chem* e utilizaram-se dois métodos denominados de gota suspensa e gota assente, técnica de difusão de vapor. Também se recorreu ao método de *streak seeding*. Concluídos os testes, examinaram-se as gotas e registaram-se as alterações que ocorreram durante este processo (por exemplo, gotas com precipitado e presença de microcristais), até se obterem bons cristais avermelhados, devido à presença do ferro hémico.

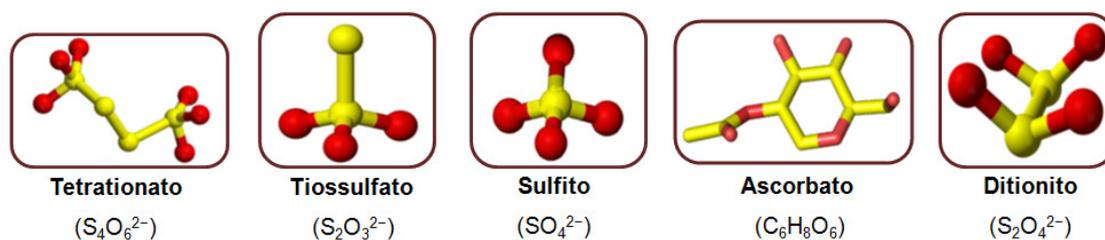
### 5.3. Crio-cristalografia, incubação, e recolha de dados

Para manter a integridade dos cristais até serem difratados, os mesmos são congelados e mantidos em azoto líquido (-174,15 °C). A técnica de crio-cristalografia é imprescindível na recolha de dados de difração, para minimizar os danos causados no cristal pelo feixe de raios-X, sendo o cristal mantido em condições criogénicas, utilizando-se uma corrente de azoto líquido (57). São necessárias duas características principais para uma solução crio-protetora. Em primeiro lugar, a solução crio-protetora

deve vitrificar durante o arrefecimento instantâneo sem a formação de gelo. Por outro lado, a solução não deve danificar nem degradar o cristal (57). A rutura da ordem interna do cristal e interferências no padrão de difração da proteína podem ser evitadas, já que são danos muitas vezes causados pela formação de gelo (57). Nesta técnica é necessário escolher um agente crio-protetor, que minimiza a dispersão dos raios-X pelas moléculas de água, uma vez que impede a formação de cristais de gelo na superfície do cristal (57). Estes agentes reduzem as taxas de congelamento necessárias para conseguir a vitrificação do solvente, principalmente pela supressão da nucleação do gelo (57).

É necessário decidir qual o agente crio-protetor a ser utilizado, primeiramente tem que se ter em consideração os componentes da solução de cristalização, de forma a manter a integridade do cristal (57). Em algumas situações os agentes crio-protetores já estão presentes em baixa concentração, esta pode muitas vezes ser aumentada sem danificar o cristal ou dar-lhe um choque osmótico muito grande (57). Embora, certos componentes das soluções de cristalização já sejam agentes crio-protetores, como alguns PEGs (ver outros exemplos na Tabela 14 em anexo), estes podem estar a concentrações abaixo do seu potencial de crio-proteção, sendo necessário testar outros agentes como 2-metil-2,4-pentanodiol; sacarose; glicerol; etilenoglicol; PEG 400 e óleo de perfluoropoliéter (57). Os cristais obtidos na gota de crescimento são transferidos para solução crio-protetora de 2  $\mu$ L, ocorrendo uma incubação de alguns segundos, de forma a substituir a solução superficial do cristal pela solução com o agente crio-protetor. Utilizamos a técnica de *soaking*, para transferir o cristal da sua gota de crescimento para a solução crio-protetora. Na execução deste processo, utilizaram-se uns *loops* que contêm pequenas alças de nylon 0,05-2,0 mm de diâmetro (71).

As diversas variantes da TsdA em estudo foram incubadas com ligandos e cristalizadas em condições semelhantes à TsdA *wild type*. Os ligandos utilizados (Figura 20) tiveram tempos de incubação de 2-10 minutos e concentrações entre 0,1-1 mM. Posteriormente os cristais foram congelados em azoto líquido, e de seguida foram analisados por radiação de raios-X em sincrotrões nas linhas ID30A (ESRF - Grenoble, França) e I04 (DLS – Didcot, Oxford, UK), com comprimentos de onda de 0,967 Å e 0,9795 Å, respetivamente.



**Figura 20:** Ligandos utilizados nas incubações dos cinco variantes da TsdA\_Cj em estudo. (Carbono avermelho e Enxofre a amarelo).

Após obtenção de conjuntos de dados de difração dos raios-X dos referidos cristais, estes foram indexados e integrados com o programa *XDS* (72), determinou-se o grupo espacial com o programa *POINTLESS* (61) e escalaram-se os dados com o programa *AIMLESS* (61). Todos estes programas foram utilizados dentro do programa *autoPROC* (63). Uma pequena fração de reflexões do conjunto de dados (5-10 %) são reservadas para cálculo de  $R_{\text{free}}$ , não sendo utilizadas durante o processo de refinamento, mas como um índice independente deste processo, para avaliar o possível *overmodelling* dos dados (73). Normalmente espera-se que o  $R_{\text{free}}$  seja mais alto que o  $R_{\text{factor}}$  e se a diferença entre os dois foi maior que 12 %, é necessário uma análise detalhada ao modelo refinado (73).

#### 5.4. Determinação das estruturas e refinamento

Na resolução da estrutura dos variantes da TsdA\_Cj, determinou-se as fases pelo método de substituição molecular, utilizando o programa *PHASER* (74) como implementado num conjunto de programas *PHENIX* (75). Foi utilizado como modelo a enzima TsdA de *A. vinosum* “as isolated” (PDB ID 4WQ-7) sem moléculas de solvente nem cofactores. Combinando fase e as intensidades pode-se calcular mapas de densidade eletrónica ( $2F_{\text{observado}}-F_{\text{calculado}}$  e  $F_{\text{observado}}-F_{\text{calculado}}$ ) que permitem a construção de um modelo da estrutura tridimensional da proteína (62). Posteriormente, as estruturas foram submetidas a ciclos de refinamento com *phenix.refine* (41) intercalados com ciclos de construção e ajuste do modelo com o programa *COOT* (76). Após refinados os

modelos foram validados com o programa *MolProbity* (75), como implementado em *PHENIX* (75).

Como os cristais de cada variante de TsdA eram isomorfos entre si, o processo de obtenção de fases das variantes de TsdA após determinação da primeira estrutura, foi com refinamento de corpo rígido com o programa *BUSTER-TNT* (77). Há uma eliminação dos grupos prostéticos e dos resíduos de coordenação do modelo utilizado neste refinamento e do programa macro “*Missing Atoms*”, juntamente com “-L” *flag*, para tornar clara densidade de elétrons nessas regiões (2). Após obtenção do modelo estrutural viável e coerente com os dados experimentais, realizou-se ciclos de otimização automática, correções manuais (2), até determinar-se e validar-se a estrutura da proteína.

## 6. Resultados

### 6.1. Ensaio de cristalização dos cinco variantes em estudo

#### 6.1.1. Resultados do *screening* inicial de cristalização da *wild type* e dos quatro mutantes de TsdA\_Cj

Nesta primeira abordagem utilizaram-se dois *screenings* comerciais (*Stura FootPrint* e *JCSG+ Molecular Dimensions*) para cristalização da *wild type* e os quatro mutantes em estudo da TsdA\_Cj e proporções da gota, pelo método de difusão de vapor em *sitting drop* a (100+100) nL de proteína/reservatório, a uma temperatura de aproximadamente 20 °C. Após observação das gotas, passadas 24 a 72 h, surgiram vários cristais em diversas condições de cristalização com diferentes precipitantes (como agentes de cristalização, por exemplo PEG 1000, 2-propanol, citrato de sódio, sulfato de amônio, entre outros). Destas condições foram escolhidas duas para cada variante, baseando-se no tipo de precipitante e o pH, uma vez, que se verificou diferentes tonalidades (principalmente no caso da *wild type*, Tabela 8 e o mutante K252G, Tabela 9), o que indica diferentes estados de oxidação consoante o pH, despertando imenso interesse nesta fase inicial do projeto.

Nos ensaios realizados aos variantes da TsdA\_Cj (Tabela 8, Tabela 9 e Tabela 10) resultaram alguns cristais vermelhos, alguns múltiplos, com tamanhos e formas distintas em duas condições, onde os agentes precipitantes foram os PEG 600, PEG 1000, PEG 3350, PEG 4000 e citrato de sódio, em concentrações diferentes. Ocorreu uma discrepância de tamanhos (variando entre 0,01 e 0,1 mm na sua dimensão mais comprida) e de formas dos cristais, também influenciada pelas condições de cristalização. Estes resultados foram o ponto de partida para a realização de ensaios manuais com a finalidade de otimizar as condições iniciais para obtenção de bons cristais.

**Tabela 8: Resultados obtidos e condições de cristalização do *screening* inicial da *wild type* e do mutante C138G de TsdA\_Cj.**

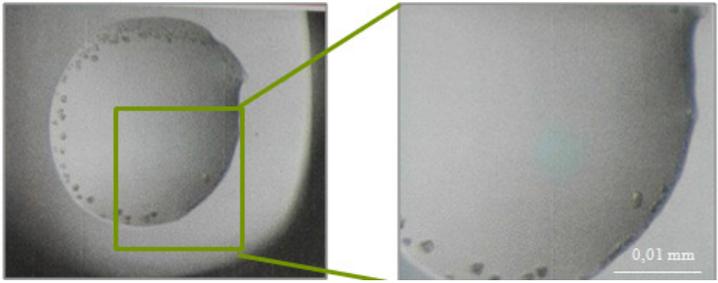
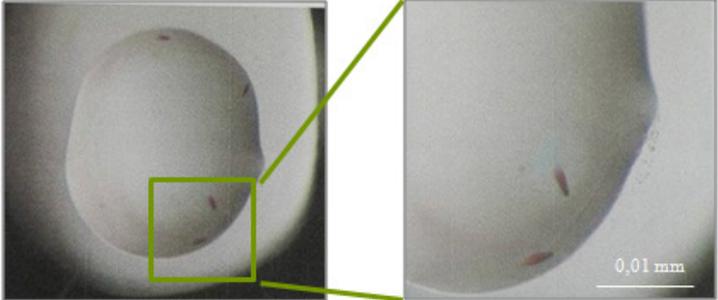
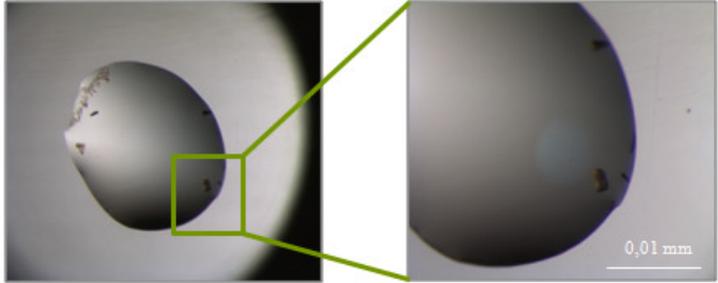
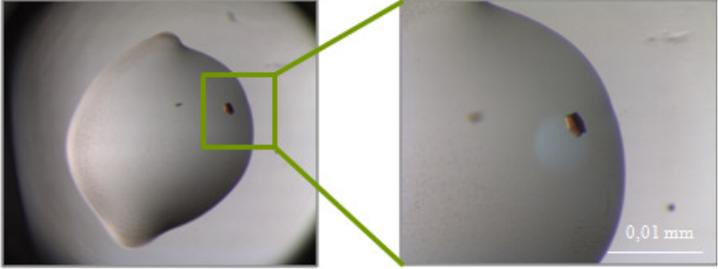
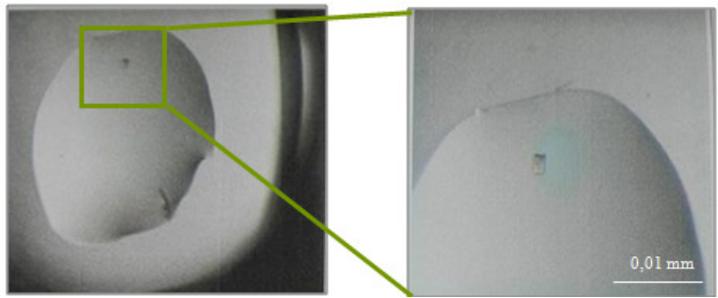
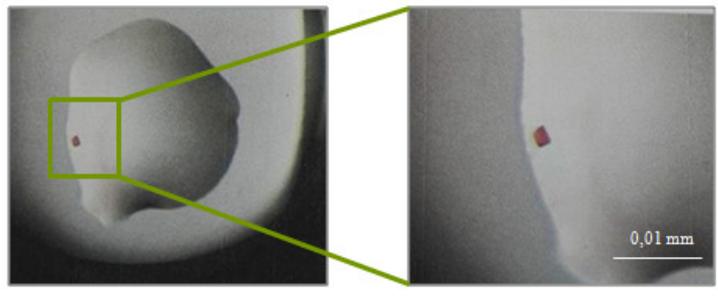
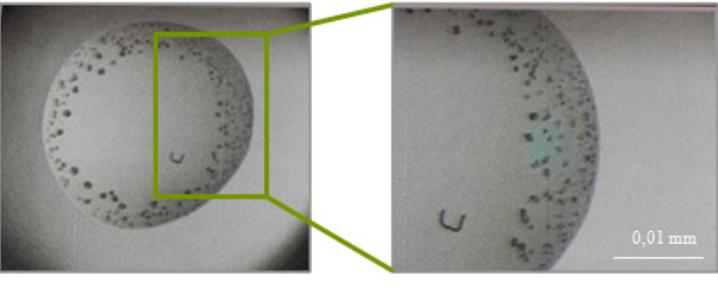
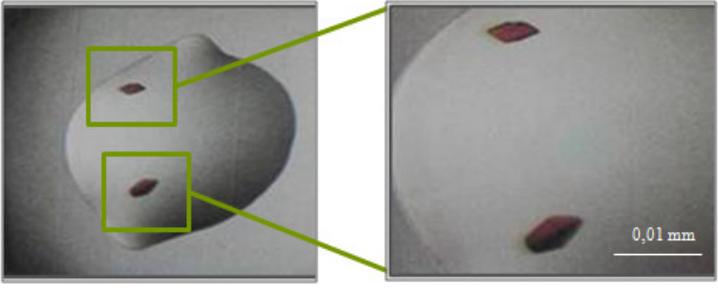
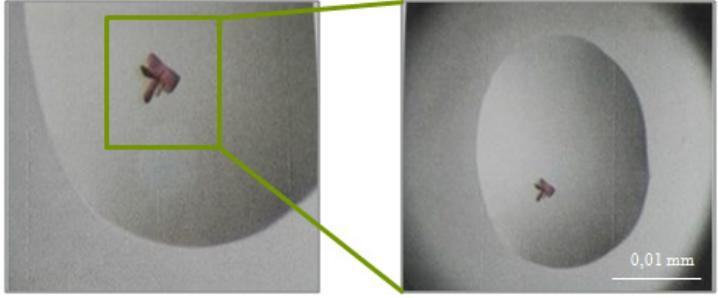
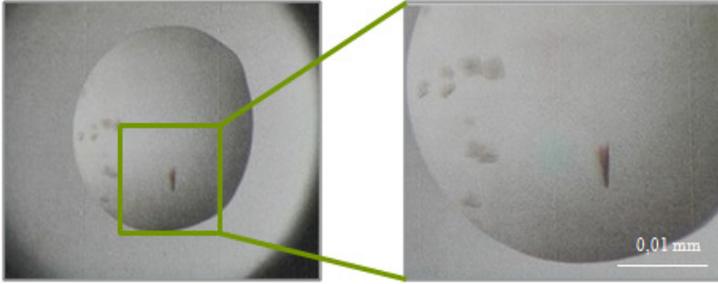
| <b>Screening inicial da <i>wild type</i> de TsdA_Cj</b>                             |  |
|---|--|
|    | <b>Screen: JCSG (M. Dimens.)</b>   |
|   | 20 % PEG 1000<br>0,1 M citrato/fosfato, pH 4,2<br>0,2 M sulfato de lítio |
|   | <b>Screen: Stura FootPrint (M. Dimens)</b>                               |
|   | 1,5 M citrato de sódio tribásico<br>0,01M borato de sódio, pH 8,5        |
| <b>Screening inicial do mutante C138G de TsdA_Cj</b>                                |  |
|  | <b>Screen: JCSG (M. Dimens.)</b>   |
|   | 20% PEG 3350; 0,2 M cloreto de amónio                                    |
|  | <b>Screen: Stura FootPrint (M. Dimens.)</b>                              |
|   | 1,5 M citrato de sódio; 0,01 M borato de sódio<br>pH 8,5                 |

Tabela 9: Resultados obtidos e condições de cristalização do *screening* inicial dos mutantes K252G e N254G de TsdA\_Cj.

| <b>Screening inicial do mutante K252G de TsdA_Cj</b>                                |  |
|---|--|
|    | <b>Screen: JCSG (MD)</b>   |
|   | 20 % PEG 3350<br>0,2 M citrato de amónio dibásico, pH 5,25               |
|   | <b>Screen: Stura FootPrint (MD)</b>                                      |
|   | 1,5 M citrato de sódio tribásico<br>0,01 M boreto de sódio, pH 8,5       |
| <b>Screening inicial do mutante N254G de TsdA_Cj</b>                                |  |
|  | <b>Screen: JCSG (MD)</b>   |
|   | 20 % PEG 1000<br>0,1 M citrato/fosfato, pH 4,2<br>0,2 M sulfato de lítio |
|  | <b>Screen: Stura FootPrint (MD)</b>                                      |
|   | 33 % PEG 600<br>imidazol malato, pH 5,5                                  |

**Tabela 10: Resultados obtidos e condições de cristalização do *screening* inicial do mutante M255G de TsdA\_Cj.**

| <b>Screening inicial do mutante M255G de TsdA_Cj</b>                               |  |
|--|--|
|   | <b>Screen: Stura FootPrint (MD)</b>                                  |
|  | 15 % PEG 4000<br>0,2 M imidazol malato<br>pH 6,0                     |
|  | <b>Screen: Stura FootPrint (MD)</b>                                  |
|  | 25 % PEG 3350<br>0,1 M tampão Tris, pH 8,5<br>0,2 M sulfato de lítio |

### 6.1.2. Resultados da otimização manual da cristalização da *wild type* e dos quatro mutantes de TsdA\_Cj

Através dos resultados obtidos anteriormente (Tabela 8, Tabela 9 e Tabela 10), procedeu-se à otimização da cristalização de *wild type* e de quatro mutantes da enzima TsdA de *C.jejuni*. As condições iniciais foram alteradas, variando o pH, concentração de PEG e a concentração do sal, com o objetivo de melhorar a qualidade dos cristais, como descrito na Tabela 11. De seguida, examinou-se as gotas após a finalização dos ensaios de forma a facilitar o estudo do diagrama de fases do crescimento de cristais para cada variante. Todos os cristais obtidos, antes de serem congelados em azoto líquido, foram transferidos para uma solução crio-protetora (incubação de 2 a 10 minutos), com ou sem a presença de um ligando.

- **TsdA\_Cj. Wild Type (“as isolated”)**

Após vários ensaios realizados, verificou-se a formação de um cristal múltiplo (num período de aproximadamente 30 dias), de forma muito irregular, numa gota que continha 1,5 M citrato de sódio, 0,01 M borato de sódio pH 8,5 da solução original do *screen* de cristalização e o reservatório com 1,5 M citrato de sódio. Recorreu-se a esta solução, porque após várias tentativas de reprodução das condições de cristalização otidas nos ensaios *screening* (Tabela 8), não houve crescimento de nenhum cristal, apesar de ter-se variado a concentração do precipitante e o pH do sal. A explicação para esta situação, pode estar relacionada com os componentes dos reagentes da solução *screen* não serem iguais aos disponíveis no laboratório.

Como não se conseguiu obter mais nenhum cristal pelo método de difusão de vapor em gota assente ou gota suspensa, seguiu-se com os ensaios de cristalização. Para se tentar obter melhores cristais, decidiu-se recorrer a um outro método, *streak seeding*, a partir do cristal já obtido. Após 24 h obteve-se cristais com forma de pequenos “palitos” múltiplos, numa nova condição de cristalização que era 18 % (w/v) PEG 1000, 0,1 M fosfato/citrato pH 3,8; 0,2 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e proporção da gota (2 µL proteína + 1 µL de precipitante), como indicado na Tabela 11. Apesar de não serem cristais únicos, efetuou-se o estudo para a difração de raios-X, que foram transferidos para uma nova gota com a solução crio-protetora (indicada na Tabela 11). Na experiência de difração recorreu-se à radiação de sincrotrão na linha I04 (DLS – Didcot, Oxford, Uk), com um comprimento de onda de 0,98 Å, mas alguns cristais não apresentaram boa qualidade de difração, outros apresentaram um padrão de difração múltiplo, ou então difrataram mas

com uma baixa resolução. Deste modo, a *wild type* de TsdA ainda se encontra em fase de otimização do processo de cristalização.

- **TsdA\_Cj. Mutante C138G**

Para o mutante C138G da TsdA\_Cj também foram realizados vários ensaios de cristalização, que tiveram como ponto de partida as condições de cristalização *screen* indicadas na Tabela 8. Muitos cristais tiveram que ser testados em sincrotrão até que surgisse um com boa qualidade de difração. No entanto, cresceram alguns cristais com uma morfologia não muito definida, após 6 dias na condição de cristalização 25 % (v/v) PEG 3350, indicada na Tabela 11. Com estes cristais seguiu-se para experiências de crio-proteção, transferindo-se os cristais para uma nova gota de uma solução crio-protetora com 25,5 % (v/v) PEG 3350 suplementado com 5 % (v/v) PEG 400. Esta adição deu-se, porque baseado em resultados anteriores do projeto da TsdA\_Av, sabe-se que o PEG 3350 com uma concentração superior a 25 % (v/v) atua como um agente crio-protetor, e para tentar manter a integridade dos cristais, adicionou-se uma pequena quantidade de 5 % (v/v) PEG 400 e assim, a solução resulta perfeitamente como crio-protetora dos cristais. A informação de crio-proteção está resumida na Tabela 11, que indica este processo foi realizado com e sem a adição de excesso de tioissulfato, e com um tempo de incubação de cerca de 10 minutos.

Seguidamente foram recolhidos conjuntos de dados cristalográficos a um comprimento de onda de 0,98 Å, na linha I04 do sincrotrão Diamond Light Source (Didcot, Oxford, UK). Os cristais difrataram a 2,18 Å. Este mutante ainda se encontra em processo de otimização, para futuramente co-cristalizar este mutante da TsdA\_Cj com o substrato e produto, bem como obter a estrutura em diferentes estados redox. O que proporcionará informações valiosas sobre o mecanismo de reacção da enzima TsdA\_Cj.

- **TsdA\_Cj. Mutante K252G**

Foram realizados vários ensaios de otimização, na qual conseguiu-se obter cristais vermelhos, múltiplos e alguns em forma de “estrela” deste mutante, nas condições de 20 % (v/v) PEG 3350 e 0,2 M de citrato de amónio dibásico pH 4,8. Com estes resultados fizeram-se algumas alterações nomeadamente na concentração do precipitante, proporção da gota para variar a concentração da proteína e do precipitante e da temperatura (30, 20 e 4 °C). O fator temperatura pode influenciar o crescimento do

crystal, por alterar a solubilidade, a velocidade de difusão e facilitar ou dificultar os contatos entre as moléculas podendo até alterar a simetria interna do cristal obtido (78). Nas três temperaturas estudadas obtiveram-se diversos cristais (entre 2 a 4 dias), mas a 4 °C (nas soluções com 19 e 20 % (v/v) PEG 3350 e 0,2 M de citrato de amónio dibásico pH 4,8) cresceram com morfologia mais definida e dimensões de cerca de 20 µm.

Para manter a integridade dos cristais até à difração, alguns destes foram transferidos para uma solução crio-protetora com 25,5 % (v/v) PEG 3350 suplementado com 5 % (v/v) PEG 400, com um tempo de incubação de cerca de 5 minutos, como descrito na Tabela 11. Os restantes cristais foram também transferidos para a mesma solução crio-protetora, mas com a adição com um excesso de 10x de tioissulfato, tetracionato, ascorbato e sulfito, e tiveram tempos de incubação de 2-10 minutos. De seguida os cristais de TsdA foram analisados por radiação de sincrotrão nas linhas ID30A (ESRF - Grenoble, França), em que difrataram a 1,94 Å; 2,02 Å; 1,86 Å e 2,00 Å, respetivamente com um comprimento de onda de 0,98 Å. Posteriormente, os processos de refinamento, construção e validação dos modelos foram realizados.

- **TsdA\_Cj. Mutante N254G**

Após análise detalhada às diversas gotas no *screening* inicial (Tabela 9), escolheu-se duas condições de cristalização e procedeu-se às suas otimizações manuais. Alterou-se a concentração do precipitante e proporção da gota, variando a concentração inicial e final da proteína e do precipitante, pois altera a cinética de equilíbrio entre a gota e o reservatório (Tabela 11). Também se modificou a temperatura para 4 °C, para haver um crescimento lento e proporcionar a formação de um cristal com uma estrutura bem ordenada e de dimensões úteis à experiência de difracção em sincrotrão. Os cristais obtidos (em 2 a 5 dias) nas condições 19 e 20 % (w/v) PEG 3350, 0.20 M citrato de amónio dibásico pH 4.8, foram transferidos para uma solução crio-protetora com 38 % (w/v) PEG 600 (baseado em estudos anteriores ao projeto da TsdA\_Av, sabe-se que o PEG 600 é agente crio-protetor a uma concentração de 38 %), antes de serem congelados em azoto líquido. Este mutante foi analisado “as isolated”, e com adição excesso de tioissulfato, tertationato, ascorbato e ditionito, com incubações entre 2 a 10 minutos. De seguida, foram expostos a uma radiação de sincrotrão na linha ID30A (ESRF - Grenoble, França), em que difrataram a 1,78 e 1,64 Å, respetivamente, a um

comprimento de onda de 0,98 Å. Prosseguiu-se então para as fases de refinamento, construção e validação dos modelos.

- **TsdA\_Cj. Mutante M255G**

Para este mutante foram testadas as duas condições do *screen* que foram escolhidas para o decorrer do projeto, alterando também as concentrações dos precipitantes, o rácio das gotas e o pH do sal. Deste modo, conseguiu-se obter alguns cristais múltiplos (em um período de uma semana) nas soluções de cristalização com 20 e 25 % (w/v) PEG 3350; 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 8.5; 0.2 M sulfato de lítio (ver Tabela 11). Apesar de não terem boa forma e tamanho, estes foram também expostos a uma radiação de sincrotrão nas linhas I04 (DLS – Didcot, Oxford, UK), a um comprimento de onda de 0,98 Å. Este mutante foi incubado numa solução crio-protetora 25,5 % PEG 3350 suplementado com 5 % PEG 400, sem adição de ligando, com um tempo de incubação de 2 a 10 minutos. Os cristais apresentaram uma difração entre 2,13 e 2,8 Å, mas encontra-se em curso outras análises para determinar as fases. Também se está a tentar obter a estrutura em diferentes estados de oxidação-redução e em complexo com o seu substrato (tioissulfato) e produto (tetrionato). Por isso, o crescimento de cristais deste variante da TsdA ainda se encontra em fase de otimização, o que poderá conceder informações importantes sobre o mecanismo de reacção da enzima TsdA\_Cj.

Tabela 11: Condições de otimização da cristalização da *wild type* e dos quatro mutantes de TsdA\_Cj.

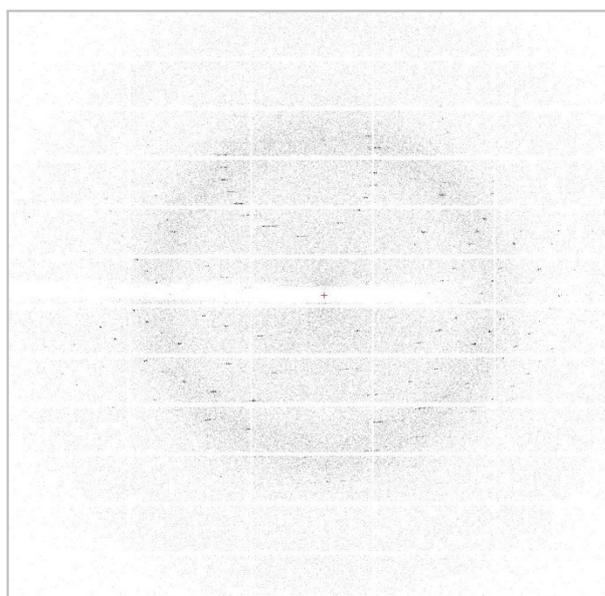
|   | Método   | Temperatura (°C) | Composição da solução do reservatório  | Volume do reservatório (µL) | Rácio da gota Proteína: precipitante pp (µL) Conc. Prot. (mg/ml) | Condição Crio-cristalização   | Soak  |
|---|--|------------------|--|-----------------------------|--|---|---|
| <b>TsdA_Cj. Wild Type</b> (“as isolated”) | <i>Streak seeding</i><br>(1,5 M citrato de sódio; 0,01 M borato de sódio pH 8,5 - Difusão de vapor a <i>Sitting-drop</i> ) | ~ 20             | 18 % (w/v) PEG 1000; 0,1 M fosfato/citrato pH 3,8; 0,2 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 500                         | 2 + 1  | 25 % PEG 3350; 0,1 M fosfato/citrato pH 3,8; 0,2 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                  | -   |
| <b>TsdA_Cj. Mutante C138G</b>             | Difusão de vapor a gota suspensa   | ~ 20             | 18 e 25% (w/v) PEG 3350, 0.2 M NH <sub>4</sub> Cl pH 6.2                                 | 500                         | 2 + 1  | Adicionou-se à gota 25,5 % PEG 3350; 0,2 M NH <sub>4</sub> Cl pH 6,2 e 5 % PEG 400 (incubação entre 2 a 10 minutos) | 1 mM Tiossulfato  |
| <b>TsdA_Cj. Mutante K252G</b>             | Difusão de vapor a gota suspensa   | 4                | 19 e 20 % (w/v) PEG 3350, 0.20 M Citrato de amónio dibásico pH 4.8                       | 500                         | 1 + 1  | 25,5 % PEG 3350; 0,2 M citrato de amónio dibásico pH 3,0; 5 % PEG 400 (incubação entre 2 a 10 minutos)              | 1 mM Tiossulfato, 1 mM tetrionato, 1 mM bisulfite, 1 mM ascorbato |
| <b>TsdA_Cj. Mutante N254G</b>             | Difusão de vapor a gota suspensa   | ~ 20             | 30 % e 33 % (w/v) PEG 600; 0,2 M imidazol/malato pH 6,0                                  | 500                         | 1 + 1  | 38 % PEG 600; 0,2 M imidazol/malato pH6,0 (incubação entre 2 a 10 minutos)  | 1 e 0,1 mM Tiossulfato, 1 mM ascorbato, 1 mM ditonito             |
| <b>TsdA_Cj. Mutante M255G</b>             | Difusão de vapor a gota suspensa   | ~ 20             | 20 e 25 % (w/v) PEG 3350; 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 8.5; 0.2 M sulfato de lítio            | 500                         | 2 + 1  | 25 % (w/v) PEG 3350; 0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 0,2 M Tris-HCl pH 8,0 e 4 % PEG 400 (incubação entre 2 a 10 minutos)    | -   |



## 6.2. Dados obtidos da difração de raios-X, refinamento e resolução da estrutura

Foram realizados ensaios de cristalização às cinco variantes da TsdA\_Cj e recolheram-se dados de difração em dois sincrotrões Diamond Light Source (DLS – Didcot, Oxfordshire, Inglaterra) e European Synchrotron Radiation Facility (ESRF - Grenoble, França), tendo-se concluído a caracterização estrutural de duas dessas em três diferentes condições. Utilizando-se dados recolhidos na linha ID30-A do ESRF obtiveram-se as estruturas da TsdA\_Cj do mutante K252G – *soak* com tiosulfato e K252G – *soak* com ascorbato e do mutante N254G (“as isolated”).

Com o uso de programas computacionais referidos anteriormente, as imagens de difração recolhidas (ver exemplo de um padrão de difração recolhido na Figura 21) foram indexadas de forma a determinar os índices de Miller ( $hkl$ ), as intensidades ( $I_{hkl}$ ) e respetivos erros associados ( $\sigma_{hkl}$ ) (61). Foi igualmente possível caracterizar a Célula unitária através da determinação das constantes  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e dos ângulos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  para cada cristal (37). Na Tabela 12, encontram-se alguns parâmetros estatísticos úteis para proceder a uma avaliação da qualidade dos dados, juntamente com a determinação da célula unitária e do grupo espacial. Posteriormente realizaram-se vários ciclos de refinamento, construção do modelo e sucessiva validação, para convergir os modelos para os três variantes em estudo, e subsequente determinação da estrutura tridimensional dos mesmos.



**Figura 21: Padrão de difracção de um cristal da TsdA\_Cj obtido a aproximadamente 20 °C.**

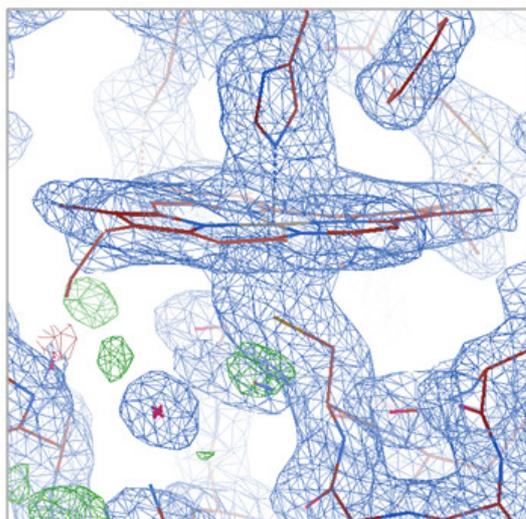
A experiência de difracção foi efectuada na linha de radiação de sincrotrão na linha ID30A (ESRF - Grenoble, França ) e o conjunto de dados recolhido tem uma resolução máxima de 2,02 Å.

Tabela 12: Estatísticas e refinamento dos dados recolhidos das estruturas da TsdA de *C. jejuni*.

| <b>Parâmetros</b>                                | <b>Mutante K252G<br/>Tiosulfato <i>soak</i><br/>(TsdA_K252G_S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)</b> | <b>Mutante K252G<br/>Ascorbato <i>soak</i><br/>(TsdA_K252G_C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>)</b> | <b>Mutante N254G<br/>(TsdA_N254G)</b>   |
|--|---|---|---|
| <b>Sincrotrão</b>                                | <b>European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble</b>                             |   |   |
| <b>Beamline</b>                                  | <b>ID30A</b>  |   |   |
| <b>Comprimento de onda (Å)</b>                   | 0,967   |   |   |
| <b>Resolução (Å)<sup>a</sup></b>                 | 63,29 – 1,82<br>(1,88 – 1,82)   | 77,85 – 1,86<br>(1,87 – 1,86)   | 49,87 – 1,78<br>(1,79 – 1,78)   |
| <b>Grupo espacial</b>                            | C 1 2 1   |   |   |
| <b>Célula unitária:</b>                          |   |   |   |
| <i>a, b, c</i> (Å)                               | 195,21; 74,26; 103,32   | 195,03; 74,25; 103,15   | 100,91; 58,38; 56,42  |
| <i>α, β, γ</i> (°)                               | 90; 101,80; 90  | 90; 101, 97; 90   | 90; 108,10; 90  |
| <b>Número total de reflexões</b>                 | 519234 (5097)   | 490139 (4552)   | 124444 (913)  |
| <b>Número total de reflexões únicas</b>          | 130499 (12604)  | 118701 (1068)   | 29676 (263)   |
| <b>Multiplicidade</b>                            | 4,0 (4,0)   | 4,1 (4,3)   | 4,2 (3,5)   |
| <b>Completeness (%)</b>                          | 99,9 (96,7)   | 98 (87,3)   | 99,3 (92,6)   |
| <b>&lt;I/σ(I)&gt;</b>                            | 13,1 (2,0)  | 9,5 (1,3)   | 8,8 (2,1)   |
| <b>Wilson B-factor (Å<sup>2</sup>)</b>           | 24,90   | 31,36   | 23,37   |
| <b>R<sub>merge</sub> (%)</b>                     | 6,9 (64,6)  | 6,8 (79,9)  | 8,0 (42,7)  |
| <b>R<sub>pim</sub> (%)</b>                       | 3,9 (36,7)  | 4,2 (50,3)  | 4,8 (29,3)  |
| <b>CC<sub>1/2</sub> (%)</b>                      | 99,9 (65,2)   | 99,8 (54,6)   | 99,7 (46,0)   |
| <b>Refinamento</b>                               |   |   |   |
| <b>R<sub>work</sub> (%)</b>                      | 17,4 (29)   | 17,9 (38)   | 17,4 (38)   |
| <b>R<sub>free</sub> (%)</b>                      | 20,2 (32)   | 20,5 (38)   | 20,6 (41)   |
| <b>Número de átomos que não sejam hidrogénio</b> | 10528   | 10204   | 2644  |
| <b>Número de átomos</b>                          |   |   |   |
| <b>Macromoléculas</b>                            | 9520  | 9520  | 2374  |
| <b>Ligandos</b>                                  | 390   | 357   | 86  |
| <b>Solvente</b>                                  | 618   | 327   | 184   |
| <b>Ligações r.m.s.d. (Å)</b>                     | 0,01  | 0,02  | 0,02  |
| <b>Ângulos r.m.s.d. (°)</b>                      | 1,22  | 1,72  | 1,78  |
| <b>Resíduos</b>                                  |   |   |   |
| <b>Cadeia A</b>                                  | Ser <sup>15</sup> – Met <sup>321</sup>  | Ser <sup>15</sup> – Met <sup>321</sup>  | Gly <sup>14</sup> – Ala <sup>255</sup><br>Asp <sup>261</sup> – Met <sup>321</sup> |
| <b>Cadeia B</b>                                  | Ser <sup>15</sup> – Met <sup>321</sup>  | Ser <sup>15</sup> – Met <sup>321</sup>  |   |
| <b>Cadeia C</b>                                  | Ser <sup>15</sup> – Tyr <sup>324</sup>  | Ser <sup>15</sup> – Tyr <sup>324</sup>  |   |
| <b>Cadeia D</b>                                  | Ser <sup>15</sup> – Thr <sup>319</sup>  | Ser <sup>15</sup> – Met <sup>321</sup>  |   |
| <b>Ramachandran plot</b>                         |   |   |   |
| <b>Favorecido (%)</b>                            | 97,2  | 97,63   | 97,97   |
| <b>Permitido (%)</b>                             | 2,64  | 2,37  | 2,03  |
| <b>Não permitido (%)</b>                         | 0,17  | 0,00  | 0,00  |
| <b>Rotâmeros não permitidos (%)</b>              | 0,40  | 0,20  | 1,98  |
| <b>Clashscore</b>                                | 2,31  | 0,67  | 2,48  |
| <b>B-factor médio (Å<sup>2</sup>)</b>            | 34,75   | 48,35   | 37,31   |
| <b>Macromoléculas</b>                            | 34,93   | 48,87   | 37,30   |
| <b>Ligandos / iões</b>                           | 30,44   | 41,78   | 28,73   |

<sup>a</sup> – dados em parênteses correspondem à camada de resolução mais alta, r.m.s.d.- root mean square deviation

O processo de refinamento consistiu na minimização da discordância entre os fatores de estrutura observados ( $F_{\text{obs}}$  – dados experimentais da difração de raios-X) e os fatores de estrutura calculados ( $F_{\text{cal}}$  – não experimentais, calculados a partir do modelo construído), realizando pequenas modificações nos parâmetros atômicos (79). Este passo foi intercalado com um ajuste do modelo à densidade calculada, respeitando a posição espacial da cadeia principal, a sequência de aminoácidos e as cadeias laterais (Figura 22). Esta etapa é crucial dependendo dos conhecimentos e interpretação da densidade electrónica pelo cristalógrafo) (79). É fundamental neste ciclo iterativo de construção do modelo e refiamento, a validação dos resultados obtidos, pois podem surgir erros que interferem na qualidade e fiabilidade das estruturas modeladas. Os critérios analisados foram a coerência química na estrutura, o conjunto dos dados, a precisão nas distâncias e ângulos de ligação, a qualidade dos índices estatísticos, a vibração térmica dos átomos, as interações intermoleculares, a desordem no cristal e espaço tridimensional cristalino completo (79), recorrendo, nomeadamente, ao programa *MolProbability* (75).



**Figura 22:** Ilustração da densidade electrónica de um dos hemos de TsdA\_Cj.

Vista do hemo 1 da TsdA, com a representação da densidade electrónica após os vários processos de refinamento. A verde encontra-se o mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{cal}}$ , calculado depois do primeiro ciclo de refinamento, com contorno de  $3\sigma$  para os centros de ferro enxofre. A azul encontra-se o mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{cal}}$  com contorno de  $1\sigma$  para os centros de ferro enxofre.

A recolha de dados e as estatísticas de refinamento obtidos para os três variantes da TsdA\_Cj estão na Tabela 12, com um grupo espacial monoclinico *C2*. Relativamente aos variantes **TsdA\_K252G\_S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** e **TsdA\_K252G\_C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>**, os cristais pertencem ao grupo espacial monoclinico *C2*, com dimensões da célula unitária de  $a = 195,2 \text{ \AA}$ ,  $b = 74,3 \text{ \AA}$ ,  $c = 103,3 \text{ \AA}$ . Contêm 4 moléculas na unidade assimétrica, correspondendo a um coeficiente de Mathews de  $2,2 \text{ \AA}^3 \cdot \text{Da}^{-1}$  e um teor de solvente de ~45 %. As estruturas foram refinadas às resoluções de  $1,82 \text{ \AA}$  e  $1,87 \text{ \AA}$ , com  $R_{\text{work}}$  final de 17% e 18 %,  $R_{\text{free}}$  de 20% e 21 %, respetivamente. Os modelos contêm os resíduos Ser<sup>15</sup>-Met<sup>321</sup> em quase todas as cadeias (A, B, C e D), conforme informação detalhada na Tabela 12 e dois hemos em cada cadeia. As soluções de crio-proteção continham PEG, citrato de amónio, para serem semelhantes com a solução de cristalização e preservar a integridade do cristal. Também continham um ião tiosulfato (no hemo 1, entre os resíduos Arg<sup>124</sup>, Cys<sup>138</sup>, Arg<sup>134</sup>, Ser<sup>142</sup> e Gly<sup>240</sup>) e um ião ascorbato (que não é observado nos mapas de densidade eletrónica, nem na vizinhança do hemo 1 ou Cys<sup>138</sup>).

O cristal do **mutante TsdA\_N254G** em comparação com os restantes é “*as isolated*”, ou seja, na solução crio-protetora continha somente o PEG e o imidazol/malate, não tendo sido adicionado nenhum ligando. As dimensões da célula unitária foram ligeiramente diferentes das anteriores,  $a = 100,91 \text{ \AA}$ ,  $b = 58,38 \text{ \AA}$ ,  $c = 56,42 \text{ \AA}$ , a estrutura refinada a uma resolução de  $1,78 \text{ \AA}$  com  $R_{\text{work}}$  de 17% e  $R_{\text{free}}$  de 21% e compreende resíduos Gly<sup>14</sup> – Ala<sup>255</sup> e Asp<sup>261</sup> – Met<sup>321</sup> (o mapa de densidade eletrónica não era de boa qualidade entre Ala<sup>255</sup> - Asp<sup>261</sup>, o que não possibilitou a modelação desta região), dois hemos e 184 moléculas de águas. Abrange um monómero na unidade assimétrica, que corresponde ao coeficiente de Mathews de  $3,36 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  e um teor de solvente de 63,40 %.

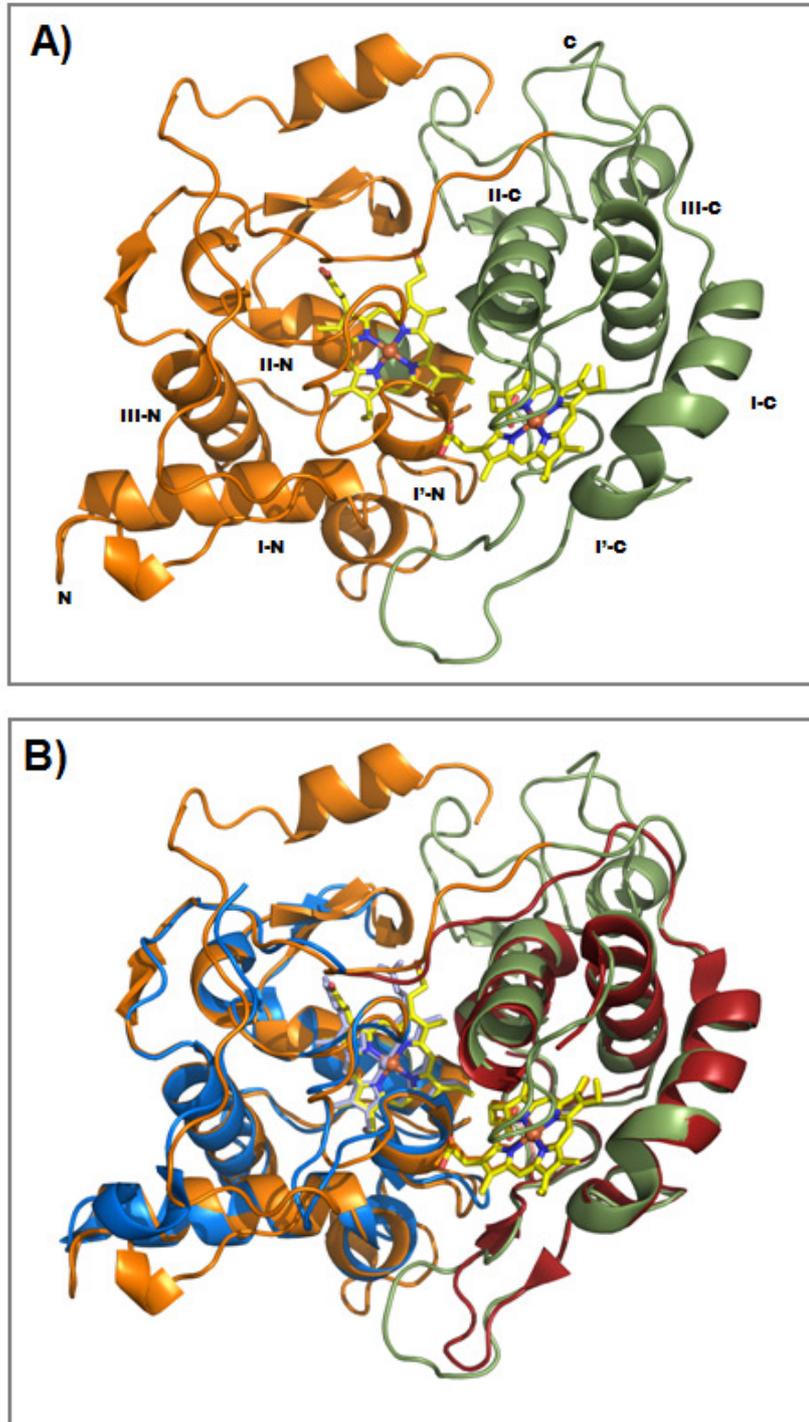
Neste trabalho, numerou-se os resíduos de TsdA\_Cj sem integrar o sinal do péptido de 22 aminoácidos que é removido durante o transporte da proteína para o periplasma (1). Os mapas de densidade eletrónica calculados foram geralmente de boa qualidade, exceto para duas regiões desordenadas: as extremidades N- e C-terminais (aproximadamente 4 e 15 resíduos, respetivamente) e o segmento entre os resíduos Met<sup>255</sup> - Pro<sup>260</sup> (possível de modelar) (Tabela 12). Os parâmetros finais dos modelos e estatísticas relevantes para todas as estruturas TsdA\_Cj caracterizadas são descritos na Tabela 12.

### 6.2.1. Overall Fold da estrutura da proteína TsdA de *C. jejuni* e comparação estrutural com a proteína TsdA de *A. vinosum*.

A estrutura da TsdA de *C. jejuni* (Figura 23 A) é uma molécula em forma de coração com dimensões globais aproximadas de  $60 \times 45 \times 30 \text{ \AA}^3$  e está organizada em dois domínios. Cada domínio é composto por quatro hélices  $\alpha$  que cercam cada hemo, correlacionados por um eixo de simetria *pseudo-2-fold*, em que cada um apresenta a típica topologia de citocromo-*c* classe I, que tem sido relatado ao longo dos estudos estruturais das proteínas TsdA\_Av (2) e TsdAB\_Mp (3). Esta organização sugere que esta proteína resultou de um evento de duplicação de genes durante a evolução (2). Ao analisar a estrutura da TsdA\_Cj (Figura 23 A), verifica-se uma interseção ligeiramente perpendicular entre as hélices I-N/C e III-N/C, e encontram-se num plano oposto as hélices I-N/C e II-N/C. Cada domínio possui, além das hélices descritas, duas cadeias de folha- $\beta$  antiparalela, que estão localizadas em lados opostos do plano do hemo.

Avançando com o estudo relacionado com as coordenadas da TsdA\_Cj, esta foi submetida ao servidor *DALI* (80), observando-se uma maior similaridade sequencial de 43% com a TsdA de *A. vinosum* (ID no PDB 4WQD), RMSD de 1, 1  $\text{\AA}$  para 223 C $\alpha$  alinhados e um *Z-score* de aproximadamente 30 (duas estruturas são consideradas semelhantes com *Z-score* acima de 10).

Comparando-se as duas estruturas (Figura 23 B) é visível a sobreposição das hélices  $\alpha$  ao redor dos hemoss. Deste modo, pode-se concluir que a TsdA\_Cj, como TsdA\_Av, também está organizada em dois domínios que estão relacionados por um eixo de simetria *pseudo-2-fold*, em que cada um apresenta a típica topologia de citocromo-*c* classe I (2).



**Figura 23: Comparação da estrutura da proteína TsdA de *C. jejuni* e da proteína TsdA de *A. vinosum*.**

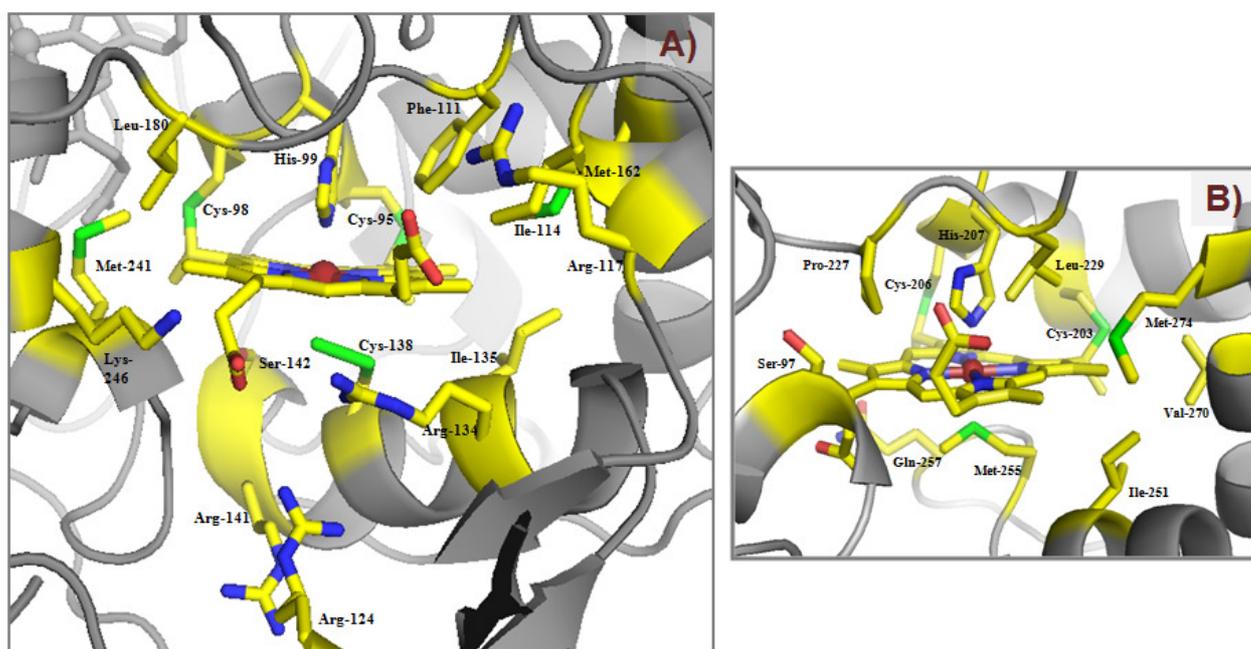
A) Cadeia A da TsdA de *C. jejuni* com o domínio N-terminal (resíduos 15-184) representado a laranja e domínio C-terminal (resíduos 184-321) a verde. Também estão ilustrados os grupos prostéticos dos hemos, variando a cor pelo tipo de átomo que são utilizadas de igual forma para todas as figuras (Carbono a amarelo; Azoto a azul; Oxigénio a vermelho; Ferro a avermelhado escuro).

B) Sobreposição da estrutura da TsdA de *C. jejuni* com a TsdA de *A. vinosum*, com o domínio N-terminal (resíduos 5-135) representado a azul (hemo 1 está a azul claro) e o com o domínio C-terminal (resíduos 136-337) a vermelho (hemo 2 está a vermelho claro).

Estas imagens foram criadas com programa *PyMol* (81).

### 6.2.2. Coordenação dos hemos dos mutantes K252G e N254G da proteína TsdA\_Cj

As estruturas cristalinas dos mutantes da proteína TsdA\_Cj têm dois hemos por cadeia (Figura 24), que estão ligados covalentemente à cadeia polipeptídica através de ligações tioéster entre a Cys<sup>95</sup> e Cys<sup>98</sup> para o hemo 1 e Cys<sup>203</sup> e Cys<sup>206</sup> para o hemo 2. A distância Fe-Fe entre os dois hemos é de ~15,3 Å, sendo considerado um intervalo próximo do observado noutros citocromos tipo *c* (hemos com uma distância inferior a 14 Å, ocorre uma rápida e essencial transferência de elétrões) (2). Têm uma distância de 5,1 Å entre cada extremidade dos hemos, o que também está de acordo com outras estruturas de citocromo *c* e multi-hêmicas, que indicam que estas distâncias são de 4-8 Å (3). Estas estruturas apresentam uma ligação axial His/Cys típica do centro ativo das proteínas TsdAs (1). Por outro lado, este tipo de ligação é raro entre procariotas e parece ser de especial importância no metabolismo energético baseado em enxofre (1). Além disso, a estrutura confirmou a evidência espectroscópica indicada no estudo de Kurth, *et. al*, (1) mostrando que este citocromo *c* di-hêmico tem 2 hemos (hemo 1, 2) com uma coordenação His/Met (1).

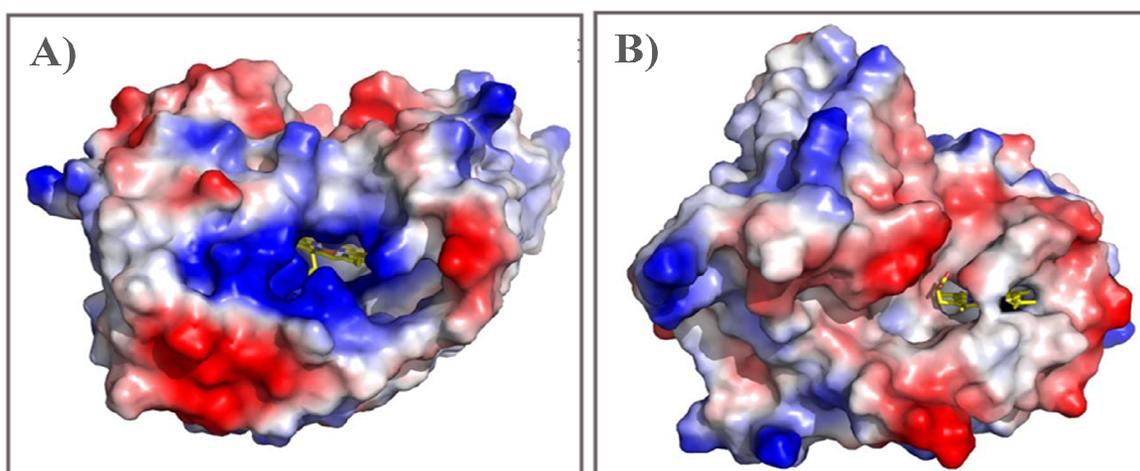


**Figura 24: Representação ampliada dos hemos de TsdA\_Cj.**

Estão identificados os resíduos de aminoácidos que formam a entrada da cavidade estão marcados no hemo 1 (A) e no hemo 2 (B). As figuras foram criadas através do programa PyMol (81).

Em cada um dos hemos há um canal de ligação ao solvente a partir dos ligandos axiais (Cys<sup>138</sup> e Met<sup>255</sup>). No hemo 1, perto ao resíduo Cys<sup>138</sup> (Figura 24 A) é visível a cavidade que se encontra alinhada pelas cadeias laterais dos resíduos Arg<sup>117</sup>, Arg<sup>124</sup>, Arg<sup>134</sup> e Arg<sup>141</sup> (1). O resíduo Arg<sup>134</sup> é o mais próximo ao hemo, e tem uma distância de 6,5 Å do S2 ao Cys<sup>138</sup> e também tem uma proximidade à Arg<sup>124</sup> de 5,3 Å. Esta última, comparativamente com outros estudos efetuados a outras proteínas da família da TsdA, revelam que a Cys<sup>138</sup> é essencial para a atividade catalítica de TsdA\_Cj (1), sendo sugerido ser o canal do local ativo para substratos aniônicos, devido ao canal positivo em torno do hemo 1 (2). À semelhança do hemo 1 e à TsdA\_Av, o hemo 2 também está exposto ao solvente, apesar de um só grupo propionato ligado ao anel pirrol D estar direcionado para o solvente (Figura 24 B) (2).

O hemo 1 tem um potencial eletrostático positivo em torno da cavidade e constitui o local ativo da TsdA\_Cj (Figura 25). Relativamente ao hemo 2, este está mais exposto ao solvente e tem uma carga positiva em torno de um núcleo mais hidrofóbico (Figura 25). Neste caso, o hemo 2 é o centro de fluxo de eletrões, que liga o local ativo ao parceiro redox da TsdA. Estas observações podem ser explicadas, uma vez, que os resíduos que estão carregados positivamente em torno da cavidade de heme 1 atraem a molécula de substrato (tetrionato) com carga negativa e ajudam a liberar o produto (tiosulfato) com carga negativa. Deste modo, confirma-se que hemo 1 e hemo 2 constituem um par redox ligado ao fluxo de eletrões (2).



**Figura 25: Potencial de superfície eletrostática da proteína TsdA\_Cj**

A) Está ilustrado o potencial de superfície eletrostática em torno do hemo 1; B) Está indicado o potencial de superfície eletrostática do hemo 2. A carga positiva é representada em azul e carga negativa em vermelho.

As figuras foram criadas através do programa PyMol (81).

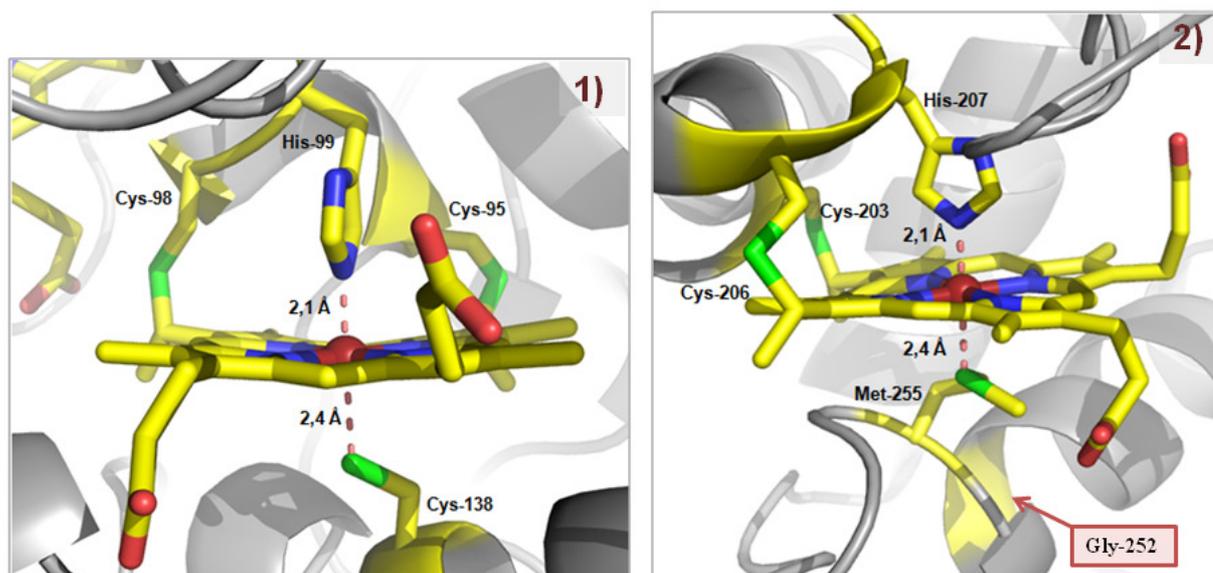
- **Coordenação dos hemos do mutante K252G de TsdA\_Cj com ascorbato**

A estrutura tridimensional do mutante K252G com ascorbato obtida (Figura 26) apresenta uma hexacoordenação no hemo 1 e tem um ligando proximal a His<sup>99</sup> e um ligando distal a Cys<sup>138</sup> (Figura 26-1), com uma distância ao Fe de 2,1 e 2,4 Å, respectivamente. Relativamente ao hemo 2 o ligando proximal é His<sup>207</sup> e o ligando distal é Met<sup>255</sup>, com uma igual distância de ligação ao ferro do hemo 1 (Figura 26-2). Comparativamente à estrutura da TsdA\_Av determinada em Brito, *et. al.*, (2) as distâncias dos ligandos proximais e distais ao Fe em ambos os hemos são idênticas, havendo uma ligeira diferença entre o ligando proximal do hemo 2 (diminuição de distância para 2,0 Å em TsdA\_Av).

Com os dados cinéticos disponíveis sobre a enzima TsdA\_Cj, sabe-se que provavelmente o átomo de ferro do hemo 1 tem um estado de baixa rotação de seis coordenadas, assim como também se confirmou que o Cys138 é um sexto ligando distal do hemo 1 (1). De acordo com a estrutura obtida para este mutante (Figura 26-1), o ligando distal do hemo 1 encontra-se na conformação principal, está diretamente coordenando ao ferro através de seu S $\gamma$  (2).

Em comparação com os resultados obtidos com a TsdA\_Av, esperava-se que na de ascorbato (agente redutor), houvesse uma alteração conformacional na Cys<sup>138</sup> do hemo 1, com o intuito de promover a redução do hemo, saindo a Cys<sup>138</sup> para fora do eixo de coordenação do ferro. Neste caso, ocorreria também uma mudança de ligando distal do hemo 2, para um outro resíduo perto do hemo, provocando o *ligando switch*. Como não se verificou *ligando switch* no hemo 1, surgiu assim uma outra diferença muito importante entre TsdA\_Cj e TsdA\_Av. Pois, na estrutura da TsdA\_Av verificou-se que a proteína na presença de um agente redutor (como foi o caso do ditionito) provocou uma dupla conformação e a Cys distal saiu fora da esfera de coordenação do hemo 1 e o hemo 2 deixou de ser coordenado pelo ligando distal Lis<sup>208</sup> para a Met<sup>209</sup> (2).

Por outro lado, o tipo de coordenação do hemo 2 já era antecipado também por analogia à estrutura da TsdA\_Av (coordenação do hemo 1 é de His<sup>54</sup> - Cys<sup>96</sup> e do hemo 2 de Lys<sup>208</sup> - His<sup>164</sup>), uma vez, que a metionina está localizada na sequência da TsdA\_Cj, numa posição equivalente em *A. vinosum*. Foram também realizados vários testes cinéticos e espectroscópicos indicando que a Met<sup>255</sup> atua como ligando distal do hemo 2 (pelo menos em estado de oxidação da TsdA\_Cj), o que corrobora os resultados obtidos (Figura 26-2). Em conclusão, os ligandos distais do ferro de cada hemo da proteína TsdA\_Cj são indispensáveis para a sua função enzimática (1).



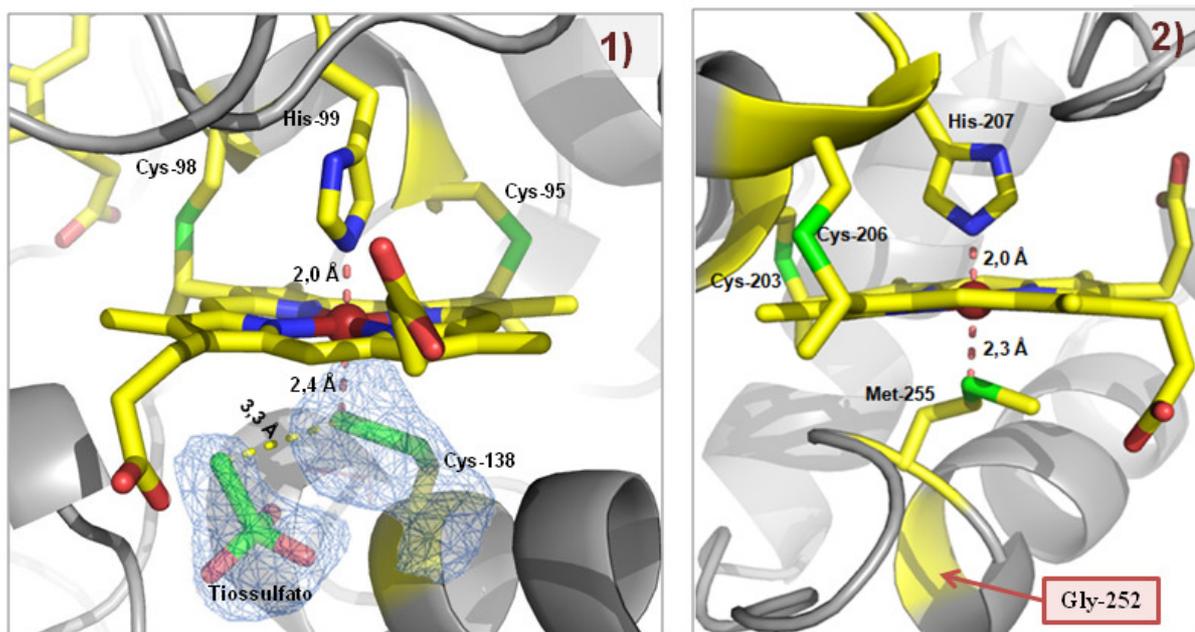
**Figura 26: Coordenação dos hemos do mutante K252G de TsdA\_Cj com ascorbato.**

1) O hemo 1 é coordenado por His<sup>99</sup> e Cys<sup>138</sup>; 2) O hemo 2 é coordenado por His<sup>207</sup> e Met<sup>255</sup>, e também está identificado o local da mutação do variante. As figuras foram criadas através do programa PyMol (81).

- **Coordenação dos hemos do mutante K252G de TsdA\_Cj com tiosulfato.**

Os estudos anteriores à proteína TsdA\_Av, indicaram que o S $\gamma$  do átomo da cisteína (Cys<sup>138</sup>) do sítio ativo, pode adotar duas conformações diferentes devido apenas à rotação da cisteína C $\alpha$  - C $\beta$  e não envolve nenhum rearranjo importante a nível da cadeia principal (2), consequentemente a conformação do átomo de enxofre alterna entre os estados de ligação ao Fe e de Fe não ligante (3). Relativamente à outra estrutura do mutante K252G foi obtida com soaking do substrato tiosulfato (Figura 27). Neste caso observou-se o tiosulfato estabilizado por uma ligação de hidrogénio, na cavidade do centro ativo (como já tinha sido proposto em TsdA\_Av (2) e TsdAB\_Mp (3)) (Figura 27-1), delineada pelas cadeias laterais dos resíduos Arg<sup>124</sup>, Arg<sup>134</sup> e Arg<sup>141</sup> carregados positivamente, e proposto o seu envolvimento na orientação e estabilização do substrato para a catálise (3; 2). O tiosulfato está orientado de modo que a ligação do S1-S2 está direcionada para o hemo 1, como foi possível ver na estrutura reduzida de TsdA\_Av em ditionito (entrada PDW 4WQ9) (2). A distância entre o átomo S $\gamma$  da Cys<sup>138</sup> e o S2 do tiosulfato é de 3,3 Å, não estando dentro da distância de

ligação covalente, podendo afetar a captação do substrato para a realização do fluxo de elétrons. O tiosulfato foi refinado com uma ocupação de 78 %. O  $S\gamma$  do resíduo Cys<sup>138</sup> (tem uma ocupação total) sobrepõe com o  $S\gamma$  do resíduo Cys<sup>96</sup> em TsdA\_Av com bisulfito (código PDB 4WQB) (2). Em ambas as estruturas, estas cisteínas ligadas ao ligando não estão a coordenar o hemo. No caso da TsdA\_Cj, é notório a continuidade nos mapas de densidade eletrónica no hemo 1, apesar de Cys<sup>138</sup> não estar ligada ao ferro hemo, mas espera-se que a cisteína coordene o hemo quando não há ligando ou substrato presente, semelhante ao sucedido nas estruturas cristalinas de TsdA\_Av e TsdAB\_Mp (2; 3).



**Figura 27: Coordenação dos hemos do mutante K252G de TsdA\_Cj com tiosulfato.**

O hemo 1 é coordenado por His<sup>99</sup> e Cys<sup>138</sup>; 2) O hemo 2 é coordenado por His<sup>207</sup> e Met<sup>255</sup> e também está identificado o local da mutação deste variante em estudo.

Representação dos hemos da TsdA com densidade eletrónica após os vários processos de refinamento. A verde e vermelho encontra-se o mapa  $F_{obs}-F_{cal}$ , calculado depois do primeiro ciclo de refinamento, com contorno de  $3\sigma$  para os centros de ferro enxofre. A azul encontra-se o mapa  $2F_{obs}-F_{cal}$  com contorno de  $1\sigma$  para os centros de ferro enxofre.

As figuras foram criadas através do programa PyMol (81).

Normalmente, quando é visível um ião de tiosulfato no centro ativo ocorre uma modificação de estados de oxidação na Cys distal do hemo 1, como já foi possível verificar em outras estruturas da família das TdsAs. Deste modo, através da estrutura obtida do mutante K252G, sabe-se que Cys<sup>138</sup> adota uma segunda conformação, havendo uma ligeira rotação do  $S\gamma$  para fora da esfera de coordenação do ferro do hemo 1. Esta situação sucede-se devido ao  $S\gamma$  deste resíduo ser o ligando mais fraco do hemo, o que pode propiciar a mover-se para uma posição alternada, promovendo a catálise, revelando diversidade conformacional e

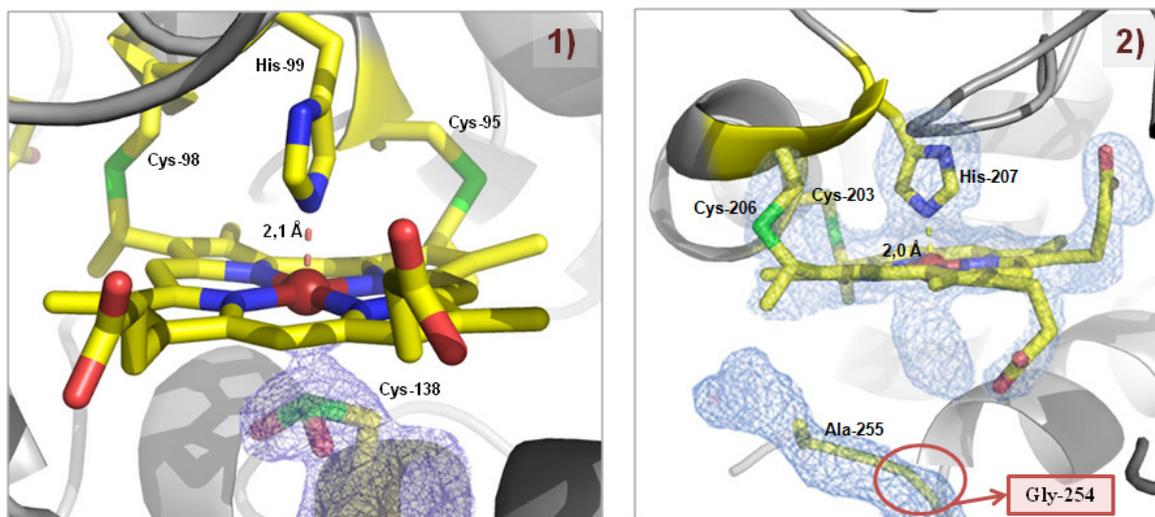
química em torno da Cys<sup>138</sup> (2), em comparação com o sucedido na estrutura do mutante K252G com ascorbato (Figura 26-1) que a Cys<sup>138</sup> apresenta a conformação principal. Nesta estrutura a Cys<sup>138</sup> também se encontra em estado de persulfuração completa, semelhante ao que foi observado anteriormente na estrutura cristalina da TsdA\_Av crio-cristalizada com tetrionato (PDB 4WQA) (2). No que diz respeito ao hemo 2 deste mutante (Figura 27-2), não se observou nenhuma desordem na região da zona do ligando axial, mas sim a ligação à Met<sup>255</sup>, como já se era de esperar.

Como já foi referido anteriormente, foi possível modelar uma molécula de tiosulfato numa cavidade perto do hemo 1, recorrendo à interpretação do mapa de densidade eletrónica (ver **Erro! A origem da referência não foi encontrada.**).

- **Coordenação dos hemos do mutante N254G, da proteína TsdA\_Cj**

Neste caso, realizou-se um estudo estrutural do mutante N254G “*as isolated*”, sem adição de nenhum ligando, para se ver como esta mutação afeta a atividade enzimática da proteína TsdA\_Cj. Este mutante tem uma coordenação de dois hemos, que estão ligados covalentemente à cadeia polipeptídica (Figura 28). No hemo 1, observou-se também (como em K252G) uma heterogeneidade conformacional na Cys<sup>138</sup>, que se encontra em estado de dupla oxidação, passando a ser uma cisteína no estado de ácido sulfónico (Figura 28-1). Esta oxidação é um processo irreversível e provavelmente resultou de um dano oxidativo durante o longo processo de cristalização à temperatura ambiente (2), o que também foi observado em TsdA\_Av (PDB 4WQ-7). Deste modo, a Cys<sup>138</sup> neste estado dupla de oxidação, não se encontra coordenada com o Fe do hemo 1.

Não foi possível modelar loop Ala<sup>255</sup> - Pro<sup>260</sup>, no mutante N254G. Esta região, aliás, já por si é móvel dado que em todos os conjuntos de dados analisados não foi possível modelar porções do loop (Ile<sup>251</sup> - Pro<sup>260</sup>). Assim sendo, é de assumir que o mutante N254G introduziu um maior grau de flexibilidade na região em redor do ligando distal do heme 2, pela introdução de um resíduo de aminoácido sem qualquer cadeia lateral (mutação da Asn<sup>254</sup> para Gly) tornando esta zona extremamente flexível e difícil de modelar. De facto, esta situação também foi observada com um mutante da TsdA\_Av (2). Não sendo, possível modelar correctamente este loop, não podemos afirmar qual o ligando distal nesta variante. Contudo, não sendo a Asn254 e a Met255, existe uma porção de densidade que ainda não foi modelada, ou seja, esta variante não assume um estado high spin dado que algo liga na posição distal do heme 2.



**Figura 28: Coordenação dos hemos do mutante N254G, da proteína TsdA\_Cj.**

1) O hemo 1 é coordenado por His<sup>99</sup> e Cys<sup>138</sup> oxidada; 2) O hemo 2 é coordenado por His<sup>207</sup> e está também identificado o local da mutação deste variante em estudo.

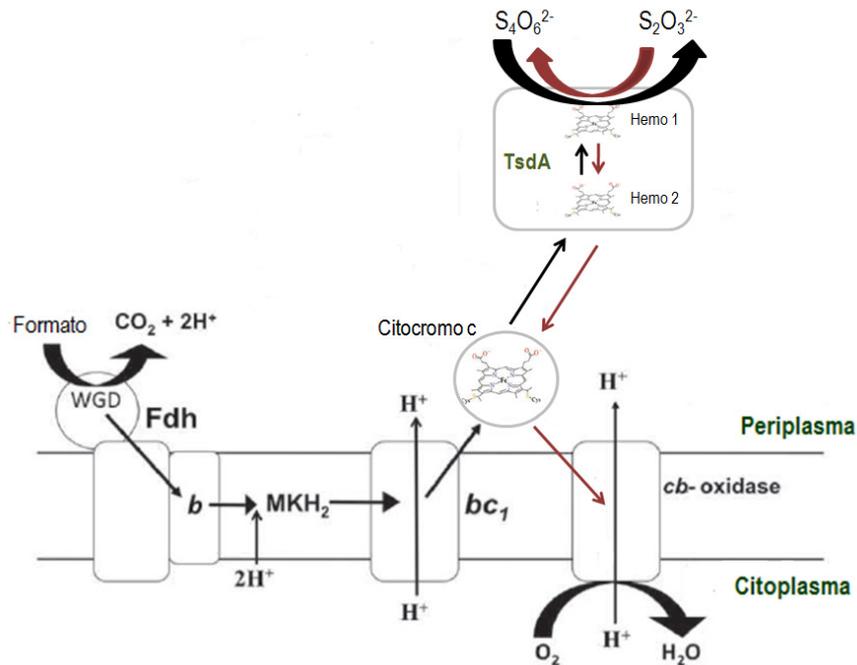
Representação dos hemos da TsdA com densidade electrónica após os vários processos de refinamento. A verde e vermelho encontra-se o mapa  $F_{\text{obs}}-F_{\text{cal}}$ , calculado depois do primeiro ciclo de refinamento, com contorno de  $3\sigma$  para os centros de ferro enxofre. A azul encontra-se o mapa  $2F_{\text{obs}}-F_{\text{cal}}$  com contorno de  $1\sigma$  para os centros de ferro enxofre.

As figuras foram criadas através do programa PyMol (81).

## 7. Discussão

Neste projeto de dissertação realizou-se uma análise estrutural à enzima tiosulfato desidrogenase de *Campylobacter jejuni* (TsdA\_Cj), de forma a complementar resultados cinéticos e espectroscópicos obtidos por Kurth *et. al*, (1) relativamente às propriedades catalíticas deste citocromo *c* di-hémico, que são alteradas de acordo com os ambientes em torno dos hemos (1). Por outro lado, tem-se conhecimento que através das características enzimáticas as proteínas TsdAs podem utilizar o tetrionato como doador de elétrons (como é o caso da *C. jejuni*), ou então, o tiosulfato como doador de elétrons (como é o caso de *A. vinosum* e *M. purpuratum*) (1).

Todos estes dados cristalográficos adquiridos ao longo desta dissertação, dão a entender que há uma compatibilidade com o mecanismo catalítico sugerido para TsdA\_Av (2). Neste caso, duas moléculas de tiosulfato entram no local do centro ativo, induzindo o S<sub>γ</sub> do resíduo Cys<sup>138</sup> a sair temporariamente para fora da esfera de coordenação do ferro durante a reação, levando a uma alteração no potencial redox (2). Durante esta reação direta, são libertados dois elétrons, que podem ser acomodados pelos dois grupos hemos, que os irá reduzir e surgirá uma molécula de tetrionato, que é libertada posteriormente, ficando os hemos de novo oxidados, como está indicado na Figura 29 (2). No caso da *C. jejuni* (reação inversa), ocorre atividade de redutase de tetrionato. O tetrionato é atraído para o local do centro ativo do hemo 1, e com o auxílio de dois elétrons que são fornecidos a partir de um citocromo *c* periplasmático (sendo estes elétrons facultados ao citocromo *c* pelo formato desidrogenase (Fdh) e o citocromo *bc1*, devido á sue natureza eletrónica) ocorre a redução do tetrionato a duas moléculas de tiosulfato (ver Figura 29). Deste modo, espera-se uma alteração na coordenação do hemo em que a Cys sai fora da esfera de coordenação, para facilitar a entrada do substrado (tiosulfato) na cavidade do hemo 1. Após a libertação de tetrionato, Cys<sup>138</sup> retorna à esfera de coordenação do ferro (2); (4). O que poderá enfatizar o papel importante da Cys<sup>138</sup> na proteína, como resíduo do local ativo, essencial para a catálise (2).



**Figura 29: Modelo de transferência de elétrons bi-direcional *in vivo* entre o tetrionato e tiosulfato.**

Esta transferência de elétrons é catalisada por TsdA de *C. jejuni*. O transporte de elétrons do citocromo c para a redução do tetrionato (setas pretas) são facultados pelo formato através do formato desidrogenase (Fdh), devido à natureza eletrogênica da formato desidrogenase e do complexo citocromo bc1. Por outro lado, a atividade de tiosulfato desidrogenase produz 2 elétrons, em que o aceitador final é a oxidase do tipo cb (setas vermelhas). Adaptado de (4).

Em todos os mutantes da TsdA\_Cj a ligação axial His/Cys do hemo 1 é equivalente com as estruturas das enzimas TsdA\_Av e TsdAB\_Mp. Com estudos cinéticos realizados, tem-se conhecimento que o hemo 1 constitui o local ativo da TsdA\_Cj, pois a atividade enzimática é nula em ambas as direções (redução ou oxidação) quando a Cys<sup>138</sup> é substituída (3), não só pela glicina mas também por uma metionina e histidina (1). A redução do tetrionato e a oxidação do tiosulfato também são igualmente afetadas (1). Isto identifica Cys<sup>138</sup> como um resíduo de local ativo e enfatiza um papel importante geral para a cisteína em proteínas contendo hemos ligados a His / Cys (2). A coordenação Cys<sup>138</sup> do hemo 1 como ponto de entrada de elétrons parece algo surpreendente, porque implicaria uma transferência de elétrons altamente improvável da oxidação do tiosulfato para o hemo 1 de TsdA (2). Verificou-se uma cavidade com carga positiva ao lado do heme 1 e Cys<sup>138</sup>, que constitui o local ativo (2). Esta região parece ser muito semelhante à descrita para a TsdA\_Av, e espera-se que vários resíduos de Arg (Arg<sup>117</sup>, Arg<sup>124</sup>, Arg<sup>134</sup> e Arg<sup>141</sup>) criem um forte campo eletrostático positivo, possibilitando a ligação do substrato tiosulfato em ambos os casos (2). Também se propõe que outros resíduos perto do local ativo estabilizem a Cys (2). Neste

estudo, houve uma estrutura que continha tiosulfato, estando este em grande proximidade à Cys<sup>138</sup> e ao ferro do hemo1, como acontece em TsdA\_Av. Em alguns dos casos o Sγ do resíduo Cys<sup>138</sup> pode adotar diferentes conformações, havendo uma alteração da sua posição para fora do eixo de coordenação. Embora a TsdA apresente uma elevada atividade específica com um pH baixo, supõe-se que quando esta se encontra na sua forma protonada (baixo potencial redox), o Sγ de Cys<sup>138</sup> é indicado como um ligando mais fraco para o hemo, o que poderá desencadear o movimento para fora da coordenação do ferro, passando a ter uma posição alternativa, o que irá promover a catálise (2; 1).

Deste modo, pode-se concluir que o movimento Cys<sup>138</sup> para fora da esfera de coordenação do ferro do hemo 1 e a ligação covalente de tiosulfato para o Sγ do resíduo da Cys é uma parte central do ciclo de reação da TsdA\_Cj (1). Por outro lado, comparando com o mecanismo de reação proposto por Grabarczyk *et. al*, para a TsdA\_Av, onde se observa a formação de um intermediário da cisteína, S-tiosulfonato (1). Durante a oxidação de tiosulfato, o intermediário liberta dois eletrões, que vão reduzir os átomos de ferro dos dois hemos em TsdA para o estado Fe (II). (2; 1). No caso de TsdA\_Cj, na direção inversa (redução do tetrionato), a ligação S-S da molécula de tetrionato possivelmente será a primeira a ser quebrada, devido ao ataque do Sγ da cisteína, libertando uma molécula de tiosulfato e forma-se o S-tiosulfonato de cisteína. A partir deste intermediário, o segundo tiosulfato poderá ser libertado na sua forma redutora com dois eletrões fornecidos por uma via dadora de eletrões externa, através dos dois grupos hélicos da TsdA (1).

Como já foi referido anteriormente, o hemo 2 da TsdA\_Cj atua como um centro de retransmissão de eletrões e liga o local ativo do par redox da enzima (1). Comparando com a estrutura de TsdA\_Av, há uma diferença importante entre a redução de tetrionato adaptada CjTsdA e a enzima oxidante tiosulfato de *A. vinosun* (1). Primeiramente sabe-se que o hemo 2 de TsdA\_Av é ligado pela Lys<sup>208</sup> quando a enzima se encontra em estado de oxidação, mas quando há uma alteração do ligando de lisina para metionina ocorre um *ligand-switch* do hemo 2 após redução (1; 2). No caso de TsdA\_Cj o ligando distal é a Met<sup>255</sup> no estado oxidado, mas com a substituição de Met<sup>255</sup> pela glicina há a uma forte deterioração em ambas as direções catalíticas, no entanto a formação de tetrionato é um processo muito mais importante (1). Inesperadamente surgiram alterações na direccionalidade da reação catalítica da TsdA, em que há uma adaptação da enzima na redução do tetrionato (TsdA\_Cj) ou na oxidação do tiosulfato (TsdA\_Av), o que deve ter implicações sobre a sua função em redes

metabólicas *in vivo*, permitindo que a redução do tetrionato possa ser utilizada como um processo respiratório alternativo (1).

Em suma, os resultados obtidos em *C. jejuni*, estão de acordo com os relatados em *A. vinosum*, havendo uma alteração relacionada com a ligação distal ao Ferro do hemo 2 no estado oxidado. Em TsdA\_Cj a Cys<sup>138</sup> como ligando axial de hemo 1 e a Met<sup>255</sup> de ligação ao ferro do hemo 2 são indispensáveis para a função enzimática eficiente *in vitro* e *in vivo*. Os resultados aqui descritos serão publicados brevemente, e também as restantes estruturas de outros mutantes da TsdA\_Cj refinadas e validadas, serão descritas.



## 8. Conclusão

O objetivo principal deste projeto científico consistiu no estudo estrutural da enzima tioissulfato desidrogenase de *Campylobacter jejuni*. Foi possível obter cristais de boa qualidade para o mutante K252G com ascorbato; mutante K252G com tioissulfato e mutante N254G, tendo sido recolhidos conjuntos de dados em sincrotrões, a uma resolução de, 1,86, 1,82 e 1,78 Å, respetivamente. Deste modo, realizou-se uma análise estrutural completa e verificou-se que a proteína continha dois hemos ligados covalentemente à cadeia polipeptídica através de ligações tio-éster entre a Cys<sup>95</sup> e Cys<sup>98</sup> para o heme 1 e entre a Cys<sup>203</sup> e Cys<sup>206</sup> para o heme 2. Relativamente ao ferro do hemo 1 é hexacoordinado e tem como ligando proximal a His<sup>99</sup> e como ligando distal a Cys<sup>138</sup>, tal como His<sup>207</sup> e Met<sup>255</sup> para o hemo 2. Também foi possível visualizar a presença de um ligando, tioissulfato, próximo do hemo 1 no mutante.

### 8.1. Perspetivas futuras

Como um projeto científico dificilmente se considera terminado, é importante refletir acerca das perspetivas futuras:

- Pretende-se finalizar o processo de refinamento de todos os conjuntos de dados que foram recolhidos da enzima TsdA Cj (*wild type*, C138G, M255G), em diferentes estados de oxidação;
- No trabalho futuro serão realizados mais ensaios de cristalização na presença de ligandos, nomeadamente a otimização da cristalização dos mutantes K252G e N254G.
- Devido ao estado de oxidação do mutante C138G, será necessário realizar ensaios de cristalização numa câmara de anaerobiose;

Estes ensaios fornecerão a informação que é necessária para propor mecanismo de reação para *C. jejuni* TsdA, juntamente com dados de atividade e caracterização cinética.



## 9. Bibliografia

1. **Kurth, Julia M., et al.** *Influence of haem environment on the catalytic properties of the tetrathionate reductase TsdA from Campylobacter jejuni.*, 36, Bioscience reports, 2016.
2. **Brito, José A., et al.** *Thiosulfate Dehydrogenase (TsdA) from Allochromatium vinosum: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INSIGHTS INTO THIOSULFATE OXIDATION.*, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 290 (14), pp. 9222-9238, 2015.
3. **Kurth, Julia M., et al.**, *Electron Accepting Units of the DihemeCytochrome c TsdA, a Bifunctional Thiosulfate Dehydrogenase/Ttetrathionate Reductase.* s.l. : The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 291, pp. 24804-24818, 2016.
4. **Liu, Yang-Wei, et al.**, *Tetrathionate stimulated growth of Campylobacter jejuni identifies a new type of bi-functional tetrathionate reductase (TsdA) that is widely distributed in bacteria.*, Molecular Microbiology, Vol. 88 (1), pp. 173-188, 2013.
5. **Kurth, Julia M., Dahl, Christiane e Butt, Julia N.**, *Catalytic Protein Film Electrochemistry Provides a Direct Measure of the Tetrathionate/Thiosulfate Reduction Potencial.*, Journal of the American Chemical Society, Vol. 137, pp. 13232-13235, 2015.
6. **Rothery, Richard A., Workun, Gregory J. e Weiner, Joel H.**, *The prokaryotic complex iron-sulfur molybdoenzyme family.* Elsevier., Biochimica et Biophysica , Vol. 1778, pp. 1897-1929, 2008.
7. **Benvenuti, Manuela e Mangani, Stefano.**, *Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography.*, Nature Protocols, Vol. 2 (7), pp. 1633-1651, 2007.
8. **Dahl, Christiane, et al.** Introduction to Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms. [autor do livro] Rudiger Hell, et al. *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms.* s.l. : Springer, Vol. 27, 2008.
9. **Klotz, Martin G., Bryant, Donald A. e Hanson, Thomas E.** The microbial sulfur cycle. *The microbial sulfur cycle.* s.l. : Frontiers in Microbiology , 2011.
10. **Calijuri, Maria do Carmo e Cunha, David Gasparini Fernandes.** *Engenharia Ambiental: Conceitos, Tecnologia e Gestão.* s.l. : Elsevier Editora Ltda., 2013.
11. **Grein, Fabian, et al.** , *Unifying concepts ins anaerobic respiration: Insights drom dissimilatory sulfur metabolism.*, Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1827, pp. 145-160, 2012.
12. **Leustek, Thomas.**, *Sulfate Metabolism.*, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., Vol. 51, pp. 141-165, 2000.
13. **Stulen, Ineke e De Kok, Luit J.** Foreword: Exploring Interactions Between Sulfate and Nitrate Uptake at a Whole Plant Level. [autor do livro] Luit J. De Kok, et al. *Sulfur Metabolism in Plants.* s.l. : Springer, 2012.
14. **Andrew.** Sulfur Cycle. *Environmental Decision Making, Science and Technology.* <http://environ.andrew.cmu.edu/m3/s4/cycleSulfur.shtml>, 2003. [Citação: 28 de Agosto de 2016.]

15. **Santos, André A., et al.**, *A protein trisulfide couples dissimilatory sulfate reduction to energy conservation.*, Science, Vol. 350 (6267), pp. 1541-1545, 2015.
16. **Allos, Ban Mishu.**, *Campylobacter jejuni Infections: Update on Emerging Issues and Trends.*, Food Safety, Vol. 32, pp. 1201-1206, 2001.
17. **Kelly, D. J.**, *The physiology and metabolism of Campylobacter jejuni and Helicobacter pylori.* 90., Journal of Applied Microbiology, pp. 16-24, 2001.
18. **Santos, José Filipe Abreu.** *Caracterização de isolados de Campylobacter jejuni de origem animal e humana quanto aos seus factores genéticos de virulência.* Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências. Lisboa : s.n., Dissertação de Mestrado, 2011 .
19. **Gomes, Marcos JP.** *Gênero Campylobacter spp.* s.l. : FAVET-UFRGS, 2013.
20. **Viegas, Silvia Judite.** *Alterações do Estado de Saúde Associadas à Alimentação.* Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Lisboa : s.n., 2009.
21. **Boysen, Louise, Knochel, Susanne e Rosenquist, Hanne.**, *Survival of Campylobacter jejuni in different gas mixtures.*, FEMS Microbial Lett, Vol. 266, pp. 152-157, 2007.
22. **Miller, William G. e Mandrell, Robert E.** Prevalence of Campylobacter in the Food and Water Supply: Incidence, Outbreaks, Isolation and Detection. [autor do livro] Julian M. Ketley e Michael E. Konkel. *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology.* s.l. : Horizon Scientific Press, p. Capítulo 6, 2005.
23. **Humphrey, Tom, O'Brien, Sarah e Madsen, Mogens.**, *Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective.* ELSEVIER. 3, International Journal of Food Microbiology, Vol. 117, 2007.
24. **Dasti, Javid I., et al.**, *Campylobacter jejuni: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms.*, 4, s.l. : ELSEVIER, International Journal of Medical Microbiology , Vol. 300, pp. 205-211, 2010.
25. **Nyati, Kishan Kumar e Nyati, Roopanshi.**, *Role of Campylobacter jejuni Infection in the Pathogenesis of Guillain-Barré Syndrome: An Update.*, BioMed Research Internacional, pp. 1-13, 2013.
26. **Brito, José A, et al.**, *Production, crystallization and preliminary crystallographic analysis of Allochromatium vinosum thiosulfate dehydrogenase TsdA, an unusual acidophilic c-type cytochrome.*, Acta Crystallographica, Vol. F70 , pp. 1424-1427, 2014.
27. **Hell, Rudiger, et al.** *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms.* s.l. : Springer Science & Business Media,. Vol. 27, 2008.
28. [Online] <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>.
29. **Jaskolski, Mariusz, Dauter, Zbigniew e Wlodawer, Alexander.**, *A brief history of macromolecular crystallography, illustrated by a family tree and its Nobel fruits.*, The FEBS Journal, Vol. 281 , pp. 3985-4009, 2014.

30. **McPherson, Alexander.** Introduction to the Crystallization of Biological Macromolecules. [autor do livro] Larry Delucas. *Membrane Protein*. 2009.
31. *Crystallization screening: the influence of history on current practice.* **Luft, Joseph R., Newman, Janet e Snell, Edward H.** s.l. : CrossMark, Acta Crystallographic Section F: Structural Biological Communications, pp. 835-853, 2014.
32. **Gelin, Muriel, et al.,** *Combining 'dry' co-crystallization and in situ diffraction to facilitate ligand screening by X-ray crystallography.* J. L. Martin. Austrália : Cross Mark, Acta Crystallographica, Vol. D71, pp. 1777-1787, 2015.
33. **Brito, José A. e Archer, Margarida.** X-ray Crystallography. [autor do livro] Robert Crichton e Ricardo Louro. *Practical Approaches to Biological Inorganic Chemistry*. s.l. : Elsevier, Vol. 1ª Edição, 9, pp. 217-255, 2013.
34. **Nemcovicová, Ivana e Smatanová, Ivana Kutá.** Alternative Protein Crystallization Technique: Cross-Influence Procedure (CIP). [autor do livro] Elena Borisenko. *Crystallization and Materials Science of Modern Artificial and Natural Crystals*. Croatia : InTech, pp. 249-275, 2012.
35. **Smyth, M. S. e Martin, J. H. J.,** *X-Ray Crystallography*. 53, J Clin Pathol: Mol Pathol, pp. 8-14, 1999.
36. **Romão, Maria João.** Cristalografia de Proteínas: Metodologias e Aplicações em Bioquímica., pp. 18-36, 1996.
37. **Jeruzalmi, David.** First Analysis of Macromolecular Crystals. [autor do livro] Sylvie Doublie. *Methods in Molecular Biology: Macromolecular Crystallography protocols*. s.l. : Human Press, Vol. 2, 2007.
38. **Rhodes, Gale.** *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*. 3ª Edição. s.l. : Academic Press, 2006.
39. **Miller, F. M.** CHAPTER 3: Crystal Structures and Crystal Geometry. *CHEMISTRY: Structure and Dynamics*. s.l. : New York: McGraw-Hill, 1984.
40. **Chayen, Naomi E.,** *Methods for separating nucleation and growth in protein crystallisation*. 88, s.l. : Elsevier, Progress in Biophysics and Molecular Biology, pp. 329-337, 2005.
41. **Terwilliger, Thomas C., et al.,** *Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard*. 65, s.l. : Biological Crystallography, Acta Crystallographica Section D, pp. 582-601, 2009.
42. **Asherie, Neer.,** *Protein crystallization and phase diagrams*. U.S.A. : Elsevier, Methods , pp. 266-272, 2004.
43. **Riès-Kautt, Madeleine.** Strategy 2: An Alternative to Sparse Matrix Screens. [autor do livro] Terese M. Bergfors. *Protein Crystallization: Techniques, Strategies and Tips - A Laboratory Manual*. s.l. : IUL Biotechnology Series, 1999.

44. **McPherson, Alexander.**, *Introduction to protein crystallization.*, Methods, Vol. 34, pp. 254-265, 2004.
45. **Unge, Torsten.** Crystallization Methods. [autor do livro] Terese M. Bergfors. *Protein Crystallization: Techniques, Strategies and Tips.* California : International University Line, pp. 7-11, 1999.
46. **Bergfors, Terese.** *Screening and Optimization Methods for Nonautomated Crystallization Laboratories in Macromolecular Crystallography Protocols.* [ed.] Sylvie Doublé. Totowa : Humana Press Inc., pp. 131-151. Vol. 1, 2007.
47. **Falcão, Paula Kuser.** CRISTALOGRAFIA DE PROTEÍNAS. *Determinação da Estrutura tri-dimensional de Proteínas utilizando difração.* [Online] [Citação: 18 de Abril de 2016.] <http://slideplayer.com.br/slide/1789483/>.
48. **Drenth, Jan.** *Principles of Protein X-Ray Crystallography.* [ed.] Charles R. Cantor. Segunda. s.l. : Springer Advanced Texts in Chemistry, 1999.
49. **Rowlett, Roger S.** *Protein X-Ray Crystallography Methods.* 2ª. 2005.
50. **Stura, Enrico A. e Wilson, Ian A.,** *Analytical and production seeding techniques.* 1, s.l. : Elsevier, Methods, Vol. 1, pp. 38-49, 1990.
51. **Jeffrey, Phil.** Streak Seeding Protocole. [Online] 2013. [Citação: 13 de Julho de 2016.] <http://xray0.princeton.edu/~phil/Facility/Guides/StreakSeeding.html>.
52. **Stura, Enrico A.** Seeding. [autor do livro] Terese M. Bergfors. *Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips.* La Jolla : International University Line, 1999.
53. [Online] <http://www.esrf.eu/about/synchrotron-science/synchrotron-light>.
54. **Garrido, Carlos, et al.** *Espectroscopias: Raios X, RMN, MRI, EPR E Raman.* 2010.
55. [Online] <http://www.diamond.ac.uk/industry/>.
56. **Garman, Elspeth e Owen, Robin L.** Crystallography of Macromolecules. [autor do livro] Sylvie Doublé. *Methods in Molecular Biology: Macromolecular Crystallography protocols.* s.l. : Human Press, Vol. Volume 2, 2007.
57. **Pflugrath, J. W.,** *Practical macromolecular cryocrystallography.* 71, s.l. : CrossMark, Acta Cryst F: Structural Biology Communications, Vol. F, pp. 622-642, 2015.
58. **Garman, Elspeth e Owen, Robin.** Cryocrystallography of Macromolecules: Practice and Optimization. [autor do livro] Sylvie Doublé. *Methods in Molecular Biology: Macromolecular Crystallography protocols.* s.l. : Human Press, Vol. Volume 2, 2007.
59. **Chapman, Michael S. e Somasundaram, Thayumanasamy.,** *De-icing: recovery of diffraction intensities in the presence of ice rings.*, Acta Crystallographic Section D66, pp. 741-744, 2010.

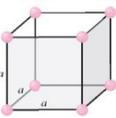
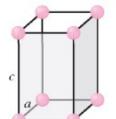
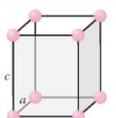
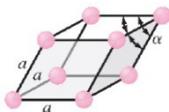
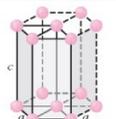
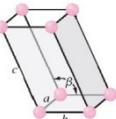
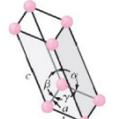
60. **Carmo, Maria Thereza Cargnelutti.** *Estudos funcionais e cristalográficos de interação de análogos de suramina com alpha-trombina humana-trombina humana.* Dissertação, 2009.
61. **Evans, Philip R.,** *An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics.* Cambridge : Biological Crystallography 67, Acta Crystallographica Section D, pp. 282-292, 2011.
62. **Leslie, Andrew G. W.,** *The integration of macromolecular diffraction data.* s.l. : Biological Crystallography, Acta Crystallographica , Vol. D62, pp. 48-47, 2006.
63. **Vonrhein, Clemens, et al.,** *Data processing and analysis with the autoPROC toolbox.* Castle Park, Cambridge : s.n, Acta Crystallographica Section D67, pp. 0907-4449., 2011.
64. **Taylor, Garry L. ,** *Introduction to phasing.* 4, Acta Cryst D: Biological Crystallography, Vol. D, pp. 325-338, 2010.
65. **Wlodawer, Alexander, et al.,** *Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures.* 1, s.l. : Blackwell Publishing, The FEBS Journal, Vol. 275, pp. 1-21, 2007.
66. **Cardoso, Ana Rita Castro Otrelo.** *Caracterização estrutural de enzimas de molibdénio e suas chaperonas.* Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.. Dissertação de mestrado, 2012.
67. **Dahl, C., et al. ,** *Novel genes of the dsr gene cluster and evidence for close interaction of Dsr proteins during sulfur oxidation in the phototropic sulfur bacterium Allochromatium vinosum.* 187, Journal of Bacteriology, pp. 1392-1404, 2005.
68. **Luft, Joseph R., et al.,** *Efficient optimization of crystallization conditions by manipulation of drop volume ratio and temperature.,* The Protein Science, pp. 715-722, 2007.
69. [Online] <http://www.moleculardimensions.com/applications/upload/MD1-43%20Stura%20Footprint%20Screen%20MacroSol%20HT96.pdf>.
70. [Online] <http://www.moleculardimensions.com/applications/upload/MD1-37%20JCSG%20plus.pdf>.
71. [Online] [http://www.mitegen.com/mic\\_catalog.php?c=MicroLoopsLD](http://www.mitegen.com/mic_catalog.php?c=MicroLoopsLD).
72. **Kabsch, Wolfgang.,** *XDS.* 66, s.l. : Biology Crystallography, Acta Crystallographica Section D, pp. 125-132, 2010.
73. **Azevedo, Walter F.,** *Refinamento Cristalográfico .* 2015.
74. **McCoy, Airlie J., et al.,** *Phaser crystallographic software.* 40, s.l. : CrossMark, Applied Crystallography, pp. 658-674, 2007.
75. **Chen, Vincent B., et al.,** *MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography.* 66, s.l. : Biological Crystallography, Acta Crystallographica Sections D, pp. 12-21, 2009.

76. **Emsley, Paul e Cowtan, Kevin.** , *Coot: model-building tools for molecular graphics*. 60, s.l. : Biological Crystallography, Acta Crystallographica Section D, pp. 2126-2132, 2004.
77. **Blanc, E., et al.**, *Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER±TNT*. 60, s.l. : Biological Crystallography, Acta Crystallographica Section D, pp. 2210-2221, , 2004.
78. [Online] [https://hamptonresearch.com/tip\\_detail.aspx?id=217](https://hamptonresearch.com/tip_detail.aspx?id=217).
79. **Fernandes, William B., et al.**, *Aplicações Tecnológicas da Metodologia Cristalográfica*. s.l. : SENAI, Revista Processos Químicos, pp. 19-32, 2010.
80. **Holm, Liisa e Rosenström, Päivi.**, *Dali server: conservation mapping in 3D*. s.l. : Web Server issue, Research,, Vol. 38, pp. 545-549, 2010.
81. [Online] [https://pymolwiki.org/index.php/Main\\_Page](https://pymolwiki.org/index.php/Main_Page).
82. **Carreira , Ana Cláudia Nunes;** *Caracterização de isolados de Campylobacter jejuni e Campylobacter coli obtidos de cecos de frango, em Portugal, no âmbito de um estudo comunitário de prevalência*. Escola Superior Agrária , Instituto Politécnico de Santarém . Tese de Mestrado, 2012..

## Anexos

### ➤ Organizações internas do cristal

Tabela 13: Classificação da estrutura espacial dos sistemas cristalinos, adaptado de (39).

| Sistemas cristalinos  | Parâmetros da célula  | Simetria  | Grupo espacial   |
|---|---|---|--|
| <b>Cúbico</b><br>        | $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$<br>$a = b = c$                         | Quatro eixos tríplices ao longo da diagonal do cubo | P23, P2 <sub>1</sub> 3, F23, I23, I2 <sub>1</sub> 3<br>P432, P4 <sub>1</sub> 32, P4 <sub>2</sub> 32;<br>P4 <sub>3</sub> 32, F432, F4 <sub>1</sub> 32, I432,<br>I4 <sub>1</sub> 32  |
| <b>Tetragonal</b><br>    | $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$<br>$a = b \neq c$                      | Eixos quádruplos (paralelo a c)                     | P4, P4 <sub>1</sub> , P4 <sub>2</sub> , P4 <sub>3</sub> , I4, I4 <sub>1</sub><br>P422, P4 <sub>1</sub> 22, P4 <sub>2</sub> 22,<br>P4 <sub>3</sub> 22, P4 <sub>2</sub> 12, P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2,<br>P4 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2, P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2, I422,<br>I4 <sub>1</sub> 22 |
| <b>Ortorrômbica</b><br> | $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$<br>$a \neq b \neq c$                   | Três eixos duplos perpendiculares                   | P22, P222 <sub>1</sub> , P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2,<br>P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> , C222, C222 <sub>1</sub> ,<br>F222, I222, I2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>   |
| <b>Trigonal</b><br>    | $\alpha = \beta = 90^\circ,$<br>$\gamma = 120^\circ$<br>$a = b = c$         | Eixos triplos (paralelo a c)                        | P3, P3 <sub>1</sub> , P3 <sub>2</sub> , R3<br>P321, P312, P3 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> , P3 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> ,<br>P3 <sub>1</sub> 12, P3 <sub>2</sub> 12, R32   |
| <b>Hexagonal</b><br>   | $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$<br>$a = b \neq c$           | Eixos sêxtuplos (paralelo a c)                      | P6, P6 <sub>5</sub> , P6 <sub>4</sub> , P6 <sub>3</sub> , P6 <sub>2</sub> , P6 <sub>1</sub><br>P622, P6 <sub>1</sub> 22, P6 <sub>2</sub> 22,<br>P6 <sub>3</sub> 22, P6 <sub>4</sub> 22, P6 <sub>5</sub> 22   |
| <b>Monoclínica</b><br> | $\alpha = \gamma = 90^\circ,$<br>$\beta \neq 90^\circ$<br>$a \neq b \neq c$ | Eixos duplos (paralelo a b)                         | P2, P2 <sub>1</sub> , C121   |
| <b>Triclínica</b><br>  | $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$<br>$a \neq b \neq c$          | Nenhuma   | P1   |

➤ **Agentes crio-protetores**

Tabela 14: Exemplos de Agentes crio-protetores utilizados na crio-proteção de cristais (57).

| <b>Tipo</b>                           | <b>Agente crio-protetor</b>  | <b>Concentração</b>  | <b>Observações</b>   |
|---------------------------------------|--|--|--|
| <b>Pequenos polióis</b>               | <b>Glicerol, etilenoglicol, propilenoglicol, 1,2-propanodiol, dietilenoglicol, 2-metil-2,4-pentanodiol, 2,3-butanodiol, 1,6-hexanodiol</b> | 25-50 % (v/v)  | Substituir a água, NÃO diluir outros componentes do tampão                               |
| <b>Álcoois</b>                        | Metanol, etanol, 2-propanol  | 50-75 % saturado   | Utilização através da fase de vapor ou evitar estes voláteis                             |
| <b>Açúcares</b>                       | <b>Sacarose</b> , trealose, glucose, sorbitol, xilitol, Eritritol, inositol  | 50-75 % saturado   | Utilização em solução de cristalização ou reservatório                                   |
| <b>Sais orgânicos</b>                 | Malonato, formiato, acetato  | 50-100 % saturado  | Ajustar o pH das soluções de stock para neutro   |
| <b>Sais inorgânicos</b>               | Nitrato de lítio, sulfato de lítio, cloreto de lítio, nitrato de sódio   | 50-90 % saturado   | O lítio é incompatível com o fosfato   |
| <b>PEGs de baixo peso molecular</b>   | PEG 200, <b>PEG 400</b> , PEG 600 etc.   | 25-50 % (v/v)  |  |
| <b>PEGs de elevado peso molecular</b> | PEG 3350, PEG 6000, PEG 8000, etc.   | 25-50 % (m/v)  | Não penetrante   |
| <b>Aminoácidos</b>                    | L-Prolina 2  | 2-3 M  |  |
| <b>Osmolitos</b>                      | N-óxido de trimetilamina, sarcosina, betaína   | 4 M  |  |
| <b>Outras</b>                         | Dimetilsulfóxido   | ~30 % (v/v)  | Ajuda a solubilizar pequenos ligandos  |
| <b>Óleos</b>                          | Parabar 10312, <b>óleo de perfluoropoliéter</b> , óleo de bomba turbomolecular, óleo de parafina, óleo de canola, azeite de oliva          | Uma camada muito fina sobre o cristal para absorver o excesso de óleo e reduzir a dispersão de raios-X | Parabar 10312 é também conhecido como Paratone-N e é mais viscoso do que os outros óleos |
| <b>Misturas</b>                       | Parabar 10312 + óleo de perfluoropoliéter, polióis + açúcares + polióis PEG, depois óleo   |  | As misturas de crioprotectores são limitadas apenas pela imaginação da pessoa            |

➤ **Soluções precipitantes de screen comercial Stura FootPrint (Molecular Dimensions para os ensaios de cristalização dos cinco variantes em estudo)**

Tabela 15: Várias soluções precipitantes de screen comercial de Stura FootPrintCombination (Molecular Dimensions) (69).

| Stura Footprint Combination Screen HT-96 |           |                                   |           | Rows A1 – D12              |     |       | MD1-43 |              |
|--|-----------|-----------------------------------|-----------|----------------------------|-----|-------|--------|--------------|
| Tube                                     | Conc1 (M) | Salt1                             | Conc2 (M) | Buffer2                    | pH  | Conc3 | Unit3  | Precipitant3 |
| A1                                       |           |                                   | 0,2       | Imidazole malate           | 5,5 | 15    | % v/v  | PEG 600      |
| A2                                       |           |                                   | 0,2       | Imidazole malate           | 5,5 | 24    | % v/v  | PEG 600      |
| A3                                       |           |                                   | 0,2       | Imidazole malate           | 5,5 | 33    | % v/v  | PEG 600      |
| A4                                       |           |                                   | 0,2       | Imidazole malate           | 5,5 | 42    | % v/v  | PEG 600      |
| A5                                       |           |                                   | 0,2       | Imidazole malate           | 7,0 | 10    | % w/v  | PEG 4000     |
| A6                                       |           |                                   | 0,2       | Imidazole malate           | 7,0 | 15    | % w/v  | PEG 4000     |
| A7                                       |           |                                   | 0,2       | Imidazole malate           | 7,0 | 20    | % w/v  | PEG 4000     |
| A8                                       |           |                                   | 0,2       | Imidazole malate           | 7,0 | 25    | % w/v  | PEG 4000     |
| A9                                       |           |                                   | 0,2       | Imidazole malate           | 8,5 | 7,5   | % w/v  | PEG 10,000   |
| A10                                      |           |                                   | 0,2       | Imidazole malate           | 8,5 | 12,5  | % w/v  | PEG 10,000   |
| A11                                      |           |                                   | 0,2       | Imidazole malate           | 8,5 | 17,5  | % w/v  | PEG 10,000   |
| A12                                      |           |                                   | 0,2       | Imidazole malate           | 8,5 | 22,5  | % w/v  | PEG 10,000   |
| B1                                       | 0,75      | Ammonium sulfate                  | 0,15      | Sodium citrate             | 5,5 |       |        |              |
| B2                                       | 1,0       | Ammonium sulfate                  | 0,15      | Sodium citrate             | 5,5 |       |        |              |
| B3                                       | 1,5       | Ammonium sulfate                  | 0,15      | Sodium citrate             | 5,5 |       |        |              |
| B4                                       | 2,0       | Ammonium sulfate                  | 0,15      | Sodium citrate             | 5,5 |       |        |              |
| B5                                       |           |                                   | 0,8       | Potassium/sodium phosphate | 7,0 |       |        |              |
| B6                                       |           |                                   | 1,32      | Potassium/sodium phosphate | 7,0 |       |        |              |
| B7                                       |           |                                   | 1,6       | Potassium/sodium phosphate | 7,0 |       |        |              |
| B8                                       |           |                                   | 2,0       | Potassium/sodium phosphate | 7,0 |       |        |              |
| B9                                       | 0,75      | Sodium citrate tribasic dihydrate | 0,01      | Sodium borate              | 8,5 |       |        |              |

|     |     |                                   |      |                   |     |      |       |              |
|-----|-----|-----------------------------------|------|-------------------|-----|------|-------|--------------|
| B10 | 1,0 | Sodium citrate tribasic dihydrate | 0,01 | Sodium borate     | 8,5 |      |       |              |
| B11 | 1,2 | Sodium citrate tribasic dihydrate | 0,01 | Sodium borate     | 8,5 |      |       |              |
| B12 | 1,5 | Sodium citrate tribasic dihydrate | 0,01 | Sodium borate     | 8,5 |      |       |              |
| C1  |     |                                   | 0,1  | Sodium HEPES      | 8,2 | 30   | % v/v | PEG 500 MME  |
| C2  |     |                                   | 0,1  | Sodium HEPES      | 8,2 | 40   | % v/v | PEG 500 MME  |
| C3  |     |                                   | 0,1  | Sodium HEPES      | 8,2 | 50   | % v/v | PEG 500 MME  |
| C4  |     |                                   | 0,1  | Sodium HEPES      | 8,2 | 60   | % v/v | PEG 500 MME  |
| C5  |     |                                   | 0,1  | Sodium HEPES      | 7,5 | 18   | % v/v | PEG 600      |
| C6  |     |                                   | 0,1  | Sodium HEPES      | 7,5 | 27   | % v/v | PEG 600      |
| C7  |     |                                   | 0,1  | Sodium HEPES      | 7,5 | 36   | % v/v | PEG 600      |
| C8  |     |                                   | 0,1  | Sodium HEPES      | 7,5 | 45   | % v/v | PEG 600      |
| C9  |     |                                   | 0,1  | Sodium cacodylate | 6,5 | 18   | % w/v | PEG 2000 MME |
| C10 |     |                                   | 0,1  | Sodium cacodylate | 6,5 | 27   | % w/v | PEG 2000 MME |
| C11 |     |                                   | 0,1  | Sodium cacodylate | 6,5 | 36   | % w/v | PEG 2000 MME |
| C12 |     |                                   | 0,1  | Sodium cacodylate | 6,5 | 45   | % w/v | PEG 2000 MME |
| D1  |     |                                   | 0,2  | Imidazole malate  | 6,0 | 8    | % w/v | PEG 4000     |
| D2  |     |                                   | 0,2  | Imidazole malate  | 6,0 | 15   | % w/v | PEG 4000     |
| D3  |     |                                   | 0,2  | Imidazole malate  | 6,0 | 20   | % w/v | PEG 4000     |
| D4  |     |                                   | 0,2  | Imidazole malate  | 6,0 | 30   | % w/v | PEG 4000     |
| D5  |     |                                   | 0,1  | Sodium acetate    | 5,5 | 12   | % w/v | PEG 5000 MME |
| D6  |     |                                   | 0,1  | Sodium acetate    | 5,5 | 18   | % w/v | PEG 5000 MME |
| D7  |     |                                   | 0,1  | Sodium acetate    | 5,5 | 24   | % w/v | PEG 5000 MME |
| D8  |     |                                   | 0,1  | Sodium acetate    | 5,5 | 36   | % w/v | PEG 5000 MME |
| D9  |     |                                   | 0,1  | Ammonium acetate  | 4,5 | 9    | % w/v | PEG 10,000   |
| D10 |     |                                   | 0,1  | Ammonium acetate  | 4,5 | 15   | % w/v | PEG 10,000   |
| D11 |     |                                   | 0,1  | Ammonium acetate  | 4,5 | 22,5 | % w/v | PEG 10,000   |
| D12 |     |                                   | 0,1  | Ammonium acetate  | 4,5 | 27   | % w/v | PEG 10,000   |

**Tabela 16: Continuação das várias soluções precipitantes de screen comercial de Stura FootPrint Combination (Molecular Dimensions) (69).**

| MacroSol Screen HT-96 |           |  |           |                           |           | Rows E1 – H12     |     |       |        | MD1-43        |               |               |
|-----------------------|-----------|--|-----------|---------------------------|-----------|-------------------|-----|-------|--------|---------------|---------------|---------------|
| Tube                  | Conc1 (M) | Salt1                                  | Conc2 (M) | Salt2                     | Conc3 (M) | Buffer3           | pH  | Conc4 | Units4 | Precipitant 4 | Conc5 (% v/v) | Precipitant 5 |
| E1                    | 0,02      | Calcium chloride dihydrate             |           |                           | 0,1       | Sodium acetate    | 4,5 | 10    | % v/v  | MPD           |               |               |
| E2                    | 0,02      | Calcium chloride dihydrate             |           |                           | 0,1       | Sodium acetate    | 4,5 | 20    | % v/v  | MPD           |               |               |
| E3                    |           |  |           |                           | 0,1       | Sodium acetate    | 4,5 | 30    | % v/v  | MPD           |               |               |
| E4                    | 0,02      | Calcium chloride dihydrate             |           |                           | 0,1       | Sodium acetate    | 4,5 | 30    | % v/v  | MPD           |               |               |
| E5                    | 0,1       | Sodium phosphate monobasic monohydrate | 1,0       | Sodium acetate trihydrate | 0,1       | Sodium cacodylate | 6,5 |       |        |               |               |               |
| E6                    | 0,1       | Sodium phosphate monobasic monohydrate | 1,4       | Sodium acetate trihydrate | 0,1       | Sodium cacodylate | 6,5 |       |        |               |               |               |
| E7                    | 0,1       | Sodium phosphate monobasic monohydrate | 1,7       | Sodium acetate trihydrate | 0,1       | Sodium cacodylate | 6,5 |       |        |               |               |               |
| E8                    |           |  | 1,7       | Sodium acetate trihydrate | 0,1       | Sodium cacodylate | 6,5 |       |        |               |               |               |
| E9                    | 0,2       | Ammonium acetate                       |           |                           | 0,1       | Sodium acetate    | 4,5 | 8     | % w/v  | PEG 3350      |               |               |
| E10                   | 0,2       | Ammonium acetate                       |           |                           | 0,1       | Sodium acetate    | 4,5 | 15    | % w/v  | PEG 3350      |               |               |
| E11                   | 0,2       | Ammonium acetate                       |           |                           | 0,1       | Sodium acetate    | 4,5 | 20    | % w/v  | PEG 3350      |               |               |
| E12                   | 0,2       | Ammonium acetate                       |           |                           | 0,1       | Sodium acetate    | 4,5 | 30    | % w/v  | PEG 3350      |               |               |

|     |      |                                |     |                  |     |    |       |            |  |
|-----|------|--------------------------------|-----|------------------|-----|----|-------|------------|--|
| F1  | 0,75 | Ammonium phosphate monobasic   | 0,1 | Sodium citrate   | 5,5 |    |       |            |  |
| F2  | 1,0  | Ammonium phosphate monobasic   | 0,1 | Sodium citrate   | 5,5 |    |       |            |  |
| F3  | 1,5  | Ammonium phosphate monobasic   | 0,1 | Sodium citrate   | 5,5 |    |       |            |  |
| F4  | 2,0  | Ammonium phosphate monobasic   | 0,1 | Sodium citrate   | 5,5 |    |       |            |  |
| F5  | 0,2  | Magnesium chloride hexahydrate | 0,1 | Sodium HEPES     | 7,5 | 10 | % v/v | 2-Propanol |  |
| F6  | 0,2  | Magnesium chloride hexahydrate | 0,1 | Sodium HEPES     | 7,5 | 15 | % v/v | 2-Propanol |  |
| F7  | 0,2  | Magnesium chloride hexahydrate | 0,1 | Sodium HEPES     | 7,5 | 20 | % v/v | 2-Propanol |  |
| F8  | 0,2  | Magnesium chloride hexahydrate | 0,1 | Sodium HEPES     | 7,5 | 30 | % v/v | 2-Propanol |  |
| F9  | 0,2  | Lithium sulfate                | 0,1 | Tris             | 8,5 | 16 | % w/v | PEG 3350   |  |
| F10 | 0,2  | Lithium sulfate                | 0,1 | Tris             | 8,5 | 25 | % w/v | PEG 3350   |  |
| F11 | 0,2  | Lithium sulfate                | 0,1 | Tris             | 8,5 | 30 | % w/v | PEG 3350   |  |
| F12 | 0,5  | Lithium sulfate                | 0,1 | Tris             | 8,5 | 25 | % w/v | PEG 3350   |  |
| G1  | 1,0  | Lithium sulfate                |     |                  |     | 2  | % w/v | PEG 8000   |  |
| G2  | 1,0  | Lithium sulfate                | 0,1 | Imidazole malate | 5,5 | 2  | % w/v | PEG 8000   |  |
| G3  | 1,0  | Lithium sulfate                | 0,1 | Imidazole malate | 6,5 | 2  | % w/v | PEG 8000   |  |

|     |     |                  |     |                  |     |    |       |          |    |            |
|-----|-----|------------------|-----|------------------|-----|----|-------|----------|----|------------|
| G4  | 1,0 | Lithium sulfate  | 0,1 | Imidazole malate | 7,5 | 2  | % w/v | PEG 8000 |    |            |
| G5  | 0,2 | Ammonium sulfate |     |                  |     | 12 | % w/v | PEG 8000 |    |            |
| G6  | 0,2 | Ammonium sulfate |     |                  |     | 18 | % w/v | PEG 8000 |    |            |
| G7  | 0,2 | Ammonium sulfate |     |                  |     | 24 | % w/v | PEG 8000 |    |            |
| G8  | 0,2 | Ammonium sulfate |     |                  |     | 30 | % w/v | PEG 8000 |    |            |
| G9  | 0,5 | Ammonium sulfate |     |                  |     | 10 | % w/v | PEG 4000 |    |            |
| G10 | 0,3 | Ammonium sulfate |     |                  |     | 20 | % w/v | PEG 4000 |    |            |
| G11 | 0,2 | Ammonium sulfate |     |                  |     | 30 | % w/v | PEG 4000 |    |            |
| G12 | 0,2 | Ammonium sulfate |     |                  |     | 36 | % w/v | PEG 4000 |    |            |
| H1  | 1,0 | Ammonium sulfate | 0,1 | Sodium HEPES     | 7,5 | 2  | % v/v | PEG 400  |    |            |
| H2  | 1,5 | Ammonium sulfate | 0,1 | Sodium HEPES     | 7,5 | 2  | % v/v | PEG 400  |    |            |
| H3  | 2,0 | Ammonium sulfate | 0,1 | Sodium HEPES     | 7,5 | 2  | % v/v | PEG 400  |    |            |
| H4  | 2,0 | Ammonium sulfate | 0,1 | Sodium HEPES     | 7,5 | 5  | % v/v | PEG 400  |    |            |
| H5  |     |                  | 0,1 | Sodium citrate   | 5,5 | 12 | % w/v | PEG 4000 | 5  | 2-Propanol |
| H6  |     |                  | 0,1 | Sodium citrate   | 5,5 | 16 | % w/v | PEG 4000 | 10 | 2-Propanol |

|     |       |                        |     |                   |     |    |       |          |    |            |
|-----|-------|------------------------|-----|-------------------|-----|----|-------|----------|----|------------|
| H7  |       |                        | 0,1 | Sodium citrate    | 5,5 | 20 | % w/v | PEG 4000 | 15 | 2-Propanol |
| H8  |       |                        | 0,1 | Sodium citrate    | 5,5 | 20 | % w/v | PEG 4000 | 20 | 2-Propanol |
| H9  | 0,005 | Zinc acetate dihydrate | 0,1 | Sodium cacodylate | 6,5 | 9  | % w/v | PEG 8000 |    |            |
| H10 | 0,005 | Zinc acetate dihydrate | 0,1 | Sodium cacodylate | 6,5 | 12 | % w/v | PEG 8000 |    |            |
| H11 | 0,005 | Zinc acetate dihydrate | 0,1 | Sodium cacodylate | 6,5 | 18 | % w/v | PEG 8000 |    |            |
| H12 | 0,005 | Zinc acetate dihydrate | 0,1 | Sodium cacodylate | 6,5 | 24 | % w/v | PEG 8000 |    |            |

➤ **Soluções precipitantes de screen comercial JCSG-*plus* (Molecular Dimensions para os ensaios de cristalização dos cinco variantes em estudo**

Tabela 17: Várias soluções precipitantes de screen comercial de JCSG-*plus* (Molecular Dimensions) (70).

| JCSG- <i>plus</i> |        |                              | Conditions 1-48 (Box 1) |                   |     | MD1-37   |             |
|-------------------|--------|------------------------------|-------------------------|-------------------|-----|----------|-------------|
| Tube              | Conc.  | Salt                         | Conc.                   | Buffer            | pH  | Conc.    | Precipitant |
| 1-1               | 0,2 M  | Lithium sulfate              | 0,1 M                   | Sodium acetate    | 4,5 | 50 % w/v | PEG 400     |
| 1-2               |        | None                         | 0,1 M                   | Sodium citrate    | 5,5 | 20 % w/v | PEG 3000    |
| 1-3               | 0,2 M  | Ammonium citrate dibasic     |                         | None              | -   | 20 % w/v | PEG 3350    |
| 1-4               | 0,02 M | Calcium chloride dihydrate   | 0,1 M                   | Sodium acetate    | 4,6 | 30 % v/v | MPD         |
| 1-5               | 0,2 M  | Magnesium formate dihydrate  |                         | None              | -   | 20 % w/v | PEG 3350    |
| 1-6               | 0,2 M  | Lithium sulfate              | 0,1 M                   | Phosphate/citrate | 4,2 | 20 % w/v | PEG 1000    |
| 1-7               |        | None                         | 0,1 M                   | CHES              | 9,5 | 20 % w/v | PEG 8000    |
| 1-8               | 0,2 M  | Ammonium formate             |                         | None              | -   | 20 % w/v | PEG 3350    |
| 1-9               | 0,2 M  | Ammonium chloride            |                         | None              | -   | 20 % w/v | PEG 3350    |
| 1-10              | 0,2 M  | Potassium formate            |                         | None              | -   | 20 % w/v | PEG 3350    |
| 1-11              | 0,2 M  | Ammonium phosphate monobasic | 0,1 M                   | Tris              | 8,5 | 50 % v/v | MPD         |
| 1-12              | 0,2 M  | Potassium nitrate            |                         | None              | -   | 20 % w/v | PEG 3350    |
| 1-13              | 0,8 M  | Ammonium sulfate             | 0,1 M                   | Citrate           | 4,0 |          | None        |
| 1-14              | 0,2 M  | Sodium thiocyanate           |                         | None              | -   | 20 % w/v | PEG 3350    |
| 1-15              |        | None                         | 0,1 M                   | BICINE            | 9,0 | 20 % w/v | PEG 6000    |
| 1-16              |        | None                         | 0,1 M                   | HEPES             | 7,5 | 10 % w/v | PEG 8000    |
| 1-17              |        | None                         | 0,1 M                   | Sodium cacodylate | 6,5 | 40 % v/v | MPD         |
|                   |        |                              |                         |                   |     | 5 % w/v  | PEG 8000    |
| 1-18              |        | None                         | 0,1 M                   | Phosphate/citrate | 4,2 | 40 % v/v | Ethanol     |
|                   |        |                              |                         |                   |     | 5 % w/v  | PEG 1000    |

|      |     |   |  |     |   |                            |     |    |       |                 |
|------|-----|---|--|-----|---|----------------------------|-----|----|-------|-----------------|
| 1-19 |     |   | None                                   | 0,1 | M | Sodium acetate             | 4,6 | 8  | % w/v | PEG 4000        |
| 1-20 | 0,2 | M | Magnesium chloride hexahydrate         | 0,1 | M | Tris                       | 7,0 | 10 | % w/v | PEG 8000        |
| 1-21 |     |   | None                                   | 0,1 | M | Citrate                    | 5,0 | 20 | % w/v | PEG 6000        |
| 1-22 | 0,2 | M | Magnesium chloride hexahydrate         | 0,1 | M | Sodium cacodylate          | 6,5 | 50 | % v/v | PEG 200         |
| 1-23 | 1,6 | M | Sodium citrate tribasic dihydrate      |     |   | None                       | 6,5 |    |       | None            |
| 1-24 | 0,2 | M | Potassium citrate tribasic monohydrate |     |   | None                       | -   | 20 | % w/v | PEG 3350        |
| 1-25 | 0,2 | M | Sodium chloride                        | 0,1 | M | Phosphate/citrate          | 4,2 | 20 | % w/v | PEG 8000        |
| 1-26 | 1,0 | M | Lithium chloride                       | 0,1 | M | Citrate                    | 4,0 | 20 | % w/v | PEG 6000        |
| 1-27 | 0,2 | M | Ammonium nitrate                       |     |   | None                       | -   | 20 | % w/v | PEG 3350        |
| 1-28 |     |   | None                                   | 0,1 | M | HEPES                      | 7,0 | 10 | % w/v | PEG 6000        |
| 1-29 | 0,8 | M | Sodium phosphate monobasic monohydrate | 0,1 | M | Sodium HEPES               | 7,5 |    |       | None            |
|      | 0,8 | M | Potassium phosphate monobasic          |     |   |                            |     |    |       |                 |
| 1-30 |     |   | None                                   | 0,1 | M | Phosphate/citrate          | 4,2 | 40 | % v/v | PEG 300         |
| 1-31 | 0,2 | M | Zinc acetate dihydrate                 | 0,1 | M | Sodium acetate             | 4,5 | 10 | % w/v | PEG 3000        |
| 1-32 |     |   | None                                   | 0,1 | M | Tris                       | 8,5 | 20 | % v/v | Ethanol         |
| 1-33 |     |   | None                                   | 0,1 | M | Sodium/potassium phosphate | 6,2 | 25 | % v/v | 1,2-Propanediol |
|      |     |   |  |     |   |                            |     | 10 | %v/v  | Glycerol        |
| 1-34 |     |   | None                                   | 0,1 | M | BICINE                     | 9,0 | 10 | % w/v | PEG 20,000      |
|      |     |   |  |     |   |                            |     | 2  | % v/v | 1,4-Dioxane     |
| 1-35 | 2,0 | M | Ammonium sulfate                       | 0,1 | M | Sodium acetate             | 4,6 |    |       | None            |
| 1-36 |     |   | None                                   |     |   | None                       | -   | 10 | % w/v | PEG 1000        |
|      |     |   |  |     |   |                            |     | 10 | % w/v | PEG 8000        |
| 1-37 |     |   | None                                   |     |   | None                       | -   | 24 | % w/v | PEG 1500        |
|      |     |   |  |     |   |                            |     | 20 | % v/v | Glycerol        |
| 1-38 | 0,2 | M | Magnesium chloride hexahydrate         | 0,1 | M | Sodium HEPES               | 7,5 | 30 | % v/v | PEG 400         |
| 1-39 | 0,2 | M | Sodium chloride                        | 0,1 | M | Sodium/potassium phosphate | 6,2 | 50 | % v/v | PEG 200         |
| 1-40 | 0,2 | M | Lithium sulfate                        | 0,1 | M | Sodium acetate             | 4,5 | 30 | % w/v | PEG 8000        |
| 1-41 |     |   | None                                   | 0,1 | M | HEPES                      | 7,5 | 70 | % v/v | MPD             |

|      |      |   |                                   |      |   |                   |      |      |       |                  |
|------|------|---|-----------------------------------|------|---|-------------------|------|------|-------|------------------|
| 1-42 | 0,2  | M | Magnesium chloride hexahydrate    | 0,1  | M | Tris              | 8,5  | 20   | % w/v | PEG 8000         |
| 1-43 | 0,2  | M | Lithium sulfate                   | 0,1  | M | Tris              | 8,5  | 40   | % v/v | PEG 400          |
| 1-44 |      |   | None                              | 0,1  | M | Tris              | 8,0  | 40   | % v/v | MPD              |
| 1-45 | 0,17 | M | Ammonium sulfate                  |      |   | None              | -    | 25,5 | % w/v | PEG 4000         |
|      |      |   |                                   |      |   |                   |      | 15   | % v/v | Glycerol         |
| 1-46 | 0,2  | M | Calcium acetate hydrate           | 0,1  | M | Sodium cacodylate | 6,5  | 40   | % v/v | PEG 300          |
| 1-47 | 0,14 | M | Calcium chloride dihydrate        | 0,07 | M | Sodium acetate    | 4,6  | 14   | % v/v | 2-Propanol       |
|      |      |   |                                   |      |   |                   |      | 30   | % v/v | Glycerol         |
| 1-48 | 0,04 | M | Potassium phosphate monobasic     |      |   | None              | -    | 16   | % w/v | PEG 8000         |
|      |      |   |                                   |      |   |                   |      | 20   | % v/v | Glycerol         |
| 2-1  | 1,0  | M | Sodium citrate tribasic dihydrate | 0,1  | M | Sodium cacodylate | 6,5  |      |       | None             |
| 2-2  | 2,0  | M | Ammonium sulfate                  | 0,1  | M | Sodium cacodylate | 6,5  |      |       | None             |
|      | 0,2  | M | Sodium chloride                   |      |   |                   |      |      |       |                  |
| 2-3  | 0,2  | M | Sodium chloride                   | 0,1  | M | HEPES             | 7,5  | 10   | % v/v | 2-Propanol       |
| 2-4  | 1,26 | M | Ammonium sulfate                  | 0,1  | M | Tris              | 8,5  |      |       | None             |
|      | 0,2  | M | Lithium sulfate                   |      |   |                   |      |      |       |                  |
| 2-5  |      |   | None                              | 0,1  | M | CAPS              | 10,5 | 40   | % v/v | MPD              |
| 2-6  | 0,2  | M | Zinc acetate dihydrate            | 0,1  | M | Imidazole         | 8,0  | 20   | % w/v | PEG 3000         |
| 2-7  | 0,2  | M | Zinc acetate dihydrate            | 0,1  | M | Sodium cacodylate | 6,5  | 10   | % v/v | 2-Propanol       |
| 2-8  | 1,0  | M | Ammonium phosphate dibasic        | 0,1  | M | Sodium acetate    | 4,5  |      |       | None             |
| 2-9  | 1,6  | M | Magnesium sulfate heptahydrate    | 0,1  | M | MES               | 6,5  |      |       | None             |
| 2-10 |      |   | None                              | 0,1  | M | BICINE            | 9,0  | 10   | % w/v | PEG 6000         |
| 2-11 | 0,16 | M | Calcium acetate hydrate           | 0,08 | M | Sodium cacodylate | 6,5  | 14,4 | % w/v | PEG 8000         |
|      |      |   |                                   |      |   |                   |      | 20   | % v/v | Glycerol         |
| 2-12 |      |   | None                              | 0,1  | M | Imidazole         | 8,0  | 10   | % w/v | PEG 8000         |
| 2-13 | 0,05 | M | Cesium chloride                   | 0,1  | M | MES               | 6,5  | 30   | % v/v | Jeffamine® M-600 |
| 2-14 | 3,2  | M | Ammonium sulfate                  | 0,1  | M | Citrate           | 5,0  |      |       | None             |
| 2-15 |      |   | None                              | 0,1  | M | Tris              | 8,0  | 20   | % v/v | MPD              |

|      |       |   |                                     |     |   |          |     |     |       |                                     |
|------|-------|---|-------------------------------------|-----|---|----------|-----|-----|-------|-------------------------------------|
| 2-16 |       |   | None                                | 0,1 | M | HEPES    | 7,5 | 20  | % v/v | Jeffamine® M-600                    |
| 2-17 | 0,2   | M | Magnesium chloride hexahydrate      | 0,1 | M | Tris     | 8,5 | 50  | % v/v | Ethylene glycol                     |
| 2-18 |       |   | None                                | 0,1 | M | BICINE   | 9,0 | 10  | % v/v | MPD                                 |
| 2-19 | 0,8   | M | Succinic acid                       |     |   | None     | 7,0 |     |       | None                                |
| 2-20 | 2,1   | M | DL-Malic acid                       |     |   | None     | 7,0 |     |       | None                                |
| 2-21 | 2,4   | M | Sodium malonate dibasic monohydrate |     |   | None     | 7,0 |     |       | None                                |
| 2-22 | 1,1   | M | Sodium malonate dibasic monohydrate | 0,1 | M | HEPES    | 7,0 | 0,5 | % v/v | Jeffamine® ED-2003                  |
| 2-23 | 1,0   | M | Succinic acid                       | 0,1 | M | HEPES    | 7,0 | 1   | % w/v | PEG 2000 MME                        |
| 2-24 |       |   | None                                | 0,1 | M | HEPES    | 7,0 | 30  | % v/v | Jeffamine® M-600                    |
| 2-25 |       |   | None                                | 0,1 | M | HEPES    | 7,0 | 30  | % v/v | Jeffamine® ED-2003                  |
| 2-26 | 0,02  | M | Magnesium chloride hexahydrate      | 0,1 | M | HEPES    | 7,5 | 22  | % w/v | Poly(acrylic acid sodium salt) 5100 |
| 2-27 | 0,01  | M | Cobalt(II) chloride hexahydrate     | 0,1 | M | Tris     | 8,5 | 20  | % w/v | Polyvinylpyrrolidone                |
| 2-28 | 0,2   | M | TMAO                                | 0,1 | M | Tris     | 8,5 | 20  | % w/v | PEG 2000 MME                        |
| 2-29 | 0,005 | M | Cobalt(II) chloride hexahydrate     | 0,1 | M | HEPES    | 7,5 | 12  | % w/v | PEG 3350                            |
|      | 0,005 | M | Cadmium chloride hemi(pentahydrate) |     |   |          |     |     |       |                                     |
|      | 0,005 | M | Magnesium chloride hexahydrate      |     |   |          |     |     |       |                                     |
|      | 0,005 | M | Nickel(II) chloride hexahydrate     |     |   |          |     |     |       |                                     |
| 2-30 | 0,2   | M | Sodium malonate dibasic monohydrate |     |   | None     | -   | 20  | % w/v | PEG 3350                            |
| 2-31 | 0,1   | M | Succinic acid                       |     |   | None     | -   | 15  | % w/v | PEG 3350                            |
| 2-32 | 0,15  | M | DL-Malic acid                       |     |   | None     | -   | 20  | % w/v | PEG 3350                            |
| 2-33 | 0,1   | M | Potassium thiocyanate               |     |   | None     | -   | 30  | % w/v | PEG 2000 MME                        |
| 2-34 | 0,15  | M | Potassium bromide                   |     |   | None     | -   | 30  | % w/v | PEG 2000 MME                        |
| 2-35 | 2,0   | M | Ammonium sulfate                    | 0,1 | M | Bis-Tris | 5,5 |     |       | None                                |
| 2-36 | 3,0   | M | Sodium chloride                     | 0,1 | M | Bis-Tris | 5,5 |     |       | None                                |
| 2-37 | 0,3   | M | Magnesium formate dihydrate         | 0,1 | M | Bis-Tris | 5,5 |     |       | None                                |
| 2-38 | 1,0   | M | Ammonium sulfate                    | 0,1 | M | Bis-Tris | 5,5 | 1   | % w/v | PEG 3350                            |
| 2-39 |       |   | None                                | 0,1 | M | Bis-Tris | 5,5 | 25  | % w/v | PEG 3350                            |
| 2-40 | 0,2   | M | Calcium chloride dihydrate          | 0,1 | M | Bis-Tris | 5,5 | 45  | % v/v | MPD                                 |

|      |     |   |                                |     |   |          |     |    |       |            |
|------|-----|---|--------------------------------|-----|---|----------|-----|----|-------|------------|
| 2-41 | 0,2 | M | Ammonium acetate               | 0,1 | M | Bis-Tris | 5,5 | 45 | % v/v | MPD        |
| 2-42 | 0,1 | M | Ammonium acetate               | 0,1 | M | Bis-Tris | 5,5 | 17 | % w/v | PEG 10,000 |
| 2-43 | 0,2 | M | Ammonium sulfate               | 0,1 | M | Bis-Tris | 5,5 | 25 | % w/v | PEG 3350   |
| 2-44 | 0,2 | M | Sodium chloride                | 0,1 | M | Bis-Tris | 5,5 | 25 | % w/v | PEG 3350   |
| 2-45 | 0,2 | M | Lithium sulfate                | 0,1 | M | Bis-Tris | 5,5 | 25 | % w/v | PEG 3350   |
| 2-46 | 0,2 | M | Ammonium acetate               | 0,1 | M | Bis-Tris | 5,5 | 25 | % w/v | PEG 3350   |
| 2-47 | 0,2 | M | Magnesium chloride hexahydrate | 0,1 | M | Bis-Tris | 5,5 | 25 | % w/v | PEG 3350   |
| 2-48 | 0,2 | M | Ammonium acetate               | 0,1 | M | HEPES    | 7,5 | 45 | % v/v | MPD        |