LINICAME

ANGELA MARIA FALA

"Expressão e purificação heteróloga do fator de transcrição induzido por hipóxia HIF-1 humano visando estudos estruturais e bioquímicos e estudos estruturais das prolil-hidroxilases (PHDs) humanas, isoformas 1 e 3, em complexo com inibidores"

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ANGELA MARIA FALA

"Expressão e purificação heteróloga do fator de transcrição induzido por hipóxia HIF-1 humano visando estudos estruturais e bioquímicos e estudos estruturais das prolil-hidroxilases (PHDs) humanas, isoformas 1 e 3, em complexo com inibidores"

Orientador: Dr. Andre Luis Berteli Ambrósio

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestra em Ciências, na área de concentração Clínica Médica.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Angela Maria Fala e orientada pelo Dr. André Luis Berteli Ambrósio

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Fala, Angela Maria, 1983-

F18m

Expressão e purificação heteróloga do fator de transcrição induzido por hipóxia HIF-1 humano visando estudos estruturais e bioquímicos e estudos estruturais das prolil-hidroxilases (PHDs) humanas, isoformas 1 e 3, em complexo com inibidores / Angela Maria Fala. — Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Andre Luís Berteli Ambrósio.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fator 1 induzível por hipóxia. 2. Prolina hidroxilase. 3. Fluorescência anisotrópica. I. Ambrósio, Andre Luís Berteli. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Heterologous expression and purification of the hypoxia-induced factor HIF-1 human aiming structural and biochemical studies and structural studies of prolylhydroxylases (PHDs) human, isoforms 1 and 3, in complex with inhibitors

Palavras-chave em inglês:

Hypoxia-inducible factor 1 Prolyl hydroxylase domain Fluorescence polarization

Área de concentração: Clínica Médica **Titulação:** Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Andre Luís Berteli Ambrósio [Orientador]

Artur Torres Cordeiro Humberto D'Muniz Pereira **Data de defesa:** 27-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ANGELA MARIA	FALA
Drientador (a) PROF(A). DR(A). ANDRÉ LUIS BERTEI	LI AMBRÓSIO
MEMBROS:	
	. 0
1. PROF(A). DR(A). ANDRÉ LUIS BERTELLI AMBRÓSIO	ANDRE AM.
2. PROF(A). DR(A). ARTUR TORRES COREDEIRO	Andmit. Lashif
3. PROF(A). DR(A). HUMBERTO D'MUNIZ PEREIRA	
Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica Universidade Estadual de Campinas	a da Faculdade de Ciências Médicas d
Data: 27 de agosto de 2013	

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Andre, pela oportunidade, confiança, paciência e ensinamentos que contribuíram no enriquecimento dos meus conhecimentos científicos.

À Dra. Sandra M. Dias, pelos ensinamentos, dicas e idéias.

À Dra. Grazyna Kochan pela orientação no SGC, ensinamentos, paciência, por compartilhar sua experiência e pela amizade.

Aos pesquisadores, técnicos, funcionários e pós-graduandos do SGC, em especial ao Biotech Group e ao Dr. Wyatt Yue, por terem me recebido com tanto carinho, atenção e paciência.

À Dra. Juliana Ferreira, pela amizade e ajuda no desenvolvimento deste projeto que com certeza fizeram a diferença.

Aos amigos Patrick, Igor, Alexandre, Emerson e Carol pela sincera amizade, troca de experiências, pelos momentos de descontração e paciência em ouvir todas as dúvidas e cada nova idéia que surgiu.

Às amigas Melissa e Maruska pelas dicas durante todas os "apresentações".

Aos amigos, pós-graduandos e alunos do DPC-32, LNBio e Unicamp pela amizade, ajuda e descontração durante estes anos, em especial a Patrícia, Américo e Gustavo Mercaldi.

Ao corpo técnico dos laboratórios do LNBio (Alessandra Girasole (DPC-32), Jaque (LPP), Teresa (LBE), Gi e Celisa (Robolab)) pelo pronto atendimento e disposição em ajudar sempre.

Aos meus pais e familiares pelo apoio, carinho e cuidados ofertados!

À FAPESP pelo suporte financeiro (processo Mestrado 2010/13739-6 e BEPE-Mestrado 2012/05997-0) para o desenvolvimento destes projetos aqui apresentados.

Ao LNBio e ao CNPEM, pela oportunidade e apoio institucional.

Resumo

A adaptação das células cancerosas ao microambiente é o ponto central que leva ao fenótipo invasivo e metastático, e é garantida principalmente através do controle preciso da expressão gênica. A resposta às necessidades energéticas e biossintéticas e principalmente à disponibilidade de oxigênio intracelular, por exemplo, é em grande parte mediada pelo fator de transcrição induzido por hipóxia 1 (HIF-1). HIF-1 é um heterodímero composto pelas subunidades α e β, que respondem a sequência consenso (5´-RCGTG-3´) e ativam a transcrição de mais de 100 genes envolvidos em diversos aspectos cruciais da biologia tumoral, incluindo angiogênese, metabolismo de glicose, diferenciação celular, apoptose e resistência a radio e quimioterapias. São conhecidas três isoformas da subunidade α (1 a 3) e todas se heterodimerizam com a subunidade β. No geral, HIFs são constituídas de diferentes domínios funcionais, como de ligação ao DNA, de heterodimerização, transativação e degradação. Atualmente, pouco se sabe sobre os mecanismos estruturais e funcionais dos domínios da HIF-1, deste modo este trabalho objetivou o estudo estrutural destes domínios. Os domínios bHLH, Pas-1 e Pac de HIF-1α e HIF-β em diferentes combinações entre si e o domínio Pac da HIF-3α foram clonados, as proteínas foram expressas em sistema bacteriano e purificadas por diferentes técnicas cromatográficas. Diversas destas construções se mostraram insolúveis ou suscetíveis a degradação, enquanto outras foram purificadas com sucesso. As construções Pac, um exemplo de sucesso na produção, foram submetidas a ensaios de anisotropia de fluorescência e ressonância magnética nuclear, o que nos permitiu a caracterização dos perfis de interação entre as várias combinações de heterodimerização. Neste contexto, os resultados mostram que o equilíbrio dinâmico da interação entre Pac-1α com a subunidade -1β é alcançado imediatamente, enquanto que para a interação entre Pac-3α e -1β, são necessários pelo menos 30 horas de incubação. O mesmo pode ser extraído da caracterização da interação direta entre Pac-1α e Pac-3α. Nos experimentos de RMN, foi possível identificar a região de interação entre as subunidades -1α e -3α com a subunidade β , separadamente. Ambas as subunidades α interagem com a Pac-1ß na região das fitas-beta 1 e 5 e no loop entre as fitas 4 e 5. Em conjunto, estes resultados impactam no mecanismo de antagonização de HIF-3α na atividade transcricional de HIF-1α. Houve ainda a formação de monocristais da subunidade Pac-3α, que foram submetidos a experimentos preliminares de difração de raios X, que apesar de resultar em dados anisotrópicos e insuficientes para resolução estrutural, permitiram a caracterização dos parâmetros cristalinos, incluindo a presença de um alto conteúdo de solvente. Adicionalmente, são também apresentados os resultados obtidos visando a expressão e cristalização das Prolilhidroxilases (PHDs) isoformas 1 a 4, durante estágio de seis meses no Structural Genomics Consortium (SGC), da Universidade de Oxford, na Inglaterra. Foram expressas de maneira solúvel e purificadas, diversas construções das isoformas 1 e 3 das PHDs humanas. Cristais foram obtidos, porém estes foram determinados como sendo de compostos inorgânicos presentes na condição de cristalização. Como resultado final, está sendo estabelecida uma colaboração entre o nosso grupo e o SGC para que os estudos estruturais com PHDs se estendam e sejam realizados em nosso laboratório aqui no Brasil.

Abstract

The adaptation process of cancer cells to the microenvironment is the central point leading to the invasive and metastatic phenotypes, and is guaranteed mainly through the precise control of gene expression. The cell response to the energetic and biosynthetic needs and especially to the availability of intracellular oxygen is mediated by the hypoxia inducible transcription factor 1, or HIF-1. HIF-1 functions as a heterodimer composed by subunits α and β, binding to responsive elements with the consensus sequence 5'-RCGTG-3', thus activating the transcription of more than 100 genes involved in many crucial aspects of tumor biology, including angiogenesis, metabolism glucose, cell differentiation, apoptosis, and resistance to radiotherapy and chemotherapy. There are three known isoforms of the α subunit (1, 2 and 3) and all heterodimerize with the β subunit. HIFs are composed of different functional domains, such as the DNA binding domain, the heterodimerization, transactivation and the oxygen-dependent degradation domains. Currently, little is known about the mechanisms of structural and functional domains of HIF-1, thus this work was to study these structural domains. The domain (bHLH, Pas-1 and Pac) of HIF-1α and HIF-β in different combinations with each other and Pac domain of HIF-3α were cloned, the proteins were expressed in bacterial system and purified by various chromatographic techniques. Several of these constructs proved insoluble or susceptible to degradation, while others were purified successfully. The constructs Pac, an example of success in production, were tested for fluorescence anisotropy and nuclear magnetic resonance, which allowed us to characterize the profiles of the interaction between the various combinations of heterodimers. In this context, the results show that the dynamic equilibrium of the interaction between the Pac-1α and -1β subunits is achieved immediately, whereas for the interaction between Pac- 3α and -1 β , it takes at least 30 hours of incubation. The same can be observed from the characterization of direct interaction between Pac-1α and -3α. From the NMR experiments, it was possible to identify the region of interaction between the subunits -1α and -3α with the -1β subunit. Both α subunits interact with Pac-1 β via betastrands 1 and 5 and the loop between the strands 4 and 5. Overall, these results impact in the mechanism of HIF- 3α antagonizing the transcriptional activity of HIF- 1α . We also obtained single crystals for Pac-3a subunit, which were subjected to preliminary experiments of X-ray diffraction. Although resulting in anisotropic, insufficient data for and structural resolution, it has allowed the characterization of crystalline parameters, including the presence of a high solvent content. Additionally, we also present the results targeting the expression and crystallization of Prolyl-hydroxylases (PHDs) human isoforms 1-4, during the six-month period at the Structural Genomics Consortium (SGC), the University of Oxford in England. Several construct from of isoforms 1 and 3 were successfully expressed and purified in the soluble form. Likewise, crystals were obtained, but these were determined to be composed by inorganic compounds present in the crystallization conditions. At the end, a collaboration was established between our and the

SGC group for the structural studies with the PHDs to extend and carry out the experiments in our lab here in Brazil.	

Sumário

Lista de Figuras	xxiii
Lista de Tabelas	xxix
Lista de Abreviações	xxxi
1. Contextualização da pesquisa	
1.1. A adaptação metabólica tumoral	
1.2. As isoformas da HIF e suas arquiteturas moleculares	
1.3. HIF, regulação pós-traducional e Prolil-hidroxilases	44
2. Parte I: HIF	49
2.1. Objetivo geral	49
2.1.2. Objetivos Específicos	49
2.2 Materiais e Métodos - HIF	50
2.2.1. Clonagem e manipulação de genes	50
2.2.2. Subclonagem dos domínios funcionais	51
2.2.3. Testes de expressão heteróloga em sistema bacteria	no 53
2.2.4. Expressão em larga escala	54
2.2.5. Purificação de proteínas	55
2.2.6. Western Blotting	58
2.2.7. Eletroforese em Gel Nativo	59
2.3. Resultados e Discussão - HIF	60
2.3.1. Combinação de domínios funcionais	60
2.3.1. Domínios individuais: bHLH-1 α e bHLH-1 β	67
2.3.3. Domínios individuais: Pas1-1α e Pas1-1β	71
2.3.4. Domínios individuais: Pac-1α, Pac-3α e Pac-β	80
3. Parte II: Ensaios de interação entre os domínios Pac	85
3.1. Objetivos	85
3.1.1. Objetivos Específicos	86
3.2. Materiais e Métodos	86
3.2.1. Anisotropia de Fluorescência	86
3.2.2. Ensaio de Ressonância Magnética Nuclear	91

3.2.3. Ensaio de Cristalização	93
3.3. Resultados e Discussão	94
3.3.1. Anisotropia de Fluorescência	94
3.3.2. Ressonância Magnética Nuclear	101
3.3.3. Ensaio de cristalização da Pac-3α	107
3.4 Conclusão - Ensaios de interação entre os domínios Pac	110
4. Parte IV: Prolil-hidroxilases - PHDs	111
4.1. Objetivos	111
4.1.1. Objetivos específicos	111
4.2. Materiais e Métodos	112
4.2.1. Amplificação dos genes	112
4.2.2. Clonagem em vetores pFastBac	113
4.2.3. Recombinação e transformação	114
4.2.4. Produção do Bacmideo recombinante	115
4.2.5. Transfecção e produção das partículas virais	116
4.2.6. Ampliação viral, teste de expressão e solubilidade	117
4.2.7. Expressão em larga escala	119
4.2.8. Etapas de Purificação	119
4.2.9. Ensaios de Cristalização	121
4.3. Resultados e Discussões	122
4.3.1. Amplificação dos genes	122
4.3.2. Clonagem	122
4.3.3. Recombinação e Transfecção	124
4.3.4. Testes de expressão e solubilidade	124
4.3.5. Purificações das proteínas selecionadas	126
4.3.6. Ensaios de Cristalização	131
4.4. Conclusão – Prolil-hidroxilases	132
5. Conclusões gerais e perspectivas	133
6. Referências	135
7 Anexos	139

ANEXO 1: Lista de primers utilizados na clonagem das HIFs e temperatura de melting	
	139
ANEXO 2: Lista dos clones gerados para as PHDs, posição na placa e caracterís	sticas das
construções	140



Lista de Figuras

Figura 1 – Mecanismo de regulação da HIF-1α e sua atividade.	39
Figura 2. Representação esquemática da estrutura dos domínios que constituem HIF-la humano.	1-3α 41
Figura 3. Representação esquemática dos domínios que constituem HIF- 3α e suas	
variantes por splicing.	43
Figura 4. Representação das estruturas tridimensionais da HIF reportadas até o mome	ento. 44
Figura 5. Representação esquemática da arquitetura das PHDs 1-4.	45
Figura 6 . Representação da estrutura PHD2.	47
Figura 7. Posição dos clones gerados em relação à arquitetura básica da HIF.	51
Figura 8. Teste de expressão dos clones $\Delta NPas2-1\alpha$ e $\Delta NPas2-1\beta$.	61
Figura 9. Purificação por afinidade das proteínas $\Delta NPas2-1\alpha$ e -1β .	62
Figura 10. Teste de expressão das proteínas M1Pas2-1 α e $-\beta$.	63
Figura 11. Teste de purificação por afinidade das proteínas M1Pas- 2α e $-\beta$.	64
Figura 12. Teste de expressão e purificação das proteínas M1Pas- 1α e -1β .	66
Figura 13. Teste de expressão e purificação das proteínas bHLH-1α e bHLH-1β.	68
Figura 14 . Cromatografia por exclusão molecular bHLH- 1α e bHLH- 1β	69
Figura 15 . Eletroforese em gel nativo da bHLH-1α incubada com bHLH-1β.	70
Figura 16. Expressão e purificação das proteínas Pas1.	72
Figura 17. Afinidade reversa da Pas1.	73
Figura 18 . Purificação por troca iônica das proteínas Pas1-1α e -1β.	74



Figura 19 . Gradiente segmentado na troca iônica da Pas1-1β.	75
Figura 20. Purificação por interação hidrofóbica das proteínas Pas $1-1\alpha$ e -1β .	76
Figura 21. Perfil de eluição das proteínas Pas-1αe Pas-1β durante a purificação por exclusão molecular.	77
Figura 22. Gel Tricina das frações eluídas na cromatografia por exclusão de tamanho (Pas1-1 α e -1 β).	77
Figura 23. Análise da estrutura secundária do domínio Pas-1α.	79
Figura 24. Resumo das etapas de purificação da proteína Pac-1α.	81
Figura 25. Resumo das etapas de purificação da proteína Pac-3α.	82
Figura 26. Resumo das etapas de purificação da proteína Pac-1β.	83
Figura 27. Representação esquemática da anisotropia de fluorescência.	87
Figura 28 . Representação esquemática da diferença na anisotropia de fluorescência e moléculas pequenas e complexos formados	entre 88
Figura 29. Anisotropia de fluorescência de 20 nM de Pac-1 β -FITC incubadas com at μ M Pac-1 α .	eé 230 95
Figura 30. Anisotropia de fluorescência de 20 nM de Pac-1β-FITC incubadas até 230 Pac-3α.	95
Figura 31. Curva de comparação do alcance do equilíbrio dinâmico.	96
Figura 32. Estrutura cristalográfica do complexo Pac-2α-Pac-1β (PDB ID 3f1p).	98
Figura 33. Curva de alcance do equilíbrio dinâmico.	100
Figura 34. Sobreposição dos espectros de ¹⁵ N-HSQC.	101
Figura 35. Gráfico do deslocamento químico dos picos da Pac-1β quando titu proteína Pac-1α.	ilada a



Figura 36. Gráfico da intensidade dos picos da Pac-1β monitoradas durante a titulaçã	ăo da
Pac-1α.	104
Figura 37. Gráfico do deslocamento químico dos picos da Pac-1β quando titula proteína Pac-3α.	ida a 105
Figura 38. Gráfico da intensidade dos picos da Pac-1 β monitoradas durante a titulação Pac-3 α .	da 106
Figura 39. Estrutura cristalográfica do complexo Pac-1α-Pac-β (PDB ID 4h6j)	107
Figura 40 . Cristais da Pac-3α obtidos nas condições iniciais de screening e nas condições de refinamento.	ões 108
Figura 41 . Gel de agarose 1% corado com SYBR dos genes amplificados das enzimas PHD.	122
Figura 42. Gel de agarose 1.5% corado com SYBR do screening por PCR das enzimas PHD.	123
Figura 43. Ensaio de solubilidade das PHDs em 4 mL de cultura.	124
Figura 44. Teste de solubilidade das PHDs em 50 mL de cultura.	126
Figura 45. Purificação por afinidade dos clones C7, D10 e H11.	127
Figura 46. Purificação da proteína C7 por troca aniônica.	128
Figura 47. Purificação da proteína H11 por troca catiônica.	129
Figura 48. Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular da proteína D1	0. 130
Figura 49 : Cristais formados para a construção H11.	131



Lista de Tabelas

Tabela 1: Construções geradas a partir dos domínios funcionais de interesse	e da HIF-1(α e
β) e HIF-3α	52
Tabela 2: Descrição das titulações realizadas no ensaio de RMN	93
Tabela 3: Constantes de dissociação (kd) e tempo para as curvas de interação	o entre Pac-1α
e Pac-3α quando tituladas em 20 nM de Pac-1β	96

Lista de Abreviações

°C – Grau Celsius

BMRB – Biological Magnetic Ressonance Data Bank, ou Banco de dados para RMN

BSA – Bovine serum albumin, ou albumina de soro bovino

dCPT – *Deoxycytidine triphosphate*

dGTP – *Deoxyguanosine triphosphate*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DOC - Sodium Deoxycholate, ou Deoxicolado de sódio

DTT – Ditiotreitol

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acétic

FBS – Fetal bovine serum, ou soro fetal bovino

FDG-PET – <u>Fluordeoxyglucose Positron Emission Tomography</u>

FITC – Fluorescein isothiocyanate

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence

IPTG – Isopropil-β-D-tiogalactosídeo

 K_d – Constante de dissociação

LB – *Lysogeny broth*

LNLS – Laboratório Nacional de Luz Sincrotron

MHz – Mega Hertz

NADP+ – Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzina

SGC – Structural Genomics Consortium

PCR – Polymerase Chain Reaction – reação em cadeia da polimerase

PDB - Protein Data Bank - Banco de dados de proteína

PVDF – polyvinyl difluoride



RMN – Ressonance Magnetic Nuclear, ou Ressonância Magnética Nuclear

SDS - Sodium Dodecyl Sulfate, ou Dodecil sulfato de sódio

*Sf*9 – *Spodoptera frugiperda* cells

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TBS – Tris-buffered saline

TCEP - Tris(2-carboxyethyl)phosphine

TEV – Tobacco Etch Virus

ULP-1 – Ubiquitin-like-specific protease 1

VHL – von Hippel-Lindal



1. Contextualização da pesquisa

1.1. A adaptação metabólica tumoral

Em mamíferos, a proliferação de células saudáveis é estimulada de maneira controlada, através de vias de sinalização por fatores de crescimento, mesmo quando na presença excessiva de nutrientes. No caso de tumores, essas mesmas vias se tornam constitutivamente acionadas devido à alterações genéticas que ativam oncogenes ou geram perda de função de proteínas supressoras de tumores levando, entre outros, ao aumento robusto na captação dos nutrientes e a proliferação celular desregulada (COOPER; BARKHAN; HALE, 1963; EDINGER; THOMPSON, 2002; HEDESKOV, 1968). No contexto metabólico das células transformadas, nutrientes são tipicamente captados em maior quantidade e direcionados para vias catabólicas que visam à produção de energia e de intermediários biossintéticos usados na síntese de aminoácidos, lipídeos e ácidos nucléicos, essenciais para manter as aumentadas taxas de crescimento e divisão celular. Assim, o completo conhecimento dos mecanismos de regulação destes diferentes fluxos metabólicos é de suma importância para o entendimento do processo de proliferação celular.

Células normais quiescentes captam glicose, produzindo energia, precursores biossintéticos e poder redutor através de vias oxidativas, como a fosforilação oxidativa, o ciclo do ácido cítrico (também conhecido como ciclo de Krebs), e a via das pentoses fosfato, além da reciclagem de doadores de elétrons como NADH e NADPH. Em neoplasmas, no entanto, a proliferação acelerada tem sido associada a um fenômeno descrito como glicólise aeróbica. Neste caso, a maioria do carbono derivado do consumo do açúcar é secretada na forma de lactato mesmo em situações de alta disponibilidade de

oxigênio no micro-ambiente celular. A observação deste fenômeno foi originalmente feita pelo fisiologista alemão Otto Warburg em meados da década de 20 (WARBURG; WIND; NEGELEIN, 1927; WARBURG, 1956, 1956). O "efeito Warburg", como ficou conhecido, já foi demonstrado em diversos tipos de câncer, está associado ao aumento concomitante na captação e metabolismo de glicose e é explorado clinicamente na detecção de tumores pela técnica do FDG-PET (ENGELMAN et al., 2008). O desenvolvimento do câncer está intrinsecamente associado a reprogramação do metabolismo energético através da regulação de genes responsáveis pelo transporte de glicose, bem como da via glicolítica, de tal maneira que esse fenômeno é hoje aceito como um dos pilares de transformação celular associada ao câncer (HANAHAN E WEINBERG, 2011).

A via da glicólise aeróbica é somente 5% eficiente em termos da produção de ATP quando comparada com a fosforilação oxidativa, de maneira que a super-ativação desta via em células cancerosas altamente proliferativas soaria como um contrassenso. Porém, deve-se considerar que uma taxa glicolítica alta o suficiente, como acontece no processo canceroso, faz com que a porcentagem final de ATP produzida pela glicólise possa exceder à produzida pela via oxidativa. Além disso, em contraste com a respiração mitocondrial, a geração de energia pela glicólise é independente da presença de oxigênio no ambiente celular, conferindo assim aos tumores a capacidade de sobrevivência e a possibilidade de migração para áreas hipóxicas.

Para células saudáveis, a homeostase do oxigênio é um dos processos mais importantes a serem regulados, pois tanto o excesso como sua escassez podem levar à toxicidade, através de estresse oxidativo ou da morte celular programada,

respectivamente. Já em tumores, o crescimento em condições de hipóxia é um evento bastante comum, pois a alta taxa de proliferação e o rápido aumento na densidade celular facilmente superam o alcance e a capacidade de irrigação sanguínea. O acúmulo nuclear do fator de transcrição HIF-1 (*Hypoxia-induced factor 1*), que medeia a resposta adaptativa à mudanças nos níveis de oxigênio em tecidos, exerce um papel chave nesse processo. HIF-1 foi inicialmente identificada a aproximadamente 20 anos, através de sua atividade de ligação à DNA em extratos nucleares que foram sujeitos a hipóxia (SEMENZA; WANG, 1992).

Sabe-se hoje que HIF-1 controla a expressão de mais de 100 genes, vários deles relacionados ao metabolismo energético, formação de metástases, angiogênese, proliferação celular e apoptose (LIU et al., 2012). Como exemplo de genes regulados relacionados ao metabolismo energético, podemos citar os transportadores de glicose 1 e 3 (GLUT), hexokinases 1 e 2 (HK), fosfofrutokinase (PFK), lactato-desidrogenase (LDH), fosfoglicerato-kinase 1 (PGK), glicose fosfato isomerase (PGI), piruvato kinase M, dentre muitos outros (EBERT, B. L., FIRTH, J.D., RATCLIFFE, P.J., 1995; JIANG, 1996; SEMENZA et al., 1994), que levam então ao aumento da captação e o metabolismo de glicose, suprindo assim a elevada demanda energética de células em alto estado proliferativo. O processo de angiogênese é outro exemplo de regulação sobre hipóxia, sendo o VEGF (*Vascular Endothelial growth factor*) um dos principais alvos diretos da HIF-1, recrutando células endoteliais em hipóxia, de modo a vascularizar áreas hipóxicas e estimular a sobrevivência e proliferação celular.

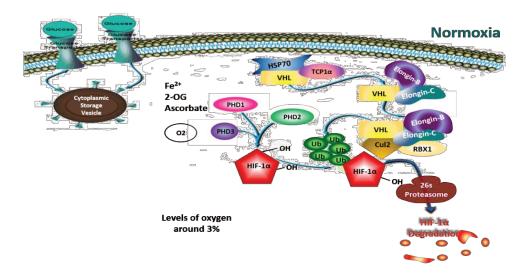
A regulação da expressão de todos esses genes por HIF-1 é considerada o exemplo mais extenso de controle metabólico coordenado em nível transcricional já descrito em

qualquer organismo (IYER et al., 1998). Desta forma, a presença HIF-1 é sempre associada com mau prognóstico e altos níveis de mortalidade de pacientes com câncer.

1.2. As isoformas da HIF e suas arquiteturas moleculares

HIF-1 é expressa em todos os tipos de células e funcionalmente é um heterodímero composto das subunidades HIF-1α (*Homo sapiens*, 826 aminoácidos) e HIF-1β também conhecida como ARNT (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) (*Homo sapiens*, 789 aminoácidos), pertencentes à família de fatores de transcrição bHLH-PAS (*basic Helix-Loop-Helix PAS*) que se ligam à elementos responsivos, HRE, em genes alvo, cuja sequência consenso é 5' – RCGTG – 3' (onde R pode ser A ou G), através do domínio bHLH.

A subunidade HIF-1α tem uma meia-vida de aproximadamente 5 minutos, altamente regulada pela tensão intracelular de oxigênio (SALCEDA, 1997). A regulação da estabilidade e a ativação de HIF-1 se dá principalmente por modificações póstraducionais como a hidroxilação de resíduos de prolina, a Figura 1 abaixo, ilustra o mecanismo de regulação da HIF-1α em condições de normoxia e sua atividade em condições hipóxicas.



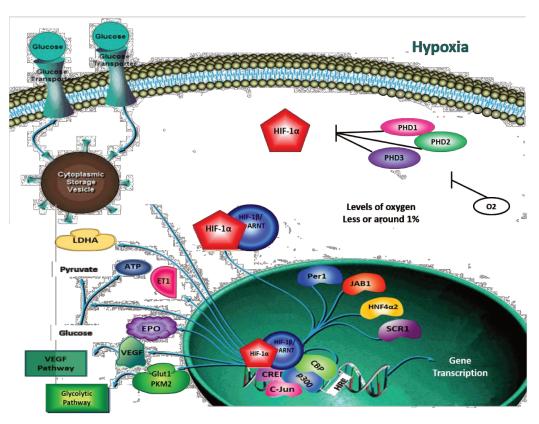


Figura 1. *Mecanismo de regulação da HIF-1α e sua atividade*: em condições de normoxia (quadro superior), onde sofre regulação pós traducional através da hidroxilação de dois resíduos de prolina, destinando-a a degradação pelo 26s proteossomo. O quadro inferior é seu mecanismo de atividade em condições de hipóxia, não sofre regulação, pode ser heterodimerizar com HIF-1β, e reconhecer os genes que contêm os elementos responsivos a hipóxia (HRE), imagem adaptada de Qiagen SABiosciences (HIF-1α pathway).

Apesar de HIF-1 ser o complexo mais estudado, no total são conhecidos três genes distintos que codificam para isoformas da subunidade α: HIF-1α, contendo 826 aa, HIF-2α, contendo 870 aa e HIF-3α, com 669 aa, todas possuindo semelhanças na organização estrutural. Mais precisamente, as três isoformas possuem quatro domínios funcionais equivalentes, detalhados a seguir, além do domínio de interação com DNA (bHLH).

O domínio PAS (família Per-ARNT-Sim) é amplamente encontrado em proteínas envolvidas na transmissão de sinal, funcionando como módulo sensorial da tensão de oxigênio, potencial redox ou intensidade de luz, e atualmente identificado em mais de 2000 proteínas entre os mais diversos organismos. Demonstrou-se ainda esse domínio como sendo um elemento de interação proteína-proteína (TAYLOR; ZHULIN, 1999). HIF-1α possui dois domínios do tipo PAS, designados PAS1 e PAS2 (às vezes também chamados de A e B). Uma sequência extra de aproximadamente 50 aminoácidos complementa o domínio PAS2 e é referida como PAC.

Uma peculiaridade das subunidades α é a presença do domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD), onde se encontram os resíduos de prolina que são hidroxilados por uma família de proteínas conhecida como PHDs (ou Prolil-hidroxilases) e facilitam a interação com a proteína supressora de tumor VHL (von Hippel-Lindal), posterior ocorre a interação com E3 ubiquitina ligase resultando na consequente degradação de HIF-1α pelo complexo proteossomal.

As isoformas 1 e 2 apresentam ainda dois domínios de transativação (estímulo da transcrição), designados NTAD (na porção n-terminal) e CTAD (na porção c-terminal), além de sequencias consenso de sinalização nuclear, NLS. Apenas NTAD é encontrado na isoforma 3. Apesar da alta conservação de domínios funcionais, HIF-1α compartilha

apenas 43% e 36% de identidade sequencial com HIF-2 α e HIF-3 α , respectivamente, enquanto que HIF-2 α e HIF-3 α são apenas 37% idênticas.

A subunidade HIF-1 β (789 aa, em média 30% idêntica à subunidades α) é compreendida dos domínios bHLH, PAS1, PAS2/PAC e possui somente um domínio de transativação C-terminal, CTAD. Todas as características estruturais das três subunidades α , como descritas acima, estão ilustradas na Figura 2.



Figura 2. Representação esquemática da estrutura dos domínios que constituem HIF-1-3α humano. Os domínios de importância funcional estão representados da seguinte forma: bHLH - domínio hélice-loop-hélice básico de ligação à sequências consenso HRE, PAS – domínio de homologia Per-ARNT-Sim com repetições internas A e B, PAC – região associada aos Pas2, ODD – domínio de degradação dependente de oxigênio, TAD – domínios de transativação N- e C- terminais respectivamente. Sequências de sinalização nuclear, NLS, são encontradas nas isoformas 1α e 2α. Adaptado de: Costa,M. e Ke,Q. Molecular Pharmacology, 2006.

O mecanismo de ativação da HIF-1α, além de requerer a heterodimerização com a subunidade –β, ainda depende de interação com proteínas co-ativadoras diversas, como CBP/p300, SRC-1 (*Steroid Receptor Coactivator-1*), Smad3 (*Mothers against decapentaplegic homolog 3*), HNF4 (*Hepatocyte Nuclear Factor 4*), AP-1 (*Activator protein-1*), Tie-2 (*V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*), dentre outros (BRACKEN; WHITELAW; PEET, 2003), esta interação ocorre através do domínio C-

TAD, que em particular, foi demonstrada como essencial para ativar a transcrição de genes específicos regulados por HIF-1 (LANDO et al., 2002).

A subunidade β da HIF-1, é normalmente encontrada em todos os tecidos, tanto em situações de normoxia quanto em hipóxia, onde está envolvida com a regulação do metabolismo de agentes xenobióticos. Neste caso, ARNT forma um complexo com a proteína AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*) (LINDEBRO; POELLINGER; WHITELAW, 1995; WHITELAW et al., 1993; YAMAGUCHI; KUO, 1995).

A isoforma HIF-2α ativa a transcrição de um grande número de genes, dentre os quais vários são igualmente regulados por HIF-1α. No entanto, alguns deles são expressos somente pela HIF-2α, como por exemplo o gene da EPO (eritropoietina), TGFA (fator de crescimento) e ANGPT2 (relacionado ao remodelamento de vasos sanguíneos) (KEITH; JOHNSON; SIMON, 2012). Keith et al., 2012, observaram em modelos animais, quando deletado o gene da HIF-2α, ocorreu o crescimento e progressão tumoral. Isso indica que HIF-1α e HIF-2α, desempenham papeis diferentes no desenvolvimento e progressão do câncer (KE; COSTA, 2006; KEITH; JOHNSON; SIMON, 2012)

Diferentemente de HIF-1 e HIF-2α, a isoforma HIF-3α é um pouco restrita quanto a expressão, comumente presente em cérebro, cerebelo, coração, pulmão, rim e músculo esquelético (LI et al., 2006; MAKINO et al., 2001). HIF-3α foi a última isoforma a ser identificada, em 1998, também é capaz de heterodimerização com a HIF-β em humanos. Esse complexo também se liga aos HREs, mas no entanto não possui atividade transcricional, devido à ausência do domínio CTAD. Recentemente em células de hepatoma, HIF-3α foi caracterizada por retardar o aumento celular, reduzir a vascularização (MAKINO et al., 2001) e por romper os complexo formado entre HIF-1α-

ARNT-DNA (MAYNARD et al., 2005). Em tecido de córnea, HIF-3α inibe a expressão dos genes responsivos a hipóxia ativados por HIF-1α, como o VEGF, regulação essa que impede a vascularização da córnea quando esta se encontram em hipóxia, ou seja, durante o sono. HIF-3α é portanto é descrita como inibidor da HIF-1α, mas seu mecanismo de ação ainda não é completamente entendido (MAYNARD et al., 2005; SEMENZA, 2003). Não temos conhecimento de estudos que correlacionam as subunidades -3α e -2α em termos de antagonização ou amplificação de função transcricional.

O gene que codifica para HIF-3α sofre *splicing* alternativo, sendo a IPAS (*inhibitory PAS domain protein*) a primeira isoforma identificada, também chamada de HIF-3α4. Além de IPAS, outras 5 isoformas variantes de *splicing* foram identificadas para HIF-3α, sendo também referidas HIF-3α1, HIF-3α2, HIF-3α3 HIF-3α5 e HIF-3α6. A única região comum entre todas *splicings* é o domínio Pas2/Pac e, no geral, as isoformas - 3α diferem grandemente no N- e no C-terminal, onde ocorre a perda parcial ou total no domínio bHLH (MAYNARD et al., 2003), enquanto outras sofrem perda total ou parcial do C-Terminal, incluindo o ODD e NTAD. A Figura 3 abaixo ilustra os domínios presentes em cada isoforma.

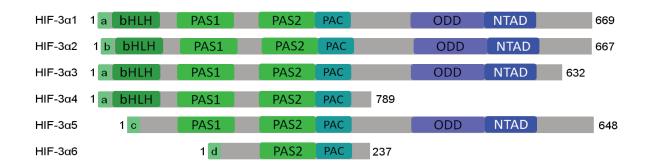


Figura 3. Representação esquemática dos domínios que constituem HIF-3a e suas variantes por splicing. Adaptado de (TANAKA et al., 2009). Os splicings contêm os domínios bHLH - domínio hélice-loop-hélice básico, PAS – domínio de homologia Per-ARNT-Sim com

repetições internas 1 e 2, PAC – região associada aos Pas2, ODD – domínio de degradação dependente de oxigênio, NTAD – domínios de transativação N- terminal.

Quanto a estrutura terciária, até o presente momento pouca informação está disponível na literatura sobre as HIF como um todo. A estrutura cristalográfica do complexo PAS2-1α e PAS2-1β foi recentemente determinada para HIF-1α e HIF-2α (CARDOSO et al., 2012; SCHEUERMANN et al., 2009), e o modelo de CTAD foi descrito por ressonância magnética nuclear (FREEDMAN et al., 2002). Todavia, a grande maioria das estruturas dos domínios funcionais continua elusiva. A Figura 4 ilustra a pouca disponibilidade de informação estrutural para esse complexo.

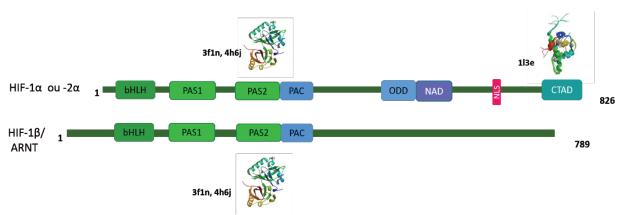


Figura 4. Representação das estruturas tridimensionais da HIF reportadas até o momento, onde somente o domínio Pas2 da HIF-2α em complexo com HIF-1β (3f1n), Pas2 da HIF-1α (4h6j) e o domínio C-TAD (113e) descrito por RMN. As isoformas são formadas pelos domínios bHLH - domínio *hélice-loop-hélice* básico, PAS – domínio de homologia Per-ARNT-Sim com repetições internas 1 e 2, PAC – região associada aos Pas2, ODD – domínio de degradação dependente de oxigênio, TAD – domínios de transativação N- e C-terminais.

1.3. HIF, regulação pós-traducional e Prolil-hidroxilases

Como mencionado, HIFs sofrem regulação pós-traducional por meio de hidroxilação em resíduos de prolina e também acetilação de uma lisina, todas dentro do

domínio ODD. Adicionalmente, um resíduo de asparagina é hidroxilado no domínio C-TAD.

As células percebem as mudanças na disponibilidade de oxigênio através de um grupo de enzimas que controlam diretamente a resposta celular às baixas concentrações de oxigênio. Estas enzimas sensoras, conhecidas como HIF prolil-4-hidroxilases (PHD), das quais são conhecidas três isoformas (PHD1, PHD2 e PHD3) (STIEHL et al., 2006), que na presença de oxigênio, levam à modificação pós-traducional (hidroxilação) das HIF-1α e -2α. As PHDs possuem uma estrutura muito semelhante, principalmente na região do sítio ativo, PHD1 e PHD2 possuem ainda sinal de localização nuclear e PHD2 possui também um motivo de exportação para o núcleo e o motivo Zf-Mynd conhecido por interação com outras proteínas, a localização e atividade das PHD1 e 2 é reportada como citoplasmática, no entanto recentemente PHD2 foi reportada no núcleo, sugerindo que sua atividade sobre HIF-1 possa ocorrer no núcleo também(PIENTKA et al., 2012). A Figura 5 abaixo, resume a arquitetura e domínios das PHDs.

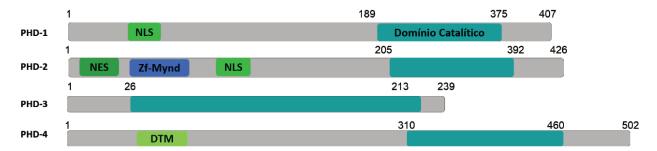


Figura 5. Representação esquemática da arquitetura das PHDs 1-4. As quatro isoformas possuem domínio catalítico, requerido para função enzimática. Adicionalmente PHD1 possui um motivo de localização nuclear (NLS), PHD2 apresenta os motivos de exportação para o núcleo (NES), de interação com outras moléculas (zf-Mynd) e o sinal de localização nuclear (NLS), PHD4 possui um domínio transmembrana (DTM) além do domínio catalítico.

Recentemente, uma quarta prolil hidroxilase foi descrita para esta família (PHD4), e sua localização celular é no retículo endoplástico, ela possui um domínio

transmembrana associado que está retículo, e seu domínio catalítico é voltado para o lúmen do retículo, entretanto, seu mecanismo de interação com a HIF permanece indeterminado (KOIVUNEN et al., 2007).

PHDs são dioxigenases que usam 2-oxoglutarato como cofator e catalisam a hidroxilação dependente de Fe (II) e oxigênio de dois resíduos específicos de prolina. Sob condições de normóxia, hidroxilação de ODD (Pro-402 e Pro-564) favorece a ligação do supressor de tumor VHL, levando HIF-1α e HIF-2α a poli-ubiquitinação e sinalizando para degradação proteossômica (BOS et al., 2003). Em condições de hipóxia, a prolil-4-hidroxilação é reduzida, e HIF-1α e HIF-2α tornam-se estabilizadas, translocam-se para o núcleo, heterodimerizando-se com a subunidade constitutivamente expressa HIF-1β e regulam a expressão dos diversos genes-alvo. Outra via de regulação das HIF por hidroxilação envolve o fator de inibição da HIF (FIH), o qual modifica um resíduo de asparagina no domínio de transactivação C-terminal de HIF-1α, impedindo a interação da HIF com os domínios CH1 dos coativadores p300/CBP transcricionais, levando à redução da atividade de transcrição desta proteína.

Enquanto que as quatro PHDs possuem domínios catalíticos parecidos, elas exibem tendencia quanto a isoforma HIF-1 ou -2α e sítio de hidroxilação, CODD ou NODD, por exemplo PHD3 preferencialmente hidroxila a HIF-2α em diversas linhagens celulares e PDH1 e 2 preferencialmente hidroxilam HIF-1α (APPELHOFF et al., 2004; KEITH; JOHNSON; SIMON, 2012).

PHD3 apresenta elevada expressão em tecidos de câncer de pescoço e cabeça, mesmo em condições de hipóxia, mas seu papel nestas condições não é bem definido. Recentemente, um ensaio utilizando siRNA contra PHD3, levou a regulação do p27,

proteína relacionada ao bloqueio do ciclo celular na fase G1 (HÖGEL et al., 2011), sugerindo desta forma, que as prolil hydroxilases estão envolvidas também em outras vias celulares, sendo este mais um motivo importante no estudo desta família de proteínas.

Até o presente momento somente a estrutura do domínio catalítico da isoforma PHD2 foi elucidado por cristalografia de raios X (CHOWDHURY et al., 2009), Figura 6 abaixo.

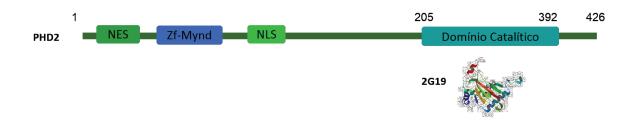


Figura 6. *Representação da estrutura PHD2*, composta pelo sinal de exportação nuclear (NES), motivo de interação com outras proteínas (Zf-Mynd), sinal de localização nuclear (NLS), e o domínio catalítico, único a possuir a estrutura tridimensional resolvido por cristalografia (2G19).

Aproveitando um encontro em 2011 com o Dr. Peter Ratcliffe, FRS (Diretor do Nuffield Department of Clinical Medicine, Oxford University, UK), surgiu a oportunidade da realização deste estágio BEPE junto ao SGC. Dentre várias importantes descobertas, o laboratório do Dr. Ratcliffe foi o primeiro a descrever o mecanismo de sinalização de degradação da subunidade HIF-1α, através de prolil-hidroxilação por PHDs, como descrito acima. Já o SGC é um consórcio dedicado à estudos estruturais, principalmente por cristalografia de raios X, de proteínas humanas de interesse farmacológico.

Dentro do contexto do metabolismo de câncer, HIF tem papel fundamental no desenvolvimento e progressão do câncer, sofre regulação pelas diferentes PHD e que apresentam preferências por sítios de hidroxilação, e dentro do contexto do nosso

laboratório em estudar o complexo processo de regulação do metabolismo energético e biossintético associado ao câncer, esse trabalho propõe estudos estruturais de domínios funcionais das proteínas HIF e PHD, visando contribuir para o entendimento dos mecanismos de ação dessas proteínas.

2. Parte I: HIF

2.1. Objetivo geral

HIF é um fator de transcrição que tem fundamental papel no desenvolvimento, adaptação e progressão do câncer, sugerindo que possa ser um alvo promissor na luta contra o câncer. Seus vários aspectos de regulação podem também oferecer uma ampla variedade de intervenção terapêutica. Conhecer a estrutura terciária destas proteínas é uma das formas para que ela possa se tornar um alvo terapêutico e buscar por moléculas que vão interagir em regiões de regulação. No entanto, até o presente momento poucas informações sobre a estrutura terciária das HIFs foram reportadas.

O objetivo principal deste projeto foi desenvolver um sistema de expressão e purificação para os domínios funcionais das isoformas HIF-1α, HIF-3α e HIF-β, com a finalidade de realizar ensaios de cristalização e difração dos cristais obtidos, bem como estudos biofísicos que caracterizem o mecanismo de interação entre elas.

2.1.2. Objetivos Específicos

- Amplificar e clonar os domínios funcionais de HIF-1α, HIF-3α e HIF-β em vetores
 de expressão em sistema heterólogo bacteriano;
- Expressar e purificar os domínios, com alta homogeneidade molecular, a fim de realizar ensaios biofísicos para a reconstituição dos complexos formados entre eles;
- Cristalizar, coletar dados de difração e resolver as estruturas referentes às construções realizadas;

2.2 Materiais e Métodos - HIF

2.2.1. Clonagem e manipulação de genes

Os genes que codificam para ambas as subunidades da HIF-1 (α e β), foram amplificados a partir de uma biblioteca de cDNA feita de linhagens de células tumorais SKBR3, cultivadas pela Dra. Sandra Dias, pesquisadora do LNBio. Para tanto, foram adquiridos dois pares de oligonucleotídeos iniciadores dos genes de interesse, complementados com sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Sac*I (HIF-1 α) e *Bam*HI e *Hind* III (HIF-1 β), a sequências dos primers é visualizada no anexo 1.

A confirmação da amplificação dos genes foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. Os fragmentos de interesse foram então extraídos do gel de agarose, purificados e inicialmente inseridos no vetor de propagação pGEM-T Easy. Uma vez clonados neste vetor, os clones foram sequenciados para conferência da sequência correta de nucleotídeos (de acordo com os números de acesso NM_001530.3 e NM_178427.2, respectivamente, no banco de dados NCBI).

Para a isoforma HIF-3α (NM_152794.3) utilizou-se uma linhagem de cérebro fetal humano a partir do qual amplificou-se o domínio Pas C-Terminal (Pac), inserindo nos primers o sítio de restrição para *NdeI* e *XhoI* (anexo 1). Confirmada a amplificação, o fragmento recuperado foi purificado, digerido e em seguida, inserido diretamente no vetor pET28a, este também previamente digeridos com as mesmas enzimas de restrição. O clone também foi posteriormente sequenciado para verificação da sequência de nucleotídeos.

2.2.2. Subclonagem dos domínios funcionais

Os clones contendo os genes completos foram utilizados como molde para a amplificação dos domínios funcionais da HIF-1α e HIF-β. A Figura 7 abaixo representa a posição dos clones gerados quando comparados a arquitetura básica dos genes completos das subunidades da HIF.

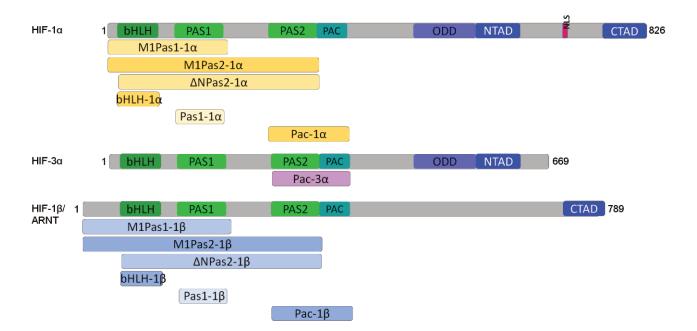


Figura 7. *Posição dos clones gerados em relação à arquitetura básica da HIF*. HIF contêm os domínios bHLH - domínio *hélice-loop-hélice* básico, PAS – domínio de homologia Per-ARNT-Sim com repetições internas 1 e 2, PAC – região associada aos Pas2, ODD – domínio de degradação dependente de oxigênio, NTAD – domínios de transativação N- terminal, além do sinal de localização nuclear (NLS).

A tabela 1 apresenta as informações sobre numeração, nomenclatura dos clones, posição dos aminoácidos (inicial e terminal), características bioquímicas e o vetor em que foram clonados.

Tabela 1: Construções geradas a partir dos domínios funcionais de interesse da HIF-1(α e β) e HIF-3 α .

Subunidade	#	Nome	Vetor	Sequência	Ponto Isoelétrico Teórico	Peso Molecular em fusão com cauda (KDa)
HIF-1α	1	M1Pas1-1α	pETSumo	Met1 - Gly158	6,4	31,9
	2	M1Pas2-1α	pETSumo	Met1 - Gly298	7,00	48,2
	3	$\Delta NPas2-1\alpha$	pETSumo	Arg17 - Gly298	7,00	46,6
	4	bHLH-1α	pETSumo	Arg17 - Lys71	10,5	20,3
	5	Pas1-1α	pETSumo	Lys85 - Gly158	5,4	22,3
	6	Pac-1α	pET28a	Asp238 - His348	6,2	15,1
HIF-3α	7	Pac-3α	pET28a	Gly235 - Thr345	5,7	14,4
HIF-1β	8	M1Pas1-1β	pETSumo	Met1 - Arg235	5,3	38,0
	9	M1Pas2-1β	pETSumo	Met1 - Lys419	6,5	58,3
	10	ΔNPAS2-1β	pETSumo	Ala90 - Lys419	8,0	50,6
	11	bHLH-1β	pETSumo	Ala90 - R143	10,5	22,3
	12	Pas1-1β	pETSumo	Asp161 - Arg235	4,3	22,2
	13	Pac-1β	pETSumo	Pro349 - Ser467	5,9	28,0

Oligonucleotídeos iniciadores correspondentes a cada uma das construções foram adquiridos (anexo 1) e, através da mesma metodologia descrita na sessão anterior, os produtos resultantes da amplificação foram clonado diretamente em vetores pETSUMO ou pET28a. O vetor pET28a contém uma sequência de 6 histidinas estrategicamente utilizadas para a purificação por afinidade a metais imobilizados. Já pETSUMO é um vetor caseiro derivado do pET28a, onde foi acrescentada a proteína de fusão Smt3 de *Saccharomyces cerevisiae*, que confere maior solubilidade ao produto proteico final. Porém, o motivo mais importante para a escolha deste vetor foi o de que a Smt3 se encontra inserida no vetor pET28a pelos sítios de clivagem das enzimas *NheI* e *BamHI*, resultando em um único resíduo de glicina ligado ao N-terminal da proteína de interesse quando realizamos a remoção da sumo (Smt3) fusionada através do uso da protease específica ULP-1. Neste sentido, a amostra final seria mais adequada para tentativas de cristalização, eliminando

possíveis regiões de flexibilidade da proteína oriundas da clonagem. Os clones foram sequenciados para conferência da sequência correta de nucleotídeos.

2.2.3. Testes de expressão heteróloga em sistema bacteriano

Visando a expressão em larga escala das construções recombinantes para estudos estruturais, os plasmídeos preparados acima foram então transformados em bactéria *Escherichia coli* da cepa Rosetta 2(DE3) (Novagen), e os níveis de expressão foram avaliados inicialmente em pequena escala. Inoculamos uma colônia em 2 ml de LB contendo 50 μg/mL de canamicina e cloranfenicol. A cultura foi incubada em *shaker*, permanecendo por 3 h a 37°C a agitação de 200 rpm. Uma fração não induzida de 350 μL foi colhida e o restante da cultura induzida com 1 mM de IPTG. Uma nova fração de 300 μL foi colhida após 3 horas de indução. As frações foram centrifugadas por 2 minutos a 5.200 x g e 4°C, e as células, separadas do sobrenadante, foram ressuspendidas com 50 μL de solução de corrida SDS-PAGE (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 30% glicerol, 0,2% azul de bromofenol e 300 mM DTT), fervidas por 5 minutos a 95°C e submetidas a análise por SDS-PAGE 15% ou outra concentração mais adequada, seguida de coloração com *Coomassie brilliant blue* (Sigma-Aldrich).

Rosetta 2(DE3) foi a cepa escolhida por duas razões principais, como se segue. Primeiramente, esta é uma cepa geneticamente modificada que contém a eficiente maquinaria de transcrição do bacteriófago T7 embutida em seu genoma (lisógeno DE3), que coordena a expressão da T7 RNA polimerase, sob controle do promotor *lacUV5* e do repressor *lacI*. A adição de lactose ao meio faz com que o repressor se desligue do DNA, induzindo assim a produção da polimerase viral. Esta é então capaz de se ligar à região promotora contida nos vetores pET, e promover a transcrição do gene alvo. A função da T7

RNA polimerase é tão eficiente e seletiva que faz com que quase todos os recursos da bactéria sejam voltados para a expressão da proteína recombinante, podendo em alguns casos chegar a até 50% da quantidade total de proteínas da bactéria. Vale a pena lembrar que *lacI* hidrolisa a lactose adicionada. De maneira a aumentar a efetividade da indução da expressão, é adicionado, ao invés desse açúcar, um análogo não hidrolisável conhecido como IPTG. Em segundo lugar, a cepa Rosetta-2 contém um plasmídeo adicional conhecido como pRARE2, que codifica para tRNAs de códons raros em bactéria, favorecendo assim a expressão de genes complexos de origem eucariótica, como é o caso de todos os alvos desse trabalho.

2.2.4. Expressão em larga escala

Os clones que geraram produtos proteicos com expressão diferencial no teste em pequena escala foram utilizados para expressão em escala de litros de meio de cultura. Uma colônia de cada placa foi utilizada para produção do pré-inóculo (50 mL de meio LB com 50 µg/mL mesmo antibióticos), o qual foi incubado em *shaker* à 37°C, 200 rpm, por 16 horas. Cinco litros de meio LB foram inoculados com os 50 mL de pré-inóculo. A cultura foi incubada em *shaker* à 37°C, 200 rpm por 5 horas até atingir a Abs₆₀₀ entre 0,4 e 0,6 (fase *log* do crescimento bacteriano). Após alcançar a densidade ótica desejada, adicionouse ao meio de cultura 0,2 M IPTG para indução da expressão por 16 horas a 18°C. As células foram coletadas por centrifugação (10 minutos, a 12.000 x g), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para uso posterior.

2.2.5. Purificação de proteínas

Os protocolos de purificação foram desenhados de maneira a se explorar e combinar as características físico-químicas inerentes a cada uma das construções de interesse (como mostradas na Tabela 1) de modo a diferenciá-las dos contaminantes bacterianos. Essas características englobam a presença de caudas de fusão, ponto isoelétrico e tamanho/peso, dentre outras, tendo como objetivo final a obtenção de amostras com alto grau de pureza e homogeneidade em relação às espécies moleculares. Os protocolos mais gerais são descritos abaixo. Variações pontuais nos protocolos serão indicadas na sessão de Resultados, quando necessário.

2.2.5.1. Purificação por afinidade a metais imobilizados

Cada umas das construções foram ressuspendidas em 100 mL de solução de lise contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM de β-mercaptoetanol, 1 mM PMSF e 10% de glicerol. Após a ressuspensão, foram adicionados 200 mg de lisozima, 200 mg de Deoxicolato de Sódio e DNAse (5 μg/mL), seguidos de incubação em gelo por 1 hora. Em seguida, o lisado foi então clarificado por centrifugação (19.400 x g, 4°C, por 1 hora) e o sobrenadante usado para purificação.

A purificação foi realizada a 4°C por cromatografia de afinidade a metais imobilizado usando 1,2 ml de resina Talon (Clontech), carregada com íons Co²⁺, para cada litro de meio de cultura. Após equilibrar a resina com solução <u>Afinidade A</u> (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, e 2 mM β-mercaptoetanol), o lisado foi passado na resina, de modo que a proteína de interesse permaneceu imobilizada através da interação da cauda de

histidina com os íons cobalto imobilizados. Em seguida, a resina foi então lavada com 50 mL da solução <u>Afinidade B</u> (300 mM de NaCL, 50 mM de Tris pH 7,5 e 2 mM BME), seguida novamente de solução <u>Afinidade A</u> adicionada de imidazol (v/v), em concentração final de 5mM. A proteína de interesse foi então eluída da resina com solução <u>Afinidade A</u> acrescentada de 500 mM de imidazol (v/v). Cada etapa da purificação foi analisada por SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie brilliant blue*.

Após a eluição, as caudas de fusão Sumo e/ou His-tag foram removidas utilizandose as proteases ULP-1, produzida em nosso laboratório, ou Trombina (Sigma-Aldrich), respectivamente, através da incubação com as amostras a 4°C por 16 horas. Foram utilizadas diferentes concentrações de sal, pH da solução tamponante, e inibidores de protease para algumas das construções, as quais serão detalhadas nos resultados.

2.2.5.2. Purificação intermediária

A etapa seguinte de purificação foi realizada em coluna de troca aniônica do tipo Mono Q 5/50 GL (GE) acoplada ao aparelho AKTA-FPLC (GE) e equilibrada com solução MonoQ A (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 30 mM NaCl, 2 mM DTT). A amostra foi aplicada na coluna e a eluição feita com solução MonoQ B (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M NaCl e 2 mM DTT), seguindo um gradiente linear de solução B 0 a 100 % em 40 volumes de coluna. Frações da eluição foram coletadas a cada 0,5 mL, e mantidas a 4°C. O *Flow Through* e as frações foram analisadas em gel SDS-PAGE 15%, ou gel de Tricina corado com *Coomassie brilliant blue*.

Além da coluna Mono Q, em algumas ocasiões foram utilizadas as colunas HiTrap Heparin 1 mL (GE) e a HiTrap Phenyl FF 1 mL (GE), ambas acopladas ao aparelho AKTA-FPLC (GE). A coluna HiTrap Heparin, tem sua matriz formada por glicosaminoglicano altamente sulfatado, de modo que ela mimetiza a estrutura polianiônica dos ácidos nucleicos, sendo portanto, utilizada para purificar proteínas que se ligam ao DNA.

Esta coluna foi equilibrada com a solução <u>Heparina A</u> (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoetanol), a amostra foi aplicada na coluna e a eluição feita com solução <u>Heparina B</u> (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 M NaCl e 2 mM DTT), seguindo um gradiente linear de solução B 0 a 100 % em 20 volumes de coluna, coletou-se frações de 0,5 mL.

Já a coluna HiTrap Phenyl FF, tem sua matriz formada por alcanos de cadeia linear hidrofóbicos, a interação ocorre através das regiões hidrofóbicas expostas na superfície das proteínas. A eluição e separação das proteínas depende das cargas expostas, onde proteínas muito hidrofóbicas são eluídas ao final do gradiente, e aquelas que são menos hidrofóbicas no começo do gradiente.

Para se utilizar a coluna HiTrap Phenyl FF lentamente foi adicionado NaCl na amostra, até a concentração de 1M. A coluna foi equilibrada com a solução <u>Fenil A</u> (50 mM de Tris-HCl pH 8,5, 1 M NaCl, 2 mM DTT), amostra foi aplicada e eluída com solução <u>Fenil B</u> (50 mM Tris-HCl pH 8,5 e 2 mM DTT), seguindo um gradiente linear de solução B 0 a 100 % em 40 volumes de coluna.

2.2.5.3. Cromatrografia por Exclusão Molecular

Como última etapa de purificação, foi empregada a cromatografia de exclusão molecular, permitindo alcançar um alto grau de pureza e homogeneidade de espécies moleculares das amostras. Utilizou-se coluna de filtração em gel Superdex 75 HR 10/30 ou 16/60 (GE), equilibrada com solução Gel Filtração (30 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,5 mM TCEP). As frações contendo a proteína de interesse vindas da purificação intermediária, foram reunidas e concentradas até o volume adequado para cada cromatografia de exclusão molecular (0,5mL para 75 10/30 e 5 mL para 75 16/60). A amostra foi injetada na coluna e seguiu-se com eluição isocrática a 0,5 mL/min, coletando-se frações de 0,5 mL. As frações obtidas foram analisadas por gel de Tricina e coradas com *Coomassie brilliant blue*, as amostras contendo somente a proteína de interesse foram reunidas e concentradas com Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit, com corte de 3 ou 10 KDa (Millipore).

A quantificação foi realizada através de absorbância de luz ultravioleta a 280 nm, utilizando-se o espectofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific), além do cálculo teórico de coeficiente de extinção feito a partir das respectivas sequencias de aminoácidos, com o auxílio do programa ProtParam (http://ca.expasy.org/tools/ protparam.html).

2.2.6. Western Blotting

Para garantir que a expressão diferencial observada nos géis corados com o corante *Coomassie blue* fosse da proteína de interesse, fez-se a análise por *western blotting*. Após eletroforese das amostras em SDS-PAGE com concentração adequada de acrilamida em função do tamanho da proteína a ser analisada, as bandas foram transferidas para membranas de PVDF (BioRad) empregando-se transferência em sistema semi-seco

(BioRad) em solução 50 mM Tris-HCl, 38 mM glicina, 1 mM SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) e 20% metanol a 80 mA por 1 hora, utilizando o equipamento Trans-Blot SD *Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado diluído em solução TBS (80 mM Tris-HCl, 16 mM Tris-base, 150 mM NaCl e 4 mM EDTA) com 0,1 % Tween 20 por 1 hora (TBS/T). Para a detecção das proteínas de interesse, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-Histag (Abnova na proporção 1:5000, diluído em TBS/0,1% Tween 20, por 16 horas a 4°C. Após a incubação, as membranas foram lavadas 3x com TBS por 5 minutos cada, seguida de incubação com anticorpo secundário (GE – anti-*mouse* diluídos 1:10.000 em TBS/0,1% Tween 20) por 1,5 horas à temperatura ambiente. A presença da banda protéica foi detectada adicionando-se reagente Luminol (*ECL Detection Reagent* – Pierce) à membrana seguido do contato da mesma com filme autoradiográfico (BioMax *light film* – Kodak) pelo tempo julgado necessário.

2.2.7. Eletroforese em Gel Nativo

A formação de complexo entre os domínios bHLHα e bHLH-β com DNA, foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em condições nativas. O DNA utilizado continha sequência nucleotídeos HIF (5'a de responsivos das TCTGTACGTGACCACACTCACCTC-3'), onde a sequência em destaque é um dos elementos responsivos a HIF. Os oligos foram ressuspendidos na concentração de 100 µM em solução com 100 mM de Tris pH 7,5, 500 mM de NaCL e 10 mM de EDTA. Foram incubados 50µM de cada oligo (Forward e Reverse) por 10 minutos no gelo, a seguir colou-se em água aquecida a 95°C e deixou-se resfriar por 16 horas.

Para o ensaio, 80 picomoles da bHLH-α foram incubados com 80 picomoles de bLH-β e incubados com o DNA dupla fita (80, 120 e 160 picomoles) em solução 50 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 2 mM BME e incubadas por 30 minutos no gelo. Após o tempo de incubação, adicionou-se solução de amostra eletroforese nativa (4X solução Bis-Tris (Invitrogen), 40% glicerol, 0,1% azul de bromofenol) e aplicou-se as mesmas em gel de agarose 1,5% elaborado em solução Bis-Tris 1X pH 7,5 (Invitrogen). O gel foi submetido a uma tensão de 60 voltz por 55 minutos, a 4°C e subsequentemente corado com brometo de etídeo na ausência de luz.

2.3. Resultados e Discussão - HIF

2.3.1. Combinação de domínios funcionais

Realizamos a clonagem dos diferentes domínios da HIF-1α e HIF-1β, agrupando os principais domínios funcionais, e clonando-os no vetor de expressão pETSUMO. As primeiras construções a serem estudadas foram ΔNPas2-1α e ΔNPas2-1β (construções 3 e 10, Tabela 1), que compreendem os domínios bHLH e os dois domínios de heterodimerização Pas1 e Pas2 de cada proteína. Em sua maioria, os protocolos para cada construção foram realizados mais que uma vez, de maneira que somente resultados representativos estão descritos a seguir.

A etapa de clonagem foi realizada com sucesso, os clones foram sequenciados para confirmar a presença do inserto e ausência de mutações. O vetor contendo cada subunidade foi utilizado para transformação em *E. coli* cepa Rosetta 2(DE3), realizou-se um teste de expressão em pequena escala. O resultado do teste, Figura 8 abaixo, quando comparadas as amostras induzidas e não induzidas, mostra uma pequena banda diferencial, indica pela seta

em vermelho, tanto para a construção $\Delta NPas2-1\alpha$, Figura 8A, quanto para a construção $\Delta NPas-1\beta$, Figura 8B.

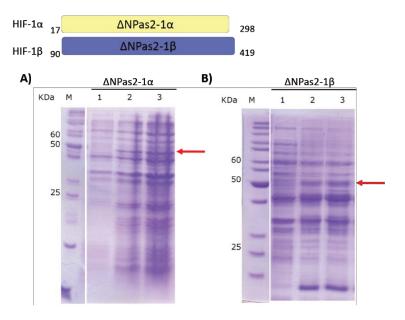


Figura 8. *Teste de expressão dos clones* ΔNPas2-1α e ΔNPas2-1β. Gel SDS-PAGE 15% (A) e 10% (B) corado com *Comassie* (A) Teste de expressão dos clones selecionados para o domínio ΔNPas2-1α. M: Marcador Molecular; Poço 1: Amostra antes da indução; Poço 2 e 3: Clones ΔNPas-2α com tamanho aproximadamente de 46,6 KDa; (B) Teste de expressão dos clones selecionados para o domínio ΔNPas2-1β. M: Marcador Molecular; Poço 1: Amostra antes da indução; Poço 2 e 3: Clones ΔNPas2-1β respectivamente com tamanho aproximado de 50,6 KDa. Indução com 1 mM de IPTG.

Observamos inicialmente bandas diferenciais que sugerissem a expressão das proteínas de interesse, tanto para ΔNPas2-1α (A), com peso molecular aproximadamente em 47 KDa, quanto para ΔNPas2-1β (B), com aproximadamente 51 KDa. Dessa maneira, realizamos experimentos, agora com expressão em 1 L de meio de cultura. A concentração de NaCl utilizada foi 500 mM e a solução tamponante foi Tris pH 8,5. Após ressuspensão das células, adicionou-se os seguintes inibidores de protease: 2μg/mL aprotinina, 2μM pepstatina, 10 μM leupeptina e 4 mM benzamidina. Os demais passos de purificação seguiram como descrito no item 2.2.5.1.

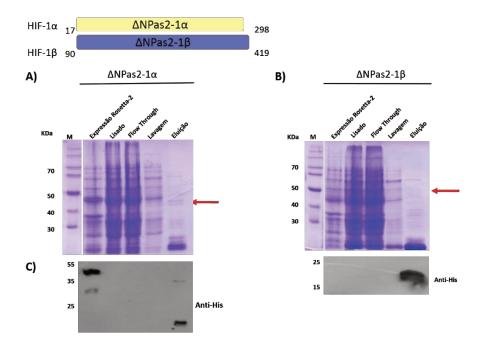


Figura 9. Purificação por afinidade das proteínas ΔNPas2-1α e -1β. Gel SDS-PAGE 10% (A e B) corado com Comassie. (**A**) Teste de expressão e purificação para o domínio ΔNPas2-1α. M: Marcador Molecular; Expressão Rosetta 2(DE3): amostra induzida na cepa Rosetta 2(DE3); Lisado: amostra da fração total de proteínas no lisado celular; Flow Through: amostra que não ligou na resina; Lavagem: Lavagem da resina com 5 mM de imidazol; Eluição: amostra eluída na purificação; (**B**): Teste de expressão e purificação para o domínio ΔNPas2-1β. Representativo das mesmas frações descritas para ΔNPas2-1α. (**C**): Análise por western blotting dos testes de expressão e afinidade descritas acima.

A análise do teste de purificação das proteínas em maior escala (Figura 9A e B) sugere que as proteínas possam ter sido degradadas, pois ao invés da amostra de interesse, observamos somente a cauda de fusão foi eluída, resultado confirmado pela análise do *western blotting* (Figura 9C), que mostra bandas apenas para o poço correspondente à eluição em ambos os géis, no tamanho aproximado de 15 KDa, correspondente como o tamanho da cauda de fusão sozinha.

Na Figura 9C (esquerda) observamos ainda a presença de duas bandas, a primeira em aproximadamente 55 KDa, o que corresponde a proteína de interesse e observamos

ainda uma segunda banda com aproximadamente 35 KDa, este resultado sugere que a degradação pode ter ocorrido logo após a lise das bactérias.

Devido ao insucesso na expressão e purificação, tentamos uma nova construção da HIF, cuja sequencia vai do aminoácido Met1 até o final do domínio Pas2, a qual denominamos de M1Pas2-1α e M1Pas2-1β (clones 2 e 9, tabela 1). Os clones foram transformados em Rosetta 2(DE3) e testou-se a expressão. A Figura 10 mostra o resultado para o teste de expressão.

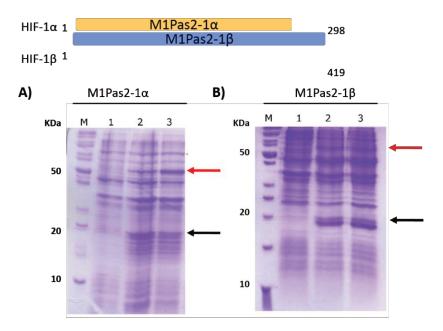


Figura 10. Teste de expressão das proteínas M1Pas2-1α e $-\beta$. Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie (**A**) Teste de expressão dos clones selecionados para o domínio M₁Pas-2α. M: Marcador Molecular; Poço 1: Amostra antes da indução; Poço 2 e 3: Clones selecionados; (**B**) Teste de expressão dos clones selecionados para o domínio M1Pas2-1β. M: Marcador Molecular; Poço 1: Amostra antes da indução; Poço 2 e 3: Clones selecionados respectivamente. Indução com 1 mM de IPTG.

O teste de expressão mostrou uma pequena banda diferencialmente expressa, correspondente com a massa esperada para cada proteína, mais precisamente de 48 KDa para M1Pas2-1α e de 58 KDa para a subunidade β, como indicado pelas setas em vermelho

na Figura 10. Curiosamente, observamos ainda a co-expressão diferencial de uma proteína com aproximadamente 20 KDa, indica pelas setas pretas em ambas as bactérias.

Testamos então a expressão das construções em 1 L de meio de cultura, a 18°C, com indução por 0,2 mM IPTG, e, seguindo o protocolo de purificação utilizado para a construção ΔNPas2 na presença de inibidores de proteases, fizemos um novo teste de purificação. O resultado do teste é visualizado na Figura 11 abaixo.

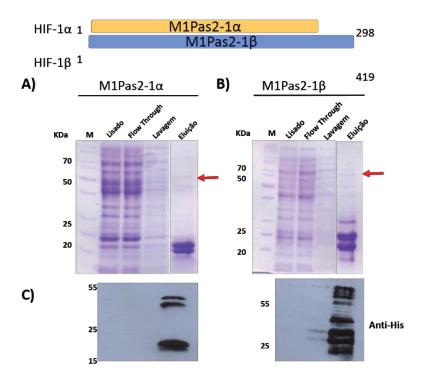


Figura 11. Teste de purificação por afinidade das proteínas M1Pas-2α $e - \beta$. Gel SDS-PAGE 10% (A e B) corado com *Comassie*. (**A**) Purificação por afinidade da proteína M1Pas-2α. M: Marcador Molecular; Lisado: amostra da fração total de proteínas no lisado celular; Flow Through: amostra que não ligou na resina; Lavagem: Lavagem da resina de afinidade com 5 mM de imidazol; Eluição: amostra eluída na purificação; (**B**): Purificação para o domínio M1Pas-2β. Representativo das mesmas frações descritas para M1Pas-2α (**C**): Análise por western blotting da purificação por afinidade descrita acima.

Ao analisarmos o teste de expressão, observamos que a proteína continua sofrendo degradação, como indicado pela seta em preto na Figura 10A e B, repetindo o resultado dos

clones 1 e 8 descrito anteriormente. E a análise do *western blotting*, Figura 11 C, mostra diversas bandas, confirmando mais uma vez que estavam sendo degradadas.

As quatro construções para os domínios funcionais da HIF, do N-terminal até o final do PAS2, sofreram rápida degradação. É fato conhecido que expressão heteróloga em bactéria pode gerar proteínas mal traduzidas, mal enoveladas, truncadas ou degradadas (GOLDBERG, 1972; KOCH, 1971). Outra explicação provável é que todo, ou grande parte do produto da tradução tenha ficado insolúvel quando da lise e extração da bactéria. Porém, não analisamos as frações insolúveis após a lise. Além disso proteínas mal enoveladas são mais susceptíveis a degradação, pois apresentam regiões desestruturadas facilmente acessíveis para proteases.

Realizamos ainda mais uma tentativa de obter uma construção que fornecesse um produto proteico solúvel e sem degradações, o clone desenhado inicia no domínio de ligação ao DNA (bHLH) e vai até o domínio de heterodimerização (Pas-1), denominado então de M1Pas1-1α e M1Pas1-1β (clones 1 e 8, tabela 1)

Os clones foram sequenciados para garantir a correta sequência dos nucleotídeos, após a confirmação, os vetores correspondentes foram transformados em *E. coli*, cepa Rosetta 2(DE3), realizou-se um teste de expressão induzida por IPTG. O resultado do teste, Figura 12A, comparando as amostras induzidas e não induzidas, obtivemos a proteína superexpressa para ambas as subunidades, em aproximadamente 32 KDa para a subunidade α e 38 KDa para a β.

Uma vez que obtivemos bandas superexpressas, passamos a produzir a proteína em 1 L de cultura para um teste de purificação por afinidade, que foi realizado com 500 mM de NaCl, solução tamponante Tris pH 8,5 e na presença dos inibidores de protease. A purificação foi realizada a 4°C de acordo com protocolo padrão.

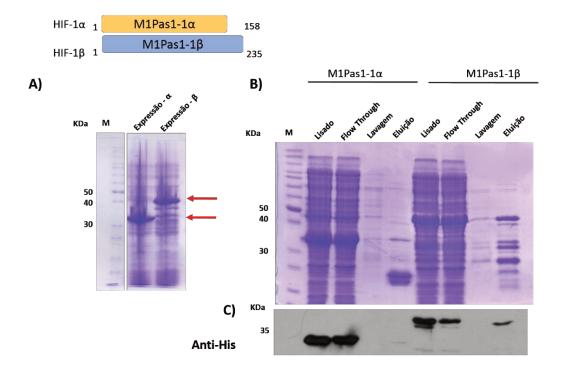


Figura 12. *Teste de expressão e purificação das proteínas M1Pas-1α e -1β.* Gel SDS-PAGE 10% (A e B) corado com *Comassie* (A) Teste de expressão das proteínas. M: marcador molecular; Expressão-α: Teste de expressão do clone M1Pas1-1α; Expressão-β: Teste de expressão do clone M1Pas-1β. (B) Purificação por afinidade da proteína M1Pas-1α e M1Pas-1β. M: Marcador Molecular; Lisado: amostra da fração total no lisado celular; Flow Through: amostra que não ligou na resina; Lavagem: Lavagem da resina de afinidade com 5 mM de imidazol; Eluição: amostra que não ligou na resina; Lavagem: Lavagem da resina de afinidade com 5 mM de imidazol; Eluição: amostra eluída na purificação (C): Análise por *western blotting* da purificação por afinidade descrita acima.

O resultado da purificação por afinidade (Figura 12 B) indica que ambas as proteínas estavam na forma solúvel. No entanto, observamos que elas estavam presente na fração *flow through*, indicando que não aderiram na resina. Um razão para que isso possa ter ocorrido é o fato de a cauda de poli-His não estava acessível ao íon metálico imobilizado na resina, impedindo assim a ligação entre eles. A análise por *western blotting* (Figura 12 C) revela que somente uma pequena porção da proteína M1Pas1-1β, estava presente na fração

eluída e que a maior parte da proteína recombinante estava de fato *flow-through*. Todavia, devido à falta de sucesso em purificar por afinidade a proteína M1Pas1-1α, decidimos não levar a purificação da M1Pas1-1β sozinha a diante, pois objetivamos trabalhar com ambas subunidades para reconstituir os complexos.

2.3.1. Domínios individuais: bHLH-1α e bHLH-1β

Os ensaios com os domínios completos não nos permitiu obter proteínas para realizar experimentos biofísicos, passamos então a trabalhar com os domínios funcionais separadamente. Iniciamos com o domínio de ligação à DNA bHLH (clones 4 e 11, tabela 1), o qual os clones de cada subunidade, em vetor pETSUMO, foram usados para transformação em *E. coli*, cepa Rosetta 2(DE3). As construções foram denominadas bHLH-1α e bHLH-1β. A Figura 13A ilustra os testes iniciais de expressão, onde a comparação entre as amostras induzidas e não induzidas sugere expressão diferencial das construções de interesse, ambas com peso molecular aproximadamente em 23 KDa.

A metodologia para a purificação inicial envolveu a etapa de cromatografia por metais imobilizados. O protocolo foi adaptado a partir daquele usado anteriormente, no qual se utilizou 500 mM de NaCl, e a solução tamponante foi Tris pH 7,5. Os demais reagentes não foram modificados.

A coluna contendo a resina foi previamente equilibrada com o tampão de lavagem (10 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 e 2 mM β-mercaptoetanol). O extrato celular solúvel foi aplicado na resina em seguida foi lavado extensivamente com o tampão de lavagem. As proteínas de interesse foram eluídas com 320 mM de imidazol, seguida da clivagem com a enzima ULP-1. A Figura 13 abaixo apresenta o resultado dessa etapa inicial de purificação.

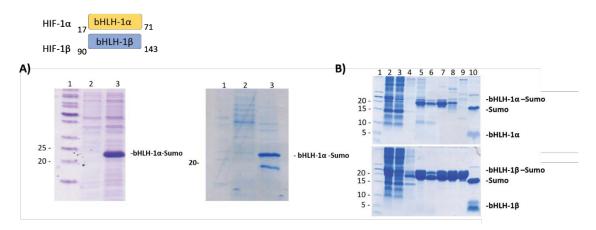


Figura 13. *Teste de expressão e purificação das proteínas bHLH-1α e bHLH-1β*. Gel de Tris-Tricina corado com *Comassie*. (**A**) Testes de expressão dos clones selecionados para o domínio bHLH. Poço 1: Marcador Molecular; Poço 2: Amostra antes da indução; Poço 3: Clones recombinantes, ambos com indução com 0,1 mM de IPTG. (**B**) Frações eluídas no processo de purificação dos domínios. **Superior:** bHLH-1 α Poço 1: Marcador Molecular; Poço 2: Amostra antes da afinidade; Poço 3: Flow Through; Poço 4: Lavagem da resina; Poço 5: Eluição Coluna Afinidade, Poço 6: Flow Through Mono-Q; Poços 7 a 9: Eluição Coluna Mono-Q; Poço 10: Clivagem com ULP-1. **Inferior:** Purificação bHLH-1β, as frações são as mesmas descritas no item A. A massa calculada para os domínios clivados são respectivamente 6.5 e 6.5 KDa.

Um segundo passo de purificação foi realizado explorando agora a carga líquida das bHLH quando na presença do tampão de lavagem (Tris-Base 50 mM pH 7,5, 10 mM NaCl). Para tanto, utilizamos uma coluna do tipo Mono Q HR 5/50 e as proteínas foram eluídas em gradiente linear de 0 a 100% em 40 minutos, e as frações foram eluídas da coluna em 40 volumes de coluna.

Posteriormente, reuniu-se as frações correspondentes as proteínas de interesse, diluiu-se a amostra em solução tampão na ausência de NaCl e foram injetadas na coluna HiTrap Heparin na solução tampão (10mM de NaCl, 50 mM de Tris pH 7,5), eluídas em gradiente linear de 0-100% da solução B (2 M NaCl, 50 mM Tris pH 7,5) em 40 volumes de coluna.

As proteínas eluídas, foram então concentradas e aplicadas numa coluna de exclusão molecular 75 10/30, em solução tampão (10 mM de NaCl, 50 mM de Tris pH 7,5,

0,5 mM TCEP). O resultado da gel filtração para as proteínas de interesse é visualizado na Figura 14 abaixo. As frações foram posteriormente concentradas em Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit com corte de 3 KDa. Ao final do protocolo de purificação o rendimento das proteínas foi de 80 μM e 115μM para bHLH-1α e bHLH-1β, respectivamente.

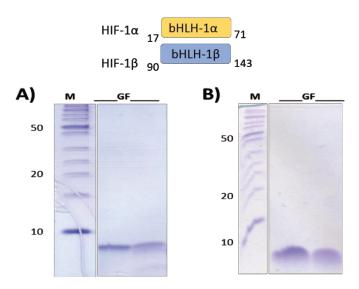


Figura 14. Cromatografia por exclusão molecular das proteínas bHLH-1α e bHLH-1β Gel Tricina corado com Comassie. (**A**) M: Marcador molecular; GF: frações coletadas da bHLH-1α após a gel filtração; (**B**) M: Marcador molecular; GF: frações coletadas da bHLH-1β após a gel filtração.

As etapas de purificação empregadas para a captura e obtenção de uma amostra homogênea e pura, requereu a utilização da coluna Mono-Q antes da coluna de heparina, ao tentarmos eliminar uma das duas etapas, não obtivemos sucesso em separar os contaminantes presentes na amostra. Ao termino da purificação as proteínas foram concentrada e quantificada, de modo que realizamos um ensaio de reconstituição do complexo através da interação com DNA que será descrito a seguir.

2.3.2.1. Eletroforese em gel nativo dos domínios

Verificamos então a capacidade das construções bHLH de se ligarem a sequência de um dos elementos responsivos. No ensaio de eletroforese em gel nativo de agarose, 80 picomoles das proteínas bHLH-1α e bHLH-1β foram previamente incubadas com DNA, e submetidos à eletroforese em condições nativa. O resultado foi observado pela coloração do gel com brometo de etídeo. A alteração no padrão de migração do DNA na presença das proteínas em comparação com o DNA na forma livre indicaria a reconstituição do complexo entre os domínios e o DNA e a obtenção de um complexo estável. Assim, poderíamos submeter o complexo para ensaios de cristalização. No entanto, não observamos nenhuma alteração na migração das bandas, mesmo quando alterando parâmetros da corrida, como por exemplo o pH do tampão. Um resultado representativo pode ser visualizado na Figura 15, indicando desta forma nas condições testadas e com o DNA escolhido, não houve formação de complexos entre bHLH-1α:bHLH-1β:DNA.



Figura 15. Eletroforese em gel nativo da proteína bHLH-1α incubada com bHLH-1β (80 pmol) incubados com duas concentrações de DNA. 1: incubação com 80 pmol de DNA; 2: incubação com 120 pmol de DNA; 3: incubação com 160 pmol de DNA; 4: Controle do experimento com 160 pmol de DNA livre.

Dados da literatura sobre a interação entre HIF-1α e HIF-1β, construções transcritas e traduzidas *in vitro*, demonstraram que somente o domínio bHLH não foi suficiente para reconstituir o complexo com DNA (JIANG, B.-H. RUE, E., WANG, G.L., ROE, R., SEMENZA, 1996), requerendo para tanto uma construção maior que 166 e no mínimo 245 aminoácidos, esta sequência corresponderia aos domínios bHLH, Pas1 e parte do domínio Pas2.

Em contrapartida, sabemos que os domínios do tipo bHLH são conservados e encontrados em um grande número de fatores de transcrição. Em outros casos, a reconstituição do complexo foi possível para proteínas na presença do DNA como tentamos realizar aqui. Dados publicados dos complexos entre o domínio bHLH de outras proteínas e seus elementos responsivos estão disponíveis sob os números de acesso 4H10, 1MDY e 1A0A no Protein Data Bank (www.rcsb.org). Foram a partir destas estruturas que planejamos nossas construções.

A constituição do complexo era fundamental para a realização dos ensaios de cristalização, visto que os domínios sozinhos não interagiram entre si, era necessário obtermos um complexo estável para submete-los a cristalização, impedindo assim a continuação dos experimentos.

2.3.3. Domínios individuais: Pas1-1α e Pas1-1β

Clonamos ainda o domínio Pas1 (clones 5 e 12, tabela 1) de heterodimerização, os clones obtidos (Pas1-1α e Pas1-1β) foram usados para transformação em *E. coli*, cepa Rosetta 2(DE3). A Figura 16A mostra o teste de expressão, onde a comparação entre as amostras induzidas e não induzidas mostra a superexpressão das proteínas, com peso molecular aproximadamente em 25 KDa para ambas proteínas, em fusão som a cauda SUMO.

A metodologia para a purificação inicial dos domínios Pas1 envolveu a etapa de cromatografia por metais imobilizados, no qual se utilizou 500 mM de NaCl, e a solução tamponante foi Tris pH 8,5, para os demais reagentes seguiu-se o protocolo descrito na metodologia. Conseguimos purificar ambas as proteínas, Figura 16B, a Pas1-1α foi eluída

na forma solúvel e posterior clivagem da cauda Sumo (Superior-poço 8), com peso molecular aproximadamente em 10 KDa.

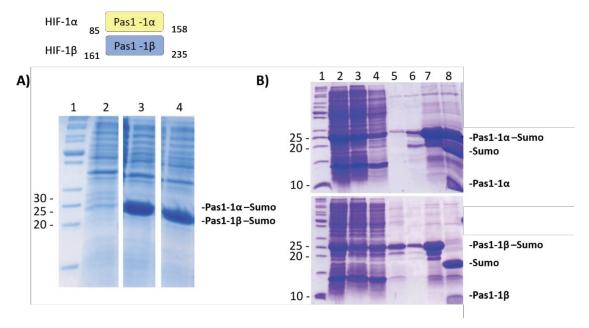


Figura 16. Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie ilustrando a expressão e purificação das proteínas Pas1. (**A**) Teste de expressão dos clones selecionados para o domínio PAS1-1α e -1β. Poço 1: Marcador Molecular; Poço 2: Amostra antes da indução; Poço 3: Clone PAS1-1α; Poço 4: Clone PAS1-1β respectivamente. Indução com 0,1 mM de IPTG. (**B**) Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie das frações eluídas na purificação dos domínios. **Figura Superior** PAS1-1α Poço 1: Marcador Molecular; Poço 2: Amostra antes da afinidade; Poço 3: Flow-through; Poços 4 a 6: Lavagem da resina; Poço 7: Eluição Coluna Afinidade, Poço 8: Clivagem com enzima ULP-1. **Figura Inferior** PAS1-1β, Poço 1: Marcador Molecular; Poço 2: Amostra antes da afinidade; Poço 3: Flow Through; Poços 4 a 6: Lavagem da resina; Poço 7: Eluição Coluna Afinidade, Poço 8: Clivagem com enzima ULP-1. A massa calculada para os domínios clivados são respectivamente 8.5 e 8.4 KDa.

O domínio Pas1-1β também foi purificado e eluído com sucesso na cromatografia por afinidade, Figura 13B inferior, na forma solúvel, livre da cauda de fusão (poço 8). Devido a presença de muitos contaminantes, testamos remover a cauda de fusão por afinidade reversa, ou seja, com a proteína imobilizada na resina, faz-se a clivagem da cauda e elui-se a proteína, que não deve mais apresentar afinidade pela resina. Para tanto, após a aplicação do extrato bruto, a resina de afinidade foi lavada com o tampão sem imidazol,

ressuspendemos a resina em 15 mL desta solução, adicionamos a enzima de clivagem ULP-1 e incubou-se por 16 horas a 4°C.

Após o tempo de incubação a resina foi novamente empacotada na coluna, coletouse o *flow-through*, e posteriormente se eluiram as proteínas restantes. A Figura 17 mostra o resultado do teste.

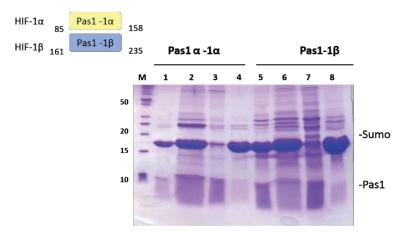


Figura 17. Afinidade reversa da Pas1 em Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie. M: Marcador molecular; **PAS1-1α**: Frações eluídas para a proteína Pas-1α, onde 1: Controle de clivagem; 2: Proteína imobilizada na resina incubada com ULP-1; 3: Fração recuperada; 4: Eluição da resina com imidazol; **PAS1-1β**: Frações eluídas para a proteína Pas1-1β, onde 5: Controle de clivagem; 6: Proteína imobilizada na resina incubada com ULP-1; 7: Fração recuperada; 8: Eluição da resina com imidazol.

Apesar de obter a proteína já clivada, poços 3 e 7, não obtivemos sucesso em separar os contaminantes presente na amostra, para a proteína Pas1-1α e para a subunidade –1β, inclusive a proteína SUMO que deveria ter ficado presa na resina, foi também recuperada no *flow through*.

Desta forma, optamos por eluir a proteína inteira e remover a cauda de fusão logo após a purificação por afinidade, e fazer uso de outras técnicas, como por exemplo, troca iônica, explorando as características bioquímicas da proteína fusionada como estratégia de purificação.

Utilizamos uma coluna de troca iônica do tipo Mono Q como segunda etapa de purificação, na qual, a proteína foi aplicada na coluna e eluida com gradiente de 0 a 100% da solução B em 40 volumes de coluna. O protocolo desenvolvido nesse caso não foi eficiente em separar a proteína alvo dos contaminantes presentes na amostra, principalmente da proteína Sumo, como ilustrado nas Figuras 18A e 18B.

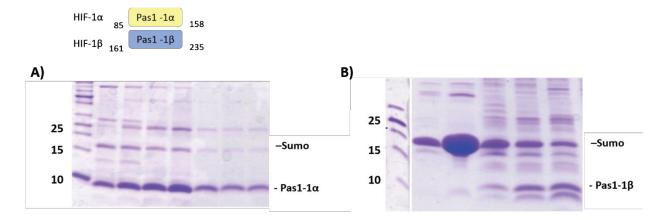


Figura 18. Purificação por troca iônica das proteínas Pas1-1α e -1β. Gel de Tricina corado com Comassie das frações eluídas durate a purificação. (A) PAS-1α das frações correspondentes à troca iônica (Mono-Q) coletadas ao longo do gradiente linear de em diferentes concentrações de sal. (**B)a** PAS-1β, correspondente as frações eluídas coluna Mono-Q também durante o gradiente linear de sal.

A eluição em gradiente linear não apresentou picos bem definidos, o que mostra que não houve separação eficiente das proteínas e contaminantes, resultado observado na análise da Figura 18. Optamos então em fazer um gradiente de eluição segmentado, onde após a injeção da amostra, a fase estacionária foi lavada com 15 volumes de coluna ou até a curva da UV voltar a linha de base, nas concentrações: 10, 18, 24, 30, 40 e 45% da solução B. Obtivemos a separação dos picos e a frações eluídas foram analisadas em gel de tricina, Figura 19, no qual observamos que somente a proteína sumo foi eluída livre de contaminantes em 10% da solução B, não sendo novamente possível separar a proteína de interesse dos demais contaminantes.

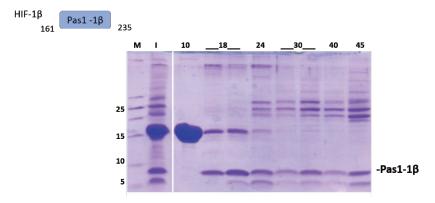


Figura 19. Gradiente segmentado na troca iônica da Pas1-1β. Gel Tricina corado com Comassie das frações eluídas. M: Marcador molecular; I: amostra da PAS1-1β aplicada na coluna;10, 18, 24, 30, 40 e 45 Amostras representativa das frações coletadas em cada etapa do gradiente, respectivas em porcentagem da solução B.

O resultado apresentado foi idêntico para a proteína Pas-1α, não sendo possível através de troca iônica obter uma amostra mais homogênea e livre de contaminantes. Após a purificação por troca iônica, que removeu somente alguns contaminantes, testamos a purificação por interação hidrofóbica. Utilizamos então a coluna HiTrap Phenyl FF 1 mL (GE), anterior a aplicação, a amostra foi preparada com 1M de NaCl, aplicamos a amostra na coluna, e seguiu-se o padrão de eluição por gradiente linear de 0-100% em 40 volumes de coluna. O perfil de carregamento da amostra, mostrou que uma parcela significativa da amostra não interage com a matriz, saindo no *flow through*, e a parte que interagiu foi eluída em um pico único, já no final do gradiente, em 0% de NaCl, indicando que houve forte interação com a matriz.

De modo a eluir as proteínas de interesse durante o gradiente, foram adicionados 10% de glicerol na solução de eluição B. O glicerol tende a desfavorecer a interação das proteínas com a matriz, permitindo assim a eluição durante o gradiente. A eluição das

proteínas ocorreu com 8% do gradiente para Pas-1α e 40% para a subunidade –β foi eluída com 40% de B. A Figura 20 abaixo, mostra o resultado da purificação.

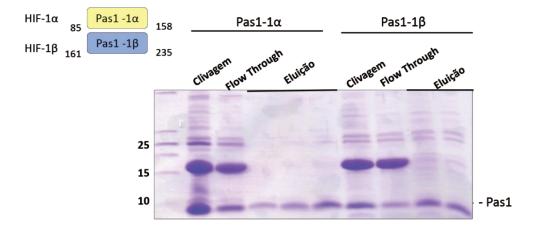


Figura 20. Purificação por interação hidrofóbica das proteínas Pas1-1α e -1β. Gel Tricina corado com Comassie das frações eluídas. M: Marcador molecular; Clivagem: amostra da PAS1-1α aplicada na coluna; Flow Through: Amostra que não interagiu com a coluna; Eluição: Frações coletadas na eluição; Clivagem: amostra da PAS1-1β aplicada na coluna; Flow Through: Amostra que não interagiu com a coluna; Eluição: Frações coletadas na eluição.

A figura mostra que uma grande parte da proteína de interesse não interagiu com a coluna, saindo no *flow through* e uma fração recuperada durante o gradiente, sugerindo a presença de populações heterogêneas da amostra. As frações recuperadas durante a eluição foram concentradas e aplicadas numa coluna de exclusão molecular Superdex 75 10/30, com o intuito de separar os contaminantes ainda presentes na amostra explorando a diferença de tamanho entre elas. No cromatograma abaixo (Figura 21) à esquerda, temos o perfil de eluição das proteínas.

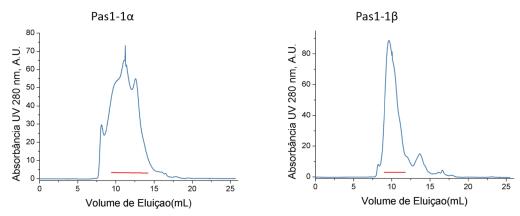


Figura 21. Perfil de eluição das proteínas Pas-1αe Pas-1β durante a purificação por exclusão molecular. **Esquerda**: Pas-1α; **Direita**: Pas-1β

O cromatograma mostra que não houve separação entre as proteínas de acordo com o tamanho esperado para a Pas1-1 α , o que seria caracterizada por picos bem definidos. O mesmo pode ser observado para a construção Pas1-1 β (figura 21 à direita). Para esta última, apesar de apresentar um pico um pouco mais bem definido, quando visualizado em gel as amostras coletadas (Figura 22) observamos a presença dos mesmos contaminantes ainda na amostra.

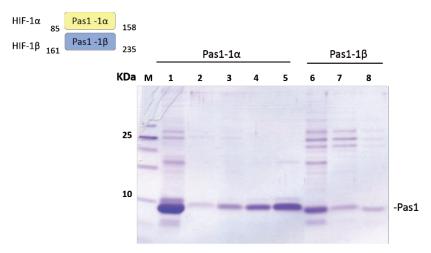


Figura 22. Gel Tricina das frações eluídas na cromatografia por exclusão de tamanho (Pas1- 1α e - 1β). M: Marcador molecular; 1: amostra da Pas1- 1α concentrada antes de ser aplicada na coluna; 2, 3, 4 e 5 frações coletadas durante a corrida; 6: amostra da Pas1- 1β concentrada antes de ser aplicada na coluna; 7 e 8 frações coletadas durante a corrida.

A Pas1-1 α , é a proteína que apresenta maior grau de pureza, quando comparada com a subunidade -1 β , no entanto o protocolo estabelecido é longo, envolve quatro etapas de purificação, especificamente cromatografia por afinidade, seguido de troca iônica, interação hidrofóbica e por fim a exclusão por tamanho, o que resultou um produto final com baixíssimo rendimento (menos de 0,4 mg de proteína pura).

Uma possível solução para obtermos maiores níveis de expressão das proteínas, maior solubilidade e com rendimento final adequado aos ensaios de cristalização, seria ampliar a região clonada no C-Terminal dos domínios, atribuindo ao domínio Pas-1, por exemplo, uma extensão, assim como no caso do domínio Pac, que é uma região associada ao domínio Pas-2. Quando analisada a estrutura secundária do domínio Pas1-1α, a predição é de uma região com três alfas hélice e duas folhas beta, no entanto, quando repetida a análise complementando a sequência com 50 aminoácidos na construção, Figura 23 abaixo (região destacada em vermelho), a predição da estrutura secundária passa a ter, seis folhas betas.

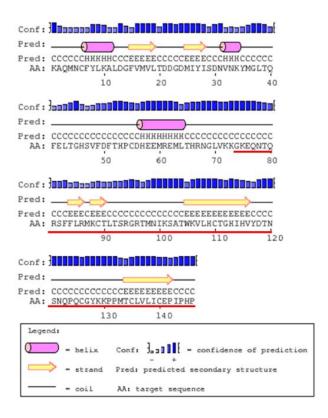


Figura 23. *Análise da estrutura secundária do domínio Pas-1α*, gerado pelo programa Psipred, acesso em: *http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/*

A ampliação do domínio Pas1 na região indicada poderia conferir maior estabilidade, no caso do clones completos que sofreram degradação, e esperamos que para o domínio Pas1 isolado diminuísse a interação com os contaminantes, desta forma, possibilitando a obtenção de uma amostra pura. Porém, construções alternativas de Pas1 ainda não foram feitas.

A interação entre os domínios Pac da HIF- 1α ou HIF- 2α com a subunidade - β ocorre através de uma folha beta (CARDOSO et al., 2012). Desta forma acreditamos que a mudança na posição terminal dos clones, com a presença de um maior número de folhas beta, colaboraria para o melhor rendimento, a purificação, e a reconstituição deste complexo *in vitro*.

2.3.4. Domínios individuais: Pac-1α, Pac-3α e Pac-β

Os clones referentes ao domínio Pac ou Pas-2 associado ao C-Terminal (clones 4, 7 e 11, tabela 1) respectivos de Pac-1α, Pac-3α e Pac-1β foram usados para transformação em *E. coli*, cepa Rosetta 2(DE3). A comparação entre as amostras bacterianas induzidas e não-induzidas mostraram a superexpressão das três proteínas, respectivamente com peso molecular aproximadamente em 15 KDa para Pac-1 e -3α clonadas em pet28a, assim como para a subunidade –β com peso molecular aproximado em 25 KDa clonada em pETSUMO. Após o teste, expressamos a proteína na escala de 5 litros por purificação realizada para Pac-1α e Pac-3α e de um litro para a Pac-1β.

A metodologia utilizada foi a mesma para os três clones, que passou por uma cromatografia por metais imobilizados, seguido de clivagem por Trombina ou ULP-1, após a clivagem utilizou-se a purificação por troca iônica (coluna Mono-Q), do qual se coletou o *flow through*, visto que a proteína não interagiu com a resina. Este foi concentrado e aplicado na coluna de Gel Filtração 75 16/60 do qual se coletamos as frações referentes ao pico. O resumo de todas as etapas de purificação para a proteína Pac-1α é visualizado na Figura 24 (A, B e C).

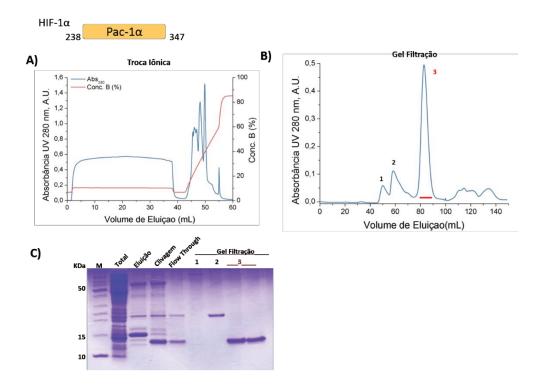


Figura 24. Resumo das etapas de purificação da proteína Pac-1α. A) Cromatograma da purificação da Pac-1α em coluna de troca aniônica (Mono Q HR5/5, GE); B) Cromatograma da purificação por filtração em gel, mostrando o pico simétrico da proteína (3). C) Gel de Tricina resumindo as etapas de purificação. M: Marcador molecular; Total: Lisado celular total; Eluição: Fração eluída na cromatografia de afinidade da resina Talon; Clivagem: clivagem da proteína com 100U de Trombina por 16 horas a 4°C. Flow Through: Fração referente ao flow through da troca iônica que foi coletado; Gel Filtração: Fração referente aos três picos da gel filtração, onde o pico 3 corresponde a proteína de interesse.

A purificação da proteína Pac-3α seguiu-se as mesmas etapas de purificação descritas para a proteína Pac-1α, cromatografia de afinidade, clivagem com trombina, troca iônica (Figura 25A) e gel filtração (Figura 25B). O resumo da purificação é visualizado na Figura 25C.

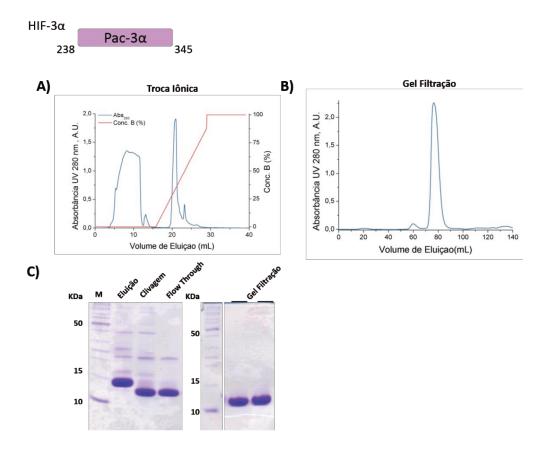


Figura 25. Resumo das etapas de purificação da proteína Pac-3α. A) Cromatograma da purificação da Pac-3α em coluna de troca aniônica (Mono Q HR5/5, GE); B) Cromatograma da purificação por filtração em gel, mostrando o pico simétrico da proteína; C) Gel de Tricina resumindo as etapas de purificação. M: Marcador molecular; Eluição: Fração eluída na cromatografia de afinidade da resina Talon; Clivagem: clivagem da proteína com 100U de Trombina por 16 horas a 4°C. Flow Through: Fração referente ao flow through da troca iônica que foi coletado; Gel Filtração: Frações referente ao centro do pico único da gel filtração.

A proteína Pac-1β foi também purificada por cromatografia de afinidade, clivagem da cauda com ULP-1, seguida por troca iônica, do qual coletou-se o *flow Through* (Figura 26 A), e por último, gel filtração (Figura 26 B). O resumo das etapas de purificação pode ser visualizado na Figura 26 C.

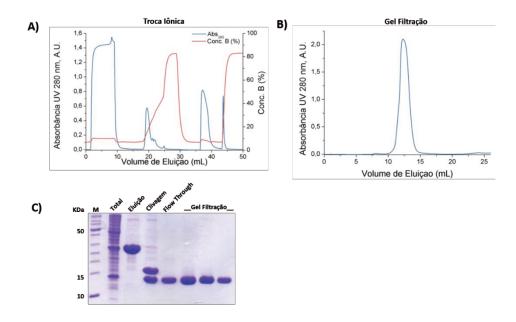


Figura 26. Resumo das etapas de purificação da proteína Pac-1β. A) Cromatograma da purificação da Pac-1β em coluna de troca aniônica (Mono Q HR5/5, GE); B) Cromatograma da purificação por filtração em gel, mostrando o pico simétrico da proteína; C) Gel de Tricina resumindo as etapas de purificação. M: Marcador molecular; Total: Lisado celular total; Eluição: Fração eluída na cromatografia de afinidade da resina Talon; Clivagem: clivagem da proteína com ULP-1. Flow Through: Fração referente ao flow through da troca iônica que foi coletado; Gel Filtração: Frações referente ao centro do pico único da gel filtração.

As frações referentes ao centro do pico da gel filtração, para as três proteínas, foram coletadas, concentradas e utilizadas nos ensaios de interação, que serão descritos separadamente no próximo capítulo.

2.4. Conclusões - HIF

Nesta primeira parte da dissertação, reportamos os resultados referentes às tentativas de produção dos diversos domínios funcionais das subunidades -1α e -1β, além do domínio Pac-3α, do fator de transcrição HIF. Apesar de várias das construções planejadas não resultarem em amostras promissoras para posteriores estudos bioquímicos e estruturais. É possível que variações nos tamanhos das construções e até mesmo mudanças mais drásticas

na composição de soluções de lise, principalmente, possam ter efeito positivo na solubilização e estabilidade das amostras. Um exemplo pode ser o caso da construção Pas1, que possivelmente, através da adição aproximadamente 60 a 70 resíduos C-terminal, viesse a gerar um produto proteico solúvel e estável. Todavia, não foi possível realizar tais testes, devido ao curto tempo de execução do projeto.

Especificamente, no caso das construções bHLH, apesar de termos expresso e purificado as proteínas com sucesso na forma solúvel, não conseguimos confirmar interação do heterodímero com o elemento responsivo testado. Uma explicação, como mencionado anteriormente, pode ser o fato de que seria necessário adicionar os domínios Pas1 e Pas2 às nossas construções, resultando em equivalentes à M1Pas1, M1Pas2 e ΔNPas2. Todavia, no banco de dados PDB encontramos exemplo de estruturas cristalográficas que foram obtidas a partir de construções equivalentes em tamanho às bHLH aqui usadas, em complexo com os respectivos fragmentos de DNA alvos.

Já no caso das construções referentes ao domínio Pac, três proteínas foram produzidas com sucesso, também na forma solúvel e em grande quantidade, o que permitiu com que déssemos andamento aos estudos inicialmente planejados, de caracterização das interações entres as diversas combinações das subunidades -1α , -1β e -3α . Os detalhes desses experimentos são descritos na próxima parte.

3. Parte II: Ensaios de interação entre os domínios Pac

O domínio Pac corresponde ao Pas-2 na arquitetura básica da HIF, acrescido de uma região adjacente, descrita como associada, com aproximadamente 50 aminoácidos, portanto *Pas-associated C-Terminal* (Pac). Como discutido na parte introdutória da dissertação, existe a suposição de que HIF-3α seja um regulador negativo da função de HIF-1α. Dado que a interação com a subunidade -1β é um ponto comum entre as duas proteínas, hipotetizamos que a afinidade de interação entre HIF-3α e HIF-1β seja maior que entre HIF-1α e HIF-1β e que o domínio Pac seja importante nesse contexto.

Apesar de os domínios serem pequenos em tamanho (~15 KDa), vale a pena ressaltar aqui os relativos baixos valores de identidades sequencias entre as três construções: Pac-1 α e Pac-3 α igual a 53%, Pac-1 α e Pac-1 β igual a 28% e Pac-3 α e Pac-1 β , igual a 25%.

```
Pac-1α
              -----DSKTFLSRHSLDMKFSYCDERITELMGYEPEELLGRSIYEYYHALDSDH 49
              -----GRGAFLSRHSLDMKFTYCDDRIAEVAGYSPDDLIGCSAYEYIHALDSDA 49
Pac-3α
Pac-18
              SPNCTDMSNVCQPTEFISRHNIEGIFTFVDHRCVATVGYQPQELLGKNIVEFCHPEDQQL 60
                              *:***.:: *:: *.* .
                                                   **.*:*:*
              LTKTHHDMFT-KGQVTTGQYRMLAKRGGYVWVETQATVIYNTKNSQPQCIVCVNYVVSGI 108
Pac-1α
Pac-3\alpha
              VSKSIHTLLS-KGOAVTGOYRFLARSGGYLWTOTOATVVSGGRGPOSESIVCVHFLISOV 108
              LRDSFQQVVKLKGQVLSVMFRFRSKNQEWLWMRTSSFTFQNPYSDEIEYIICTNTNVKNS 120
               : .: : :.. ***. : :*: ::
                                          ::* .*.: .. . : : *:*.:
Pac-1α
              IO- 110
Pac-3α
              EET 111
Pac-1β
```

3.1. Objetivos

De posse das proteínas puras, os objetivos foram de caracterizar a interação entre as proteínas, reconstituir os complexos formados entre Pac- 1α e Pac- 3α com a subunidade $-\beta$ *in vitro*, determinar através de quais regiões esta interação ocorre, e ainda o de cristalizar e difratar o domínio Pac- 3α sozinho ou em complexo.

3.1.1. Objetivos Específicos

- Determinar e caracterizar a formação de complexos através da técnica de anisotropia de fluorescência;
- Determinar as regiões de interação através de Ressonância Magnética Nuclear;
- Cristalizar e difratar o domínio Pac-3α sozinho ou em complexo;

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Anisotropia de Fluorescência

Nesta técnica, luz polarizada é incidida sobre a amostra, de forma que somente os fluoróforos orientados na mesma direção que a luz polarizada absorvem energia, tornandose excitados e subsequentemente emitindo luz. A livre movimentação das moléculas em solução altera a orientação relativa dos fluoróforos, fazendo com que a luz seja emitida em um plano de polarização diferente do incidente. Dessa forma, quando se mede a relação entre a luz emitida no mesmo plano da luz incidente ("vertical") e a luz emitida no plano ortogonal ("horizontal") é possível se inferir a velocidade de rotação das moléculas em solução (Figura 27).

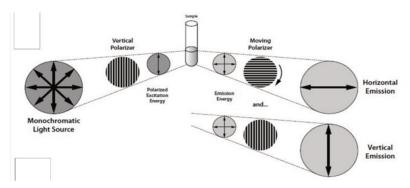


Figura 27. Representação esquemática da detecção de anisotropia de fluorescência. De acordo como o arranjo experimental do equipamento, uma luz monocromática passa por um polarizador, sendo orientada em um único sentido para então ser incidida sobre a amostra. O detector irá medir a luz emitida pela molécula tanto no sentido paralelo ao de excitação quanto no ortogonal a ele.

Devido ao movimento Browniano, moléculas livres em solução sofrem um movimento de rotação dependente do tamanho da molécula. Quanto maior for a molécula mais lento será seu movimento, de modo que a luz emitida pelo fluoróforo continuará em maior parte no mesmo plano de polarização da luz incidente. A luz emitida conserva a polarização. Já moléculas menores, cuja rotação é mais acelerada, fazem com que a luz seja emitida pelos fluoróforos em todas direções, levando a uma maior despolarização da luz (INVITROGEN MANUAL, 2006). Uma consequência direta desse fenômeno é o fato de que, moléculas sofrem uma redução na sua velocidade de rotação a partir do momento em que interagem com algum ligante, pois o complexo de interação apresentará um tamanho maior do que a molécula sozinha. A Figura 28 abaixo caracteriza essa interação:

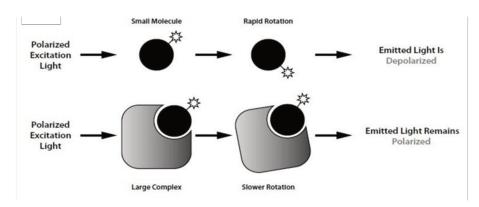


Figura 28. Representação esquemática da diferença na anisotropia de fluorescência entre moléculas pequenas e complexos formados.

Dentro desse contexto, utilizamos a técnica de anisotropia de fluorescência para a reconstituição dos heterodímeros formados entre as subunidades Pac -1 e -3α com a subunidade Pac-1β, bem como reconstituir a interação formada entre Pac-1 e Pac-3α, e posteriormente determinar as constantes destas interações. Para tanto, as proteínas foram tituladas em concentrações crescentes, em uma faixa que permita a obtenção de uma curva de interação a partir da medição de anisotropia. O cálculo da anisotropia foi feito pelo *software* do próprio equipamento (Envision PerkinElmer) pela seguinte equação:

$$r = \frac{(I_{vv} - I_{vh})}{(I_{vv} + 2GI_{vh})}$$
, onde $G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}}$,

onde r = anisotropia; Ivv = intensidade de emissão quando o polarizador da excitação e da emissão estão orientados verticalmente; Ivh = intensidade de emissão quando o polarizador da excitação se encontra na posição vertical e o polarizador da emissão se encontra orientado horizontalmente; Ihh = intensidade de emissão quando o polarizador da excitação e da emissão estão orientados horizontalmente; Ihv = intensidade de emissão quando o polarizador da excitação se encontra na posição horizontal e o polarizador da emissão se encontra orientado verticalmente.

Os valores de anisotropia foram normalizados, subtraindo da medida o valor de anisotropia obtido somente para a proteína marcada, desta forma, corrigindo o *background*. Os valores de Kd foram estimados utilizando-se os valores de anisotropia obtidos, ajustados por regressão não-linear de mínimos quadrados empregando-se o software Origin (OriginLab) utilizando-se a seguinte equação:

$$y = ai + (af - ai)(\frac{\left(\frac{x^n}{k^n}\right)}{1 + \left(\frac{x^n}{k^n}\right)})$$

Onde y é o valor de anisotropia medido, ai é a anisotropia inicial, af é a anisotropia final, k é a constante de dissociação (Kd), n é o índice de Hill e x é a quantidade de proteína não-marcada adicionada.

Para realizar o ensaio, fizemos a marcação da Pac-1α e Pac-1β purificadas com o fluoróforo FITC (*Fluorescein isothiocyanate*, Thermo Scientific), seguindo as intruções do fabricante. Após a marcação, as amostras foram purificadas em uma coluna HiTrap Dessalting (GE) acoplada a AKTA FPLC com fluxo de 1 mL/min, para se retirar o excesso de FITC não incorporado. Coletamos alíquotas de 0,5 mL que posteriormente foram quantificadas medindo-se a absorbância em 280 e 494 nm. Para se calcular a concentração da Pac-1α e Pac-1β após marcação empregou-se a seguinte fórmula:

Concentração de proteína (M) =
$$\frac{\text{A280 - (A495 X fator de correção})}{\epsilon \text{ proteína}} \text{X fator de correção}$$

Onde: ε proteína = coeficiente de extinção molar da proteína e fator de correção = A280/A494 = 0.3 (a sonda contribui com absorbância a 280 nm).

O ensaio utilizando Pac-1β-FITC foi realizado mantendo-se a concentração fixa em 20 nM e variando a concentração de Pac-1α, através de diluição seriada onde a concentração inicial a 570 μM passou por 17 diluições seriadas na razão constante de volume de 1:1, sobre solução contendo 30 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl e 0,5 mM TCEP. Em seguida, 67,50 μL de cada diluição foram então acrescentados de 22,50 μL da Pac-1β-FITC diluída na mesma solução e transferidos para uma placa OptiPlate-384 Black (PerkinElmer), com cada poço contendo 25 μL. Foram realizadas leituras periódicas da placa, no período de 0 a 100 horas. Tomou-se a precaução de manter a placa em temperatura ambiente protegida da luz e contra evaporação. Ao total foram realizados três experimentos independentes com três replicatas em cada.

O ensaio da Pac- 3α não marcada foi realizado nas mesmas condições descritas acima, no mesmo número de replicações e experimentos. A concentração de estoque inicial foi de $2.700~\mu\text{M}$, o qual também passou por 17 diluições seriadas de 1:1 em solução de $30~\mu\text{M}$ de Hepes pH 7,5, $150~\mu\text{M}$ de NaCl e TCEP 0,5 mM.

As medidas foram realizadas no equipamento EnVision (PerkinElmer), com excitação do fluoróforo no comprimento de onda de 494 nm e a emissão foi detectada no comprimento de onda de 518 nm, utilizando-se 2 filtros de polarização ortogonais entre si. Os dados coletados foram analisados no *software* Origin 8.1 (OriginLab).

Para o ensaio de interação com Pac-1α-FITC e Pac-3α não marcada, foi realizado mantendo também a concentração da proteína marcada fixa a 20 nM da proteína marcada e titulando a Pac-3α, por diluição seriada, com concentração inicial a 1300 μM, passando por 17 diluições seriadas na razão constante de volume de 1:1. A adição a proteína marcada, coletada de dados e tempo realização do ensaio foi realizado nas mesmas condições

descritas acima, realizando no total dois experimentos independentes com três replicações cada.

3.2.2. Ensaio de Ressonância Magnética Nuclear

Para identificarmos e compararmos as regiões de interação entre a Pac- 1α e - 3α com a subunidade - 1β , uma vez que as subunidades α possuem baixa identidade entre si, foram realizados experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

Para tanto fizemos a marcação isotópica da Pac-1β, expressando-a em meio mínimo M9 modificado, contendo o isótopo ¹⁵N, proveniente de ¹⁵NH₄Cl, conforme metodologia descrita por Li *et al*, 2002. A indução da proteína de interesse foi realizada com 0,2 mM de IPTG por 16 horas a 18°C. As etapas de purificação seguiram os protocolos descritos, igualmente realizados para a proteína sem marcação isotópica, porém, durante a etapa de purificação por exclusão molecular, a proteína marcada com ¹⁵NH₄Cl foi purificada em tampão contendo 30 mM de fosfato de sódio pH 7,2, 70 mM de NaCl, 0,5 mM TCEP. A proteína foi concentrada até 0,2 mM e foi adicionado 5% de D₂O na amostra.

Inicialmente, foi obtido um espectro de correlação entre hidrogênios e nitrogênios da Pac-1β contendo ¹⁵N, do tipo HSQC, no qual tem-se um mapa em duas dimensões dos picos que correspondem aos pares N-H das amidas da cadeia principal da proteína. Uma vez obtido o espectro, fez-se então o assinalamento dos picos da Pac-1β, identificando assim a posição de cada nitrogênio e seu hidrogênio associado no espectro de ¹⁵N-HSQC. Utilizando-se a lista de deslocamentos químicos dos átomos da proteína Pac-1β, previamente existente no banco de dados BMRB, depositada sob o número 6597, foi feita a identificação da maioria dos picos no espectro de ¹⁵N-HSQC. Alguns picos, entretanto, apresentaram diferenças em relação ao dado disponível no banco de dados, tornando

necessário o assinalamento destes. Para isso, expressamos a proteína novamente em meio mínimo M9 modificado contendo, além de ¹⁵NH₄Cl, ¹³C-Glicose. A proteína contendo ¹⁵N/¹³C foi expressa e purificada nas mesmas condições descritas anteriormente. De posse da proteína pura, esta foi concentrada até 500 mM, adicionou-se 5% de D₂O e foram coletados os seguintes espectros de tripla ressonância: HNCACB e CBCA(CO)NH.

Todos os espectros de RMN foram adquiridos a 25°C em espetrômetro Varian Inova de 600 MHz (com campo magnético de 14,1 T), operando na frequência de 599,883 MHz para ¹H; 60,786 MHz para ¹⁵N; e 150,866 MHz para ¹³C; com sonda criogênica de ressonância tripla. Os dados foram processados utilizando o aplicativo NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995) e visualizados através do aplicativo NMRView5 (Johnson & Blevins, 1994).

Para os experimentos de interação dos domínios Pac-1α e Pac-3α com o domínio PAC-1β, através de ressonância magnética nuclear, as subunidades α, sem marcação isotópica, foram purificadas conforme metodologia descrita, porém na etapa de purificação por exclusão molecular, trocou-se o tampão para 30 mM de fosfato de sódio pH 7,2, 70 mM de NaCl, 0,5 mM de TCEP, o mesmo utilizado para a Pac-1β. Após concentração da Pac-1α para 900 μM e da Pac-3α para 1000 μM, e adição de 5% de D₂O, cada uma delas, separadamente, foi adicionada à Pac-1β contendo ¹⁵N, em concentrações crescentes, conforme indicado na tabela 2. Então, espectros do tipo ¹⁵N-HSQC foram coletados após cada etapa da titulação.

Tabela 2: Descrição das titulações realizadas no ensaio de RMN. (**Superior**) Volumes e concentrações da Pac-1α, sem marcação isotópica, durante titulação desta, inicialmente a 900 μ M, em 350 μ L da Pac-1 β , inicialmente a 217 μ M. (**Inferior**) Volumes e concentrações da Pac-3 α , sem marcação isotópica, durante a titulação desta, inicialmente a 1000 μ M, em 350 μ L da Pac-1 β , inicialmente a 217 μ M.

#	Volume titulado Pac-1α (uL)	Volume Final do complexo (uL)	Concentração final Pac-1α (μΜ)	Concentração final Pac-1β (μΜ)
0	-	350	0	217
1	10	360	25	210
2	21	371	50	204
3	46	396	100	191
4	50,3	457	200	166
5	113,4	631	400	120

#	Volume titulado Pac-3α (uL)	Volume Final do complexo (uL)	Concentração final Pac-3α (μΜ)	Concentração final Pac-1β (μM)
0	-	340	0	217
1	9	349	25	211
2	18	358	50	206
3	27,5	367,5	75	200
4	37,2	377,2	100	195
5	58,2	398,2	150	185
6	80,2	420,2	200	175
7	129,2	269,2	299	157
8	185,2	525,2	400	140
9	326,2	666,2	600	110
10	441,2	781,2	740	94

3.2.3. Ensaio de Cristalização

Amostras puras da proteína Pac-3α foram concentradas para 500 uM e submetida a ensaios de cristalização. As varreduras iniciais por condições de cristalização foram feitas pela equipe do Robolab, junto ao LNBio, utilizando o sistema robotizado *HoneyBee* (Genomic Solutions). Esse sistema faz uso do método de difusão de vapor por gotas sentadas, através do qual, realizou-se triagens de 600 condições, utilizando os seguintes kits: Crystal Screen (Hampton Research), Wizard (Emerald BioSystems), PACT (Nextal/Qiagen), JCSG (Nextal/Qiagen), Preciptant Synergy (Emerald BioSystems) e

SaltRX (Hampton Research). Foram feitas gotas de 0,5 uL de proteína com 0,5 uL de solução do poço. Os experimentos foram mantidos em temperatura de 18 °C e 4 °C, para atingir equilíbrio da pressão de vapor ao longo dos dias. O aparecimento de possíveis cristais foi monitorado pelo equipamento Rock Imager 100 (Formulatrix), que coletou imagens em luz visível e em luz ultravioleta, diferenciando então cristais de proteínas e cristais formados por sal. As imagens foram coletadas seguindo a série Fibonacci para 55 dias.

Um ensaio de cristalização também foi realizado com o complexo Pac-3α –Pac-1β na concentração final de 500 uM, o complexo foi incubado por 16 horas a 4°C antes de ser submetido ao ensaio de cristalização. O ensaio foi realizado nas condições de 18 e 4°C, utilizou-se na triagem inicial os 6 kits já descritos acima, e do kit de cristalização para complexos de proteínas (Sigma). As gotas foram feitas com 0,5 uL de proteína com 0,5 uL de solução do poço. A formação de cristalis foi acompanhada nas mesmas condições reportadas acima.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Anisotropia de Fluorescência

Para determinação das constantes de dissociação entre Pac-1α e Pac-3α quando tituladas sobre 20 nM de Pac-1β, realizamos ensaios de anisotropia de fluorescência utilizando Pac-1β marcada com FITC. Após as titulações serem realizadas, os complexos foram incubados por até 100 horas a temperatura ambiente e protegidos da luz, e, ao longo do tempo, começando em 0 horas, medimos de cinco a seis pontos ao longo dos dias para

monitorarmos o alcance do equilíbrio de interação e assim determinar as constantes de dissociação em solução. As Figuras 29 e 30 mostram os perfis de interação em função dos tempos de leitura.

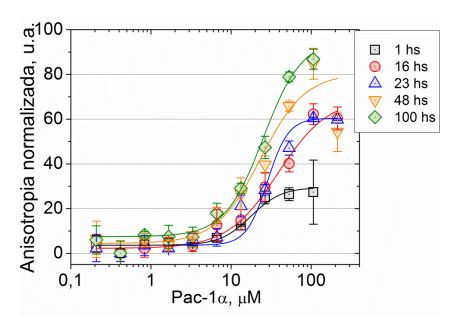


Figura 29. *Anisotropia de fluorescência de 20 nM de Pac-1\beta-FITC incubadas com até 230 \muM Pac-1\alpha. Os dados experimentais foram normalizados com relação à menor leitura de anisotropia dentro de cada conjunto de medidas.*

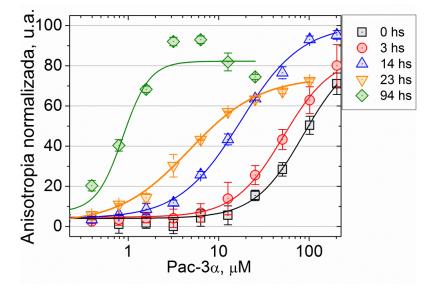


Figura 30. Anisotropia de fluorescência de 20 nM de Pac- 1β -FITC incubadas até 230 μ M Pac- 3α . Os dados experimentais foram normalizados com relação à menor leitura de anisotropia dentro de cada conjunto de medidas

Em seguida, através de ajustes de curvas do tipo sigmoidal para cada perfil de interação ao longo do tempo, extraímos os valores das constantes de dissociação, Kd, que podem ser encontrados na Tabela 3 e ilustrados na Figura 31.

Tabela 3: Constantes de dissociação (kd) e tempo para as curvas de interação entre Pac- 1α e Pac- 3α quando tituladas em 20 nM de Pac- 1β

Howas	Kd, μM		
Horas	Pac-1α:Pac-1β	Pac-3α:Pac-1β	
0	-	$871,3 \pm 281,7$	
1	$16,1 \pm 3,4$		
3	$14,0 \pm 1,5$	$518,7 \pm 333,9$	
14	-	$174,0 \pm 12,9$	
16	$20,3 \pm 11,2$	-	
23	$27,4 \pm 5,2$	$47,2 \pm 2,3$	
48	$25,5 \pm 5,0$	-	
94	-	8.7 ± 2.93	
100	$20,3 \pm 3,4$	-	

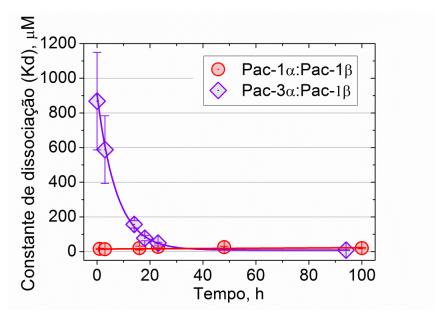


Figura 31. Curva de comparação do alcance do equilíbrio dinâmico, através da variação das constantes de dissociação, Kd, entre Pac-1 α (vermelho) e Pac-3 α (azul), quando tituladas sobre Pac-1 β .

Através da análise da Tabela 3 e Figura 31 verificamos que a interação entre Pac- 1α e Pac- 1β parece se estabilizar logo na primeira hora do experimento, sem muita variação em até 100 horas de medida. Quando todos os pontos são utilizados para um ajuste de curva do tipo linear, temos que o Kd médio da interação é de $20.5 \pm 0.1 \, \mu M \, (R^2=0.97)$.

Interessantemente, no caso da Pac-3 α , enquanto que o valor inicial da constante é de 871,3 ± 281,7 μ M, após 96 horas, temos um Kd de 8,7 ± 2,93 μ M. Um curva de decaimento do tipo exponencial do tipo Kd = Kd_i*exp(-t/d) + Kd_e, explica a interação de maneira bastante precisa (R²=0.99). Neste caso, os parâmetros da curva são: Kd em 0 hora (Kd_i) = 896,3 ± 103,7 μ M, taxa de decaimento (d) de 7,4 ± 0,3 μ M/h e Kd_e no equilíbrio = 8,8 ± 1,1 μ M e t é o tempo de medida.

Quando comparamos as constantes extraídas da interação entre Pac-1α e -3α com Pac-1β, Pac-3α atinge valores próximos do equilíbrio somente após 30 horas de incubação. Dados da literatura, obtidos por RMN, indicam que as afinidades entre os domínios Pac-1α:Pac-1β e Pac-2α:Pac-1β são intrinsecamente baixas, estimadas em aproximadamente 120 μM (SCHEUERMANN et al., 2009), e que uma afinidade na escala de nanomolar somente foi obtida após a reversão de uma ponte salina formada entre a arginina 245 (HIF-2α) com o ácido glutâmico 362 da HIF-1β. Esta reversão causou um aumento da carga positiva na região da mutação na HIF-1β, reforçando assim um conjunto de interações iônicas fracas presentes na forma *wide type* e gerando interações iônicas fortes, como observado na Figura 32 abaixo.

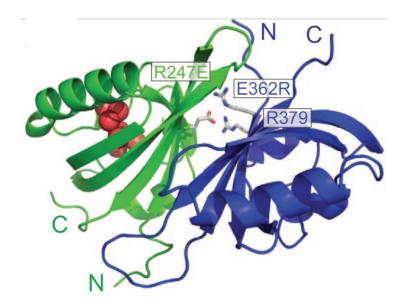


Figura 32. Estrutura cristalográfica do complexo Pac-2α-Pac-1β (PDB ID 3f1p), mostrando a reversão da ponte salina formada entre os aminoácidos R247E (Pas2-2α verde) e E362R (Pas2-1β azul). Detalhe das esferas em vermelho, são 8 moléculas de água ordenadas dentro de uma cavidade na estrutura da Pac-2α, figura extraída de Scheuermann et al, PNAS, 2009.

Primeiramente, através da técnica de anisotropia de fluorescência, obtivemos um valor bem menor (aproximadamente 6 vezes) de Kd para Pac-1α:Pac-1β na forma selvagem (sem mutação), com aquele já reportado na literatura. Uma explicação que propomos é que o método experimental utilizado possa ser a fonte de tal discrepância. Nesse caso, uma terceira metodologia poderia ser empregada, como por exemplo, calorimetria por titulação isotérmica ou ressonância plasmônica de superfície. Todavia, não foi possível testá-las neste projeto por limitação de tempo.

É curioso o fato de que a interação entre Pac-3α:Pac-1β aumente exponencialmente no tempo, demorando até 30 horas para que se estabilize. Uma explicação seria que rearranjos conformacionais, de certa maneira lentos, provavelmente em Pac-3α sejam necessários para que a interação se torne mais forte. Também, não podemos excluir o fato de a marcação com o fluoróforo FITC introduza artefatos no experimento. Essa hipótese

reforça a necessidade de realização de outra técnica experimental, de preferência que utilize as proteínas no estado nativo, como mais uma vez, por exemplo, calorimetria por titulação isotérmica.

Independentemente, nossos resultados indicam que a interação entre os domínios Pac da HIF-1α ou -3α interagem com o equivalente na subunidade HIF-1β com uma afinidade parecida, porém ligeiramente menor para HIF-3α (20,5 e 8,8 μM, respectivamente). O papel funcional da HIF-3α tem sido descrito como de inibir a função de ativação gênica de HIF-1α, provavelmente impedindo-a de se heterodimerizar com HIF-β e consequentemente impedindo a transcrição dos genes responsivos a hipóxia (MAKINO et al., 2001; MAYNARD et al., 2005). HIF-3α também pode ser um inibidor da ação de HIF-1β (ARNT), visto que ela está expressa em normoxia e em hipóxia, e está localizada no citoplasma e no núcleo (LI et al., 2006; TANAKA et al., 2009). Essa interação impediria HIF-1β de se ligar a alguns dos seus muitos parceiros, inibindo a transcrição, como por exemplo, dos genes relacionados ao metabolismo de fármacos. No entanto, quais genes poderiam ser inibidos e sobre qual ambiente celular, permanece indeterminado.

Dadas as equivalentes identidades sequencias entre o domínio Pac das três subunidades (-1α, -2α e -1β, entre 30 e 50%), ficamos curiosos em saber se uma interação direta Pac-1α:Pac-3α seria possível nas condições testadas. Para isso, realizamos mais uma vez um ensaio de anisotropia de fluorescência, agora marcando Pac-1α com o fluoróforo e fixando-a a 20 nM FITC e titulando Pac-3α. O resultado, já extraindo as constantes de dissociação em função do tempo, está mostrados na Figura 33.

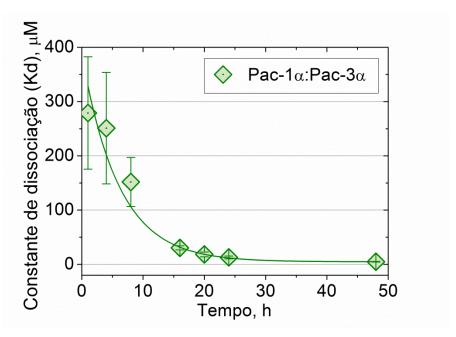


Figura 33. Curva de alcance do equilíbrio dinâmico, através da variação das constantes de dissociação, Kd, entre Pac-3α, quando titulada sobre Pac-1α.

Além de confirmarmos uma possível interação entre Pac-1 α :Pac-3 α , mais uma vez extraímos constantes que decaem exponencialmente em função do tempo, com valor inicial (medido a 1 hora) de 279,3 \pm 103,6 μ M, e após 48 horas, de 4,8 \pm 0,6 μ M. Os parâmetros da curva de decaimento exponencial (R²=0.97) são Kd_i = 382,8 \pm 67,1 μ M, d = 6,0 \pm 0,4 μ M/h e Kd_e = 4,7 \pm 0,4 μ M.

De acordo com esse último experimento, temos que não somente a interação entre Pac-3 α ou Pac-1 α é possível, mas que também acontece em faixa de interação equivalente àquelas determinadas para Pac-1 β . Portanto, HIF-3 α poderia inibir a ação de HIF-1 α , não só através da interação com o parceiro em comum, HIF-1 β , mas também através da heterodimerização direta HIF-1 α :HIF-3 α , sendo então um mecanismo de dupla inibição em hipóxia.

3.3.2. Ressonância Magnética Nuclear

Após determinar a interação entre as duas isoformas Pac-1 e Pac-3 α com a subunidade -1 β , realizamos o experimento de RMN para tentar identificar a região de interação entre elas com a subunidade - β e compará-las, de modo a inferir através de quais aminoácidos ocorre a interação.

De posse do espectro de ¹⁵N-HSQC da Pac-1β completamente assinalado, fez-se então a titulação das subunidades α, sem marcação isotópica, na Pac-1β contendo ¹⁵N. Através do monitoramento da posição e intensidade dos picos assinalados no espectro de ¹⁵N-HSQC da Pac-1β durante adições crescentes de cada subunidade -α foi possível inferir, na Pac-1β, a região de interação entre as proteínas. Quando Pac-1α ou -3α separadamente, foram adicionadas à Pac-1β, novos espectros de ¹⁵N-HSQC foram coletados e, subsequentemente, comparados com o espectro da proteína sozinha em solução, a Figura 34 compila todos os espectros coletados durante as titulações.

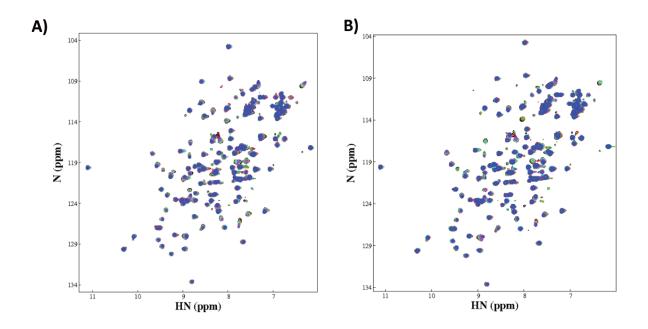


Figura 34. Sobreposição dos espectros de ¹⁵N-HSQC da Pac-1 β durante titulação de Pac-1 α (A) e Pac-3 α (B). As cores indicam as seguintes concentrações das subunidades alfa: preto $-0~\mu$ M; vermelho $-25~\mu$ M; verde $-50~\mu$ M; ciano $-100~\mu$ M; rosa $-200~\mu$ M; azul $-400~\mu$ M.

Conforme observado na Figura 34, durante a titulação das proteínas Pac-1\alpha e Pac-3α foram verificados dois tipos de comportamento nos picos do espectro de ¹⁵N-HSQC: deslocamento e diminuição da intensidade dos sinais. Quando uma proteína interage com seu ligante, ocorrem mudanças no deslocamento químico dos aminoácidos que indicam modificações no seu ambiente químico. As mudanças são divididas em três tipos: rápida, intermediária e devagar, dependendo da relação entre a diferença no deslocamento químico e a taxa de mudança entre o estado livre e o ligado das proteínas. Se a taxa de troca é maior que a diferença no deslocamento químico, um único pico aparece na posição entre o estado químico ligado e não ligado. Se a taxa de troca é menor que a diferença na mudança química, dois picos são observados, um referente ao estado livre da proteína e outro ao estado ligado. No caso intermediário, onde a taxa de troca é comparável com a alteração no deslocamento químico, os picos tornam-se alargados e podem também não ser observados (CANAVAGH, J. FAIRBROTHER, W. J. III A. G. P., SKELTON, N. J., 2007). Em ambos os casos (Pac-1α e Pac-3α) observamos picos alargados durante as titulações, indicando uma interação do tipo intermediária. Durante a titulação da Pac-1α na ¹⁵N-Pac-1β, os picos que apresentaram maior variação no deslocamento químico correspondem aos seguintes aminoácidos (considerando-se um valor de threshold de 0,04 ppm): Gln447, Glu453, Asn448, Tyr450, Phe363, Asp452, Val376, Arg379, Ser451, Arg366, Thr462 e Asp377, classificados em ordem decrescente. O deslocamento de todos os picos observado durante o experimento pode ser visualizado na Figura 35.

Deslocamento dos picos da Pac-1 β quando titulada Pac-1 α

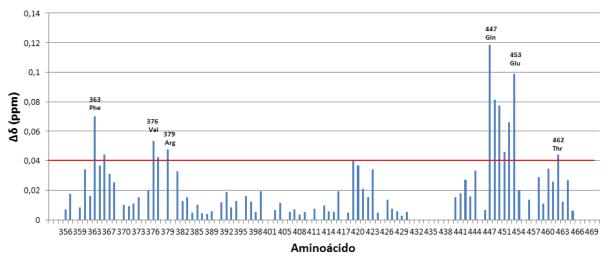


Figura 35. Gráfico do deslocamento químico dos picos da Pac-1β quando titulada a proteína Pac-1α

Quanto à intensidade, observamos a diminuição do sinal para os seguintes aminoácidos (considerando-se um *threshold* de -0,4): Glu453, Ser451, Val376, Tyr450, Arg379, Phe363, Asn448, Gln421 e Thr462, também seguindo ordem decrescente de classificação. Ou seja, com exceção da glutamina 421, todos os outros picos que apresentaram diminuição na intensidade também apresentaram deslocamento químico do pico. A intensidade de todos os picos coletados durante o ensaio é visualizado na Figura 36 abaixo.

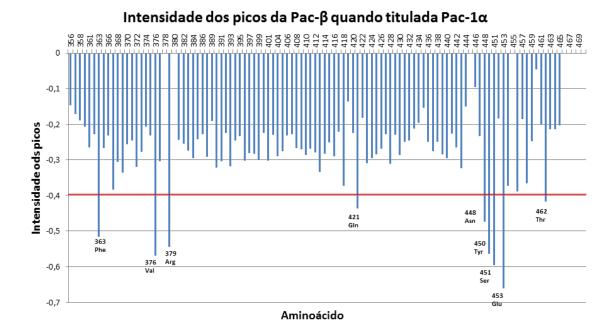


Figura 36. Gráfico da intensidade dos picos da Pac- 1β monitoradas durante a titulação da Pac- 1α .

Para análise dos resultados da titulação da Pac-3α na Pac-1β, pudemos observar o deslocamento dos seguintes aminoácidos (considerando-se o mesmo valor de *threshold*, 0,04 ppm): Glu453, His367, Arg366, Tyr450, Ile458, Gln447, Asn448 e Thr460, classificados em ordem decrescente. A Figura 37 mostra o gráfico do deslocamento dos picos.

Deslocamento dos picos da Pac-1β quando titulada Pac-3α

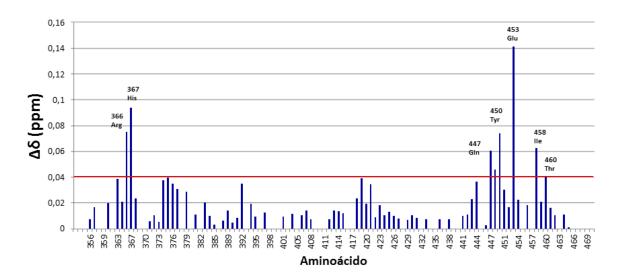


Figura 37. Gráfico do deslocamento químico dos picos da Pac-1β quando titulada a proteína Pac-3α

Em relação à intensidade, observamos a perda do sinal dos seguintes aminoácidos (considerando o mesmo valor de *threshold*, -0,4): Ser451, Glu453, His367, Arg366 e Tyr450, classificados por ordem decrescente. Novamente, com exceção do Glu453, todos os picos que apresentaram diminuição na intensidade também apresentaram deslocamento químico. A intensidade de todos os picos coletados durante o ensaio é visualizado na Figura 38 abaixo.

Intensidade dos picos da Pac-β quando titulada Pac-3α

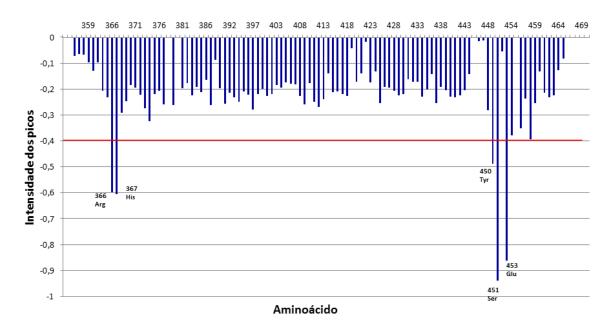


Figura 38. Gráfico da intensidade dos picos da Pac-1β monitoradas durante a titulação da Pac-3α.

Resumindo as interações obtidas nos espectros, os picos que apresentaram maior deslocamento químico e/ou maior diminuição na intensidade durante a titulação, tanto da Pac-1α quanto da Pac-3α, com base na estrutura cristalográfica do complexo Pac-1α:Pac-1β (PDB ID 4h6j), correspondem aos aminoácidos que estão na região das fitas β 1 e 5 e no loop entre as fitas 4 e 5, conforme indicado na Figura 39. Portanto, a região de interação entre Pac-3α com Pac-1β é a mesma observada para o complexo Pac-1α-Pac-1β, mediado pela presença das folhas beta de cada domínio. No entanto, nossos dados de anisotropia de fluorescência sugerem que o mecanismo de interação ocorra de modo diferente entre cada complexo, pois a interação entre Pac-3α e Pac-1β requer maior tempo para alcançar o equilíbrio.

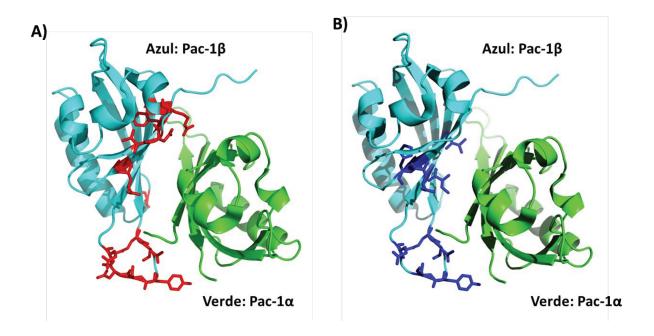


Figura 39. Estrutura cristalográfica do complexo Pac-1α-Pac-β (PDB ID 4h6j), em azul estrutura da Pac-1β, mostrando os aminoácidos que tiveram maior alteração (deslocamento e intensidade) através de titulação crescente em experimento de 15 N-HSQC do seu heterodímero Pac-1α (**A**) e Pac-3α (**B**).

3.3.3. Ensaio de cristalização da Pac-3a

A amostra pura da proteína Pac-3α foi concentrada para 6 mg/mL e submetida para ensaios de cristalização. As varreduras iniciais por condições de cristalização foram feitas pela equipe do Robolab, junto ao LNBio, utilizando o sistema robotizado *HoneyBee* (Genomic Solutions), utilizando o método de difusão de vapor por gotas sentadas. Para triagem inicial, testou-se 600 condições, utilizando os seguintes kits: Crystal Screen (Hampton Research), Wizard (Emerald BioSystems), PACT (Nextal/Qiagen), JCSG (Nextal/Qiagen), Preciptant Synergy (Emerald BioSystems) e SaltRX (Hampton Research). Foram feitas gotas de 0,5 uL de proteína com 0,5 uL de solução do poço. Os experimentos foram mantidos em temperatura de 18 °C e 4 °C, para atingir equilíbrio da pressão de vapor ao longo dos dias.

Foram obtidos cristais em duas condições do kit de cristalização *Preciptant Synergy*: 1) 2% PEG400, 2 M sulfato de amônio, 0,1M acetato de sódio pH 5,5 e 2) 2% PEG 400, 2 M sulfato de lítio, 0,1M Tris pH 8,5, ambas a 18 e 4°C. Observamos o aparecimento de cristais aproximadamente dois dias após a montagem das gotas, chegando ao tamanho máximo (100 μm na maior dimensão) em aproximadamente quatro dias (Figura 40A).

Realizamos então o refinamento e otimização das condições de cristalização, utilizando a concentração de 6 mg/mL e 3 mg/mL da proteína, em sistema robotizado, variando o precipitante PEG400 de 1-3% e o pH de 4,0 a 9,5. Os melhores cristais, visualmente (Figura 40B), foram obtidos na condição 3% PEG400, 2 M sulfato de amônio, 0,1M acetato de sódio pH 5,5. Realizamos um segundo refinamento utilizando apenas a concentração de 3 mg/mL, variando novamente o pH de 5,6 a 5,9 e o sulfato de amônio de 1,45 a 2 M. No mesmo refinamento testamos variar as concentrações de sulfato de lítio de 1,45 a 2M, mantendo o refinamento do pH igual.

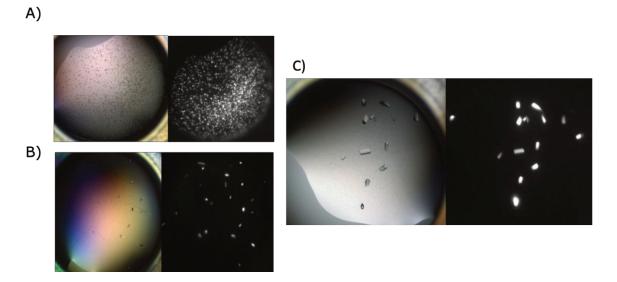


Figura 40. *Cristais da Pac-3α obtidos nas condições iniciais de screening e nas condições de refinamento*. (A): Cristais obtidos inicialmente no kit Preciptant Synergy em 2% PEG 400, 2 M sulfato de amônio, 0,1M de

acetato de sódio pH 5,5 (condição A1); (B) Cristais obtidos no primeiro refinamento na condição: 3% PEG 400, 2 M sulfato de amônio, 0,1M de acetato de sódio pH 5,5; (C) Cristais obtidos no segundo refinamento na condição 3% de PEG 400, 1,90M de sulfato de amônio, 0,1M acetato de sódio pH 5,6.

Como mostrado na Figura 40 C, no terceiro refinamento obtivemos cristais maiores e melhores formados, na condição com: 3% de PEG 400, 1,95M sulfato de amônio, 0,1 M acetato de sódio pH 5,9. Os cristais foram submetidos à testes de difração de raios X na linha W02-MX2, disponível no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), também no campus do CNPEM.

Os dados dos primeiros testes se mostraram bastante anisotrópicos, com reflexões máximas de até 6 Å em uma direção e 4 Å na perpendicular. Todavia, apesar de os dados estarem aquém daqueles minimamente necessários para resolução estrutural, foi possível caracterizar alguns dos parâmetros cristalinos. Primeiramente conseguimos determinar que a rede cristalina é do tipo primitiva, com grupo pontual 222. Portanto podemos dizer que o cristal pertence ao sistema ortorrômbico. A ausência de dados medidos ao longo dos eixos hkl no espaço recíproco não nos permite inferir sobre o exato grupo espacial, devido à incerteza com relação à extinções sistemática, o que caracterizaria a presença de eixos rototranslacionais. Os parâmetros de rede que obtivemos foram a = 51,1 Å, b = 52,2 Å e c =65,8 Å. Levando em consideração que o peso molecular de um monômero de Pac-3 é de aproximadamente 11,9 KDa, pelo cálculo do coeficiente de Matthews, podemos estimar que 1 ou 2 monômeros estejam presentes na unidade assimétrica, o que atribui ao cristal porcentagens de solvente de 66,7% ou 33,4%, respectivamente. Dada a baixa qualidade dos cristais, até o momento, mesmo após alguns ciclos de refinamento, é bem provável que a primeira estimativa (1 molécula/AU, 66,7% solvente) seja a condição real.

Refinamentos adicionais estão sendo realizados nas condições de cristalização, como por exemplo, a complementação com aditivos pelos kits *Silver Bullets* e *Additive Screen* (ambos Hampton Research) visando a obtenção de cristais de melhor qualidade.

Quanto ao complexo Pac-3α:Pac-1β, até o presente momento, não observamos a formação de monocristais para o complexo. Tentativas adicionais serão realizadas, variando as condições de incubação e a concentração das proteínas, bem como novas condições de cristalização.

3.4 Conclusão - Ensaios de interação entre os domínios Pac

A análise dos dados combinados de anisotropia de fluorescência e RMN, mostraram que ambas subunidades (Pac-1 e Pac-3 α) interagem com a subunidade Pac-1 β , e que esta interação ocorre através da fitas β 1 e 5 e no loop entre as fitas 4 e 5.

Quanto a Pac- 3α ser uma molécula inibidora para Pac- 1β , caracterizamos que a ocorre a interação entre elas, na constante de $8,70\mu\text{M} \pm 2,93$ no equilíbrio, e visto que HIF- 3α está presente na célula em condições de normoxia, acreditamos que pode ocorrer a inibição transcricional, no entanto quais os genes afetados por esta interação, permanece indeterminado.

Em relação estrutura cristalográfica da Pac-3α, novos cristais serão testados, buscando uma melhor difração que nos permita resolver a estrutura. Existe a possibilidade de que alguns cristais sejam enviados para o laboratório síncrotron Desy (Deutsche Elektronen-Synchrotron, Alemanha), em busca da obtenção de melhores dados de difração, que permitam resolução estrutural e descrição de um modelo molecular.

4. Parte IV: Prolil-hidroxilases - PHDs

4.1. Objetivos

Os objetivos do projeto com as prolil-hidroxilases estão relacionados a obtenção da sua estrutura terciária, visto que até o presente momento, somente o domínio catalítico da PHD2 foi resolvido por cristalografia. Apesar do domínio catalítico ser uma região bem conservada entre as quatro isoformas, em ensaios de hidroxilação sobre a HIF, elas apresentam diferenças quanto ao sítio de hidroxilação (CODD ou NODD) e isoforma (HIF-1 e -2α). Conhecer a estrutura tanto das proteínas completas, quanto o domínio catalítico das hidroxilases é de grande importância, para se entender os diferentes papéis desempenhados pelas prolil hidroxilases, portanto, o objetivo deste projeto, foi definir complexos estáveis entre HIFs e PHDs, bem como a estrutura tridimensional das PHDs, ambos visando posteriores estudos estruturais.

Este projeto foi realizado junto ao SGC, financiado pelo programa BEPE da FAPESP, em resultado da parceria entre nosso laboratório no Brasil e os pesquisadores da Universidade de Oxford, Dr. Peter Ratcliffe e Dr. Christopher Schofield.

4.1.1. Objetivos específicos

- Gerar construções das prolil-hidroxilases, isoformas 1 a 4, em vetores apropriados para expressão heteróloga em sistema de células de inseto;
- Avaliar os níveis de expressão e solubilidade das diversas construções através da expressão em sistema baculovírus;

- Determinação de protocolos de purificação, explorando-se as diversas propriedades físico-químicas inerentes à cada uma das construções promissoras;
- Varredura por condições de cristalização de todas as construções que se mostrarem solúveis e homogêneas em termos de espécies moleculares;
- Coleta de dados de difração de raios X, junto às linhas de cristalografia de macromoléculas do Laboratório de Luz Síncrotron Diamond, em Didcot.
- Resolução estrutural, construção e refinamento do modelo atômico;

4.2. Materiais e Métodos

A metologia foi padronizada e desenvolvida de acordo com as técnicas utilizadas pelo SGC, que serão descritas a seguir. Optamos por expressar as proteínas em sistema heterólogo de células de inseto, uma vez que dados preliminares do grupo do Dr. Ratcliffe do Departamento de Quimica da Universidade de Oxford indicaram que a expressão das PHDs em sistema bacteriano é problemática.

4.2.1. Amplificação dos genes

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para amplificação e clonagem das enzimas PHD, de modo a obter fragmentos truncados em diferentes posições. No total, vinte e quatro clones foram gerados para cada isoforma (PHD1-4), totalizando 96 clones. O desenho experimental contendo todos os detalhes à respeito das construções planejadas e parâmetros físico-químicos dos respectivos produtos proteicos podem ser encontrados no Anexo 1, no final deste documento.

Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação foram adaptados para o sistema LIC de clonagem, que será descrito ao longo da metodologia. O DNA molde para as reações de amplificação foram adquiridos clonados em plasmídeos com Prof. Christopher Schofield no departamento de Química da Universidade de Oxford.

Para a amplificação dos fragmentos, utilizando-se uma placa de PCR com 96 poços, de acordo com recomendação do fabricante da enzima DNA polimerase Platinum Pfx (Invitrogen).

4.2.2. Clonagem em vetores pFastBac

Os vetores pFastBac (pFB) são utilizados na primeira etapa de clonagem para a produção de um baculovírus recombinante. Eles apresentam na sua região transponível (entre as duas regiões Tn7) um gene que confere resistência a ampicilina, o promotor de polihedrina, seguido do sítio múltiplo de clonagem onde é inserido o gene de interesse. Devido ao vetor possuir duas regiões Tn7, ele é também conhecido como plasmideo doador.

Esta etapa de clonagem foi realizada em sistema LIC, para o qual não se utilizam enzimas de restrições para processamento das extremidades do inserto e do vetor, metodologia adaptada de (ASLANIDIS; DE JONG, 1990). Mais precisamente, os fragmentos de DNA são tratados com a enzima T4 polimerase, fazendo uso da sua atividade exonuclease. Para a clonagem, após a amplificação, os produtos obtidos por PCR foram tratados com a enzima DPN1 para remoção do DNA metilado utilizado como molde. A seguir, incubou-se os fragmentos de DNA com a enzima T4 polimerase, complementada por dCTP, seguindo recomendação do fabricante (New Englang Biolabs).

Foram utilizados dois vetores para subclonagem: pFB-Lic-BSE que insere uma cauda de 10 resísudos de histidinas seguido pela sequencia de clivagem da protease TEV na região N-terminal da proteína de interesse e o vetor pFB-CT10GF-LIC, que adiciona a sequencia de clivagem da protease TEV e mais 10xHis na regão C-terminal da proteína de interesse. Inicialmente, os vetores foram linearizados, com a enzima BseRI para pFB-LIC-BSE e a BfuAI para o vetor pFB-CT10HF-LIC, e então incubados com a enzima T4 polimerase complementada por dCTP ou dGTP, quando adequado, formando extremidades coesivas e antiparalelas aos fragmentos amplificados por PCR.

4.2.3. Recombinação e transformação

Após o tratamento com a enzima T4 polimerase, fez a recombinação entre gene de interesse e o vetor escolhido. Este processo foi realizado em placa de 96 poços, onde foram misturados os plasmídeo e os fragmentos de DNA seguido de incubação em temperatura ambiente por 30 minutos em temperatura ambiente para que ocorrese a recombinação. A seguir, os plamídeos foram transformados em célula competente *E.coli* (MACH-1) através de choque térmico por 45 segundos a 42°C. Em seguida, adicionou-se 100 μl de meio de cultura LB (*Lysogeny Broth* – 1% Triptona, 1% NaCl e 0,5% Extrato de Levedura em água). A placa foi coberta com filme adesivo poroso e incubou-se a 37°C por 1 hora, posteriormente, cada reação foi plaqueada em meio seletivo LB-agar contendo 200 μg/mL de ampicilina e 5% de sucrose.

A presença des sucrose na placas de ágar utilizadas é uma segunda seleção clonal, além da seleção por antibiótico, vez que os vetores escolhidos possuem o gene SacB que codifica a enzima Levansucrose. A combinação desta enzima com a sucrose é tóxica para a célula e impede sua multiplicação. No processo de clonagem adotado, durante a

linearização do vetor, o gene SacB foi removido, de modo que as colônias formadas na presença de sucrose são recombinantes.

As placas permaneceram na estufa a 37°C por 12 horas e então verificou-se o crescimento de colônias recombinantes. Uma colônia de cada placa foi utilizada para inocular em 3 mL de meio de cultura LB acrescido de 200 μg/mL de ampicilina e mantido sob agitação a 37°C por 12 horas.

A partir da cultura líquida, fez-se uma varredura de PCR para confirmar a clonagem e seguida de extração plasmidial. Os clones confirmados como recombinantes foram utilizados para extração plasmidial através de lise alcalina em placa de 96 poços utilizando o *kit* 96-well Miniprep (Millipore).

4.2.4. Produção do Bacmideo recombinante

A expressão de proteínas no sistema baculo requer a produção de um vírus recombinante pela inserção do gene de interesse no DNA do baculovírus, este processo requer duas etapas de produção. A primeira delas foi a construção de um vetor de transferencia (doador), já descrito acima, e a segunda é a produção do baculovirus recombinante, na qual irá ocorrer a transposição da região Tn7 do vetor, contendo o gene de interesse, para o DNA do baculovirus. O DNA do virus é então transfectado em um linhagem de células de inseto para qua ocorra sua replicação, produzindo assim as particulas virais e expressando as proteínas de interesse.

Para obter o bacmideo, os clones recombinantes foram transformados em célula competente *E. coli* DH10Bac. Esta célula competente possui o Bacmid viral e um plasmídeo auxiliar, denominado Helper. Este plasmídeo possui o gene de resistência a

tetraciclina e codifica a enzima transposase, que irá realizar a transposição da região Tn7 do plasmideo doador para o Bacmid. Esta transposição é inserida no meio do gene LacZα, dentro mini-att Tn7, possibilitando a transposição e ainda a seleção do clones recombinantes pela interrupção da expressão da β-galactosidase.

Deste forma, 3μL de cada plasmideo foram incubados em 20μL de célula competente DH10BacTM *E.coli* por 0.5Hs. Após a incubação fez-se choque térmico por 45 segundos a 42°C em água. Adicionou-se 900 μl de meio de cultura LB, cobriu-se a placa com filme adesivo poroso e incubou-se a 37°C, a 700 rpm por 5 horas. A cultura líquida foi então plaqueada em meio de cultura sólido contendo 50μg/mL de kanamicina; 7μg/mL gentamicina; 10μg/mL tetraciclina; 40μg/mL de IPTG e 100μg/mL de Bluo X-gal. As placas foram mantidas a 37°C por 48 horas. Verificou-se o crescimento de colonias recombinantes na placa de coloração branca e azuis. As placas crescidas foram estocadas a 4°C.

Somente uma colonia branca de cada construção foi selecionada para a extração do Bacmideo. Esta colônia foi inoculada em 3mL de meio de cultura LB na presença de kanamicina, gentamicina e tetraciclina, incubados a 37°C por 12 horas sob agitação e posteriormente fez-se o isolamento do Bacmideo recombinante por preciptação do DNA com isopropanol.

4.2.5. Transfecção e produção das partículas virais

A transfecção do bacmideo recombinante nas células de inseto é a etapa inicial de produção das particulas virais, após o período de infecção, em um determinado momento, as células infectadas param a divisão celular, sofrem lise e liberam os vírus recombinantes

no meio de cultura que reiniciam o ciclo. Os vírus são então coletados para estoque e utilizados para re-infecção de novas células.

A transfecção foi feita em células de inseto *Sf9* sedimentadas na densidade de 2x10⁵/mL com meio de cultura TC100 suplementado com 20% soro fetal bovino (FBS) e antibiótico. Foram semeadas 4 placas com 24 poços cada e aguardou-se a adesão das células nas placas, após 30 minutos removeu-se o meio de cultura e adicionou-se em cada poço 1 mL de meio de cultura na ausência de soro ou antibiótico. Para a transfecção, cinco microlitros de cada um dos bacmídeos obtidos foram incubados com 0.75μL de reagente para transfecção (Fugene, Roche) e 20μL de água. Após 1 hora, o mix correspondente a cada bacmideo foi transferido para um poço das placas de 24 poços, a qual já continha as células sedimentadas.

As placas foram incubadas a 27°C por 1 hora. Após, adicionou-se 1 mL de meio de cultura contendo 20% soro fetal bovino e 20µL/mL antibiótico (penicilina e estreptomicina) e deixou-se as células incubarem por 96 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante contendo as particulas virais foi coletado (P0).

4.2.6. Ampliação viral, teste de expressão e solubilidade

A partir da primeira geração viral, utilizamos as partículas virais coletadas (P0) para re-infectar novas células, e assim ampliar a quantidade de virus gerado. Este processo é denominado de passagem, no qual a partir do P0 pode infectar uma nova cultura de células, denominada (P1) e a assim sucessivamente.

Para tanto, utilizou-se células de inseto da linhagem Sf9 crescidas a uma densidade de $2x10^6$ /mL, do qual se transferiu 4 mL/poço em blocos de 24 poços. Cada poço foi

inoculado com 50µL dos virus recombinantes (P0). Os blocos foram cobertos com filme adesivo com poros e incubado a 27°C por 72 horas com agitação a 700 rpm.

Após o tempo de incubação, os blocos foram centrifugados, a 200g/10 min. Removeu-se o sobrenadante, que continha a segunda geração viral e foi estocado a 4°C. As células resultantes desta centrifugação foram utilizadas para o teste de expressão e solubilidade das proteínas.

Os sedimentos celulares foram ressuspendidos com 1mL da solução <u>Lise A</u> (50mM Hepes, 500mM NaCl, 5mM Imidazol, 5% Glicerol) acrescentado de 2µL/mL do coquetel inibidor de protease Carbiochem Set III, 0.2% de Triton X-100 e benzonase (1µL/10 mL da solução tampão).

Os blocos foram incubados em gelo por 20 minutos sob agitação lenta. O lisado foi então transferido para 1 bloco com 96 poços e centrifugado por 30 minutos a 3.200 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo bloco onde foi incubado com resina de níquel Ni-NTA (100µL/poço) por 30 minutos sob agitação lenta a 4°C. O lisado contendo a resina foi então transferido para um bloco/filtro que reteve a resina. Após, lavou-se cada poço com 1mL da solução <u>Afinidade B</u> (50mM Hepes, 500mM NaCl, 5% Glicerol, 20mM Imidazol) por 3 vezes. As proteínas foram eluídas com 100µL (2x50µL) de solução de <u>Eluição C</u> (50mM Hepes, 500mM NaCl, 5mM Imidazol, 5% Glicerol, 250mM de Imidazol). As amostras eluídas (15µL de cada) foram analisadas por SDS-PAGE gradiente (CriterionTM XT Precast 4-12% Bis-Tris.

O teste de solubilidade das proteínas que foram inicialmente obtidas na forma solúvel foi repetido na escala de 50 mL de cultura celular, e utilizamos o mesmo protocolo

de purificação para obtenção das proteínas de interesse. As células foram ressuspendidas em 5 mL da solução tampão <u>Lise A</u>.

4.2.7. Expressão em larga escala

A partir dos resultados do teste de solubilidade em 50 mL selecionou-se as proteínas abundantemente expressas para realizar a expressão em larga escala, purificação e ensaios de cristalização. As expressões foram realizadas em células *Sf9* cultivadas na presença de antibiótico. Foram expressos 10L de cultura para cada proteína, a cada purificação. Assim, $2x10^6$ /mL de células foram adicionadas de 1.5mL/L de cultura do vírus e incubadas a 27°C, com agitação de 95 rpm por 72 horas.

Terminado o tempo de incubação, a cultura foi centrifugada por 30 minutos a 1000xg. Removeu-se o meio sobrenadante e ressuspendeu-se as células duas vezes com solução 1x PBS, seguidas de nova centrifugação. Após as lavagens, as células foram ressuspendidas em 1 volume da solução <u>Lise A</u>, acrescida de coquetel de inibidores de protease e congeladas a -80°C, para uso posterior.

4.2.8. Etapas de Purificação

Para etapa de lise celular, as células foram descongeladas, homogeneizadas e suplementadas com 0,2% Triton X-100 e benzonase (1μL/10 mL lisado). O resuspendido foi homogeneizado usando *Dounce homogenizer* e clarificado por centrifugação por 1hora a 53000xg, 4°C.

Para purificação das proteínas, empregou-se a purificação por afinidade à metais imobilizados. Desta forma, o produto clarificado foi incubado com 1mL da resina Ni-NTA, previamente lavada com água, equilibrada com solução Lise A e posteriormente incubada

com o extrato solúvel por 2 horas a 4°C, sob leve agitação. A resina foi centrifugada a 200xg por 10 minutos para remoção do sobrenadante. Em seguida, lavou-se a resina na solução <u>Lise A</u> por duas vezes, a qual foi transferida para uma coluna de purificação.

A resina imobilizada na coluna foi lavada com 20 volumes de coluna da solução Afinidade B por 3 vezes. As proteínas foram eluídas em gradiente de imidazol usando a solução tampão <u>Lise A</u>, acrescida de 40, 60, 80,100 e 250 mM de imidazol (v/v).

Após a purificação, fez-se a remoção da cauda de histidina por adição de TEV protease (preparada no próprio laboratório) por 12 horas a 4°C. Concomitantemente ao período de clivagem da cauda, foi realizada diálise para remover o imidazol da amostra e permitir que a proteína pudesse ser novamente incubada com a resina de níquel, pela técnica de afinidade reversa. Nesta nova incubação, a cauda de fusão já clivada e a protease TEV, ligam-se à resina, e desta maneira, se separam da proteína de interesse.

Utilizamos dois tipos de purificação intermediária para purificação das proteínas (troca aniônica e troca catiônica), e uma etapa de polimento (purificação por exclusão molecular).

Para a troca aniônica, uma coluna do tipo HiTrap-Q 5 mL (GE) acoplada ao aparelho AKTA-FPLC (GE) e equilibrada com solução A (50mM Tris pH9, 50 mM de NaCl). Esta coluna que possui matriz porosa carregada negativamente que irá interagir com as cargas positivas na superfície da proteína. Necessitamos diluir a amostra 10 vezes para sua aplicação, adequando assim a concentração de NaCl adequada ao tipo de troca iônica. Posteriormente à injeção da amostra, a coluna foi lavada com um gradiente salino linear (de 50 mM a 500mM de NaCl) em 75 minutos com fluxo de 1 mL/minuto. Frações da eluição foram coletadas a cada 0,5 mL. O *flow Through* e as frações foram analisadas em gel SDS gradiente.

Utilizamos também a purificação por troca catiônica, coluna HiTrap-S 5 mL (GE), acoplada ao aparelho AKTA-FPLC (GE) e equilibrada com solução HiTrap A (50mM Mes pH6, 50 mM de NaCl). Esta coluna possui matriz porosa carregada positivamente, que ao contrário da HiTrap-Q irá interagir com as cargas positivas da proteína. A amostra foi diluída 10 vezes o seu volume na solução A. Posteriormente à injeção da amostra, a coluna foi lavada com um gradiente salino linear (de 50 mM a 500mM de NaCl) para remoção de contaminantes presos por interações inespecíficas e a eluição seguiu o mesmo modelo descrito acima.

Como etapa de polimento, utilizou-se a purificação por exclusão molecular, empregando-se uma coluna Superdex 75 HR 16/60 (GE), equilibrada com solução 50mM Hepes, 500 mM NaCl. Foram aplicados 5 mL das amostras na coluna.

4.2.9. Ensaios de Cristalização

A reação de hidroxilação da HIF é catalizada pelas PHDs na presença de 2-oxoglutarato (2OG), e para realizar os ensaios de cristalização, incubamos a proteína com o composto NOG (análogo inativo do 2OG, cofator da enzima PHD) e um peptídeo da HIF-1α (CODD D⁵⁵⁶-L⁵⁷⁴) de 2.25 KDa que compreende a região do domínio ODD, previamente diluído em solução Tris pH 9. Após purificada e concentrada, cada proteína foi incubada por 30 minutos com 8.5 mM de NOG, na presença e na ausência de 1.8mg/mL do peptídeo CODD.

As placas de cristalização foram feitas em sistema robotizado utilizando 35nL/gota da proteína nas proporções 1:1; 1:2; 2:1 de relação proteína/solução poço, totalizando então 288 testes por placa, do *kit*: JCSG (Nextal/Qiagen) e mais soluções preparadas no laboratório.

4.3. Resultados e Discussões

4.3.1. Amplificação dos genes

Conseguimos amplificar todos os fragmentos de interesse, de acordo com o anexo 1.

A Figura 41 abaixo, ilustra os resultados parciais da amplificação dos genes para as hidroxilases (PHD1-4).

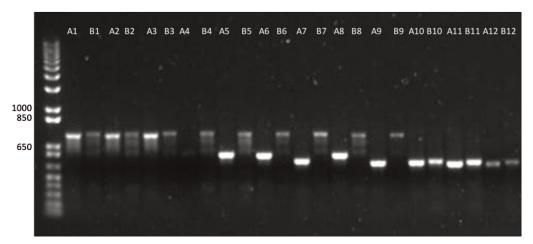


Figura 41. *Gel de agarose 1% corado com SYBR dos genes amplificados das enzimas PHD*. **(A)** Poço 1: Marcador molecular;**(A1-D12)** :Fragmentos obtidos na reação de amplificação, nomeados de acordo com o Anexo 1.

4.3.2. Clonagem

O resultado da clonagem e recombinação é visualizado na Figura 42 abaixo, no qual após a transformação em bactéria competente, fizemos um *screening* de colônia por PCR, para confirmação dos clones recombinantes.

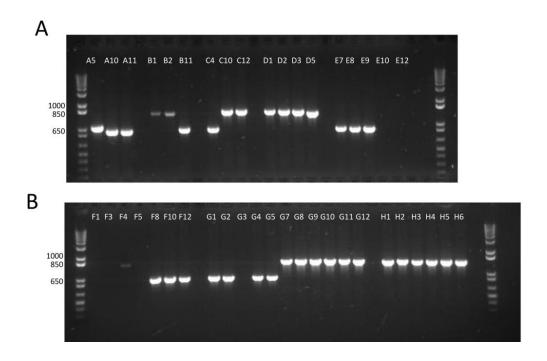


Figura 42. Gel de agarose 1.5% corado com SYBR do screening por PCR das enzimas PHD. (A) Poço 1: Marcador molecular; 2: A5-E12 fragmentos amplificados; (B) Poço 1: Marcador molecular; 2: F1-H6 fragmentos amplificados. A caracterização molecular destes fragmentos pode ser encontrada no Anexo I.

No sistema LIC de clonagem utiliza-se a enzima T4 DNA polimerase, explorando sua atividade exonuclease (sentido 3´-5´), desta forma, a polimerase remove nucleotídeos presentes nas extremidades do DNA amplificado. A atividade exonuclease da enzima é inibida quando encontra o primeiro nucleotídeo na fita molde igual ao que estiver na reação mix, ou seja, quando a reação mix houver um dGTP, a função exonuclease da enzima é inibida quando encontrar o primeiro nucleotídeo G na fita do DNA amplificado.

Neste sistema, a recombinação entre DNA alvo e plasmídeo ocorre por pareamento e formação das pontes de hidrogênio entre estas extremidades coesivas a temperatura ambiente.

4.3.3. Recombinação e Transfecção

A etapa de recombinação foi realizada com sucesso, no qual após 48 horas observamos a formação de colônias brancas e azuis na placa de cultura. A padrão de coloração branco é devido a interrupção da expressão dos genes do *LacZ* presente no Bacmideo, demonstrando assim que a transposição foi positiva. Para garantir a pureza dos clones obtidos no processo de transposição, três colônias brancas de cada placa foram selecionadas e replaqueadas e incubadas por 12 horas a 37°C. Após a recombinação entre os fragmentos gênicos e o DNA do Bacmideo, foi possível isolá-los e transfectar as células *Sf9*. No total foram transfectados 55 diferentes construções. Após a infecção das células, inicia-se o processo de produção viral, onde as partículas virais formadas são liberadas no meio de cultura, e as células são lisadas para obtermos as proteínas de interesse.

4.3.4. Testes de expressão e solubilidade

O teste de solubilidade foi realizado em pequena escala com os 55 clones transfectados. A Figura 43 abaixo ilustra o resultado parcial do teste.

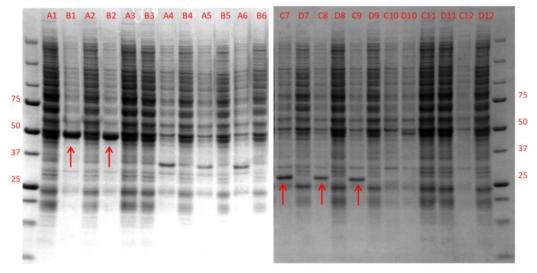


Figura 43. Teste de solubilidade das PHDs em 4 mL de cultura. Gel SDS-PAGE CriterionTM XT Precast 4-12% Bis-Tris corado com Coomassie das frações eluídas no ensaio de

solubilidade. As setas em vermelho indicam as construções que se apresentaram solúveis após o teste de purificação. A nomenclatura dos poços (A1-D12) segue o anexo 1.

O teste de solubilidade indicou que algumas das construções apresentaram proteína solúvel após eluição da resina de afinidade. Dos 55 clones usados para transfecção das células, observamos 23 deles expressando as proteínas de interesse na forma solúvel, como indicado pelas setas em vermelho na figura 43 acima.

Não foi observada a expressão de nenhuma banda diferencial dos clones referente a PHD4, que é a isoforma associada ao reticulo endoplasmático, ou seja, nenhuma das construções transfectadas para esta isoforma expressou a proteína em forma solúvel, neste caso diferentes construções podem ser desenhadas e iniciar novamente o processo de amplificação e clonagem.

A partir das 23 proteínas mais expressas e solúveis, testamos a expressão das mesmas em 50 mL de cultura. Desta vez, selecionamos as proteínas de expressão mais abundantes para desenvolver os protocolos de purificação em larga escala. Alguns dos resultados obtidos no teste de purificação em 50 mL podem ser visualizados na Figura 44.

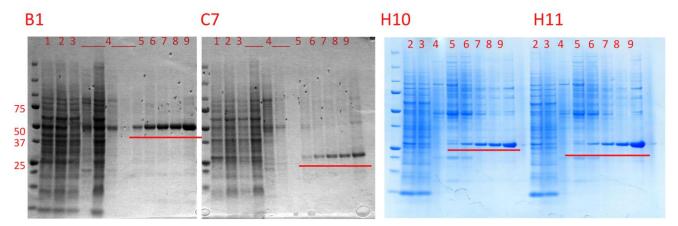


Figura 44. *Teste de solubilidade das PHDs em 50 mL de cultura.* Gel SDS-PAGE Criterion™ XT Precast 4-12% Bis-Tris corado com Coomassie das frações eluídas durante o teste. Poço 1: Amostra total; Poço 2: Amostra após centrifugação; Poço 3: *Flow Through*; Poço 4: lavagem da resina; Poço 5-9: proteínas eluídas por gradiente de imidazol (40, 60, 80, 100 e 250 mM de Imidazol, respectivamente). **B1** é subclone da isoforma PHD2, **C7, H10 e H11** são subclones da isoforma PHD3. A massa calculada para elas são 46,94, 29,25; 29,90 e 29,69 KDa, respectivamente.

Apesar das construções B1 (Figura 44) e B2 (dados não mostrados) estarem abundantemente expressas e em boas condições de pureza apenas com a purificação por afinidade, a análise do sequenciamento de DNA destas construções mostrou uma mutação que levou a substituição de um aminoácido, portanto estes clones não foram utilizados para novas expressões.

4.3.5. Purificações das proteínas selecionadas

De acordo com o resultado dos testes em 50 mL foram selecionados três clones para expressar e purificar em escalas maiores, sendo eles: D10 referente a isoforma PHD1, C7 e H11 referente a isoforma PHD3.

A Figura 45 mostra o resultado da purificação das proteínas, durante a etapa inicial de afinidade, bem como após a clivagem com a TEV protease e afinidade reversa.

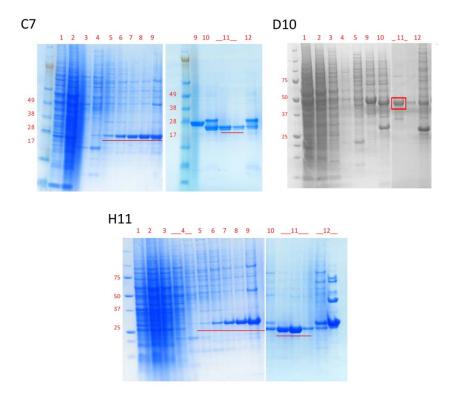


Figura 45. Purificação por afinidade dos clones C7, D10 e H11. Gel SDS-Page corado com Coomassie das frações eluídas seguidas da clivagem e remoção do histag. (C7 e H11): Poço 1: lisado total; Poço 2: sobrenadante; Poço 3: sobrenadante após incubação com a resina; Poço 4: lavagem com 20 mM de imidazol; Poço 5-9: Gradiente de Eluição (40, 60, 80, 100 e 250 mM de Imidazol); Poço 9: Total de amostra Eluída; Poço 10: clivagem; Poço 11: Proteína C7 clivada; Poço 12: Remoção por imidazol do que ligou na resina (contaminantes e a TEV protease) (D10): Poço 1: lisado total; Poço 2: sobrenadante; Poço 3: sobrenadante após incubação com a resina; Poço 4: lavagem com 20 mM de imidazol; Poço 5: Lavagem com 40mM de Imidazol; Poço 9: Eluição com 250mM de imidazol; Poço 10: clivagem; Poço 11: Proteína D10 clivada; Poço 12: Remoção por imidazol do que ligou na resina (contaminantes e a TEV protease). As respectivas massas moleculares para os clones C7, D10 e H11 esperadas após a clivagem são 26,73, 43,61 e 27,17 KDa.

As proteínas recombinantes possuem um sítio de clivagem para a proteína TEV, possibilitando separar as proteínas de interesse da cauda de histidinas utilizada para a purificação por afinidade a metais.

4.3.5.1. Construção C7

Para a purificação da proteína C7, após a remoção da cauda, utilizou-se a cromatografia por troca iônica. O resultado da purificação é visualizado na Figura 46 abaixo.

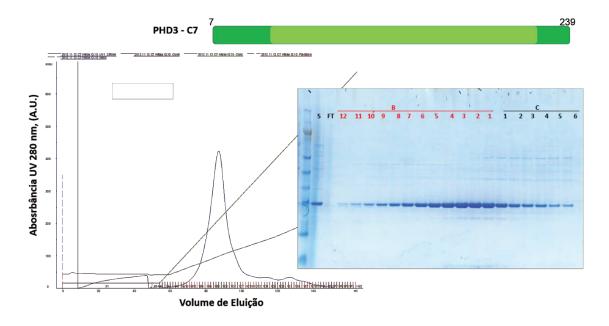


Figura 46. Purificação da proteína C7 por troca aniônica. **Esquerda**: Cromatograma de troca iônica em coluna Hitrap-Q mostrando perfil de eluição da proteína C7. **Direita:** Gel SDS referente a todas as frações eluídas, onde S é a fração total antes da aplicação na coluna; FT a fração não ligada à coluna; B-C as frações eluídas indicadas pela barra em preto no cromatograma.

A purificação por troca iônica permitiu separar os contaminantes da proteína de interesse, da qual se utilizou as frações B11 até C1, que foram concentradas e utilizadas nos ensaios de cristalização.

4.3.5.2. Construção H11

O clone H11, por sua vez, foi purificado com sucesso pelo método de cromatografia de troca catiônica, após a remoção da cauda de histidinas. O resultado da purificação é visualizado na Figura 47.

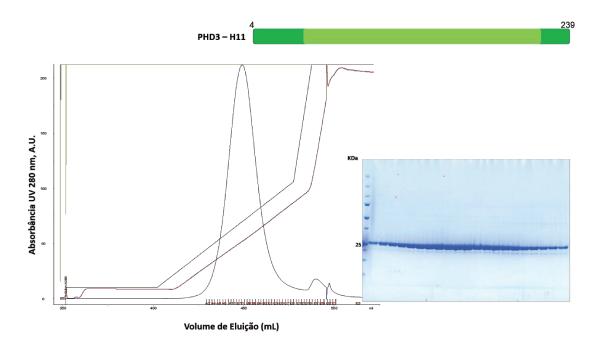


Figura 47. *Purificação da proteína H11 por troca catiônica*. **Esquerda**: Cromatograma de troca aniônica em coluna Hitrap-S mostrando perfil de eluição da proteína H11. **Direita:** Gel SDS referente a todas as frações eluídas na purificação, indicadas pela barra em preto no cromatograma.

Após a purificação por troca catiônica, foi possível obter uma amostra pura da proteína de interesse H11, foram utilizadas todas as frações visualizadas na Figura 47, a direita, para os ensaios de cristalização.

4.3.5.3. Construção D10

Somente o clone D10, após remoção da cauda His, foi submetido a purificação por exclusão de massa molecular, do qual conseguimos amostras bastante puras e com alto grau de homogeneidade. O resultado desta purificação é ilustrado na Figura 48 abaixo.

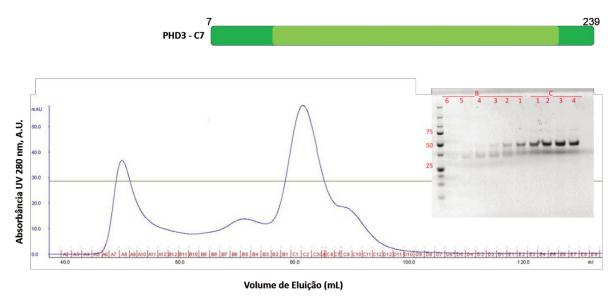


Figura 48. Perfil cromatográfico da purificação por exclusão molecular da proteína D10. As frações B1 e C1 até C9 representam o terceiro pico, indicado pela barra em preto, no qual continham a proteína de interesse.

Após a cromatografia por exclusão molecular, e de acordo com o resultado observado no gel SDS, houve a separação da proteína de interesse, do qual somente as frações B1 a C1, Figura 48 à direita, foram concentradas e utilizadas nos ensaios de cristalização.

Todas as frações referentes as proteínas purificadas, C7, D10 e H11 foram reunidas, após as cromatografias de troca iônica, aniônica e exclusão molecular, foram concentradas em amicon e então utilizadas para os ensaios de cristalização.

4.3.6. Ensaios de Cristalização

Após o tempo de incubação das proteínas com os aditivos (NOG) e o peptídeo da HIF (CODD D⁵⁵⁶-L⁵⁷⁴), foram montados os experimentos de cristalização. As placas de cristalização foram acompanhadas diariamente por monitoramento em sistema digitalizado. Observamos a formação de cristais para as construções C7 e H11 em diversas condições de cristalização. Algumas das imagens podem ser visualizadas na Figura 49.

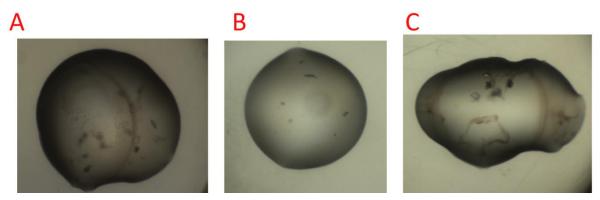


Figura 49: *Cristais formados para a construção H11*. **(A)** Cristal formado a 4°C na condição de 0.1M Bicine pH9, 10%PEG 10.000 e 2% Dioxane; **(B)** Cristal formado a 20°C na condição de 0.1M Bicine pH9, 0.1M de NaCl, 20%PEG methyl ether 550. **(C)** Cristal formado a 4°C na condição de 0.1M Bicine pH9.3, 20%PEG 10.000.

Alguns dos cristais formados a partir da construção C7 foram testados para confirmação de sua composição e avaliação da capacidade de difração de raios X. O teste foi realizado pelos responsáveis pela fonte de raios X disponível no *Nuffield Department of Medicine*, da Universidade de Oxford, no prédio onde se situa o SGC. De acordo com os responsáveis pelos testes, concluiu-se que eram cristais de compostos inorgânicos. Devido a utilização do níquel na condição de cristalização, na tentativa de reproduzir as condições em que PHD hidroxila o domínio ODD da HIF, podem ter levado a sua cristalização. Deste modo, reduzimos a concentração de níquel utilizados nos demais ensaios. Os cristais

obtidos da construção H11 e D10 não haviam sido testados até o momento da finalização do estágio.

4.4. Conclusão - Prolil-hidroxilases

Durante o desenvolvimento deste projeto, foram estabelecidos protocolos para a expressão e purificação das PHDs. Os resultados obtidos possibilitaram-nos realizar ensaios de cristalização das isoformas PHD1 e PHD3.

Estes resultados são de grande importância, pois possibilitaram testar a expressão destas proteínas em sistema de baculovírus, diferentemente do que já havia sido testado (expressão bacteriana), e a partir do qual, foram definidas construções solúveis. Apesar de não termos obtidos cristais difratáveis até o presente momento, os resultados adquiridos foram promissores e indicam variações nas condições de cristalização que podem ser feitas para obtenção de monocristais que permitam a difração e resolução das estruturas. Quando foram realizados os ensaios de cristalização, observamos a formação dominante de precipitados amorfos em quase todas as gotas de cristalização, mesmo quando a concentração das proteínas foram diminuídas. Baseado nessa observação, talvez mudanças na composição das soluções de purificação das proteínas, como por exemplo, força iônica ou pH, sejam necessárias para mudarmos o perfil de solubilidade das amostras antes mesmo da realização dos experimentos de cristalização.

5. Conclusões gerais e perspectivas

HIF é um fator de transcrição chave no desenvolvimento, adaptação e progressão do câncer. Atualmente, na literatura, existem reportados inúmeros ensaios celulares com as diferentes isoformas, mas pouco foi descrito quanto a sua estrutura terciária, o que tornou plausível este projeto. Durante o período de realização do projeto de mestrado, conseguimos expressar e purificar com sucesso os domínios bHLH e Pac da HIF, subunidades -1α, -3α e -1β. Pudemos ainda, determinar a constante de interação entre as isoformas da Pac-1α e -3α com a subunidade -1β e também entre Pac-1α:Pac-3α, com afinidades maiores, sem a necessidade de mutações pontuais como já reportado na literatura. Devido, às constantes de dissociação dos domínios Pac serem bastante similares, pudemos propor que HIF-3α antagoniza a função de fator de transcrição de HIF-1α através da interação direta tanto com HIF-1β ou com a própria HIF-1α. Determinamos, por RMN, as regiões através das quais ocorrem as interações e observamos que são equivalentes entre as subunidades -1α e -3α.

Quanto aos cristais obtidos para Pac-3α, estamos em busca de melhores condições de cristalização e posteriormente estes serão submetidos a novos testes de difração, de modo que possamos resolver a estrutura. Na tentativa de cristalizarmos os complexos, realizaremos a reversão da ponte salina entre R245 e E362 (mutação já realizada) o que, a princípio, aumenta a afinidade entre os monômeros em mais de uma ordem de grandeza.

Adicionalmente, novos clones dos domínios Pas-1 poderão ser gerados, adicionando uma extensão de aproximadamente 70 aminoácidos na região C-terminal, na tentativa de se obter um produto protéico estável, visando purificação e caracterizações bioquímica, biofísica e estrutural. Vale a pena mencionar que nehuma informação nesse sentido está disponível na literatura, até o momento de confecção desta dissertação.

Quanto ao período de trabalho no SGC, o estágio possibilitou a aprendizagem de uma ferramenta importante para biologia molecular (sistema LIC de clonagem), testar um novo sistema de expressão pela produção de baculovirus, além da experiência com metodologias de larga-escala. Apesar de ainda não termos obtidos cristais, estamos estabelecendo uma colaboração com Dr. Peter Ratcliffe, FRS (Nuffield Department of Clinical Medicine, Oxford University, UK) e o e Dr Christopher Schofield, (Chemistry Department, Oxford University, UK) para a continuidade dos experimentos com a proteína PHD3 aqui no LNBio, com o objetivo de cristalizá-la, bem como testar ligantes e inibidores.

Os resultados obtidos como um todo ao longo da dissertação, quando finalizados serão disponibilizados para a comunidade científica através de publicações em periódicos internacionais indexados e também no banco de dados de estruturas cristalográficas PDB.

.

6. Referências

APPELHOFF, R. J. et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 37, p. 38458–65, 10 set. 2004.

ASLANIDIS, C.; DE JONG, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic acids research**, v. 18, n. 20, p. 6069–74, 25 out. 1990.

BOS, R. et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 6, p. 1573–81, 15 mar. 2003.

BRACKEN, C. P.; WHITELAW, M. L.; PEET, D. J. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 60, n. 7, p. 1376–93, jul. 2003.

CANAVAGH, J. FAIRBROTHER, W. J. III A. G. P., SKELTON, N. J., R. M. T **HEORETICAL D ESCRIPTION OF NMR**. [s.l: s.n.].

CARDOSO, R. et al. Identification of Cys255 in HIF- 1α as a novel site for development of covalent inhibitors of HIF- 1α /ARNT PasB domain protein-protein interaction. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 21, n. 12, p. 1885–96, dez. 2012.

CHOWDHURY, R. et al. Structural basis for binding of hypoxia-inducible factor to the oxygen-sensing prolyl hydroxylases. **Structure (London, England: 1993)**, v. 17, n. 7, p. 981–9, 15 jul. 2009.

COOPER, E. H.; BARKHAN, P.; HALE, A J. Observations on the proliferation of human leucocytes cultured with phytohaemagglutinin. **British journal of haematology**, v. 9, p. 101–11, jan. 1963.

EBERT, B. L., FIRTH, J.D., RATCLIFFE, P.J. Hypoxia and Mitochondrial Inhibitors Regulate Expression of Glucose Transporter-1 via Distinct Cis-acting Sequences. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 49, p. 29083–29089, 8 dez. 1995.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Akt Maintains Cell Size and Survival by Increasing mTOR-dependent Nutrient Uptake. v. 13, n. July, p. 2276–2288, 2002.

ENGELMAN, J. A et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. **Nature medicine**, v. 14, n. 12, p. 1351–6, dez. 2008.

FREEDMAN, S. J. et al. Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 8, p. 5367–72, 16 abr. 2002.

GOLDBERG, A. L. Degradation of abnormal proteins in Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 2, p. 422–426, 1972.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HEDESKOV, C. J. Early effects of phytohaemagglutinin on glucose metabolism of normal human lymphocytes. **The Biochemical journal**, v. 110, n. 2, p. 373–80, nov. 1968.

HÖGEL, H. et al. Prolyl hydroxylase PHD3 enhances the hypoxic survival and G1 to S transition of carcinoma cells. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e27112, jan. 2011.

INVITROGEN MANUAL. Fluorescence Polarization, 2006.

IYER, N. V. et al. Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1alpha. **Genes & Development**, v. 12, n. 2, p. 149–162, 15 jan. 1998.

JIANG, B.-H. Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 51, p. 32529–32537, 20 dez. 1996.

JIANG, B.-H. RUE, E., WANG, G.L., ROE, R., SEMENZA, G. L. Dimerization, DNA Binding, and Transactivation Properties of Hypoxia-inducible Factor 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 30, p. 17771–17778, 26 jul. 1996.

KE, Q.; COSTA, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). v. 70, n. 5, p. 1469–1480, 2006.

KEITH, B.; JOHNSON, R.; SIMON, M. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 1, p. 9–22, 2012.

KOCH, A. L. STRAIN DIFFERENCES IN THE DEGRADATION OF PROTEIN AND NUCLEIC ACID RESULTING FROM STARVATION Protein Degradation in Escherichia. 1971.

KOIVUNEN, P. et al. An endoplasmic reticulum transmembrane prolyl 4-hydroxylase is induced by hypoxia and acts on hypoxia-inducible factor alpha. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30544–52, 19 out. 2007.

LANDO, D. et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. **Science** (New York, N.Y.), v. 295, n. 5556, p. 858–61, 1 mar. 2002.

LI, Q. F. et al. Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3alpha expression in lung epithelial cells: characterization and comparison with HIF-1alpha. **Cell research**, v. 16, n. 6, p. 548–58, jun. 2006.

LINDEBRO, M. C.; POELLINGER, L.; WHITELAW, M. L. Protein-protein interaction via PAS domains: role of the PAS domain in positive and negative regulation of the bHLH/PAS dioxin receptor-Arnt transcription factor complex. **The EMBO journal**, v. 14, n. 14, p. 3528–39, 17 jul. 1995.

LIU, W. et al. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. v. 3, n. 2, p. 165–178, 2012.

MAKINO, Y. et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. **Nature**, v. 414, n. 6863, p. 550–4, 29 nov. 2001.

MAYNARD, M. A et al. Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 13, p. 11032–40, 28 mar. 2003.

MAYNARD, M. A et al. Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 11, p. 1396–406, set. 2005.

PIENTKA, F. K. et al. Oxygen sensing by the prolyl-4-hydroxylase PHD2 within the nuclear compartment and the influence of compartmentalisation on HIF-1 signalling. **Journal of cell science**, v. 125, n. Pt 21, p. 5168–76, 1 nov. 2012.

SALCEDA, S. Hypoxia-inducible Factor 1alpha (HIF-1alpha) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. ITS STABILIZATION BY HYPOXIA DEPENDS ON REDOX-INDUCED CHANGES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 36, p. 22642–22647, 5 set. 1997.

SCHEUERMANN, T. H. et al. Artificial ligand binding within the HIF2alpha PAS-B domain of the HIF2 transcription factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 2, p. 450–5, 13 jan. 2009.

SEMENZA, G. L. et al. Transcriptional Regulation of Genes Encoding Glycolytic. p. 0–6, 1994.

SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 10, p. 721–32, out. 2003.

SEMENZA, G. L.; WANG, G. L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. **Molecular and cellular biology**, v. 12, n. 12, p. 5447–54, dez. 1992.

STIEHL, D. P. et al. Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 33, p. 23482–91, 18 ago. 2006.

TANAKA, T. et al. The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3alpha gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. **The Biochemical journal**, v. 424, n. 1, p. 143–51, 15 nov. 2009.

TAYLOR, B. L.; ZHULIN, I. B. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 63, n. 2, p. 479–506, jun. 1999.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. **Science** (**New York, N.Y.**), v. 123, n. 3191, p. 309–314, 1956.

WARBURG, O. On respiratory impairment in cancer cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 124, n. 3215, p. 269–70, 10 ago. 1956.

WARBURG, O.; WIND, F.; NEGELEIN, E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. **The Journal of general physiology**, v. 8, n. 6, p. 519–30, 7 mar. 1927.

WHITELAW, M. et al. Ligand-dependent recruitment of the Arnt coregulator determines DNA recognition by the dioxin receptor. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 4, p. 2504–14, abr. 1993.

YAMAGUCHI, Y.; KUO, M. T. Functional analysis of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator interactions with aryl hydrocarbon receptor in the yeast two-hybrid system. **Biochemical pharmacology**, v. 50, n. 8, p. 1295–302, 12 out. 1995.

7. Anexos

ANEXO 1: Lista de primers utilizados na clonagem das HIFs e temperatura de melting

	Primer Forward -	Primer Foward -	Temperatura de Melting	Primer Reverse -	Primer Reverse -	Temperatura de Melting
Subunidade	Aminoácido	Sequência	(° C)	A minoácido	Sequência	(° C)
	Met 1	5'-ATA TAC ATA TGG AGG GCG CCG GCG GCG CGA ACG AC-3'	87,3	Asn 826	5'-GCG CC <u>G AGC</u> <u>TC</u> T TAG TTA ACT TGA TCC AAA GCT CT -3'	77,1
	Net 1	5'-TTG GT <u>G GAT</u> CCC GTC GAA AAG AAA AGT	07,5	11511 020	5′-AGC TT <u>G TCG</u> ACT TAT CCT TTA GTA AAC ATA TCA	,,,1
	Arg 17	CTC GAG AT-3'	64,3	Gly 298	TG-3′	58,1
	Lys 85	5'-TTG GT <u>G GAT</u> <u>CC</u> A AAG CAC AGA TGA ATT GCT TTT AT-3'	61,7	Lys 71	5'-AGC TT <u>G TCG</u> <u>AC</u> T TAT TTC CTC ACA CGC AAA TAG CT-3'	63,5
HIF-1α	Asp 238	5'-AGT CT <u>C ATA</u> TGG ATA GCA AGA CTT TCC TCA GTC G-3'	63,2	Gly 158	5'-AGC TT <u>G TCG</u> ACT TAA CCC TTT TTC ACA AGG CCA TT-3'	64,1
	A3P 230	ica die U-J	UJ,2	His 348	5'-CGT ACC TCG AGT TAG TGC TGA ATA ATA CCA CTC AC-3' 5'-GCG CCG AGC TCT TAG TTA ACT TGA TCC AAA GCT	64,4
				Asn 826	CT-3′	77,1
HIF-3α	Gly 235	5'-AGT CT <u>C ATA</u> TGG GCC GAG GGG CCT TCC TCA CCG CC-3'	72,6	Thr 345	5'-CGT AC <u>C TCG</u> AGT TAG GTC TCT TCC ACC TGG CTG AT-3'	67,9
	Met 1	5'-AGC CAG GAT CCG ATG GCG GCG ACT ACT GCC AAC CC-3	88,2	Glu 789	5'-CCG CA <u>A AGC</u> <u>TT</u> T TAT TCT GAA AAG GGG GGA AAC AT'3	78,3
НІГ-1β	Ala 90	5'-TTG GT <u>G GAT</u> <u>CC</u> G CCA GGG AAA ATC ACA GTG AAA TT-3'	65,4	Lys 419	5'-GCC GC <u>A AGC</u> <u>TT</u> T TAT TTT AAT TTC ACT ACC TGT TG-3'	60,2
		5'-TTG GT <u>G GAT</u> CCG ATC AGG AAC TGA AAC	62,6	Ĭ	5'-GCC GC <u>A AGC</u> <u>TT</u> T TAC CGC AAG GAC TTC ATG TGA	
	Asp 161	ATT TGA TC-3′ 5′-TTG GT <u>G GAT</u> <u>CC</u> C CCA ACT GTA CAG ACA	·	Arg 143	GA-3′ 5′-GCC GC <u>A AGC</u> TTT TAA CGC CCT GTC AGG GCA TTT	66,9
	Pro 349	TGA GTA AT-3′	64,1	Arg 235	TC-3′ 5′-GCC GC <u>A AGC</u> TTT TAA GAG TTC TTC ACA TTG GTG	68
				Ser 467	TT-3′ 5′-CCG CAA <u>AGC</u> <u>TTT</u> TAT TCT GAA AAG GGG GGA AAC	63,5
				Glu 789	AT-3′	78,3

ANEXO 2: Lista dos clones gerados para as PHDs, posição na placa e características das construções.

Gene	Posição Placa	Vetor	Massa Molecular	Ponto Isoeletrico Teórico	MW sem	Ponto Isoelétrico Teórico sem cauda	Aminoácido Inicial	Aminoácido Final
PHD1-a000	A01	pFB-LIC-Bse	45355,3	8,55	42832,6	9,15	M1	V398
PHD1-a001	A02	pFB-LIC-Bse	44971,9	8,55	42449,2	9,15	M1	K394
PHD1-a002	A03	pFB-LIC-Bse	44658,5	7,85	42135,8	8,95	M1	S391
PHD1-a003	A04	pFB-LIC-Bse	32144,7	9,35	29622	9,55	S132	V398
PHD1-a004	A05	pFB-LIC-Bse	31761,2	9,35	29238,5	9,55	S132	K394
PHD1-a005	A06	pFB-LIC-Bse	31447,9	9,25	28925,1	9,55	S132	S391
PHD1-a006	A07	pFB-LIC-Bse	28358,6	9,55	25835,9	9,85	E168	V398
PHD1-a007	A08	pFB-LIC-Bse	27975,1	9,55	25452,4	9,85	E168	K394
PHD1-a008	A09	pFB-LIC-Bse	27661,8	9,55	25139,1	9,75	E168	S391
PHD1-a009	A10	pFB-LIC-Bse	27948,1	9,65	25425,4	9,85	S172	V398
PHD1-a010	A11	pFB-LIC-Bse	27564,6	9,65	25041,9	9,85	S172	K394
PHD1-a011	A12	pFB-LIC-Bse	27251,3	9,65	24728,6	9,85	S172	S391
PHD2-a000	B01	pFB-LIC-Bse	46943,2	9,55	44420,5	9,65	G10	K416
PHD2-a009	B02	pFB-LIC-Bse	46458,6	9,55	43935,9	9,65	G10	V412
PHD2-a002	B03	pFB-LIC-Bse	46104,2	9,55	43581,4	9,65	G10	G409
PHD2-a003	B04	pFB-LIC-Bse	46604,8	9,55	44082,1	9,65	S14	K416
PHD2-a004	B05	pFB-LIC-Bse	46120,2	9,55	43597,5	9,65	S14	V412
PHD2-a005	B06	pFB-LIC-Bse	45765,8	9,55	43243,1	9,65	S14	G409
PHD2-a006	B07	pFB-LIC-Bse	46232,4	9,55	43709,7	9,65	D17	K416
PHD2-a007	B08	pFB-LIC-Bse	45747,9	9,55	43225,2	9,65	D17	V412
PHD2-a008	B09	pFB-LIC-Bse	45393,4	9,55	42870,7	9,65	D17	G409
PHD3-a000	B10	pFB-LIC-Bse	29660,9	7,05	27138,2	8,65	G4	D239
PHD3-a001	B11	pFB-LIC-Bse	29315,6	8,65	26792,9	9,15	G4	L236
PHD3-a002	B12	pFB-LIC-Bse	29131,4	8,65	26608,7	9,15	G4	S234
PHD3-a003	C01	pFB-LIC-Bse	29222,4	7,05	26699,7	8,65	M7	D239
PHD3-a004	C02	pFB-LIC-Bse	28877	8,65	26354,3	9,15	M7	L236
PHD3-a005	C03	pFB-LIC-Bse	28692,8	8,65	26170,1	9,15	M7	S234
PHD3-a006	C04	pFB-LIC-Bse	29697,8	6,75	27175,1	7,75	G4	D239
PHD3-a007	C05	pFB-LIC-Bse	29352,5	7,85	26829,8	8,95	G4	L236
PHD3-a008	C06	pFB-LIC-Bse	29168,3	7,85	26645,6	8,95	G4	S234
PHD3-a009	C07	pFB-LIC-Bse	29259,3	6,65	26736,6	7,65	M7	D239
PHD3-a010	C08	pFB-LIC-Bse	28914	7,85	26391,3	8,95	M7	L236
PHD3-a011	C09	pFB-LIC-Bse	28729,7	7,85	26207	8,95	M7	S234
PHD4B-a000	C10	pFB-LIC-Bse	54755,2	5,95	50089,9	5,75	T107	S546
PH4B-a001	C11	pFB-LIC-Bse	54337,8	5,95	49672,5	5,85	T107	E541

PH4Ba-0003 D01 pFB-LIC-Bse 53969,4 5,95 49304,1 5,85 L111 E541 PH4Ba-0004 D02 pFB-LIC-Bse 53376,5 5,85 48711,2 5,65 G120 S546 PH4Ba-005 D03 pFB-LIC-Bse 52959,2 5,95 48293,9 5,75 G120 E541 PH4Ba-006 D04 pFB-LIC-Bse 52428,4 5,75 47763,1 5,55 V128 S546 PH4Ba-007 D05 pFB-LIC-Bse 52428,4 5,75 47763,1 5,55 V128 E541 PH4Ba-007 D05 pFB-LIC-Bse 50535,2 5,65 45869,9 3,35 L144 S546 PH4Ba-009 D07 pFB-LIC-Bse 50117,9 5,75 4552,6 5,45 L144 E541 PH4Ba-010 D08 pFB-LIC-Bse 49935,5 5,75 45270,2 5,45 G149 S546 PH4Ba-011 D09 pFB-LIC-Bse 49935,5 5,75 45270,2 5,45 G149 S546 PH4Ba-011 D09 pFB-LIC-Bse 49918,1 3,75 44852,8 5,55 G149 S546 PH4Ba-011 D10 pFB-CTIOHF-LIC 46064,9 7,15 43611,5 8,95 M1 V398 PHD1-a100 D10 pFB-CTIOHF-LIC 45681,5 7,15 43611,5 8,95 M1 K394 PHD1-a102 D12 pFB-CTIOHF-LIC 43568,1 6,85 42914,7 8,55 M1 S391 PHD1-a103 E01 pFB-CTIOHF-LIC 32458,3 8,95 30400,8 9,45 S132 V398 PHD1-a104 E02 pFB-CTIOHF-LIC 32470,8 8,95 30400,8 9,45 S132 V398 PHD1-a106 E04 pFB-CTIOHF-LIC 23684,7 9,35 26231,3 9,65 E168 V398 PHD1-a107 E05 pFB-CTIOHF-LIC 22684,7 9,35 26231,3 9,65 E168 V398 PHD1-a107 E05 pFB-CTIOHF-LIC 22684,7 9,35 22507,4 9,75 S172 V398 PHD1-a109 E07 pFB-CTIOHF-LIC 22864,7 9,35 25507,4 9,75 S172 V398 PHD1-a109 E07 pFB-CTIOHF-LIC 228647,7 9,45 25204,2 9,75 S172 V398 PHD1-a109 E07 pFB-CTIOHF-LIC 228647,7 9,45 25204,2 9,75 S172 V398 PHD1-a107 E05 pFB-CTIOHF-LIC 228647,7 9,45 25204,2 9,75 S172 V398 PHD1-a107 E05 pFB-CTIOHF-LIC 228647,7 9,45 24504,2 9,75 S172 V398 PHD1-a107 E05 pFB-CTIOHF-LIC 24647,4 9,45 44486,6 9,65 G10 K416 PHD2-a100 E10 pFB-CTIOHF-LIC 44647,4 9,45 44486,6 9,65 G10 K416 PH	PH4B-a002	C12	pFB-LIC-Bse	54386,8	5,95	49721,5	5,75	L111	S546
PH4B-a004 D02 pFB-LIC-Bse 53376,5 5.85 48711,2 5.65 G120 S546 PH4B-a005 D03 pFB-LIC-Bse 5299,2 5.95 48293,9 5.75 G120 E541 PH4B-a006 D04 pFB-LIC-Bse 52428,4 5.75 47763,1 5.55 V128 E541 PH4B-a007 D05 pFB-LIC-Bse 5011,1 5.85 4734,8 5.65 V128 E541 PH4B-a008 D06 pFB-LIC-Bse 50117,9 5.75 4452,0 5.45 L144 E546 PH4B-a010 D08 pFB-LIC-Bse 49918,1 5.75 4452,0 5.45 L144 E541 PH4B-a010 D0 pFB-LIC-Bse 49918,1 5.75 4452,0 5.45 G149 E541 PH4B-a010 D10 pFB-LIC-Bse 49918,1 5.75 4452,0 5.45 G149 E541 PH4B-a010 D10 pFB-LIC-Bse 49918,5 5.75 4452,2 5.55	PH4B-a003	D01	-	53969,4	5,95	49304,1	5,85	L111	E541
PH4B-a005 D03 pFB-LIC-Bse 52959.2 5.95 48293.9 5.75 G120 E541 PH4B-a006 D04 pFB-LIC-Bse 52428.4 5.75 47763.1 5.55 V128 S546 PH4B-a007 D05 pFB-LIC-Bse 50355.2 5.65 45869.9 5.35 L144 S546 PH4B-a009 D07 pFB-LIC-Bse 50355.2 5.65 45869.9 5.35 L144 E541 PH4B-a010 D08 pFB-LIC-Bse 49955.5 5.75 44852.8 5.55 G149 S546 PH4B-a011 D09 pFB-LIC-Bse 49955.5 5.75 44852.8 5.55 G149 S546 PHDI-a101 D10 pFB-CTIOHF-LIC 46064.9 7.15 43611.5 8,95 M1 V398 PHD1-a102 D12 pFB-CTIOHF-LIC 45681.5 7.15 43228 8,95 M1 K394 PHD1-a103 F61 pFB-CTIOHF-LIC 43568.1 6,85 42914.7 <t< td=""><td>PH4B-a004</td><td>D02</td><td>pFB-LIC-Bse</td><td></td><td></td><td>48711,2</td><td>5,65</td><td>G120</td><td>S546</td></t<>	PH4B-a004	D02	pFB-LIC-Bse			48711,2	5,65	G120	S546
PH4B-a006 D04 pFB-LIC-Bse 52428.4 5.75 47763.1 5.55 V128 S546 PH4B-a007 D05 pFB-LIC-Bse 52011.1 5.85 47345.8 5.65 V128 E541 PH4B-a008 D06 pFB-LIC-Bse 5035.2 5.65 45869.9 5.35 L144 E541 PH4B-a010 D08 pFB-LIC-Bse 49935.5 5.75 45452.6 5.45 G149 S546 PH4B-a011 D09 pFB-LIC-Bse 49935.5 5.75 45270.2 5.45 G149 S546 PH4B-a010 D10 pFB-CTIOHF-LIC 46064.9 7.15 43611.5 8.95 M1 V398 PHD1-a100 D12 pFB-CTIOHF-LIC 45368.1 6.85 42914.7 8.55 M1 K394 PHD1-a103 E01 pFB-CTIOHF-LIC 32470.8 8.95 30017.4 9.45 S132 X398 PHD1-a104 E02 pFB-CTIOHF-LIC 32675.8 8.65 29704			-	•					+
PH4B-a008 D06 pFB-LIC-Bse 50535,2 5,65 45869,9 5,35 L144 S546 PH4B-a009 D07 pFB-LIC-Bse 50117,9 5,75 45452,6 5,45 L144 E541 PH4B-a010 D08 pFB-LIC-Bse 49935,5 5,75 45270,2 5,45 G149 S546 PH4B-a011 D09 pFB-LIC-Bse 49935,5 5,75 45270,2 5,45 G149 E541 PHDI-a100 D10 pFB-CTIOHF-LIC 46064,9 7,15 43611,5 8,95 M1 V398 PHDI-a101 D11 pFB-CTIOHF-LIC 46064,9 7,15 43611,5 8,95 M1 K394 PHDI-a102 D12 pFB-CTIOHF-LIC 45368,1 6,85 42914,7 8,55 M1 S391 PHDI-a103 E01 pFB-CTIOHF-LIC 32470,8 8,95 30017,4 8,45 S132 V398 PHDI-a104 E02 pFB-CTIOHF-LIC 32470,8 8,95 30017,4 9,45 S132 K394 PHDI-a105 E03 pFB-CTIOHF-LIC 32470,8 8,95 30017,4 9,45 S132 K394 PHDI-a106 E04 pFB-CTIOHF-LIC 32470,8 8,95 30017,4 9,45 S132 K394 PHDI-a106 E04 pFB-CTIOHF-LIC 32450,8 8,95 30017,4 9,45 S132 K394 PHDI-a106 E04 pFB-CTIOHF-LIC 32457,5 8,65 29704 9,35 S132 S391 PHDI-a106 E06 pFB-CTIOHF-LIC 29068,2 9,35 26614,7 9,65 E168 V398 PHDI-a108 E06 pFB-CTIOHF-LIC 28084,7 9,35 26231,3 9,65 E168 K394 PHDI-a108 E06 pFB-CTIOHF-LIC 28257,7 9,45 26204,2 9,75 S172 V398 PHDI-a109 E07 pFB-CTIOHF-LIC 28257,3 9,45 26204,2 9,75 S172 V398 PHDI-a111 E09 pFB-CTIOHF-LIC 27960,9 9,35 25507,4 9,75 S172 S391 PHD2-a100 E10 pFB-CTIOHF-LIC 47652,8 9,45 44590,4 9,65 G10 R411 PHD2-a104 F02 pFB-CTIOHF-LIC 4768,2 9,45 44590,4 9,65 G10 R411 PHD2-a104 F02 pFB-CTIOHF-LIC 4768,2 9,45 44714,8 9,65 G10 R411 PHD2-a105 F03 pFB-CTIOHF-LIC 47682,8 9,45 44714,8 9,65 G10 R411 PHD2-a106 F04 pFB-CTIOHF-LIC 47682,9 9,45 44714,8 9,65 G10 R411 PHD2-a107 F05 pFB-CTIOHF-LIC 47682,9 9,45 44714,8 9,65 G10 G10 FB-CTIOHF-LIC 47082,9 9,45 44704,9 9,65 G10 G10 FB-CTIOHF-LIC 470	PH4B-a006	D04	pFB-LIC-Bse		5,75	47763,1	5,55	V128	S546
PH4B-a009 D07 pFB-LIC-Bse 50117.9 5.75 45452.6 5.45 L144 E541 PH4B-a010 D08 pFB-LIC-Bse 49935.5 5.75 45270.2 5.45 G149 S546 PH4B-a011 D09 pFB-LIC-Bse 49935.5 5.75 44852.8 5.55 G149 E541 PH4B-a101 D10 pFB-CT10HF-LIC 46064.9 7.15 43611.5 8.95 M1 V398 PHD1-a100 D10 pFB-CT10HF-LIC 45681.5 7.15 43228 8.95 M1 K394 PHD1-a102 D12 pFB-CT10HF-LIC 45581.1 6.85 42914.7 8.55 M1 S391 PHD1-a103 E01 pFB-CT10HF-LIC 32854.3 8.95 30400.8 9.45 S132 V398 PHD1-a104 E02 pFB-CT10HF-LIC 32854.3 8.95 30400.8 9.45 S132 V398 PHD1-a105 E03 pFB-CT10HF-LIC 32157.5 8.65 29704 9.45 S132 S391 PHD1-a106 E04 pFB-CT10HF-LIC 29068.2 9.35 26614.7 9.65 E168 V398 PHD1-a107 E05 pFB-CT10HF-LIC 2884.7 9.35 26231.3 9.65 E168 K394 PHD1-a109 E07 pFB-CT10HF-LIC 28684.7 9.35 26231.3 9.65 E168 S391 PHD1-a109 E07 pFB-CT10HF-LIC 2867.7 9.45 25820.8 9.75 S172 V398 PHD1-a110 E08 pFB-CT10HF-LIC 28274.3 9.45 25820.8 9.75 S172 V398 PHD1-a110 E08 pFB-CT10HF-LIC 28274.3 9.45 25820.8 9.75 S172 V398 PHD2-a100 E10 pFB-CT10HF-LIC 27960.9 9.35 25507.4 9.75 S172 S391 PHD2-a100 E10 pFB-CT10HF-LIC 47652.8 9.45 44714.8 9.65 G10 K416 PHD2-a104 F02 pFB-CT10HF-LIC 4768.2 9.45 44714.8 9.65 G10 G409 PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 46813.8 9.35 44360.3 9.55 S14 R411 PHD2-a106 F04 pFB-CT10HF-LIC 46857.5 9.45 44360.4 9.65 S14 R411 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 46857.5 9.45 44364.6 9.65 S14 R411 PHD2-a106 F04 pFB-CT10HF-LIC 46857.5 9.45 44364.6 9.65 S14 R411 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 466457.5 9.45 44368.6 9.65 D17 K416 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 466457.5 9.45 44364.6 9.65 D17 G409 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 466457.5 9.45 44364.6 9.65 D17 G409	PH4B-a007	D05	pFB-LIC-Bse	52011,1	5,85	47345,8	5,65	V128	E541
PH4B-a010 D08	PH4B-a008	D06	pFB-LIC-Bse	50535,2	5,65	45869,9	5,35	L144	S546
PH4B-a011 D09	PH4B-a009	D07	pFB-LIC-Bse	50117,9	5,75	45452,6	5,45	L144	E541
PHD1-a100 D10 pFB-CT10HF-LIC 46064.9 7.15 43611.5 8.95 M1 V398 PHD1-a101 D11 pFB-CT10HF-LIC 45681.5 7.15 43228 8.95 M1 K394 PHD1-a102 D12 pFB-CT10HF-LIC 43368.1 6.85 42914.7 8.55 M1 S391 PHD1-a103 E01 pFB-CT10HF-LIC 32854.3 8.95 30400.8 9.45 S132 V398 PHD1-a104 E02 pFB-CT10HF-LIC 32470.8 8.95 30017.4 9.45 S132 S394 PHD1-a105 E03 pFB-CT10HF-LIC 32157.5 8.65 29704 9.35 S132 S391 PHD1-a106 E04 pFB-CT10HF-LIC 29068.2 9.35 26614.7 9.65 E168 V398 PHD1-a107 E05 pFB-CT10HF-LIC 28684.7 9.35 26231.3 9.65 E168 K394 PHD1-a108 E06 pFB-CT10HF-LIC 28371.4 9.15 25917.9 9.65 E168 S391 PHD1-a109 E07 pFB-CT10HF-LIC 28657.7 9.45 26204.2 9.75 S172 V398 PHD1-a110 E08 pFB-CT10HF-LIC 28657.7 9.45 26204.2 9.75 S172 V398 PHD1-a110 E08 pFB-CT10HF-LIC 28743.3 9.45 25507.4 9.75 S172 S391 PHD2-a100 E10 pFB-CT10HF-LIC 47652.8 9.45 45199.3 9.65 G10 K416 PHD2-a101 E11 pFB-CT10HF-LIC 46813.8 9.35 44360.3 9.55 G10 G409 PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 46813.8 9.35 44360.3 9.55 G10 G409 PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 46829.9 9.45 444861 9.65 S14 K416 PHD2-a104 F02 pFB-CT10HF-LIC 46829.9 9.45 44486.4 9.65 S14 R411 PHD2-a105 F03 pFB-CT10HF-LIC 46475.4 9.45 44486.6 9.65 D17 K416 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 46475.4 9.35 44040 9.65 D17 R411 PHD2-a108 F06 pFB-CT10HF-LIC 46475.4 9.35 44040 9.65 D17 R411 PHD2-a109 F09 pFB-CT10HF-LIC 46475.4 9.35 44040 9.65 D17 R411 PHD2-a109 F09 pFB-CT10HF-LIC 46475.4 9.35 44040 9.65 D17 R411 PHD2-a109 F09 pFB-CT10HF-LIC 46475.4 9.35 44040 9.65 D17 R411 PHD2-a109 F09 pFB-CT10HF-LIC 46475.4 9.35 44040 9.65 D17 R411 PHD2-a109 F09 pFB-CT10HF-LIC 46445.4 9.35 44044 9.65 D17 R411 PHD2-a1	PH4B-a010	D08	pFB-LIC-Bse	49935,5	5,75		5,45	G149	S546
PHD1-a101 D11 pFB-CT10HF-LIC 45681,5 7,15 43228 8,95 M1 K394 PHD1-a102 D12 pFB-CT10HF-LIC 45368,1 6,85 42914,7 8,55 M1 S391 PHD1-a103 E01 pFB-CT10HF-LIC 32854,3 8,95 30400,8 9,45 S132 V398 PHD1-a104 E02 pFB-CT10HF-LIC 32470,8 8,95 30017,4 9,45 S132 K394 PHD1-a105 E03 pFB-CT10HF-LIC 32157,5 8,65 29704 9,35 S132 S391 PHD1-a106 E04 pFB-CT10HF-LIC 22068,2 9,35 26614,7 9,65 E168 V398 PHD1-a107 E05 pFB-CT10HF-LIC 228684,7 9,35 26231,3 9,65 E168 K394 PHD1-a109 E06 pFB-CT10HF-LIC 288684,7 9,35 26231,3 9,65 E168 K394 PHD1-a109 E07 pFB-CT10HF-LIC 28371,4 9,15 25917,9 9,65 E168 S391 PHD1-a109 E07 pFB-CT10HF-LIC 28274,3 9,45 25820,8 9,75 S172 V398 PHD1-a110 E08 pFB-CT10HF-LIC 22760,9 9,35 25507,4 9,75 S172 K394 PHD2-a100 E10 pFB-CT10HF-LIC 27960,9 9,35 25507,4 9,75 S172 S391 PHD2-a100 E10 pFB-CT10HF-LIC 47168,2 9,45 44714,8 9,65 G10 K416 PHD2-a101 E11 pFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 G10 G409 PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 47314,4 9,45 44861 9,65 S14 K416 PHD2-a104 F02 pFB-CT10HF-LIC 46829,9 9,45 444861 9,65 S14 K416 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 46942 9,45 44488,6 9,65 S14 R411 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44488,6 9,65 D17 K416 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44488,6 9,65 D17 K416 PHD2-a108 F06 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44488,6 9,65 D17 K416 PHD2-a109 F09 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27371,8 8,95 G4 L236 PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27371,8 8,95 G4 D239 PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27371,8 8,95 G4 D239 PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27371,8 8,95 G4 D239 PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 29867,7 7,15 27371,8 8,95 M7 D239 PHD3-a	PH4B-a011	D09	pFB-LIC-Bse	49518,1	5,75	44852,8	5,55	G149	E541
PHD1-a102 D12 PFB-CT10HF-LIC 45368,1 6,85 42914,7 8,55 M1 S391 PHD1-a103 E01 PFB-CT10HF-LIC 32854,3 8,95 30400,8 9,45 S132 V398 PHD1-a104 E02 PFB-CT10HF-LIC 32470,8 8,95 30017,4 9,45 S132 K394 PHD1-a105 E03 PFB-CT10HF-LIC 32157,5 8,65 29704 9,35 S132 S391 PHD1-a106 E04 PFB-CT10HF-LIC 2968,2 9,35 26614,7 9,65 E168 K394 PHD1-a107 E05 PFB-CT10HF-LIC 28684,7 9,35 26231,3 9,65 E168 K394 PHD1-a107 E05 PFB-CT10HF-LIC 28684,7 9,35 26231,3 9,65 E168 K394 PHD1-a109 E07 PFB-CT10HF-LIC 28657,7 9,45 26204,2 9,75 S172 V398 PHD1-a110 E08 PFB-CT10HF-LIC 28657,7 9,45 25204,2 9,75 S172 X394 PHD1-a111 E09 PFB-CT10HF-LIC 27960,9 9,35 25507,4 9,75 S172 S391 PHD2-a100 E10 PFB-CT10HF-LIC 4768,2 9,45 44714,8 9,65 G10 K416 PHD2-a102 E12 PFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 G10 G409 PHD2-a103 F01 PFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 S14 K416 PHD2-a104 F02 PFB-CT10HF-LIC 46829,9 9,45 44376,4 9,65 S14 K416 PHD2-a105 F03 PFB-CT10HF-LIC 46829,9 9,45 44486,1 9,65 S14 K416 PHD2-a107 F05 PFB-CT10HF-LIC 46475,4 9,35 44021,9 9,55 S14 G409 PHD2-a107 F05 PFB-CT10HF-LIC 46475,4 9,35 44021,9 9,55 S14 G409 PHD2-a107 F05 PFB-CT10HF-LIC 46475,5 9,45 44488,6 9,65 D17 K416 PHD2-a107 F05 PFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44004 9,65 D17 K416 PHD2-a107 F05 PFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44004 9,65 D17 G409 PHD3-a100 F07 PFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44004 9,65 D17 G409 PHD3-a100 F07 PFB-CT10HF-LIC 3025,2 7,15 27571,8 8,95 G4 L236 PHD3-a100 F07 PFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27387,5 8,95 G4 A235 PHD3-a100 F07 PFB-CT10HF-LIC 29932 6,65 27917,1 7,75 G4 D239 PHD3-a100 F07 PFB-CT10HF-LIC 29932 6,65 27917,1 7,75 G4 D239 PHD3-a1	PHD1-a100	D10	pFB-CT10HF-LIC	46064,9	7,15	43611,5	8,95	M1	V398
PHD1-a103	PHD1-a101	D11	pFB-CT10HF-LIC	45681,5	7,15	43228	8,95	M1	K394
PHD1-a104 E02 pFB-CT10HF-LIC 32470,8 8,95 30017,4 9,45 S132 K394 PHD1-a105 E03 pFB-CT10HF-LIC 32157,5 8,65 29704 9,35 S132 S391 PHD1-a106 E04 pFB-CT10HF-LIC 29068,2 9,35 26614,7 9,65 E168 V398 PHD1-a107 E05 pFB-CT10HF-LIC 28684,7 9,35 26231,3 9,65 E168 K394 PHD1-a108 E06 pFB-CT10HF-LIC 28371,4 9,15 25917,9 9,65 E168 S391 PHD1-a109 E07 pFB-CT10HF-LIC 28371,4 9,15 25917,9 9,65 E168 S391 PHD1-a110 E08 pFB-CT10HF-LIC 28274,3 9,45 25820,8 9,75 S172 V398 PHD1-a110 E08 pFB-CT10HF-LIC 28274,3 9,45 25820,8 9,75 S172 K394 PHD1-a110 E09 pFB-CT10HF-LIC 27960,9 9,35 25507,4 9,75 S172 S391 PHD2-a100 E10 pFB-CT10HF-LIC 47652,8 9,45 45199,3 9,65 G10 K416 PHD2-a101 E11 pFB-CT10HF-LIC 47682,8 9,45 44714,8 9,65 G10 R411 PHD2-a102 E12 pFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 G10 G409 PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 47314,4 9,45 44861 9,65 S14 K416 PHD2-a104 F02 pFB-CT10HF-LIC 46829,9 9,45 44376,4 9,65 S14 K416 PHD2-a105 F03 pFB-CT10HF-LIC 46475,4 9,35 44021,9 9,55 S14 G409 PHD2-a106 F04 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44488,6 9,65 D17 K416 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44404 9,65 D17 K416 PHD2-a108 F06 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44404 9,65 D17 K416 PHD2-a108 F06 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44004 9,65 D17 G409 PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 30370,5 6,65 27917,1 7,75 G4 D239 PHD3-a101 F08 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27571,8 8,95 G4 L236 PHD3-a104 F11 pFB-CT10HF-LIC 2986,7 7,15 27571,8 8,95 G4 A235 PHD3-a104 F11 pFB-CT10HF-LIC 2986,7 7,15 27133,2 8,95 M7 A235 PHD3-a106 G01 pFB-CT10HF-LIC 2986,7 7,15 27954,8 8,95 M7 A235 PHD3-a106 G01 pFB-CT10HF-LIC 29402,4 7,15 26949 8,95 M7 A235 PHD3-a10	PHD1-a102	D12	pFB-CT10HF-LIC	45368,1	6,85	42914,7	8,55	M1	S391
PHD1-a105 E03 pFB-CT10HF-LIC 32157,5 8,65 29704 9,35 S132 S391 PHD1-a106 E04 pFB-CT10HF-LIC 29068,2 9,35 26614,7 9,65 E168 V398 PHD1-a107 E05 pFB-CT10HF-LIC 28684,7 9,35 26231,3 9,65 E168 K394 PHD1-a108 E06 pFB-CT10HF-LIC 28371,4 9,15 25917,9 9,65 E168 S391 PHD1-a109 E07 pFB-CT10HF-LIC 28657,7 9,45 26204,2 9,75 S172 V398 PHD1-a11 E08 pFB-CT10HF-LIC 2874,3 9,45 25820,8 9,75 S172 K394 PHD2-a100 E10 pFB-CT10HF-LIC 27960,9 9,35 25507,4 9,75 S172 S391 PHD2-a101 E11 pFB-CT10HF-LIC 47652,8 9,45 45199,3 9,65 G10 K416 PHD2-a102 E12 pFB-CT10HF-LIC 47168,2 9,45 44714	PHD1-a103	E01	pFB-CT10HF-LIC	32854,3	8,95		9,45	S132	V398
PHD1-a106 E04 pFB-CT10HF-LIC 29068,2 9,35 26614,7 9,65 E168 V398 PHD1-a107 E05 pFB-CT10HF-LIC 28684,7 9,35 26231,3 9,65 E168 K394 PHD1-a108 E06 pFB-CT10HF-LIC 28371,4 9,15 25917,9 9,65 E168 S391 PHD1-a109 E07 pFB-CT10HF-LIC 28657,7 9,45 26204,2 9,75 S172 V398 PHD1-a110 E08 pFB-CT10HF-LIC 28674,3 9,45 25820,8 9,75 S172 K394 PHD1-a111 E09 pFB-CT10HF-LIC 27960,9 9,35 25507,4 9,75 S172 S391 PHD2-a100 E10 pFB-CT10HF-LIC 47652,8 9,45 45199,3 9,65 G10 K416 PHD2-a102 E12 pFB-CT10HF-LIC 47168,2 9,45 44714,8 9,65 G10 R411 PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44	PHD1-a104	E02	pFB-CT10HF-LIC	32470,8	8,95	30017,4	9,45	S132	K394
PHD1-a107 E05 pFB-CT10HF-LIC 28684,7 9,35 26231,3 9,65 E168 K394 PHD1-a108 E06 pFB-CT10HF-LIC 28371,4 9,15 25917,9 9,65 E168 S391 PHD1-a109 E07 pFB-CT10HF-LIC 28657,7 9,45 26204,2 9,75 S172 V398 PHD1-a110 E08 pFB-CT10HF-LIC 28274,3 9,45 25820,8 9,75 S172 K394 PHD1-a111 E09 pFB-CT10HF-LIC 27960,9 9,35 25507,4 9,75 S172 S391 PHD2-a100 E10 pFB-CT10HF-LIC 47652,8 9,45 45199,3 9,65 G10 K416 PHD2-a101 E11 pFB-CT10HF-LIC 47168,2 9,45 44714,8 9,65 G10 R411 PHD2-a102 E12 pFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 G10 G10 G409 PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 46829,9 9,45	PHD1-a105	E03	pFB-CT10HF-LIC	32157,5	8,65	29704	9,35	S132	S391
PHD1-a108 E06 pFB-CT10HF-LIC 28371,4 9,15 25917,9 9,65 E168 S391 PHD1-a109 E07 pFB-CT10HF-LIC 28657,7 9,45 26204,2 9,75 S172 V398 PHD1-a110 E08 pFB-CT10HF-LIC 28274,3 9,45 25820,8 9,75 S172 K394 PHD1-a111 E09 pFB-CT10HF-LIC 27960,9 9,35 25507,4 9,75 S172 S391 PHD2-a100 E10 pFB-CT10HF-LIC 47652,8 9,45 45199,3 9,65 G10 K416 PHD2-a101 E11 pFB-CT10HF-LIC 47168,2 9,45 44714,8 9,65 G10 R411 PHD2-a102 E12 pFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 G10 G409 PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 46829,9 9,45 44376,4 9,65 S14 K416 PHD2-a105 F03 pFB-CT10HF-LIC 46475,4 9,35 4402	PHD1-a106	E04	pFB-CT10HF-LIC	29068,2	9,35	26614,7	9,65	E168	V398
PHD1-a109 E07 pFB-CT10HF-LIC 28657,7 9,45 26204,2 9,75 S172 V398 PHD1-a110 E08 pFB-CT10HF-LIC 28274,3 9,45 25820,8 9,75 S172 K394 PHD1-a111 E09 pFB-CT10HF-LIC 27960,9 9,35 25507,4 9,75 S172 S391 PHD2-a100 E10 pFB-CT10HF-LIC 47652,8 9,45 45199,3 9,65 G10 K416 PHD2-a101 E11 pFB-CT10HF-LIC 47168,2 9,45 44714,8 9,65 G10 R411 PHD2-a102 E12 pFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 G10 G409 PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 G10 G409 PHD2-a104 F02 pFB-CT10HF-LIC 46829,9 9,45 44376,4 9,65 S14 R411 PHD2-a105 F03 pFB-CT10HF-LIC 46942 9,45 44488,6	PHD1-a107	E05	pFB-CT10HF-LIC	28684,7	9,35	26231,3	9,65	E168	K394
PHD1-a110 E08 pFB-CT10HF-LIC 28274,3 9,45 25820,8 9,75 S172 K394 PHD1-a111 E09 pFB-CT10HF-LIC 27960,9 9,35 25507,4 9,75 S172 S391 PHD2-a100 E10 pFB-CT10HF-LIC 47652,8 9,45 45199,3 9,65 G10 K416 PHD2-a101 E11 pFB-CT10HF-LIC 47168,2 9,45 44714,8 9,65 G10 R411 PHD2-a102 E12 pFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 G10 G409 PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 G10 G409 PHD2-a104 F02 pFB-CT10HF-LIC 46829,9 9,45 44376,4 9,65 S14 R411 PHD2-a105 F03 pFB-CT10HF-LIC 466475,4 9,35 44021,9 9,55 S14 G409 PHD2-a106 F04 pFB-CT10HF-LIC 46942 9,45 44488,6	PHD1-a108	E06	pFB-CT10HF-LIC	28371,4	9,15	25917,9	9,65	E168	S391
PHD1-a111 E09 pFB-CT10HF-LIC 27960,9 9,35 25507,4 9,75 S172 S391 PHD2-a100 E10 pFB-CT10HF-LIC 47652,8 9,45 45199,3 9,65 G10 K416 PHD2-a101 E11 pFB-CT10HF-LIC 47168,2 9,45 44714,8 9,65 G10 R411 PHD2-a102 E12 pFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 G10 G409 PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 G10 G409 PHD2-a104 F02 pFB-CT10HF-LIC 46829,9 9,45 44376,4 9,65 S14 K416 PHD2-a105 F03 pFB-CT10HF-LIC 46475,4 9,35 44021,9 9,55 S14 G409 PHD2-a106 F04 pFB-CT10HF-LIC 464475,4 9,35 44021,9 9,55 D17 K416 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 444004	PHD1-a109	E07	pFB-CT10HF-LIC	28657,7	9,45	26204,2	9,75	S172	V398
PHD2-a100 E10 pFB-CT10HF-LIC 47652,8 9,45 45199,3 9,65 G10 K416 PHD2-a101 E11 pFB-CT10HF-LIC 47168,2 9,45 44714,8 9,65 G10 R411 PHD2-a102 E12 pFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 G10 G409 PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 47314,4 9,45 44861 9,65 S14 K416 PHD2-a104 F02 pFB-CT10HF-LIC 46829,9 9,45 44376,4 9,65 S14 R411 PHD2-a105 F03 pFB-CT10HF-LIC 46475,4 9,35 44021,9 9,55 S14 G409 PHD2-a106 F04 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44488,6 9,65 D17 K416 PHD2-a108 F06 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44004 9,65 D17 R411 PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 30370,5 6,65 27917,1	PHD1-a110	E08	pFB-CT10HF-LIC	28274,3	9,45	25820,8	9,75	S172	K394
PHD2-a101 E11 pFB-CT10HF-LIC 47168,2 9,45 44714,8 9,65 G10 R411 PHD2-a102 E12 pFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 G10 G409 PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 47314,4 9,45 44861 9,65 S14 K416 PHD2-a104 F02 pFB-CT10HF-LIC 46829,9 9,45 44376,4 9,65 S14 R411 PHD2-a105 F03 pFB-CT10HF-LIC 46475,4 9,35 44021,9 9,55 S14 G409 PHD2-a106 F04 pFB-CT10HF-LIC 46942 9,45 44488,6 9,65 D17 K416 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 444004 9,65 D17 R411 PHD2-a108 F06 pFB-CT10HF-LIC 46103 9,35 43649,6 9,55 D17 G409 PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 30025,2 7,15 27571,8	PHD1-a111	E09	pFB-CT10HF-LIC	27960,9	9,35	25507,4	9,75	S172	S391
PHD2-a102 E12 pFB-CT10HF-LIC 46813,8 9,35 44360,3 9,55 G10 G409 PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 47314,4 9,45 44861 9,65 S14 K416 PHD2-a104 F02 pFB-CT10HF-LIC 46829,9 9,45 44376,4 9,65 S14 R411 PHD2-a105 F03 pFB-CT10HF-LIC 46475,4 9,35 44021,9 9,55 S14 G409 PHD2-a106 F04 pFB-CT10HF-LIC 46942 9,45 44488,6 9,65 D17 K416 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 444004 9,65 D17 R411 PHD2-a108 F06 pFB-CT10HF-LIC 46103 9,35 43649,6 9,55 D17 G409 PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 30370,5 6,65 27917,1 7,75 G4 D239 PHD3-a101 F08 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27387,5	PHD2-a100	E10	pFB-CT10HF-LIC	47652,8	9,45	45199,3	9,65	G10	K416
PHD2-a103 F01 pFB-CT10HF-LIC 47314,4 9,45 44861 9,65 S14 K416 PHD2-a104 F02 pFB-CT10HF-LIC 46829,9 9,45 44376,4 9,65 S14 R411 PHD2-a105 F03 pFB-CT10HF-LIC 46475,4 9,35 44021,9 9,55 S14 G409 PHD2-a106 F04 pFB-CT10HF-LIC 46942 9,45 44488,6 9,65 D17 K416 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 444004 9,65 D17 R411 PHD2-a108 F06 pFB-CT10HF-LIC 46103 9,35 43649,6 9,55 D17 G409 PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 30370,5 6,65 27917,1 7,75 G4 D239 PHD3-a101 F08 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27571,8 8,95 G4 A235 PHD3-a103 F10 pFB-CT10HF-LIC 29932 6,65 27478,5	PHD2-a101	E11	pFB-CT10HF-LIC	47168,2	9,45	44714,8	9,65	G10	R411
PHD2-a104 F02 pFB-CT10HF-LIC 46829,9 9,45 44376,4 9,65 S14 R411 PHD2-a105 F03 pFB-CT10HF-LIC 46475,4 9,35 44021,9 9,55 S14 G409 PHD2-a106 F04 pFB-CT10HF-LIC 46942 9,45 44488,6 9,65 D17 K416 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44004 9,65 D17 R411 PHD2-a108 F06 pFB-CT10HF-LIC 46103 9,35 43649,6 9,55 D17 G409 PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 30370,5 6,65 27917,1 7,75 G4 D239 PHD3-a101 F08 pFB-CT10HF-LIC 30025,2 7,15 27571,8 8,95 G4 L236 PHD3-a102 F09 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27387,5 8,95 G4 A235 PHD3-a103 F10 pFB-CT10HF-LIC 29932 6,65 27478,5	PHD2-a102	E12	pFB-CT10HF-LIC	46813,8	9,35	44360,3	9,55	G10	G409
PHD2-a105 F03 pFB-CT10HF-LIC 46475,4 9,35 44021,9 9,55 S14 G409 PHD2-a106 F04 pFB-CT10HF-LIC 46942 9,45 44488,6 9,65 D17 K416 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44004 9,65 D17 R411 PHD2-a108 F06 pFB-CT10HF-LIC 46103 9,35 43649,6 9,55 D17 G409 PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 30370,5 6,65 27917,1 7,75 G4 D239 PHD3-a101 F08 pFB-CT10HF-LIC 30025,2 7,15 27571,8 8,95 G4 L236 PHD3-a102 F09 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27387,5 8,95 G4 A235 PHD3-a103 F10 pFB-CT10HF-LIC 29932 6,65 27478,5 7,65 M7 D239 PHD3-a104 F11 pFB-CT10HF-LIC 29402,4 7,15 26949 <td< td=""><td>PHD2-a103</td><td>F01</td><td>pFB-CT10HF-LIC</td><td>47314,4</td><td>9,45</td><td>44861</td><td>9,65</td><td>S14</td><td>K416</td></td<>	PHD2-a103	F01	pFB-CT10HF-LIC	47314,4	9,45	44861	9,65	S14	K416
PHD2-a106 F04 pFB-CT10HF-LIC 46942 9,45 44488,6 9,65 D17 K416 PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44004 9,65 D17 R411 PHD2-a108 F06 pFB-CT10HF-LIC 46103 9,35 43649,6 9,55 D17 G409 PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 30370,5 6,65 27917,1 7,75 G4 D239 PHD3-a101 F08 pFB-CT10HF-LIC 30025,2 7,15 27571,8 8,95 G4 L236 PHD3-a102 F09 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27387,5 8,95 G4 A235 PHD3-a103 F10 pFB-CT10HF-LIC 29932 6,65 27478,5 7,65 M7 D239 PHD3-a104 F11 pFB-CT10HF-LIC 29586,7 7,15 27133,2 8,95 M7 A235 PHD3-a106 G01 pFB-CT10HF-LIC 30407,5 6,45 27954	PHD2-a104	F02	pFB-CT10HF-LIC	46829,9	9,45	44376,4	9,65	S14	R411
PHD2-a107 F05 pFB-CT10HF-LIC 46457,5 9,45 44004 9,65 D17 R411 PHD2-a108 F06 pFB-CT10HF-LIC 46103 9,35 43649,6 9,55 D17 G409 PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 30370,5 6,65 27917,1 7,75 G4 D239 PHD3-a101 F08 pFB-CT10HF-LIC 30025,2 7,15 27571,8 8,95 G4 L236 PHD3-a102 F09 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27387,5 8,95 G4 A235 PHD3-a103 F10 pFB-CT10HF-LIC 29932 6,65 27478,5 7,65 M7 D239 PHD3-a104 F11 pFB-CT10HF-LIC 29586,7 7,15 27133,2 8,95 M7 L236 PHD3-a105 F12 pFB-CT10HF-LIC 29402,4 7,15 26949 8,95 M7 A235 PHD3-a106 G01 pFB-CT10HF-LIC 30407,5 6,45 27954 6	PHD2-a105	F03	pFB-CT10HF-LIC	46475,4	9,35	44021,9	9,55	S14	G409
PHD2-a108 F06 pFB-CT10HF-LIC 46103 9,35 43649,6 9,55 D17 G409 PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 30370,5 6,65 27917,1 7,75 G4 D239 PHD3-a101 F08 pFB-CT10HF-LIC 30025,2 7,15 27571,8 8,95 G4 L236 PHD3-a102 F09 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27387,5 8,95 G4 A235 PHD3-a103 F10 pFB-CT10HF-LIC 29932 6,65 27478,5 7,65 M7 D239 PHD3-a104 F11 pFB-CT10HF-LIC 29586,7 7,15 27133,2 8,95 M7 L236 PHD3-a105 F12 pFB-CT10HF-LIC 29402,4 7,15 26949 8,95 M7 A235 PHD3-a106 G01 pFB-CT10HF-LIC 30407,5 6,45 27954 6,75 G4 D239 PHD3-a107 G02 pFB-CT10HF-LIC 30062,1 6,85 27608,7	PHD2-a106	F04	pFB-CT10HF-LIC	46942	9,45	44488,6	9,65	D17	K416
PHD3-a100 F07 pFB-CT10HF-LIC 30370,5 6,65 27917,1 7,75 G4 D239 PHD3-a101 F08 pFB-CT10HF-LIC 30025,2 7,15 27571,8 8,95 G4 L236 PHD3-a102 F09 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27387,5 8,95 G4 A235 PHD3-a103 F10 pFB-CT10HF-LIC 29932 6,65 27478,5 7,65 M7 D239 PHD3-a104 F11 pFB-CT10HF-LIC 29586,7 7,15 27133,2 8,95 M7 L236 PHD3-a105 F12 pFB-CT10HF-LIC 29402,4 7,15 26949 8,95 M7 A235 PHD3-a106 G01 pFB-CT10HF-LIC 30407,5 6,45 27954 6,75 G4 D239 PHD3-a107 G02 pFB-CT10HF-LIC 30062,1 6,85 27608,7 8,65 G4 L236 PHD3-a108 G03 pFB-CT10HF-LIC 29877,9 6,85 27424,4 <td< td=""><td>PHD2-a107</td><td>F05</td><td>pFB-CT10HF-LIC</td><td>46457,5</td><td>9,45</td><td>44004</td><td>9,65</td><td>D17</td><td>R411</td></td<>	PHD2-a107	F05	pFB-CT10HF-LIC	46457,5	9,45	44004	9,65	D17	R411
PHD3-a101 F08 pFB-CT10HF-LIC 30025,2 7,15 27571,8 8,95 G4 L236 PHD3-a102 F09 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27387,5 8,95 G4 A235 PHD3-a103 F10 pFB-CT10HF-LIC 29932 6,65 27478,5 7,65 M7 D239 PHD3-a104 F11 pFB-CT10HF-LIC 29586,7 7,15 27133,2 8,95 M7 L236 PHD3-a105 F12 pFB-CT10HF-LIC 29402,4 7,15 26949 8,95 M7 A235 PHD3-a106 G01 pFB-CT10HF-LIC 30407,5 6,45 27954 6,75 G4 D239 PHD3-a107 G02 pFB-CT10HF-LIC 30062,1 6,85 27608,7 8,65 G4 L236 PHD3-a108 G03 pFB-CT10HF-LIC 29877,9 6,85 27424,4 8,65 G4 A235	PHD2-a108	F06	pFB-CT10HF-LIC	46103	9,35	43649,6	9,55	D17	G409
PHD3-a102 F09 pFB-CT10HF-LIC 29841 7,15 27387,5 8,95 G4 A235 PHD3-a103 F10 pFB-CT10HF-LIC 29932 6,65 27478,5 7,65 M7 D239 PHD3-a104 F11 pFB-CT10HF-LIC 29586,7 7,15 27133,2 8,95 M7 L236 PHD3-a105 F12 pFB-CT10HF-LIC 29402,4 7,15 26949 8,95 M7 A235 PHD3-a106 G01 pFB-CT10HF-LIC 30407,5 6,45 27954 6,75 G4 D239 PHD3-a107 G02 pFB-CT10HF-LIC 30062,1 6,85 27608,7 8,65 G4 L236 PHD3-a108 G03 pFB-CT10HF-LIC 29877,9 6,85 27424,4 8,65 G4 A235	PHD3-a100	F07	pFB-CT10HF-LIC	30370,5	6,65	27917,1	7,75	G4	D239
PHD3-a103 F10 pFB-CT10HF-LIC 29932 6,65 27478,5 7,65 M7 D239 PHD3-a104 F11 pFB-CT10HF-LIC 29586,7 7,15 27133,2 8,95 M7 L236 PHD3-a105 F12 pFB-CT10HF-LIC 29402,4 7,15 26949 8,95 M7 A235 PHD3-a106 G01 pFB-CT10HF-LIC 30407,5 6,45 27954 6,75 G4 D239 PHD3-a107 G02 pFB-CT10HF-LIC 30062,1 6,85 27608,7 8,65 G4 L236 PHD3-a108 G03 pFB-CT10HF-LIC 29877,9 6,85 27424,4 8,65 G4 A235	PHD3-a101	F08	pFB-CT10HF-LIC	30025,2	7,15	27571,8	8,95	G4	L236
PHD3-a104 F11 pFB-CT10HF-LIC 29586,7 7,15 27133,2 8,95 M7 L236 PHD3-a105 F12 pFB-CT10HF-LIC 29402,4 7,15 26949 8,95 M7 A235 PHD3-a106 G01 pFB-CT10HF-LIC 30407,5 6,45 27954 6,75 G4 D239 PHD3-a107 G02 pFB-CT10HF-LIC 30062,1 6,85 27608,7 8,65 G4 L236 PHD3-a108 G03 pFB-CT10HF-LIC 29877,9 6,85 27424,4 8,65 G4 A235	PHD3-a102	F09	pFB-CT10HF-LIC	29841	7,15	27387,5	8,95	G4	A235
PHD3-a105 F12 pFB-CT10HF-LIC 29402,4 7,15 26949 8,95 M7 A235 PHD3-a106 G01 pFB-CT10HF-LIC 30407,5 6,45 27954 6,75 G4 D239 PHD3-a107 G02 pFB-CT10HF-LIC 30062,1 6,85 27608,7 8,65 G4 L236 PHD3-a108 G03 pFB-CT10HF-LIC 29877,9 6,85 27424,4 8,65 G4 A235	PHD3-a103	F10	pFB-CT10HF-LIC	29932	6,65	27478,5	7,65	M7	D239
PHD3-a106 G01 pFB-CT10HF-LIC 30407,5 6,45 27954 6,75 G4 D239 PHD3-a107 G02 pFB-CT10HF-LIC 30062,1 6,85 27608,7 8,65 G4 L236 PHD3-a108 G03 pFB-CT10HF-LIC 29877,9 6,85 27424,4 8,65 G4 A235	PHD3-a104	F11	pFB-CT10HF-LIC	29586,7	7,15	27133,2	8,95	M7	L236
PHD3-a107 G02 pFB-CT10HF-LIC 30062,1 6,85 27608,7 8,65 G4 L236 PHD3-a108 G03 pFB-CT10HF-LIC 29877,9 6,85 27424,4 8,65 G4 A235	PHD3-a105	F12	pFB-CT10HF-LIC	29402,4	7,15	26949	8,95	M7	A235
PHD3-a108 G03 pFB-CT10HF-LIC 29877,9 6,85 27424,4 8,65 G4 A235	PHD3-a106	G01	pFB-CT10HF-LIC	30407,5	6,45	27954	6,75	G4	D239
	PHD3-a107	G02	pFB-CT10HF-LIC	30062,1	6,85	27608,7	8,65	G4	L236
PHD3-a109 G04 pFB-CT10HF-LIC 29968,9 6,45 27515,4 6,75 M7 D239	PHD3-a108	G03	pFB-CT10HF-LIC	29877,9	6,85	27424,4	8,65	G4	A235
	PHD3-a109	G04	pFB-CT10HF-LIC	29968,9	6,45	27515,4	6,75	M7	D239

PHD3-a110	G05	pFB-CT10HF-LIC	29623,6	6,85	27170,1	8,65	M7	L236
PHD3-a111	G06	pFB-CT10HF-LIC	29439,4	6,85	26985,9	8,65	M7	A235
PH4B-a100	G07	pFB-CT10HF-LIC	53322,2	5,85	50868,8	5,65	T107	S546
PH4B-a101	G08	pFB-CT10HF-LIC	52904,9	5,95	50451,4	5,75	T107	E541
PH4B-a102	G09	pFB-CT10HF-LIC	52953,8	5,85	50500,4	5,65	L111	S546
PH4B-a103	G10	pFB-CT10HF-LIC	52536,4	5,95	50083	5,75	L111	E541
PH4B-a104	G11	pFB-CT10HF-LIC	51943,6	5,85	49490,1	5,65	G120	S546
PH4B-a105	G12	pFB-CT10HF-LIC	51526,2	5,85	49072,7	5,65	G120	E541
PH4B-a106	H01	pFB-CT10HF-LIC	50995,5	5,75	48542	5,45	V128	S546
PH4B-a107	H02	pFB-CT10HF-LIC	50578,1	5,85	48124,6	5,55	V128	E541
PH4B-a108	H03	pFB-CT10HF-LIC	49102,3	5,65	46648,8	5,25	L144	S546
PH4B-a109	H04	pFB-CT10HF-LIC	48684,9	5,75	46231,4	5,35	L144	E541
PH4B-a110	H05	pFB-CT10HF-LIC	48502,5	5,75	46049,1	5,35	G149	S546
PH4B-a111	H06	pFB-CT10HF-LIC	48085,1	5,75	45631,7	5,45	G149	E541
PHD3-a012	H07	pFB-LIC-Bse	29871,2	7,05	27348,5	8,65	M1	D239
PHD3-a013	H08	pFB-LIC-Bse	29660,9	7,05	27138,2	8,65	G4	D239
PHD3-a014	H09	pFB-CT10HF-LIC	30580,8	6,65	28127,3	7,75	M1	D239
PHD3-a015	H10	pFB-LIC-Bse	29908,1	6,75	27385,4	7,75	M1	D239
PHD3-a016	H11	pFB-LIC-Bse	29697,8	6,75	27175,1	7,75	G4	D239
PHD3-a017	H12	pFB-CT10HF-LIC	30617,7	6,45	28164,3	6,75	M1	D239