

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *PAH* EM PACIENTES COM
FENILCETONÚRIA E UMA ABORDAGEM ESTRUTURAL DA
ENZIMA FENILALANINA HIDROXILASE**

Juliana Casagrande Ceolato

Porto Alegre, março de 2011

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *PAH* EM PACIENTES COM
FENILCETONÚRIA E UMA ABORDAGEM ESTRUTURAL DA
ENZIMA FENILALANINA HIDROXILASE**

Juliana Casagrande Ceolato

Dissertação de Mestrado submetida
ao programa de Pós-graduação em
Biologia Celular e Molecular da
UFRGS como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Hugo Verli

Porto Alegre, março de 2011

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Identificação Genética do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Grupo de Bioinformática Estrutural do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE-HCPA) e do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) .

AGRADECIMENTOS

Ao pessoal do laboratório de Identificação Genética e ao grupo de Bioinformática estrutural pela receptividade, pela amizade e pelo conhecimento dividido.

Ao Rodrigo Braun em especial, pela paciência e dedicação.

À Marina Siebert e Vanessa Emmel por ter compartilhado todos os momentos, ruins e bons, dessa jornada durante conclusão do mestrado.

Aos meus pais, que sempre deram prioridade aos meus estudos. E que sempre me apoiaram incentivaram e me deram sempre muito amor.

À minha irmã que escolheu o mesmo caminho que eu e pôde compartilhar de perto as dificuldades deste trajeto, além de ser minha confidente e melhor amiga.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Hugo Verli pela oportunidade, pela dedicação e pela amizade na conclusão deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira, que acreditou em mim e soube me ouvir e me conhecer antes de me julgar, e por isso eu sou extremamente grata.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | vi |
| RESUMO..... | viii |
| ABSTRACT..... | ix |
| LISTA DE FIGURAS..... | x |
| LISTA DE TABELAS..... | xi |
| 1. Introdução | 01 |
| 1.1. Fenilcetonúria (PKU)..... | 01 |
| 1.1.1. Manifestações Clínicas..... | 02 |
| 1.1.2. Diagnóstico..... | 03 |
| 1.1.3. Tratamento da PKU..... | 05 |
| 1.1.4. Aspectos Bioquímicos..... | 05 |
| 1.2. Fenilalanina Hidroxilase (PAH)..... | 08 |
| 1.2.1. Tetrahydrobiopterina (BH ₄)..... | 11 |
| 1.2.2. Gene da PAH..... | 12 |
| 1.3 Análise conformacional de biomoléculas através da Dinâmica molecular (DM)..... | 14 |
| 2. Objetivos..... | 17 |
| 3. Resultados e Discussão..... | 18 |
| 3.1. Parte I - Análises <i>in vitro</i> | 18 |
| 3.1.1 Preâmbulo..... | 18 |
| <i>Mutational Spectrum of Phenylketonuria in South Brazil Population</i> | |
| 3.2. Parte II - Análises <i>in silico</i> | 39 |
| 3.2.1. Materiais e métodos..... | 40 |
| 3.2.2. Resultados | 44 |
| 3.2.3. Discussão | 55 |
| 3.3. Discussão Geral..... | 57 |
| 4. Conclusões..... | 61 |
| 5. Referências Bibliográficas..... | 63 |
| 6. Apêndices..... | 71 |
| <i>Curriculum Vitæ</i> | 76 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| ARS | <i>autoregulatory sequence</i> |
| BH ₄ | tetrahidrobiopterina |
| CG | <i>coarse-grained</i> |
| DHPR | dihidropteridina redutase |
| DM | dinâmica molecular |
| EC | <i>Enzyme Commission</i> |
| EDTA | <i>ethylene diamine tetracetic acid</i> |
| EIM | erros inatos do metabolismo |
| GTP | guanosina trifosfato |
| GTPCH | guanosina trifosfato ciclohidrolase I |
| H ₂ NTP | 7,8-dihidroneopterina trifosfato |
| HPA | hiperfenilalaninemia |
| kb | quilobase |
| L-Phe | L-fenilalanina (L-phenylalanine) |
| MM | mecânica molecular |
| NADH | adenina nicotinamida dinucleotídeo reduzido |
| NADPH | adenina nicotinamida dinucleotídeo fosfato reduzido |
| OMIM | <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> |
| PAH | fenilalanina hidroxilase (<i>phenylalanine hydroxylase</i>) |
| pb | pares de bases |
| PCD | pterina-4 α -carbinolamina desidratase |
| PDB | <i>Protein data bank</i> |
| PKU | fenilcetonúria (<i>phenylketonuria</i>) |
| PTP | 6-piruvil-5,6,7,8-tetrahidropterina |
| PTPS | 6-piruvil-tetrahidropterina sintase |
| QM | mecânica quântica |
| RFLP | <i>restriction fragment length polymorphism</i> |
| RMSD | <i>root mean square deviation</i> |
| RMSF | <i>root mean square fluctuation</i> |
| SNP | <i>single-nucleotide polymorphism</i> |

| | |
|---------------------------|--|
| SR | sepiapterina redutase |
| <i>Taq</i> DNA polimerase | DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i> |
| TH | tirosina hidroxilase (<i>tyrosine hydroxylase</i>) |

Nomenclatura da mutações

A nomenclatura das mutações utilizadas no presente estudo foi baseada nas recomendações da *Human Genome Variation Society* - HGVS (<http://www.hgvs.org>).

RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é o erro inato do metabolismo dos aminoácidos mais comum e caracteriza-se por elevadas concentrações de L-fenilalanina no sangue devido a deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH). A PAH é composta por monômeros divididos em três domínios: de regulação, catalítico e de tetramerização. Os objetivos do presente trabalho foram identificar as mutações no gene *PAH* responsáveis por PKU em pacientes do sul do Brasil e analisar o comportamento da PAH nas formas de monômero, dímero e tetrâmero. A amostra foi composta por 44 pacientes não aparentados. As mutações comuns foram analisadas por PCR em tempo real (sistema *TaqMan*®) e através de análise por RFLP. Os pacientes que, após a triagem para as mutações comuns, não tiveram seu alelo mutante definido, foram submetidos ao sequenciamento direto do gene *PAH*. Um modelo do monômero da PAH foi construído através do programa *Modeller 9v7* para as análises *in silico*. A montagem do dímero e do tetrâmero da enzima foi realizada no programa PyMOL 1.1 e a simulação de DM *coarse-grained* pelo pacote de programas GROMACS 4.0. A aplicação conjunta das técnicas para identificação de mutações no gene *PAH* permitiu a definição de 83 alelos mutantes (94,3%) do total de 88 alelos estudados e a identificação do genótipo de 40 (90,9%) dos 44 pacientes incluídos neste trabalho. Os resultados obtidos contribuem com o perfil de mutações na população do sul do Brasil e indicam que o mesmo é representado por poucas mutações frequentes e um número maior de mutações raras. O perfil da trajetória dos monômeros durante a simulação nas estruturas propostas é diferente, principalmente pelo comportamento das α -hélices envolvidas na oligomerização da proteína. A α -hélice no monômero sofre compactação ao núcleo da proteína. A α -hélice no dímero apresenta alta flexibilidade mostrando que apenas duas α -hélices coordenadas não parecem suficientes para imobilizar este sistema e torná-lo rígido e estável, o que é observado na simulação da estrutura tetramérica quando quatro α -hélices estão coordenadas. Assim, mutações que impeçam a oligomerização da proteína podem formar estruturas mais instáveis que, como observado no monômero livre, podem iniciar um processo de agregação e serem enviadas a degradação rápida ou, somente por não atingirem conformação adequada, sejam encaminhadas a esta rota. Ambos aspectos abordados nesse trabalho contribuem para o melhor conhecimento do metabolismo normal e das alterações hereditárias relacionadas a fenilalanina hidroxilase.

ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU), the most common inborn error of amino acids metabolism, is characterized by high levels of L-phenylalanine in blood due to deficiency of the enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH). The PAH consists of monomers divided into three domains: regulatory, catalytic, and tetramerization. The aims of this study were to identify mutations in the PAH gene responsible for PKU in patients from South Brazil and to analyze the behavior of PAH as monomer, dimer, and tetramer. The sample for *in vitro* analyzes was composed by 44 unrelated patients. Common mutations were analyzed by qualitative Real time PCR (TaqMan[®] system) and by RFLP analysis. Patients with undefined mutant alleles after the screening for common mutations were submitted to direct DNA sequencing of the PAH gene. For *in silico* analyses a model of the PAH monomer was built through Modeller 9v7 program. The assembly of PAH dimer and tetramer was performed by PyMOL 1.1 program and the simulation of MD coarse-grained by package GROMACS 4.0. The combined approach for identifying mutations in the PAH gene identified of 83 mutant alleles (94.3%) of a total of 88 alleles and genotypes were defined in 40 (90.9%) of the 44 patients included in this work. Results show mutation profile where few mutations were present in the majority of mutant alleles while the remaining ones were rare sequence alterations. Considering *in silico* analyses, monomers trajectory profile of the monomers during the simulation in the proposed structures was different mainly by the behavior of α -helices involved in protein oligomerization. The α -helix in the monomer undergoes compression toward the protein core. The dimer α -helix presents high flexibility showing that only two α -helices coordinated do not seem to be sufficient to immobilize this system and make it rigid and stable, which is observed in simulation of the tetrameric structure when four α -helices are coordinated. Thus, mutations that prevent protein oligomerization can form these unstable structures in a higher level and they may initiate an aggregation process and be rapidly degraded or be conducted to this route by failing to achieve proper conformation. Both aspects addressed in this work contribute for a wider knowledge of normal metabolism and inherited alterations related to phenylalanine hydroxylase.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Reação de hidroxilação da fenilalanina..... | 7 |
| Figura 2. Via alternativa de metabolização da fenilalanina | 8 |
| Figura 3. Representação da estrutura tridimensional do monômero da PAH..... | 9 |
| Figura 4. Estruturas tridimensionais dos tetrâmeros das hidroxilases PAH e TH..... | 10 |
| Figura 5. Representações esquemáticas das abordagens multiescala..... | 16 |
| Figura 6. Representação dos aminoácidos no sistema <i>coarse-grained</i> | 43 |
| Figura 7. Predição da estrutura secundária da PAH..... | 45 |
| Figura 8. Composição das estruturas cristalográficas selecionadas como moldes..... | 45 |
| Figura 9. Moldes e modelos da PAH..... | 46 |
| Figura 10. Análise de RMSD dos monômeros da PAH..... | 48 |
| Figura 11. Análises de Raio de Giro..... | 50 |
| Figura 12. Análise da flexibilidade dos monômeros da PAH..... | 52 |
| Figura 13. Análise de distância entre o centro de massa do núcleo da proteína (AA 1- 411) e o último átomo da α -hélice do domínio de oligomerização (Lys - 452)..... | 54 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Frequências dos tipos de mutações identificadas no gene <i>PAH</i> | 13 |
| Tabela 2. Descrição dos cristais obtidos na busca para seleção de moldes para construção do modelo..... | 44 |

1. Introdução

1.1. Fenilcetonúria

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças metabólicas geneticamente determinadas, que resultam da deficiência parcial ou total de uma ou mais proteínas, geralmente enzimas específicas. Esta deficiência pode levar ao bloqueio de diversas vias metabólicas e, conseqüentemente, ao acúmulo do substrato destas enzimas e/ou falta de seu produto. A fenilcetonúria (PKU; OMIM 261600) é uma das formas mais comuns de EIM, sendo o mais comum dos erros hereditários do metabolismo dos aminoácidos. Por ser um tipo de hiperfenilalaninemia (HPA), é caracterizada por elevadas concentrações de L-fenilalanina (L-Phe) e de metabólitos neurotóxicos nos fluidos corporais. O acúmulo da L-Phe e destes metabólitos culmina em danos mentais irreversíveis no desenvolvimento cognitivo de portadores de PKU não tratados (Scriver & Kaufman, 2001). Em 98% dos casos, o aumento da L-Phe sanguínea ocorre pelo bloqueio na conversão da L-Phe em tirosina devido a um defeito na enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) (Smith & Lee, 2000)

A PKU é uma doença de herança autossômica recessiva e sua prevalência varia conforme a população analisada, podendo ser considerada uma doença pan-étnica devido a sua variabilidade genética. A incidência mundial é estimada entre 1:10.000 a 1:20.000 nascimentos (Blau *et al.*, 2010), sendo mais frequente em caucasianos. A Irlanda apresenta a maior prevalência (1:4.500 nascidos vivos) (O'Neill *et al.*, 1994) e a menor prevalência é encontrada em Japoneses e na população Finlandesa, (aproximadamente 1:100.000 nascidos vivos) (Tada *et al.*, 1984; Guldberg *et al.*, 1995; Waisbren *et al.*, 2007). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a prevalência estimada é de 1:12.000 a 15.000 nascidos vivos (<http://portal.saude.gov.br/>). Em um estudo realizado em 2003 a prevalência encontrada no Brasil foi de 1:24.780 nascidos vivos (Carvalho, 2003). Entretanto, as estimativas de prevalência no Brasil são oriundas de dados estatísticos incompletos, já que a triagem não ocorre uniformemente em todos os estados (Souza *et al.*, 2002). Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, a prevalência obtida foi de 1:12.000 nascidos vivos (Jardim *et al.*, 1992).

As causas genéticas da HPA baseiam-se em mutações no gene da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), responsável pela conversão de L-Phe em tirosina, nos genes de duas enzimas envolvidas na síntese da tetrahydrobiopterina [(6R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterina], também conhecida como BH₄, o cofator para reação de hidroxilação catalisada pela PAH e, também, nos *loci* da 4 α -carbinolamina desidratase e da dihydrobiopteridina redutase, enzimas envolvidas na regeneração do BH₄. A maioria das mutações no gene da PAH (aproximadamente 98%) resulta em PKU clássica ou leve. Entretanto algumas alterações podem causar uma forma mais branda de HPA conhecida como HPA não-PKU, que está associada a um risco menor de retardo mental do que a PKU clássica (Scriver & Kaufman, 2001).

Existem diversos tipos de classificações para as HPAs, uma das formas baseia-se no nível sérico da L-Phe no momento do diagnóstico em vigência de uma dieta normal, e este dado também fornece uma estimativa da atividade enzimática residual. O fenótipo bioquímico é definido por níveis séricos de L-Phe, maiores que 20 mg/dL conferem o fenótipo de PKU clássica, entre 6 e 20 mg/dL conferem fenótipo de PKU leve e entre 2 e 6 mg/dL conferem fenótipo de HPA não-PKU (Mardsen & Levy, 2006). A condição HPA não-PKU é caracterizada por uma redução parcial da atividade enzimática, não trazendo prejuízos para o paciente e por isso não se faz necessário tratamento (Scriver & Kaufman, 2001).

Existe outra forma de PKU, não relacionada diretamente com a deficiência enzimática, mas sim causada por deficiências no metabolismo do cofator BH₄. Estas são chamadas de PKU atípicas e representam de 1 a 3% de todos os casos de PKU. Estes pacientes apresentam um pior prognóstico, pois seu quadro clínico é mais intenso, uma vez que este cofator é também necessário por outras enzimas que catalisam reações que precedem a síntese de neurotransmissores (serotonina e dopamina). Assim, nestes casos, somente o tratamento dietético não é funcional e precisa ser complementado de BH₄, 5-hidroxitriptofano, L-dopa e inibidor de dopa carboxilase, de forma a permitir a penetração da BH₄ no sistema nervoso central e a biossíntese dos neurotransmissores (Mira & Márquez, 2000; Scriver & Kaufman, 2001).

1.1.1. Manifestações Clínicas

A heterogeneidade alélica da PKU leva a formação de enzimas com diferentes atividades residuais, o que resultará em variações na concentração da L-Phe nos fluidos corporais. As diferentes mutações que acarretam no desenvolvimento da PKU levam a um quadro clínico heterogêneo, devido à gravidade das manifestações clínicas, pois a maior parte destas manifestações é constante.

O efeito destas mutações sobre o fenótipo pode ser dividido em três níveis: (1) efeito na integridade e função da enzima; (2) efeito na homeostase da L-Phe e na sua concentração nos fluidos corporais e (3) efeitos na função cerebral e no desenvolvimento cognitivo (Scriver & Kaufman, 2001).

A maioria dos pacientes com PKU apresenta deficiência na pigmentação (cabelos e pele claros), decorrente da inibição da hidroxilação da tirosina pela tirosinase, reação que é a primeira etapa para formação do pigmento melanina. A completa deficiência da tirosinase, neste caso, ocorre pelo excesso de L-Phe, que inibe competitivamente a hidroxilação de tirosina. Assim, pacientes com PKU apresentarão um fenótipo mais claro, em relação à pigmentação, que seus irmãos não afetados (Pascual *et al.*; 1989).

Os pacientes com PKU apresentam aumento na excreção dos metabólitos fenilactato, fenilacetato e fenilpiruvato na urina. O acúmulo da L-Phe, e destes ácidos orgânicos citados que são derivados de uma via de metabolização alternativa da própria L-Phe, no plasma dos pacientes, leva a graves consequências no sistema nervoso central (Alvarez *et al.*, 1992). Portanto, pacientes com PKU não tratados ou aqueles que abandonam o tratamento vão apresentar danos neurológicos, como atraso no desenvolvimento psicomotor, hiperatividade, tremor, microcefalia, falhas no crescimento e no desenvolvimento cognitivo (Greve *et al.*, 1994).

Estes danos neurológicos, que geram prejuízos na cognição, podem se apresentar de forma leve ou até evoluir para um quadro de retardo mental, sendo esta a manifestação clínica mais severa (Scriver & Kaufman, 2001).

1.1.2. Diagnóstico

O diagnóstico da PKU é realizado através da dosagem quantitativa da L-Phe sanguínea, obtida através de amostras de sangue colhidas em papel filtro. Para que o aumento da concentração de L-Phe seja detectado, é essencial que a criança tenha realizado

ingestão protéica. Portanto, o recomendado é que a coleta do sangue seja realizada entre o 3º e o 7º dia de vida. Mesmo crianças, que ainda não tiveram contato com leite materno por motivos de risco ou contaminação materna, devem ter material colhido, desde que estejam sob dieta parenteral (Scriver & Kauffman, 2001).

Os valores de referência para a população normal é de uma concentração de L-Phe igual ou menor a 2,5 mg/dL (Scriver & Kaufman, 2001). Após este primeiro resultado positivo, uma segunda análise deve ser realizada para confirmação do diagnóstico, considerando que alguns recém-nascidos podem apresentar um quadro chamado HPA transitória, que, como o próprio nome sugere, se manifesta por dias ou semanas, porém não se perpetua e não apresenta significado clínico. O diagnóstico da PKU é confirmado pela concentração elevada de L-Phe em, no mínimo, duas amostras distintas, apresentando concomitantemente níveis baixos de tirosina. Estes casos serão posteriormente classificados nas formas clássica, leve ou HPA não-PKU. Em um primeiro momento, por se tratar de uma hiperfenilalaninemia, deve-se avaliar uma possível deficiência do cofator BH₄, uma vez que o tratamento neste caso é diferenciado (Scriver & Kaufman, 2001).

O diagnóstico laboratorial ou bioquímico realizado através do sangue coletado pode ser realizado por diferentes metodologias. A dosagem da L-Phe sanguínea por ser medida através de fluorimetria, ensaio enzimático-colorimétrico ou espectrometria de massa (McCamam & Robins, 1962; Campbell *et al.*, 1992; Chace *et al.*, 1993).

A PKU é uma doença metabólica que necessita ser diagnosticada precocemente, pois ela se mostra assintomática ao nascimento da criança. Os seus sintomas só aparecerão após o acúmulo do metabólitos que ocorre ao curso da doença. Em um diagnóstico tardio, ou seja, casos que não foram identificados durante a triagem neonatal, as seguintes manifestações clínicas trazem a necessidade da busca por um diagnóstico de fenilcetonúria: atraso no desenvolvimento psicomotor, retardo mental, comportamento agressivo, agitado ou de padrão autista e quadro convulsivo sem etiologia conhecida (Scriver & Kaufman, 2001).

A PKU foi a primeira doença a ser triada no Brasil (Souza *et al.*, 2002) e vem sendo rastreada desde a década de 70. Entretanto, somente em 1990 foi criada a Lei Federal nº 8,069 do Estatuto da criança e do adolescente, a qual determina que hospitais e estabelecimentos da atenção a saúde realizem exames, com o objetivo de diagnosticar desordens relacionadas ao metabolismo de recém-nascidos. A criação e implantação do

programa nacional de triagem neonatal (PNTN) ocorreu em 2001 e, em outubro do mesmo ano, o Ministério da Saúde publicou a portaria 822, que fortaleceu o PNTN prevendo a obrigatoriedade da realização dos exames para diagnóstico de desordens relacionadas ao metabolismo de recém-nascidos. Atualmente, no sul do Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) realiza a triagem neonatal para diagnóstico das seguintes doenças: hiperfenilalaninemias, hipotireoidismo congênito e hemoglobinopatias, devido a maior prevalência das mesmas na população do sul do Brasil. A combinação das doenças triadas varia em cada estado e a triagem neonatal pode incluir ainda a fibrose cística (Souza *et al.*, 2002).

1.1.3. Tratamento da PKU

O tratamento de pacientes com PKU se baseia na redução dos níveis plasmáticos de L-Phe, tendo por finalidade evitar os efeitos neuropatológicos desta doença (Matalon *et al.*, 2001). A forma de reduzir as concentrações elevadas da L-Phe no sangue dos pacientes com PKU é através de dieta hipoprotéica pobre em L-Phe e suplementada com outros substitutos protéicos e tirosina (Santos *et al.*, 2006). Assim, o tratamento da PKU é um exemplo clássico onde um fenótipo normal, ou quase normal, é restaurado sem modificação do genótipo mutante (Scriver & Kaufman 2001).

O tratamento deve ser iniciado logo que se obtiver o diagnóstico da doença, de forma a manter os níveis normais de L-Phe entre 2 - 6 mg/dL, porém dependendo do fenótipo de paciente a concentração a ser mantida pode variar, atingindo valores de manutenção maiores que esta faixa. O tratamento iniciado no período neonatal irá modificar o fenótipo metabólico, prevenindo as consequências neurofisiológicas da HPA. A eficácia do tratamento baseia-se em três fatores. Ele deve ser iniciado logo após o diagnóstico; deve ser contínuo durante toda vida do paciente e, por fim, a restrição ao consumo de L-Phe, através da dieta hipoprotéica, deve fornecer a quantidade necessária de L-Phe para manter os valores normais ou próximos aos normais da mesma (Scriver & Kaufman, 2001). Uma vez que a restrição total ao aminoácido L-Phe afetaria o crescimento e o desenvolvimento do paciente (Scriver & Kaufman, 2001).

1.1.4. Aspectos Bioquímicos

A L-Phe é um aminoácido essencial e sua ingestão é necessária tanto para manter a homeostase da mesma como para a síntese protéica. Entretanto, somente uma porção da L-Phe ingerida é usada para este fim, considerando que grande parte da concentração ingerida é hidroxilada a tirosina e outra parte é convertida, em menor escala e só se a L-Phe estiver em excesso, a outros metabólitos (primeiramente a fenilpiruvato que é posteriormente convertido a fenilactato e fenilacetato) (Kaufman, 1976). A reação de hidroxilação da L-Phe ocorre principalmente no fígado, pois é nos hepatócitos que a PAH está ativa. Entretanto, já foi comprovado que esta conversão ocorre também nos rins (Lichter-Konecki *et al.*, 1999; Tessari *et al.*, 1999).

A conversão da L-Phe a tirosina requer oxigênio molecular e tetraidrobiopterina (BH_4). O cofator BH_4 vai ser oxidado a diidrobiopterina nesta reação e, em seguida, regenerado pela diidrobiopterina redutase, que utiliza NADH para realizar a redução. A regeneração do BH_4 é de fundamental importância, já que ele é sintetizado no organismo a partir da guanosina trifosfato (GTP), que existe em quantidades limitadas, assim o ciclo de redução e oxidação do BH_4 permite a contínua produção de tirosina a partir de L-Phe, dependendo somente da disponibilidade da mesma (Güttler, 1980; Scriver & Kaufman, 2001).

O cofator também é necessário em três outras reações catalisadas pelas enzimas tirosina hidroxilase, triptofano hidroxilase e óxido nítrico sintase. Estas enzimas catalisam a hidroxilação da tirosina e do triptofano a precursores dos neurotransmissores dopamina e serotonina, e a síntese do óxido nítrico, usando como substrato a L-arginina, respectivamente. A consequência disto é que pacientes com HPA por deficiência de BH_4 apresentam um quadro clínico mais severo do que aqueles com HPA por deficiência de PAH (Teigen *et al.*, 1999; Thöny *et al.*, 2000; Scriver & Kaufman, 2001; Zorzi *et al.*, 2002).

A enzima PAH, responsável pela conversão da L-Phe a tirosina, é uma oxidase de função mista, ou seja, na reação o oxigênio molecular vai doar um átomo para a molécula de água e outro para o substrato (L-Phe) formando assim a tirosina. A molécula de água é formada pelo átomo doado pelo oxigênio molecular e por dois hidrogênios oriundos da oxidação do cofator BH_4 (Figura 1). Esta é tanto a via de conversão da L-Phe a tirosina como o primeiro passo para a degradação da mesma. A tirosina recém sintetizada será

convertida a p-hidroxifenilpiruvato que sofrerá outras reações e, por fim, resultará na formação de fumarato e acetoacetato (Nelson & Cox, 2002; Smith *et al.*, 2007).

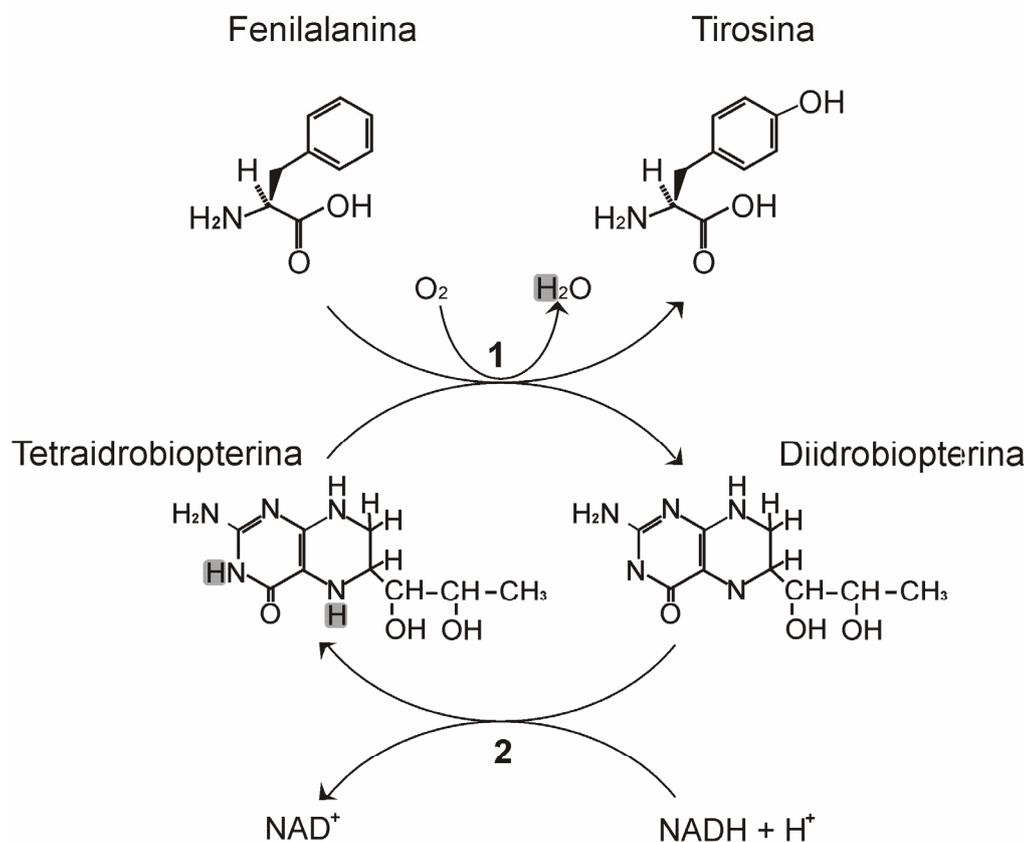


Figura 1. Reação de hidroxilação da fenilalanina. Hidroxilação da fenilalanina em tirosina e regeneração do cofator tetraidrobiopterina (BH₄). 1 – Reação catalisada pela enzima fenilalanina hidroxilase, 2 – reação catalisada pela enzima diidrobiopterina redutase.

Assim, quando a enzima PAH está defeituosa, a via metabólica secundária de conversão da L-Phe será ativada devido ao excesso da mesma. A via catabólica alternativa do excesso de L-Phe é a da transaminação a fenilpiruvato, seguida da descarboxilação deste metabólito, que origina fenilacetato, ou da redução, que leva à produção do fenilactato. O fenilacetato poderá, posteriormente, ser conjugado com a glutamina e produzir fenilacetilglutamina (Figura 2) (Nelson & Cox, 2002; Smith *et al.*, 2007).

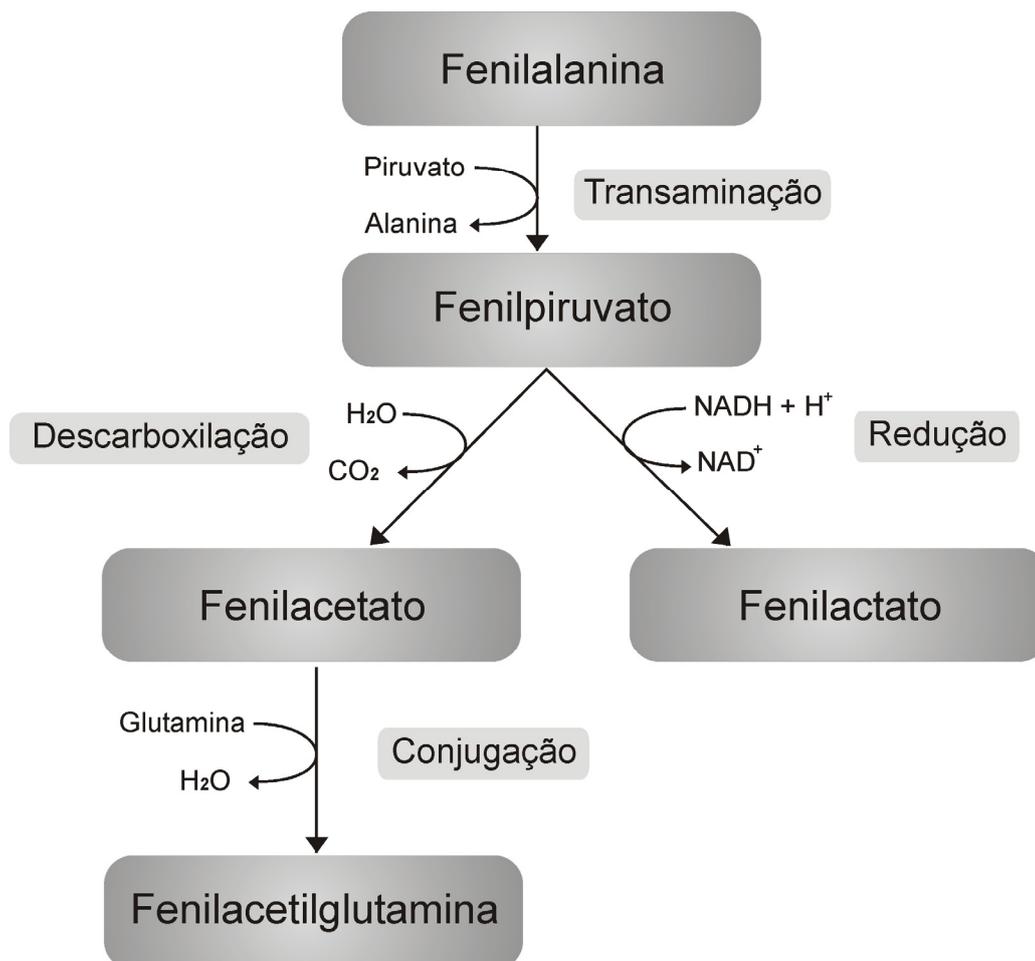


Figura 2. Via alternativa de metabolização da fenilalanina. Reação de transaminação da fenilalanina produzindo fenilpiruvato, que pode sofrer redução, gerando fenilactato, ou descarboxilação, produzindo fenilacetato, o qual pode ser conjugado com glutamina e formar fenilacetilglutamina.

1.2. Fenilalanina Hidroxilase (PAH)

A fenilalanina hidroxilase (PAH, *phenylalanine 4-monooxygenase*, [EC 1.14.16.1](#)) é uma enzima hepática dependente de ferro (não-heme), de tetrahydrobiopterina e oxigênio molecular, responsável pela hidroxilação da L-fenilalanina convertendo-a em L-tirosina. Esta reação é o passo limitante para a degradação oxidativa da fenilalanina (Champe & Harvey, 1994).

A PAH é composta por monômeros de 452 aminoácidos divididos em três domínios (Figura 3) (Erlandsen *et al.*, 2003). O domínio de regulação da atividade se estende do aminoácido 1 ao 142, a partir da porção N-terminal, e contém pequenas sequências

autoreguladoras (ARS) (resíduos 2-30) cobrindo parte da entrada ao sítio ativo (Kobe *et al.*, 1999). Essas sequências são responsáveis pela abertura do sítio catalítico e, também, pela restrição ao acesso do substrato (L-fenilalanina) e do cofator (BH_4) ao sítio ativo (Erlandsen *et al.*, 1997).

O domínio catalítico compreende a faixa do aminoácido 143 ao 410 e tem a forma de uma “cesta” do inglês ‘*basket-like*’. Este domínio ancora o ferro em seu centro, o qual está ligado a três resíduos (His - 285, His - 290 e Glu - 330) juntamente com três moléculas de água. A ativação catalítica baseia-se na redução deste ferro a Fe^{2+} pela ligação do cofator BH_4 , seguido pela ligação dos substratos O_2 e L-fenilalanina (Erlandsen *et al.*, 1997).

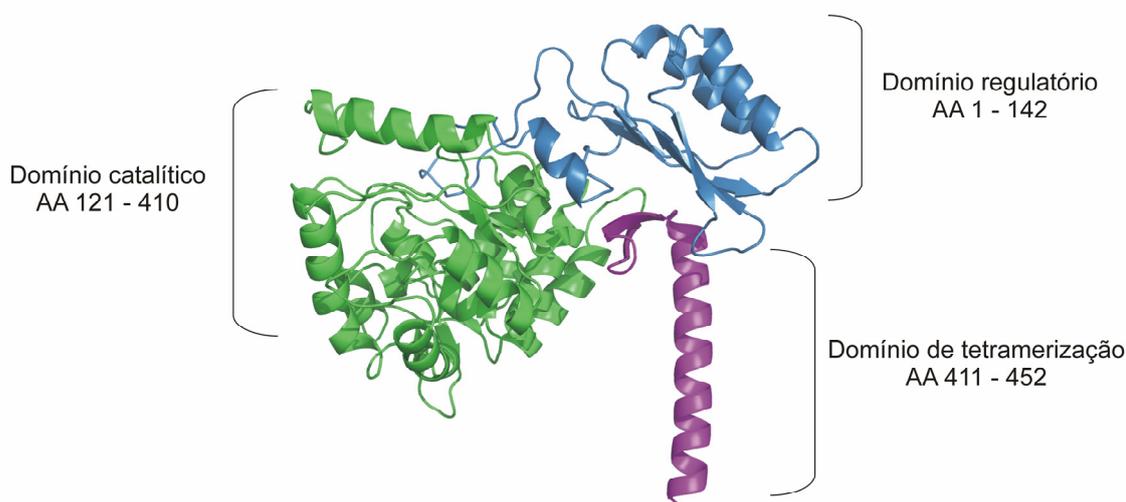


Figura 3. Representação da estrutura tridimensional do monômero da PAH. O domínio regulatório está representado em azul (aminoácidos 1 ao 142), o domínio catalítico em verde (aminoácidos 143 ao 410) e o de tetramerização em roxo (aminoácidos 411 ao 452). AA = aminoácido.

O domínio de tetramerização compreende os aminoácidos restantes e se caracteriza por um braço composto por duas fitas β e uma longa α -hélice que se estende do aminoácido 411 até o 452 na porção C-terminal. Esta longa α -hélice de 40 Å promove a oligomerização ao interagir com a α -hélice dos outros três monômeros através de um motivo em forma de cotovelo conhecido como “*coiled-coil*”, formando, assim, o tetrâmero intacto (Goodwill *et al.*, 1997; Erlandsen *et al.*, 1997).

A PAH ativa se organiza de forma tetramérica, apresentando quatro monômeros idênticos. A sua estrutura cristalográfica demonstra que os domínios, catalítico e de

tetramerização, podem assumir duas orientações diferentes, formando um tetrâmero semelhante ao da tirosina hidroxilase (TH; EC 1.14.16.2), porém possuindo uma assimetria inesperada em relação ao empacotamento das 4 subunidades (Figura 4) (Fusseti *et al.*, 1998).

A homeostase da fenilalanina é regulada principalmente pela atividade da enzima PAH. A PAH é ativada por fosforilação oxidativa e pela presença de L-fenilalanina e inibida pela presença de altas concentrações do seu cofator BH₄. No entanto estudos mostram que mesmo em altas concentrações de BH₄, elevados níveis de fenilalanina ativam a enzima (Okano *et al.*, 2007).

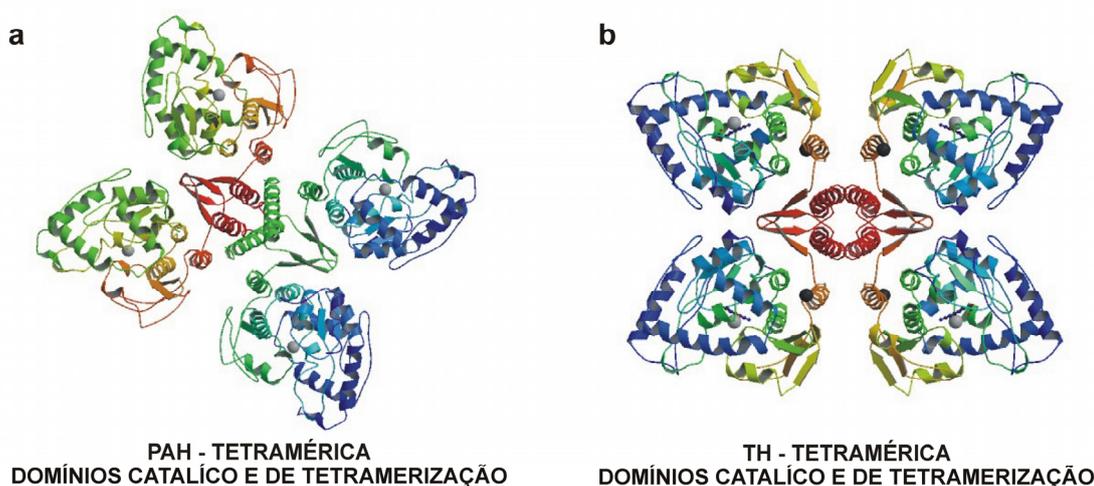


Figura 4. Estruturas tridimensionais dos tetrâmeros das hidroxilases PAH e TH. a) Tetrâmero da PAH (PDB ID 2PAH) b) Tetrâmero da TH (PDB ID 2TOH). Na ilustração, os monômeros que constituem os tetrâmeros (PAH e TH) estão constituídos apenas pelos domínios catalítico e de tetramerização.

Em condições de deficiência da enzima PAH, a via de hidroxilação da L-Phe a tirosina está bloqueada e uma via alternativa de metabolização da L-Phe é ativada. Esta rota consiste na transaminação da L-Phe a fenilpiruvato, seguida da descarboxilação do mesmo e conversão em fenilacetato sendo este reduzido a fenilactato. O fenilacetato pode ser conjugado a glutamina formando fenilacetilglutamina. O nome fenilcetonúria deriva do metabólito fenilpiruvato, o qual é excretado em grandes quantidades na urina de portadores desta doença, conferindo a urina odor característico a cheiro de ninho de rato (Longo *et al.*, 2002).

1.2.1. Tetrahidrobiopterina (BH₄)

O cofator BH₄ é essencial em vários processos e está presente, provavelmente, em todas as células ou tecidos de organismos superiores. Entre as enzimas que dependem do BH₄ temos a PAH, TH e triptofano hidroxilase. As duas últimas citadas sendo, posteriormente, enzimas limitantes para a síntese de catecolaminas e serotonina. A biossíntese do BH₄ ocorre através da via *de novo* em uma reação dependente de Mg²⁺, Zn²⁺ e NADPH, tendo com molécula de partida o GTP (Bracher *et al.*, 1998).

A biossíntese do BH₄ é catalisada por três enzimas, GTP ciclohidrolase I (GTPCH; EC 3.5.4.16), 6-piruvil-tetrahidropterina sintase (PTPS; EC 4.6.1.10) e sepiapterina redutase (SR; EC 1.1.1.153), culminando na produção de dois intermediários, 7,8-dihidroneopterina trifosfato (H₂NTP) e 6-piruvil-5,6,7,8-tetrahidropterina (PTP) (Thöny *et al.*, 2000).

O BH₄ também passa por processo de regeneração. Este processo é essencial para o sistema de hidroxilação da fenilalanina. A reação catalisada pelas hidroxilases de aminoácidos aromáticos inicia-se com a transferência de oxigênio molecular para o correspondente aminoácido seguido da oxidação do BH₄ a BH₄-4 α -carbinolamina. A regeneração a BH₄ ocorre através de uma desidratação realizada pela enzima pterina-4 α -carbinolamina desidratase (PCD; EC 4.2.1.96) e de uma subsequente redução catalisada pela dihidropteridina redutase (DHPR; EC 1.6.99.7) (Thöny *et al.*, 2000).

A reciclagem do BH₄ é essencial para o metabolismo da fenilalanina por dois motivos: (1) para um abastecimento contínuo de cofator na forma reduzida e (2) para prevenir o acúmulo prejudicial de metabólitos produzidos por rearranjos de BH₄-4 α -carbinolamina (Thöny *et al.*, 2000).

O BH₄ e a L-Phe são os mais importantes reguladores da enzima PAH. A L-Phe é um efetor alostérico positivo, ou seja, ativador, que converte a enzima inativa em seu estado ativo. O BH₄ é um efetor negativo em concentrações elevadas, competindo com ativação, causada pela Phe, para formar um complexo “*dead-end*” (BH₄-PAH). A formação deste complexo resultará em uma diminuição da concentração tanto da enzima livre quanto do cofator BH₄. Consequentemente, a L-Phe, por ser responsável pela ativação da PAH, controlará a disponibilidade metabólica do BH₄ e a quantidade de PAH ativa na célula (Thöny *et al.*, 2000)

Estudos mais recentes, através da análise molecular de alelos mutantes da PAH, mostram que o cofator BH₄ funciona também como uma chaperona, estabilizando a proteína mutada. Essa característica tornou este cofator uma alternativa terapêutica que se mostra responsiva para mutações específicas na enzima PAH (Erlandsen *et al.*; 2004).

1.2.2 Gene da PAH

O cDNA do gene da PAH foi isolado, sequenciado e expresso em sistema *in vitro* em 1985 (Kwok *et al.*, 1985, Ledley *et al.*, 1985).

O gene *PAH* se localiza no *locus* 12q22-q24.1 e se estende por aproximadamente 90 Kb (Scriver & Kaufman 2001). As sequências completas do cDNA e do gDNA do *PAH* estão disponíveis no *Phenylalanine Hydroxylase data bank* (PAHdb – www.pahdb.mcgill.ca). A sequência genômica da PAH e suas regiões flanqueadoras apresentam 171,266 pb. A região 5' UTR (“*untranslated region*”) apresenta aproximadamente 27 Kpb e a região 3' UTR a partir da região poli A do último exon (13) se estende por aproximadamente 64,5 Kpb. A região 5' não traduzida apresenta diversos elementos de controle *cis* (Konecki *et al.*, 1992). O cDNA é constituído por 2680 pb podendo ser acessado através do *GenBank* sob o código U49897 (phPAH247), e inclui o códon de iniciação da tradução (ATG) na posição 473 e o de terminação (TAA) na posição 1831, sendo traduzido em um mRNA de 2226 pb (Konecki *et al.*, 1992).

A sequência genômica da PAH é rica em marcadores polimórfico intragênicos, incluindo polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) e um grande número de repetições em *tandem* multi-alélicas. Essas características fornecem uma assinatura de vários haplótipos em associação particular à vasta gama de mutações causadoras da doença (Kwok *et al.*, 1985).

O gene *PAH* está dividido em 13 exons. A sequência genômica da PAH apresenta um conteúdo de nucleotídeos guanina (G) e citosina (C) de 40,7%, levemente acima do valor modal (37-38%) para um típico gene humano (Scriver, 2007).

Até o presente o momento mais de 500 mutações já foram descritas no gene *PAH*. Destas mutações, um pequeno número é bastante prevalente, enquanto, a grande maioria, é rara. Portanto, três quartos dos pacientes com PKU em populações miscigenadas são

heterozigotos compostos, implicando em uma mais complexa heterogeneidade fenotípica (Scriver & Kaufman, 2001; Scriver, 2007).

A maior parte das mutações no gene *PAH* são mutações do tipo *missense* (mutações de sentido trocado) (60,5%), que levam posteriormente à substituição de um aminoácido por outro na cadeia polipeptídica da proteína. Entretanto, diversos tipos de mutações já foram identificados no gene *PAH*, conforme pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Frequências dos tipos de mutações identificadas no gene *PAH*

| Tipo de Mutação | Frequência (%) |
|---------------------------------------|-----------------------|
| Mutações de sentido trocado | 60,46 |
| Deleções | 13,48 |
| Silenciosas | 10,99 |
| Mutações em sítios de <i>splicing</i> | 5,67 |
| Mutações sem sentido | 4,96 |
| Inserções | 1,77 |
| Não conhecidas | 0,71 |

<http://www.pahdb.mcgill.ca/> em 8 de fevereiro de 2011

Poucas destas mutações parecem ter um efeito primário na cinética enzimática; a maioria delas aparentemente tem um efeito secundário na função através de alterações na estabilidade e no enovelamento, e também na degradação intracelular da proteína (Scriver, 2007).

As mutações responsáveis por PKU podem ser classificadas de acordo com a localização do resíduo afetado pela mutação ou pelas características bioquímicas da enzima mutada. De acordo com o primeiro critério de classificação são propostas 5 categorias: (1) alterações no centro catalítico; (2) alterações estruturais; (3) alterações responsáveis pela interação entre os diferentes domínios no mesmo monômero; (4) alterações na região da sequência reguladora e, por fim, (5) alterações na interface de oligomerização dos dímeros ou dos tetrâmeros (Eisensmith & Woo, 1991). Quando levamos em conta a cinética e a estabilidade das proteínas mutantes, podemos delinear 3 categorias de mutações: (1) as que atingem as propriedades cinéticas e a estabilidade da enzima; (2) as que formam enzimas estruturalmente estáveis, mas cineticamente afetadas; (3) as que formam enzimas cineticamente normais, mas estruturalmente instáveis (Erlandsen & Stevens, 1999).

Assim, a PKU é considerada uma desordem estrutural, uma vez que grande parte das mutações irá afetar o enovelamento protéico, induzindo esta proteína a fenômenos de agregação e/ou degradação precoce (Leandro *et al.*, 2001).

1.3 Análise conformacional de biomoléculas através da dinâmica molecular (DM)

A dinâmica molecular (DM) é uma forma de simulação computacional que vem sendo amplamente empregada para o estudo de biomoléculas. Esta técnica tem como base o movimento dos átomos em uma molécula, sendo que tanto átomos e moléculas têm liberdade para interagir por um determinado período de tempo, sob conhecidas leis da física, proporcionando, assim, uma visão do movimento destes átomos. A DM vem sendo utilizada para o estudo de biomoléculas desde a década de 70, quando McCammon e colaboradores realizaram o trabalho intitulado “*Dynamics of folded proteins*” realizando uma análise sobre o “*folding*” e a cinética de proteínas utilizando como modelo o inibidor pancreático de tripsina bovina (McCammon *et al.*, 1977).

O fundamento da simulação de DM baseia-se no conhecimento da equação de movimento para o sistema estudado, ou seja, a solução destas equações de movimento vão fornecer uma trajetória, que descreve como as posições (e velocidades) dos átomos variam em função do tempo, referente ao sistema considerado (Leach, 2001). Esta técnica é possível pela integração da equação de movimento de Newton “ $d^2r_i(t)/dt^2 = F_i/m_i$ ”, onde “ $d^2r_i(t)/dt^2$ ” é a aceleração, “ m_i ” é a massa e “ F_i ” é a força sobre um determinado átomo “ i ”, ou seja, quando aplicada diversas vezes sobre todos os átomos presentes no sistema em estudo em um determinado tempo, resultará na trajetória anteriormente citada (Leach, 2001).

Esta equação nos permite calcular as diferenças de energia referentes a mudanças entre a conformação atual e a seguinte de um determinado átomo, uma vez que a integração baseia-se em uma força “ F_i ” causando uma aceleração sobre um átomo “ i ”, levando assim a uma mudança de posição relativa a esta aceleração. Por isso, as energias não tem significado em quantidades absolutas e somente quando comparadas entre o passo atual e o seguinte da simulação (Leach, 2001).

Associando a equação que representa a energia total do sistema em estudo com os parâmetros necessários usados para descrever o comportamento dos átomos e dos

diferentes tipos de ligação temos a definição de campo de força. Este também é conhecido por ser conjunto completo dos potenciais de interação entre as partículas (Brooks *et al.*, 1988, van Gunsteren & Berendsen, 1990). O campo de força empírico permite que a energia potencial total do sistema seja calculada a partir da estrutura tridimensional do sistema. A energia potencial total do sistema é a soma de várias energias, incluindo as energias para átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e as energias para átomos não ligados (interações de van der Waals e de Coulomb) (Leach, 2001).

Existem diversos campos de força disponíveis para realização de simulações e a escolha do mesmo vai depender do sistema a ser estudado e das propriedades que deverão ser analisadas no mesmo. Os campos de força mais utilizados para o estudo de biomoléculas são CHARMM (MacKerell *et al.*, 1998), GROMOS96 (van Gunsteren *et al.*, 1996), AMBER (Case *et al.*, 2005), OPLS (Jorgensen & Tirado-Rives, 1988), CVFF (Kitson & Hagler, 1988), entre outros.

Os estudos utilizando DM vem avançando com rapidez pelo mundo, ainda mais com o crescente desenvolvimento da tecnologia computacional permitindo o estudo de um número maior de moléculas e de estruturas mais complexas. Hoje, o que delimita alguns estudos é o tamanho do sistema a ser estudado e o tempo de simulação (por exemplo $\geq 1\mu\text{s}$) destes grandes sistemas, para que se possam observar fenômenos que expressem algum significado (Tozzini, 2010).

Uma das maneiras de contornar este problema é o uso do sistema *coarse-grained* (CG). Este sistema não representa explicitamente cada átomo, mas forma "pseudo-átomos" conhecidos como *beads* para representar grupos de átomos. A vantagem deste método está na possibilidade de simular sistemas muito grandes que exigiriam recursos computacionais de grande porte caso fossem estudados pelo método atomístico, além de permitir a simulação de processos em períodos longos (por exemplo $\geq 1\mu\text{s}$), que no sistema onde todos os átomos são incluídos seria extremamente caro, devido ao grande número de passos em relação ao tempo e número de átomos (Derreumau & Mousseau, 2007). Esta técnica também possibilita a observação de fenômenos que não são possíveis visualizar pelo método atomístico, como, por exemplo, a movimentação de domínios protéicos, porém, apresenta como ônus a perda do detalhamento atômico, que impossibilita a representação de outros fenômenos como o desenovelamento protéico (van Gunsteren *et*

al., 2006, Monticelli *et al.*, 2008). As diferenças entre os sistemas atômísticos e o CG estão ilustradas na figura 5.

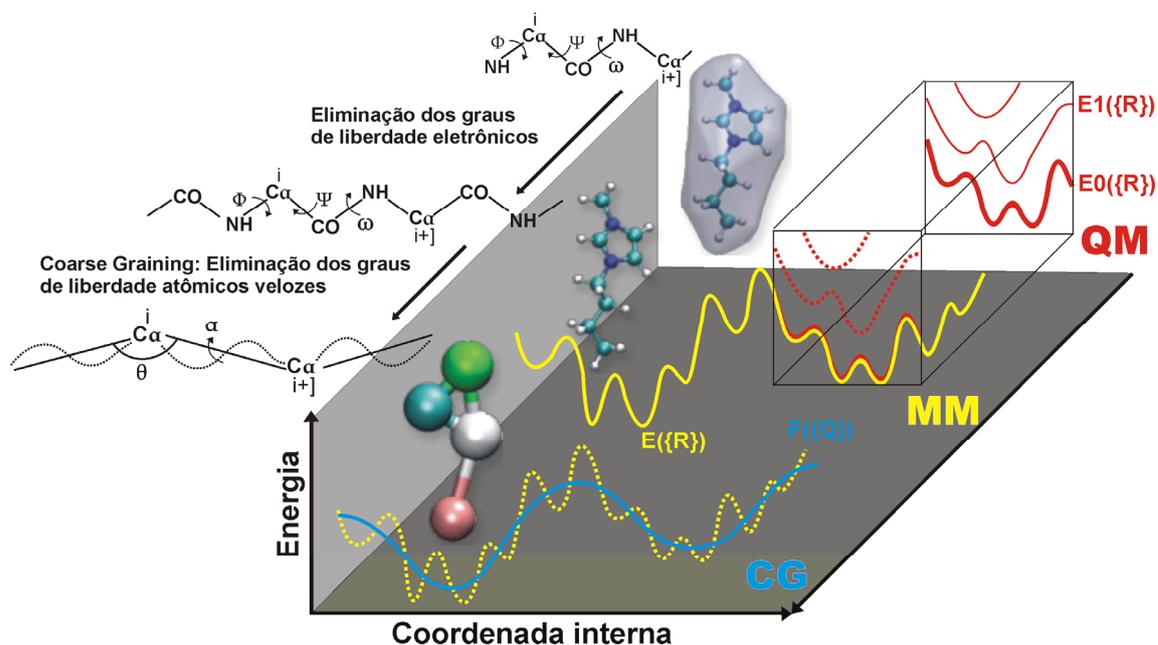


Figura 5. Representações esquemáticas das abordagens multiescala. Nos métodos de mecânica quântica (QM), em vermelho, as coordenadas atômicas $\{R\}$ e os orbitais eletrônicos do sistema são tratados explicitamente e a superfície de energia potencial (PES) é avaliada pelos parâmetros da mecânica quântica. Nos métodos de mecânica molecular (MM), em amarelo, os graus de liberdade internos são as coordenadas de todos os átomos $\{R\}$ e o PES de um estado eletrônico é uma aproximação obtida pelo uso de funções empíricas. E, por fim, no modelo *coarse-grained* (CG) em azul, os átomos são agrupados em sítios únicos de interação, cujas coordenadas são $\{Q\}$, e o PES é simplificado (azul). Adaptado de Tozzini, 2010. A molécula 1-n-butil-3-metilimidazolím está representada nos três níveis (QM, MM, CG) para ilustrar cada método (Bhargava *et al.*, 2008).

Por fim, para o sucesso da aplicação do sistema CG, se faz necessário o uso de um campo de força que seja capaz de descrever as propriedades físico-químicas do sistema de maneira adequada. O campo de força MARTINI tem destaque em simulações CG no caso de biomoléculas, pois possui aplicabilidade tanto para lipídeos quanto para proteína (Monticelli *et al.*, 2008) e para alguns carboidratos (Lopez *et al.*, 2009), permitindo reproduzir as características destes sistemas de forma mais adequada.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Identificar as mutações no gene *PAH* responsáveis pela PKU em pacientes brasileiros e analisar o comportamento da PAH nas formas de monômero, dímero e tetrâmero.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar as alterações de sequência (mutações ou polimorfismos) na região codificante do gene *PAH*;
- determinar a frequência das mutações encontradas na amostra em estudo e compará-las com dados da literatura;
- determinar o espectro de mutações de pacientes com PKU do sul do Brasil;
- comparar o comportamento da PAH na forma de monômero, dímero e tetrâmero através de dinâmica molecular *coarse-grained*;

3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos durante a realização desse trabalho foram divididos em duas partes: análises *in vitro* (parte I) e análises *in silico* (parte II).

3.1. Parte I - Análises *in vitro*

3.1.1. Preâmbulo

Os resultados das análises *in vitro* serão apresentados sob a forma de um manuscrito a ser submetido à publicação no periódico “*Journal of Inherited Metabolic Disease*”.

Mutational Spectrum of Phenylketonuria in South Brazil Population

Juliana C. Ceolato • Marina Siebert • Tamara Vaccaro • Roberto Giugliani • Maria Luiza Saraiva-Peireira.

J.C. Ceolato • M. Siebert • T. Vaccaro • R. Giugliani • M. L. Saraiva-Pereira
(corresponding author)

Laboratório de Identificação Genética (LIG), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350, 90035-903 Porto Alegre, Brazil
e-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

J.C. Ceolato • M. Siebert • T. Vaccaro • R. Giugliani • M. L. Saraiva-Pereira
Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

J.C. Ceolato • M. Siebert • M. L. Saraiva-Pereira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

R. Giugliani
Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

M. L. Saraiva-Pereira
Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Number of text words: 2688

Number of summary words: 223

Number of figures: 0

Number of tables: 4

Abstract

Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive disorder and the most frequent inborn error of the amino acid metabolism caused by phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency. Over 500 different mutations have been identified in the PAH gene to date. In order to obtain the mutational spectrum of PKU patients from South Brazil, mutation analysis was performed on genomic DNA from 44 unrelated PKU patients previously diagnosed through biochemical analysis. Common mutations in the PAH gene were screened through real-time PCR using the *TaqMan*[®] system and RFLP technique. Patients that did not have their genotype established were subjected to direct DNA sequencing of the PAH gene. The combined approach allowed the identification of 83 mutations (94.3%) in 88 alleles. The mutational spectrum was composed by 30 different mutations, including 25 missense mutations, 4 splice-site and 1 deletion. This analysis identified the genotype of 40 (90.9%) out of 44 PKU patients. The most frequent mutations identified were p.V388M (10.2%) and p.R408W (10.2%), p.R158Q (9.1%), p.I65T (5.7%), p.E390G (5.7%), IVS12+1G>A (5.7%), IVS2+5G>C (4.6%) p.R252W (4.6%) and p.R261Q (4.6%), that show a different profile of mutations when comparing to other regions of Brazil and Europe. The present data indicate that mutation profile of PKU patients from South Brazil is mainly represented by few highly frequent mutations, which is the pattern of PAH gene molecular alteration spectrum around the world.

Synopsis:

PAH mutation analysis in PKU patients from Southern Brazil.

Introduction

Phenylketonuria (PKU; OMIM 261600), an autosomal recessive disorder, is the most frequent inborn error of the amino acid metabolism due to phenylalanine-4-hydroxylase (PAH) deficiency (Scriver and Kaufman 2001). PAH is a liver-specific enzyme that catalyzes the first step of L-phenylalanine (L-phe) degradation and the reaction mechanism in this case includes molecular oxygen as substrate and tetrahydrobiopterin as cofactor (Kaufman 1993). Absence or reduced activity of the PAH leads L-phe accumulation in plasma and tissues that characterizes hyperphenylalaninemia (HPA). HPA can cause toxic effects on brain leading to mental retardation. Treatment of PKU patients consists of low-phenylalanine diet that should be initiated in the neonatal period in order to prevent impairment in the cognitive development (Scriver and Kaufman 2001).

PKU incidence varies strongly among populations. Its incidence in Caucasians was estimated to be 1:10,000 births (Scriver and Kaufman 2001). According to the ministry of health PKU incidence is approximately one every 15 to 20,000 births. In Brazil the incidence in subpopulations was estimated as 1:20,000 in Minas Gerais state (Serjeant 2000) and 1:12,000 in Rio Grande do Sul state (Jardim et al 1992). PAH gene maps to chromosome 12, region 12q22-q24.1, and is divided into 13 exons (Scherer et al 2006). To date more than 500 different mutations have been identified in the PAH gene (PAH Mutation Analysis Consortium database - <http://www.pahdb.mcgill.ca>). From those a small number is prevalent, while most are rarely found in mutant alleles.

Three quarters of the PKU phenotype in admixed populations are composed of compounds heterozygotes, implying a more complex phenotypic heterogeneity (Scriver

2007). This phenotypic variability is mainly explained by allelic heterogeneity, but other factors such as gene modifiers may contribute to the final phenotype (Dipple and McCabe 2000, Kayaalp et al 1997, Bénit et al 1999).

We have previously reported the following mutation distribution in a sample of 23 PKU patients from the South Brazilian states: p.I65T (19.5%), IVS2+5G>C (9.8%), p.R261Q (9.8%), p.R261X (9.8%), p.V388M (9.8%), p.R408W (9.8%) and IVS12+1G>A (4.9%) (Santana da Silva et al 2003). The aim of this present work was to obtain a more comprehensive spectrum of mutant alleles from PKU patients from South Brazil.

Material and methods

Sample

The sample consisted of forty-four unrelated patients previously diagnosed as having PKU in the Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The project was approved by our local ethic committee and blood sample was collected after signing an informed consent form.

Blood collection and DNA isolation

Blood samples (5 mL) were collected from each patient in EDTA, and DNA isolation was performed through salting-out technique (Miller et al 1988), and kept at -20 °C until analysis. DNA quantitation was accomplished using the fluorescence-based assay (Quant-It™ ds DNA BR Assay Kit – Invitrogen) in the Qubit™ fluorometer (Invitrogen).

PAH coding region amplification

The entire coding region of PAH and flanking intron region were amplified in thirteen fragments using primers designed as described previously (Santana da Silva et al 2003). PCR was carried out in a total volume of 25 µL containing 0.2 µM of each primer (forward and reverse), 100 ng genomic DNA, 1.25 U of *Taq* polimerase (Invitrogen), 200 µM of dNTP's, 1.5-3 mM of MgCl₂, 20 mM of Tris (pH 8,4) and 50mM of KCl. The PCR mixtures were subjected to incubation at 94 °C for 10 minutes in order to perform the initial denaturation, then fulfilled 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 seconds, annealing at 53-62 °C for 30 seconds and extension at 72 °C for 30 seconds, ultimately, followed by the final extension at 72 °C for 10 minutes. A 5 µL aliquot of the PCR products was analyzed by electrophoresis on 1.0% (w/v) agarose gel.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

In order to identify mutation p.V388M, PCR was performed in a total volume of 25 μ L containing 0.2 μ M of each primer (forward and reverse) for exon 11 region, 200 ng genomic DNA, 1.25 U of *Taq* polymerase (Invitrogen), 200 μ M of dNTP's, 1.5-3 mM of $MgCl_2$, 20 mM of Tris (pH 8,4) and 50mM of KCl. Amplification protocol was initial denaturation at 96 °C for 5 minutes, 30 cycles of denaturation at 96 °C for 30 seconds, annealing at 61 °C for 30 seconds and extension at 72 °C for 30 seconds, followed by final extension at 72 °C for 10 minutes. The PCR product is a fragment with 324 bp. A 10 μ L aliquot was digested using 10 U of restriction enzyme BsaAI (BioLabs[®]) and its respective buffer reaching a total reaction volume of 25 μ L, at 37 °C for 3 hours. Products were then analyzed through electrophoresis on 2.0% (w/v) agarose gel. The normal sequence presents the restriction site generating two fragments (188 bp and 136 bp) after digestion; p.V388M mutation destroys restriction site, generating only one fragment of 324 bp after digestion.

Real-time PCR

The regions of interest were amplified by real-time PCR using the *TaqMan*[®] (*Applied Biosystems*) system. The oligonucleotide primers specific for this regions and the allele-specific complementary probes were designed using *Primer Express*[®] *Software* (*Applied Biosystems*) (Table 1). The amplification was accomplished in a total volume of 8 μ L containing 2 ng of DNA, 0.2 μ L of SNP Genotyping Assay Mix[®] and 4.0 μ L of *TaqMan Universal PCR Master Mix*[®]. The conditions for amplification consisted of initial denaturing at 95 °C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 seconds and then

at 60 °C for 1 minute. Finally, allelic discrimination was performed at the end of amplification at 60 °C for 1 minute.

Direct DNA sequencing

Fragments of interest of the 13 exons and the respective flanking intron were amplified in 13 fragments as described before (Santana da Silva et al 2003) and a PCR product aliquot of 6 µL was purified using 2.5 U of Exonuclease I (USB) and 0.25 U of Shrimp Alkaline Phosphatase (USB). BigDye Terminator Cycle Sequencing kit version 3.1 (Applied Biosystems) was used to accomplish the direct sequencing following the manufacturer's instructions and the results were analyzed through DNA Sequencing Analysis Software version 5.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in the ABI 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Mutations identified were confirmed by sequencing an independent sample of DNA using forward and reverse primers. Mutations were named according to recommendations of Human Genome Variation Society (www.hgvs.org).

Results

PAH gene screening for common mutations

Identification of IVS2+5G>C, p.I65T, p.R261Q, p.R261X, p.V388M, p.R408W and IVS12+1G>A mutations enabled the characterization of 37 (42.4 %) of 88 mutant alleles. Most frequent mutations found were p.V388M (10.2%) and p.R408W (10.2%), both present in 9 different alleles, followed by p.I65T in 5 (5.7%), IVS12+1G>A in 5 (5.7%), IVS2+5G>C in 4 (4.6%) and p.R261Q in 4 (4.6%) mutant alleles (Table 2). p.R261X mutation was found in 1 (1.1%) allele only. This analysis allowed the identification of 7 (15.9%) genotypes within the group of 44 patients. Two patients were homozygous for p.V388M mutation and one patient was homozygous for p.R408W mutation. The remaining four genotypes were composed heterozygotes for 2 different common mutations (Table 3).

Identification of rare mutations

The remaining unidentified PKU alleles were analyzed by direct DNA sequencing. Identification of rare mutations allowed the identification of 46 (52.3%) out of 88 mutant alleles. Distribution of recurring mutations were p.R158Q (9.1%), p.E390G (5.7%), p.R252W (4.6%), p.R176X (3.4%), and p.D415N (3.4%). This analysis alone identified genotype of 11 (25.0%) out of 44 PKU patients studied. p.R158Q mutation was identified in one homozygous patient.

Mutations and genotypes distribution

The combined approach used allowed the identification of disease-causing mutations in 83 alleles reaching 94.3% of 88 mutant alleles analyzed. The mutational spectrum was

composed by 30 different mutations, including 25 missense mutations, 4 splice-site changes, and 1 deletion. Those mutations were distributed throughout PAH coding region except in exon 1, 4, and 13. The region corresponding to exon 7 showed the highest number of different mutations (eight types). On the other hand, exon 12 and flanking regions showed the highest number of mutations although represented by only five different ones. Mutations in exon 7, 11, and 12 accounts for 50% of PKU mutant alleles. Including exon 11 and exon 12 flanking regions this number rises to 57.9%. Most prevalent mutations were p.V388M (10.2%), p.R408W (10.2%), p.R158Q (9.1%), p.I65T (5.7%), p.E390G (5.7%), IVS12+1G>A (5.7%), IVS2+5G>C (4.6%) p.R252W (4.6%), and p.R261Q (4.6%) (Table 2). Fourteen additional mutations were identified only in 1 allele with a relative frequency of 1.1%. This analysis identified genotype of 40 (90.9%) of the 44 PKU patients studied and 36 patients are compound heterozygotes (Table 3). Genotypes p.V388M/p.V388M and p.R158Q/p.V388M were both found in 2 PKU patients.

Discussion

The population of South Brazil was composed by a mixture of three main groups: Europeans, Africans, and Amerindians. The immigration of Europeans began with Portuguese in the 16th century. In early 19th century other European immigrants came mainly from Spain, Italy, Germany, and Poland. Africans were brought as slaves until the 19th century and Amerindians were the local indigenous population. When compared to other regions in Brazil, South region received a small number of Africans and a larger and diversified group of Europeans, therefore the population of South Brazil is composed by a mixture of those different groups with strong European characteristics.

In the present study, 94.3% of the PKU alleles were established and 90.9% of the genotypes were defined. A total of 83 pathogenic alleles were identified in a group of 30 different mutations. Most prevalent mutations found were p.V388M, p.R408W, p.R158Q, p.I65T, p.E390G, IVS12+1G>A, IVS2+5G>C, p.R252W and p.R261Q accounting for 60.4% of the studied alleles (Table 3). Data from a previous study by our group showed that most frequent mutations were p.I65T, IVS2+5G>C, p.R261Q, p.R261X, p.V388M, p.R408W, IVS12+1G>A and P281L(Santana da Silva et al 2003). These data can be found in table 4.

Although some differences, frequencies were very similar, except for two mutations (p.I65T and IVS2+5G>C) that showed more significant differences in their frequencies. p.R158Q mutation was the third most common in this study, being identified in 8 alleles (9.1%). Frequency of this mutation was then different from Santana da Silva et al (2003). Another difference found was frequency of p.R261X mutation, that was identified in only one allele in this work and showed high frequency (9.8%) in the previously published data.

Differences in colonization of the regions of Brazil lead to variations in the mutations distribution and their respective frequencies in each subpopulation. When comparing the frequency of same mutations in this study with those found in other subpopulations this becomes evident (Table 4).

Most frequent mutations in our study were p.V388M and p.R408W. p.V388M mutation was also highly prevalent in subpopulations from São Paulo and Minas Gerais states, (9.1 and 21.2%; respectively). The high frequency of p.V388M mutation was expected considering that it is a common mutation in Portugal and Spain, the main settlers of Brazil, reaching 8.6 and 6.2% of frequency in these populations, respectively (Rivera et al 1998, Desviat et al 1999). Despite being high frequent in our sample, p.R408W mutation was very rare in subpopulation from Minas Gerais and São Paulo (0.6 and 3.5%; respectively). p.R408W mutation is highly prevalent in patients from Germany and Poland (Zschocke 2003). Since those two populations showed strong influence in more recent migration waves in South Brazil, they might account for the origin of p.R408W mutation in this population. Similar reasons can explain frequencies of p.R158Q (9.1%) and IVS12+1G>A (5.7%) described here. Again these mutations mutations are relatively common throughout patients from Germany, Poland and Northern Italy (Zschocke 2003).

p.E390G mutation was found with a relevant frequency in this study (5.7%), when compared to other Brazilian studies (Table 4). This mutation is well described in the Croatian population where it reach 9% (Zschocke 2003, Zschocke et al 2003). Different mutations as well as frequency variations among regions of Brazil denote the need of state-specific strategies for mutation-screening programs (Santos et al 2006).

Frequency of p.I65T and p.V388M mutations in Portuguese patients (5.4% and 8.6%, respectively) (Rivera et al 1998) is quite similar to the frequency found in the present work (5.7% and 10.2%, respectively). These two mutations are the third and forty most frequent in Spanish population with a respectively frequency of 6.7% and 6.2% (Desviat et al 1999). In the studies cited, it is possible to notice that a small group of mutations (IVS10nt-11G>A, p.R261Q, p.V388M, p.I65T, p.P281L, and p.R252W in Portugal; IVS10nt-11G>A, p.A403V, p.I65T, p.V388M, p.R261Q, and p.R243Q in Spain) is responsible for approximately 44% and 38%, respectively, of all mutations found, being the other mutations rare (Rivera et al 1998, Desviat et al 1999). This same pattern was found in the present study, in which p.I65T, p.R158Q, p.V388M, p.E390G, p.R408W, and IVS12+1G>A represent 46.6% of the total alleles analyzed. If we include three other mutations, IVS2+5G>C, p.R252W and p.R261Q, in this group that had a significant frequency in the present study it would reach 60.4%, which is very similar to the frequency of 68.5% previously obtained by our group with some different mutations in the top (I65T, R408W, R261X, IVS2nt5G>C, R261Q, and V388M) (Santana da Silva et al 2003).

p.R408W and IVS12+1G>A mutations were highly frequent in this data, 10.2 and 5.7% respectively. In several published works, p.R408W is shown to be the most common mutation in PKU patients from various regions of Germany, IVS12+1G>A, Y414C and IVS10-11G>A were also being relatively common in this population (Guldberg et al 1996, Hennermann et al 2000, Aulehla-Scholz and Heilbronner 2003). p.R408W and IVS12+1G>A mutations are also commonly observed in Polish patients as previously mentioned (Zschocke 2003). p.R158Q mutation was found for the first time in Brazil at a high frequency (9.1%) in this study. This mutation is well known to be relatively common throughout eastern Europe, mainly patients from Poland. p.R158Q mutation is also a

common mutation in the Netherlands and Belgium along with two other frequent mutations found in this work, IVS12+1G>A and p.R261Q. It is also highly frequent in northern Italy (Zschocke 2003).

Finally, p.R252W mutation was found in 4.7% alleles in the present study, similar to that reported in patients from Portugal (4.0%) (Rivera et al 1998), being also highly prevalent in Italian patients from the Piedmont region with a relative frequency of 15% (Zschocke 2003).

In the present work we were able to identify a total of 83 mutations in a group of 30 different mutations corresponding to 94.3% of alleles studied and determinate 40 genotypes of 44 PKU patients. The results of this study show a profile of mutations among the population of South Brazil, different of other regions of Brazil and Europe. This characteristic emphasizes the need of drawing a specific strategy for a mutation-screening program. The data indicate that the total mutations in patients with PKU from South Brazil is mainly represented by few mutations that are highly, which is the pattern of PAH gene molecular alteration spectrum around the world.

Acknowledgements

The authors are thankful to patients and their families for participate of this work, and to physicians of Medical Genetics Service. The work was supported by Brazilian Funding Agencies (CAPES, CNPq, FAPERGS and FIPE-HCPA).

References

- Acosta A, Silva Jr W, Carvalho T, Gomes M, Zago M (2001). Mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in Brazilian patients with phenylketonuria. *Hum Mutat* 17: 122-130.
- Aulehla-Scholz C, Heilbronner H (2003) Mutational spectrum in German patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 21(4): 399-400.
- Bénit P, Rey F, Blandin-Savoja F, Munnich A, Abadie V, Ray J (1999) The mutant genotype is the main determinant of the metabolic phenotype in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 68(1): 43-7.
- Desviat LR, Pérez B, Gámez A et al (1999) Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *Eur J Hum Genet* 7(3): 386-92.
- Dipple KM, McCabe ER (2000) Phenotypes of patients with “simple” Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics. *Am J Hum Genet* 66(6): 1729–1735.
- Guldberg P, Mallmann R, Henriksen KF, Guttler F (1996) Phenylalanine hydroxylase deficiency in a population in Germany: mutational profile and nine novel mutations. *Hum Mutat* 8(3): 276-9.
- Hennermann JB, Vetter B, Wolf C et al (2000) Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in eastern Germany: a characteristic molecular profile and 15 novel mutations. *Hum Mutat* 15(3): 254-60.
- Jardim LB, Silveira EL, Leite JC, Barth M, Giugliani R (1992) Resultados preliminares de um programa de detecção precoce para aminoacidopatias no Rio Grande do Sul. *J Pediatr (Rio J)* 68: 189-191.
- Kaufman S (1993) The phenylalanine hydroxylating system. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 67: 77-264.
- Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P, Scriver CR (1997) Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a meta-analysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 61(6): 1309-17.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16(3): 1215.
- Rivera I, Leandro P, Lichter-Konecki U, Tavares de Almeida I, Lechner MC (1998) Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. *J Med Genet* 35(4): 301-4.
- Santana da Silva LC, Carvalho TS, da Silva FB et al (2003) Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. *Mol Genet Metab* 79(1): 17-24.
- Santos LL, Magalhaes MC, Reis AO et al (2006) Frequencies of phenylalanine hydroxylase mutations I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt11, V388M,

- R408W, Y414C, and IVS12nt1 in Minas Gerais, Brazil. *Genet Mol Res* 5(1): 16-23.
- Santos LL, Castro-Magalhães M, Fonseca CG et al (2008) PKU in Minas Gerais State, Brazil: mutation analysis. *Ann Hum Genet* 72: 774–779.
- Scherer SE, Muzny DM, Buhay CJ et al (2006) The finished DNA sequence of human chromosome 12. *Nature* 440: 346–351.
- Scriver CR (2007) The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum Mutat* 28(9): 831-845.
- Scriver CR, Kaufman S (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill: New York 1667-1724.
- Serjeant GR (2000) Screening for sickle-cell disease in Brazil. *Lancet*. 356(9224): 168-9.
- Zschocke J (2003) Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat* 21(4): 345-56.
- Zschocke J, Preusse A, Sarnavka V et al (2003) The molecular basis of phenylalanine hydroxylase deficiency in Croatia. *Hum Mutat* 21(4): 399.

Tables

Table 1. Sequences of Primers and probes used in real-time PCR

| Mutation | Primer sequence (5' → 3') | Probe sequence (5' → 3') |
|----------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| IVS2+5G>C | Forward | Normal |
| | CATTGGCCAAAGTATTGCGCTTA | ATTGTAGCACTGACCTC |
| | Reverse | Mutant |
| | AGAACATGGAAGTTTGCTACGACAT | TTGTAGCAGTGACCTC |
| p.I65T | Forward | Normal |
| | CCTCCCCATTCTCTCTTAGGA | ACCCACATTGAATCT |
| | Reverse | Mutant |
| | CCAAATGGGTGAAAAATTCATACTCATCTT | CCCACACTGAATCT |
| p.R261Q | Forward | Normal |
| | TGCTTTCCTCTCGGGATTTCTTG | CCTTCCGAGTCTTC |
| | Reverse | Mutant |
| | GGATCCATGTCTGATGTA CTGTGT | CCTTCCA ACTCTTC |
| p.R261X | Forward | Normal |
| | TGCTTTCCTCTCGGGATTTCTTG | TGGCCTTCCGAGTCT |
| | Reverse | Mutant |
| | GGATCCAGTTCTGATGTA CTGTGT | CTGGCCTTCTGAGTCT |
| p.R408W | Forward | Normal |
| | TGGTTTTGGTCTTAGGAACTTTGCT | ACAATACCTCGGCCCTT |
| | Reverse | Mutant |
| | GTATGGGTCGTAGCGAACTGA | ACAATACCTTGGGCCCTT |
| IVS12+1G>A | Forward | Normal |
| | GGACAATACCCAGCAGCTTAAGATT | CTGATTCCATTAACAGTAAGTA |
| | Reverse | Mutant |
| | GAGTGGCCTCGTAAGGTGTAAT | TGATTCCATTAACAATAAGTA |

Table 2. Relative frequency of identified mutations

| Location | Mutation name | Relative frequency (%) |
|-----------------|----------------------|-------------------------------|
| Exon 2 | p.F39L | 1.14 |
| Exon 2 | p.F55L | 1.14 |
| Exon 2 | c.165delT | 2.27 |
| Intron2 | IVS2+5G>C | 4.55 |
| Exon 3 | p.I65T | 5.68 |
| Exon 3 | p.A104D | 1.14 |
| Intron 4 | IVS4+4A>G | 1.14 |
| Exon 5 | p.R158Q | 9.09 |
| Exon 6 | p.R176X | 3.41 |
| Exon 7 | p.T238N | 1.14 |
| Exon 7 | p.T238R | 1.14 |
| Exon 7 | p.R241H | 1.14 |
| Exon 7 | p.L249F | 2.27 |
| Exon 7 | p.R252W | 4.55 |
| Exon 7 | p.R261Q | 4.55 |
| Exon 7 | p.R261X | 1.14 |
| Exon 7 | p.E280K | 1.14 |
| Exon 8 | p.R297H | 1.14 |
| Exon 8 | p.A300S | 1.14 |
| Exon 9 | p.I306V | 1.14 |
| Exon 9 | p.L311P | 1.14 |
| Exon 10 | p.L348V | 2.27 |
| Intron10 | IVS10-11G>A | 2.27 |
| Exon 11 | p.V388M | 10.23 |
| Exon 11 | p.E390G | 5.68 |
| Exon 12 | p.R408Q | 1.14 |
| Exon 12 | p.R408W | 10.23 |
| Exon 12 | p.Y414C | 2.27 |
| Exon 12 | p.D415N | 3.41 |
| Intron 12 | IVS12+1G>A | 5.68 |

Table 3. Genotype distribution in this study

| Patient | Genotype | | Patient | Genotype | |
|---------|-----------|---------|---------|-------------|-------------|
| 1 | p.E390G | p.R408Q | 23 | p.R261Q | IVS12+1G>A |
| 2 | p.R158Q | p.T238N | 24 | c.165delT | p.R408W |
| 3 | p.V388M | p.V388M | 25 | p.R408W | p.R408W |
| 4 | p.T238R | p.I306V | 26 | p.I65T | p.R176X |
| 5 | p.R261Q | p.E390G | 27 | IVS4+4A>G | IVS12+G>A |
| 6 | p.R176X | p.D415N | 28 | p.L348V | IVS12+G>A |
| 7 | p.I65T | p.E390G | 29 | p.F55L | IVS2+5G>C |
| 8 | p.F39L | p.V388M | 30 | p.R158Q | p.R158Q |
| 9 | p.A104D | p.E390G | 31 | p.R158Q | p.R408W |
| 10 | p.R408W | p.D415N | 32 | p.R297H | p.R408W |
| 11 | p.L249F | p.R261Q | 33 | p.R158Q | IVS12+1G>A |
| 12 | p.R241H | p.R408W | 34 | IVS2+5G>C | IVS10-11G>A |
| 13 | IVS2+5G>C | p.V388M | 35 | p.R158Q | p.R252W |
| 14 | p.R176X | p.R261X | 36 | p.R252W | p.D415N |
| 15 | p.L348V | p.Y414C | 37 | p.I65T | p.R408W |
| 16 | p.L249F | p.V388M | 38 | p.R158Q | p.V388M |
| 17 | p.I65T | p.Y414C | 39 | IVS10-11G>A | p.E390G |
| 18 | p.R158Q | p.V388M | 40 | IVS2+5G>A | p.R408W |
| 19 | p.I65T | p.E280K | 41 | IVS12+1G>A | ? |
| 20 | p.A300S | p.L311P | 42 | c.165delT | ? |
| 21 | p.V388M | p.V388M | 43 | p.R252W | ? |
| 22 | p.R252W | p.R261Q | 44 | ? | ? |

? denotes unidentified mutation.

Table 4. Comparison between the relative frequencies of mutations identified in different regions of Brazil.

| Mutations | Relative Frequency (%) | | | |
|----------------------|------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| | RS ^a | RS and SC ^b | SP ^c | MG ^d |
| IVS2+5G>C | 4.6 | 9.8 | 3.5 | 5.8 |
| p.I65T | 5.7 | 19.5 | 3.5 | 5.8 |
| p.R158Q | 9.1 | 2.4 | 3.5 | 0.6 |
| p.R252W | 4.6 | - | 6.5 | 5.1 |
| p.R261Q | 4.6 | 9.8 | 12.2 | 16 |
| p.V388M | 10.2 | 9.8 | 9.1 | 21.2 |
| p.E390G | 5.7 | - | 0.8 | - |
| p.R408W | 10.2 | 9.8 | 3.5 | 0.6 |
| IVS12+1G>A | 5.7 | 4.9 | 1.3 | 0.6 |

^a Present study; ^b Santana da Silva et al 2003; ^c Acosta et al 2001; ^d Santos et al 2008
RS (Rio grande do Sul); SC (Santa Catarina); SP (São Paulo); MG (Minas Gerais).

3.2. Parte II - Análises *in silico*

Os resultados das análises *in silico* serão apresentados na forma de descrição dos dados experimentais, incluindo os matérias e métodos, resultados e discussão.

3.2.1. Materiais e métodos

3.2.1.1. Construção do Modelo Estrutural da PAH

As análises *in silico* foram realizadas através da construção de um modelo do monômero da PAH completo pelo programa Modeller 9v7, usando como molde estruturas cristalográficas da proteína PAH obtidas sob os códigos 1PHZ e 2PAH presentes no *Resource for Studying Biological Macromolecules – Protein Data Bank* (RCBS PDB).

Visando a reprodução da interface de oligomerização, um segundo modelo do monômero da PAH completo foi criado a partir dos mesmos cristais selecionados, mas usando como referência a cadeia B presente no cristal 2PAH. Todos os procedimentos de construção foram igualmente executados para este segundo modelo. As análises foram realizadas utilizando apenas o modelo criado a partir da cadeia A. Somente este modelo (cadeia A) foi submetido a simulação como monômero livre. De forma a evitar erros por comparar estruturas que apresentassem diferenças na região de oligomerização, não foram realizadas análises utilizando o modelo a partir da cadeia B, pois não tínhamos os dados do comportamento do monômero livre neste caso.

O alinhamento das sequências dos moldes selecionados foi realizado no programa ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) e a construção dos modelos foi alcançada através da utilização do programa Modeller 9v7 (Apêndices A1 e A2), apesar dos moldes apresentarem duas lacunas (1 ao 19; 136 ao 143) em sua estrutura o programa é capaz de prever regiões curtas a partir da sequência de aminoácidos (Eswar *et al.*, 2000; Marti-Renom *et al.*, 2000). Esta predição é considerada confiável para alças compostas por até 20 aminoácidos (Fiser *et al.*, 2000). Assim, realizamos a construção de 10 modelos do monômero da PAH completa para cada cadeia A e B.

Estes modelos passaram por uma inspeção visual e comparação com as estruturas dos cristais moldes. A qualidade estereoquímica foi avaliada principalmente pelo mapa de Ramachandran (Ramachandran *et al.*, 1963) gerado pelo Procheck (Laskowski *et al.*, 1993). Os modelos selecionados para o trabalho foram aqueles que apresentaram melhores valores nesta análise. O modelo da cadeia A apresentou 95,3% dos resíduos nas regiões mais favoráveis e 4,7% nas regiões adicionalmente favoráveis, enquanto que o modelo da

cadeia B apresentou 92,8% dos resíduos nas regiões mais favoráveis, 6,5% nas regiões adicionalmente favoráveis e 0,7% nas regiões generosamente favoráveis (Apêndice B).

3.2.1.2. Montagem do dímero e do tetrâmero da PAH

Após a obtenção do modelo do monômero, a montagem do dímero e do tetrâmero foi realizada pelo programa *Python-enhanced molecular graphics tool 1.1* (PyMOL 1.1). Para tanto, o ambiente cristalino da estrutura 2PAH foi reconstituída utilizando o *plugin* SYMEXP. Os modelos foram sobrepostos às formas diméricas e tetraméricas presentes no cristal. As organizações oligoméricas foram verificadas para que não houvesse qualquer tipo de impedimento estérico na região de oligomerização da PAH.

3.2.1.3. Visualização das estruturas tridimensionais

A visualização das moléculas utilizadas no presente estudo foi realizada através dos programas *Swiss-PdbViewer DeepView* (Spdbv), PyMol (DeLano, 2002) e VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

3.2.1.4. Simulação de dinâmica molecular coarse-grained

No total foram realizadas 3 simulações de DM tipo CG. Uma para cada forma de organização da PAH definida no presente trabalho (monômero, dímero e tetrâmero).

Os sistemas simulados foram:

- PAH monomérica, simulada por 1,05 μ s;
- PAH dimérica, simulada por 1,05 μ s;
- PAH tetramérica, simulada por 1,05 μ s;

Um dos primeiros passos para a realização da DM tipo CG é a conversão das estruturas atomísticas em estruturas CG. Este procedimento foi realizado por meio do *script* 'atom2cg', onde cada resíduo é substituído por seu equivalente no CG que é

composto por *beads* apresentando diferentes propriedades. O *bead* pode ser descrito como sendo, em média, a simplificação de 4 átomos em um valor único (Figura 6). Para gerar a topologia das proteínas para o CG, foram utilizadas a sequência da proteína do PDB e a estrutura secundária como arquivos de entrada para o *script* 'seq2itp.pl'. Todos os *scripts* utilizados para gerar os arquivos de topologia foram obtidos no *website* oficial do campo de força MARTINI (<http://md.chem.rug.nl/cgmartini/>).

O protocolo geral da simulação foi baseado em práticas anteriormente descritas (Monticelli *et al.*, 2008) e as simulações foram realizadas em temperatura de 300 K durante o período de 1,05 μ s. As proteínas, independentemente de sua organização, foram solvatadas em uma caixa triclínica, sendo utilizado o modelo de água descrito previamente (Marrink *et al.*, 2007). Com o objetivo de neutralizar as cargas dos sistemas estudados, quando necessário, houve a adição de contra-íons, neste caso o íon sódio. Ao que se segue, foi realizado o passo de minimização de energia baseada no algoritmo de *Steepest Descent*, seguida de um passo de integração de 10 fs (Apêndice C1). A metodologia MARTINI (Marrink *et al.*, 2007, Marrink *et al.*, 2008) foi empregada para realizar o cálculo das interações eletrostáticas. Por fim, os sistemas foram mantidos em temperatura e pressão constantes, utilizando a constante de acoplamento de $\tau_{\square} = 1,0$ ps (Monticelli *et al.*, 2008). As simulações CG foram realizadas utilizando o pacote de programas *Groningen machine for chemical simulations 4.0* (GROMACS 4.0) (Apêndice C2).

Tendo em vista a característica simplificada das estruturas para simulações do tipo CG, o ferro presente no sítio ativo da PAH foi desconsiderado.

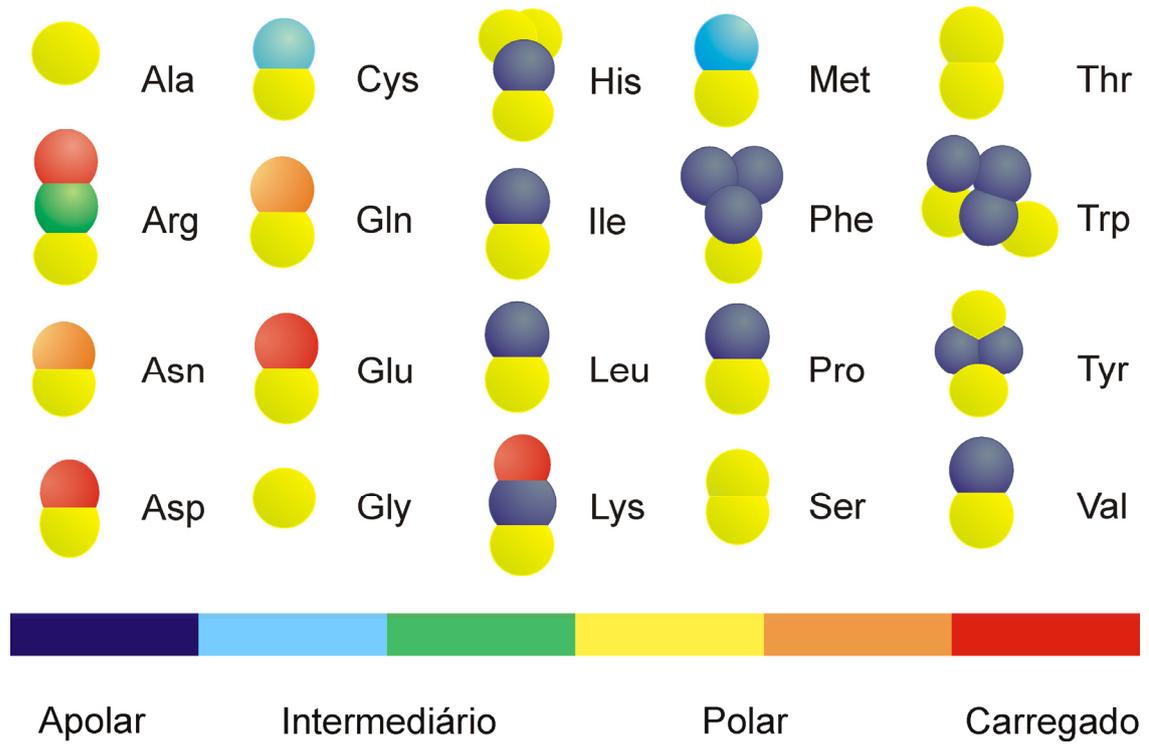


Figura 6. Representação dos aminoácidos no sistema *coarse-grained*. As cores diferentes representam classes diferentes de *bead* (Adaptado de Monticelli *et al.*, 2008).

3.2.2. Resultados

3.2.2.1. Construção do modelo da PAH completa

O primeiro passo para realização deste estudo foi a construção de um modelo completo da PAH. Isto foi necessário pelo fato que não encontramos nenhuma estrutura cristalográfica desta proteína no PDB que apresentasse a estrutura completa desta enzima (452 aminoácidos divididos em três domínios). Nesta busca, selecionamos duas estruturas cristalográficas (códigos 1PHZ e 2PAH). A seleção destes dois cristais deve-se ao fato de apresentarem regiões que se complementam para a construção do modelo completo do monômero, ou seja, o 1PHZ apresenta o domínio de regulação e o 2PAH apresenta o domínio de oligomerização, além de possuir esta interface de oligomerização. O cristal 2PHM também apresenta a mesma região que o 1PHZ, porém em menor resolução (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição dos cristais obtidos na busca para seleção de moldes para construção do modelo.

| Cristais obtidos no PDB | Descrição | Resolução (Å) |
|-------------------------|-------------------------------------|---------------|
| 1KWO | 1 cadeia A: resíduos 103 - 427 | 2,50 |
| 1LRM | 1 cadeia A: resíduos 103 - 427 | 2,10 |
| 1MMK | 1 cadeia A: resíduos 103 - 427 | 2,00 |
| 1PHZ | 1 cadeia A: resíduos 19 - 427 | 2,20 |
| 2PAH | 2 cadeias A e B: resíduos 119 - 452 | 3,10 |
| 2PHM | 1 cadeia A: resíduos 19 - 427 | 2,60 |

O cristal obtido sob o código 1PHZ estende-se do aminoácido 19 ao 427, enquanto o cristal obtido sob o código 2PAH estende-se do aminoácido 118 ao 452 (Cadeia A e B). Ambas estruturas apresentam uma lacuna entre os aminoácidos 136 ao 143, porém esta está presente em outros cristais depositados no PDB. Esta região da proteína é formada por uma alça flexível e pode não ser capaz de organizar-se em uma estrutura cristalina. Provavelmente isto ocorreu no caso dos cristais selecionados para o trabalho. Os primeiros 19 aminoácidos da proteína não estão presentes nos cristais depositados no PDB e, através da predição do conteúdo de estrutura secundária da proteína, foi possível identificar o caráter menos ordenado (alças) na estrutura secundária dessa região (Figura 7).

respeitando seus critérios para refinamento de alças curtas sem estrutura tridimensional de referência. O resultado pode ser observado na figura 9, onde, além do modelo do monômero criado, estão o dímero e o tetrâmero construídos com base neste mesmo monômero.

A validação do modelo ocorreu por uma inspeção visual e comparação com as estruturas dos cristais moldes através da sobreposição do modelo com estas estruturas, além de sua submissão à análise no programa PROCHECK, que realiza uma avaliação estereoquímica das estruturas.

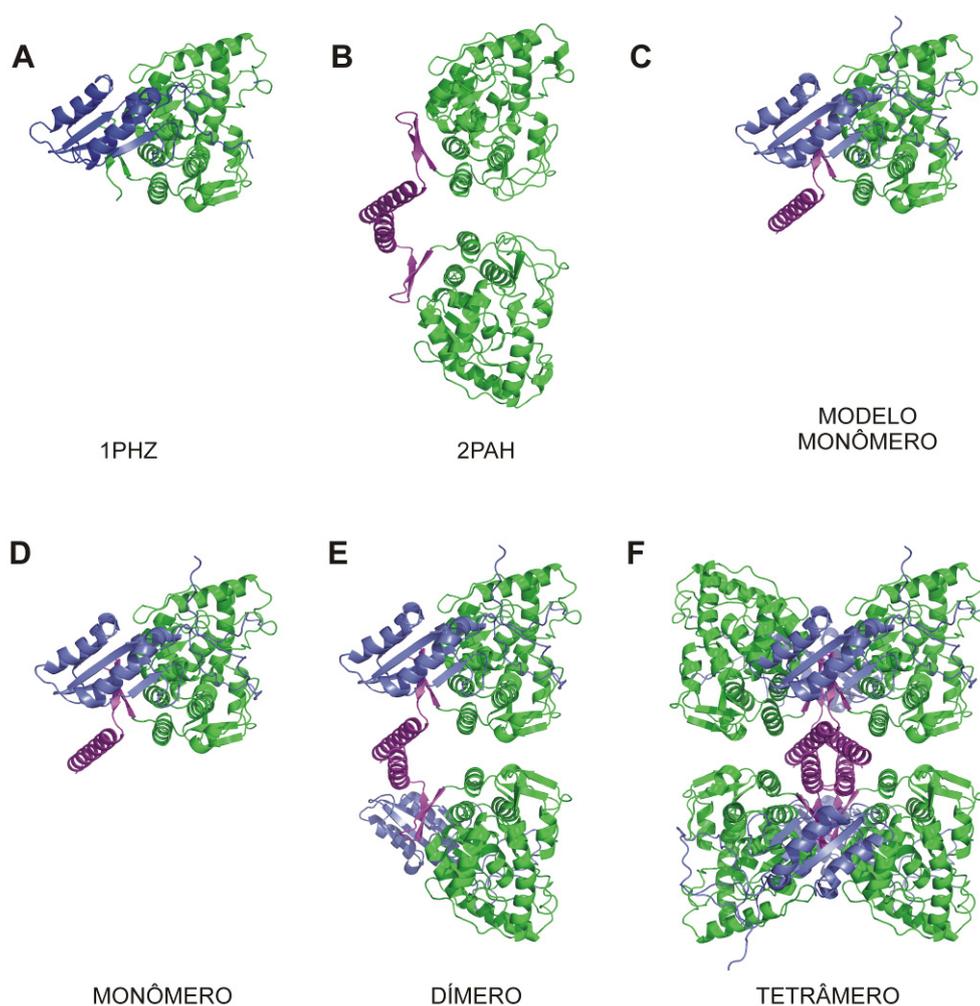


Figura 9. Moldes e modelos da PAH. a) Cristal 1PHZ utilizado como molde; b) cristal 2PAH utilizado como molde; c) e d) modelo obtido a partir dos moldes, os quais foram utilizados nas simulações; e) modelo de dímero da PAH; f) modelo de tetrâmero da PAH. O domínio de regulação está em azul, o domínio catalítico em verde e o domínio de oligomerização em roxo.

3.2.2.2. Caracterização da dinâmica da PAH em solução aquosa

A etapa seguinte à validação das estruturas construídas foi o emprego dos modelos estruturais do monômero, do dímero e do tetrâmero como estruturas de partida para estudos de DM tipo CG. Para essas simulações, empregamos o pacote GROMACS 4.0 com o campo de força MARTINI (Marrink *et al.*, 2007, Marrink *et al.*, 2008).

Os sistemas simulados foram:

- PAH monomérica, simulada por 1,05 μ s;
- PAH dimérica, simulada por 1,05 μ s;
- PAH tetramérica, simulada por 1,05 μ s;

As três simulações foram realizadas sob condições constantes de temperatura e pressão. Os dados obtidos foram avaliados através da visualização do comportamento das estruturas durante a trajetória da simulação, e pelas análises de raio de giro, de flutuação média quadrática (*root mean square fluctuations* ou RMSF), desvio médio quadrático (*root mean square deviation* ou RMSD) e análises de distância.

A escolha de realizar análises de DM deve-se a busca por respostas quanto ao comportamento e a estabilidade dos domínios da PAH, de forma a acrescentar informações sobre a estrutura destes agregados que são inacessíveis quando estudamos a proteína de forma estática. A PAH é uma proteína grande sendo composta de 452 aminoácidos e, por conseguinte, os sistemas diméricos e tetraméricos são compostos por 904 e 1808 aminoácidos, respectivamente. Devido ao tamanho dos sistemas a serem simulados, o método de DM conhecido como CG foi escolhido pois realiza uma simplificação da forma atomística, não representando cada átomo explicitamente e, sim, criando *beads* para representar grupos de átomos. O método CG também proporcionou a realização de simulações por períodos longos (e.g. $\geq 1\mu$ s).

3.2.2.3. Comportamento da PAH em solução aquosa durante a DM-CG

Inicialmente, a estabilidade dos sistemas foi evidenciada empregando análises de RMSD. Ao indicar o quanto a estrutura protéica muda, com o tempo de simulação, em relação aos dados cristalográficos, esta análise pode sugerir tanto o ganho de flexibilidade na proteína quanto a ocorrência de mudanças conformacionais. Desta forma, todos os sistemas simulados apresentaram estabilidade conformacional a partir de $\sim 0,4\mu\text{s}$ (Figura 10).

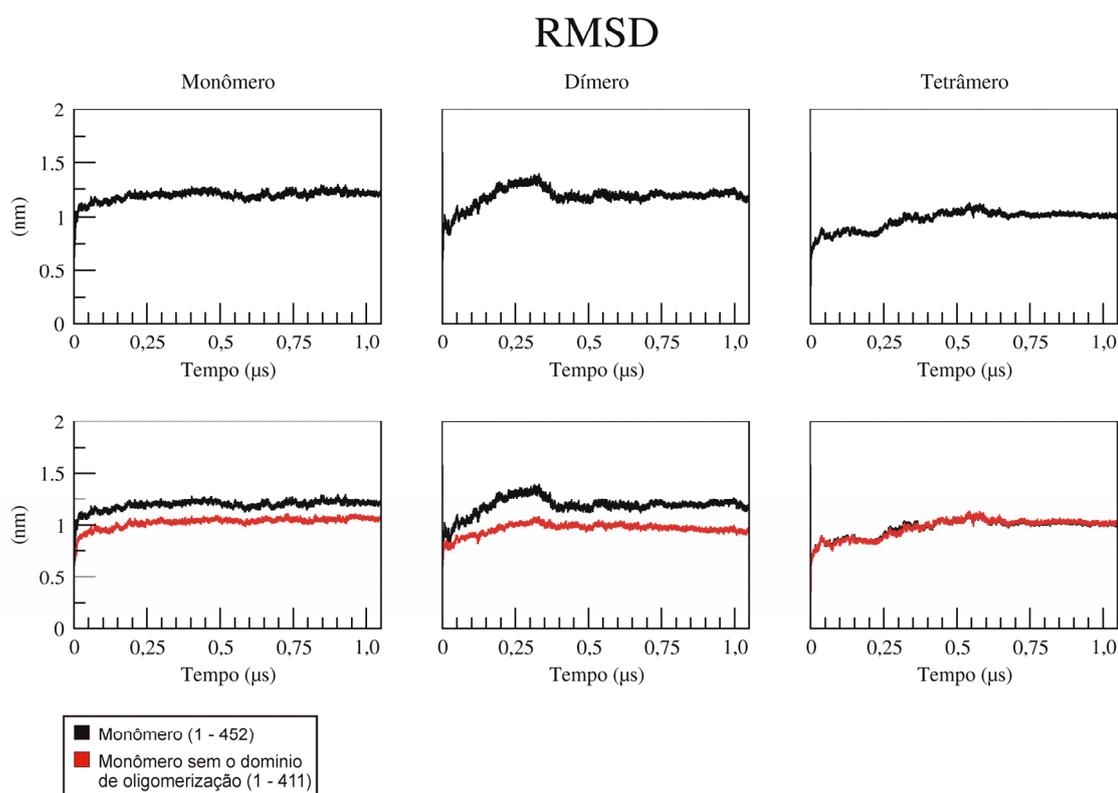


Figura 10. Análise de RMSD dos monômeros da PAH. A análise foi realizada com os monômeros nas formas monomérica, dimérica e tetramérica em função do tempo (1,05 μs) da DM-CG. As análises foram realizadas na presença da região de oligomerização (resíduo 1 ao 452) (em preto) e na ausência desta região (resíduo 1 ao 410) (em vermelho).

Após observar o comportamento dos monômeros em diferentes organizações em relação a estrutura inicial submetida a simulação, decidimos realizar uma análise para investigar a forma pela qual o domínio de oligomerização estaria influenciando na estabilidade dos sistemas. Para isso, realizamos a mesma análise (RMSD), porém excluindo a região de oligomerização da proteína (região 1 - 411) (Figura 10). O resultado obtido através desta análise mostra um perfil diferente para o comportamento do domínio

de oligomerização dos monômeros em organização monomérica e dimérica em relação à tetramérica. Podemos observar que os monômeros em sua forma livre e na organização dimérica apresentaram diferença em relação à análise realizada na presença e na ausência do domínio de oligomerização. Isto é um forte indicativo de que esta região, no caso destes dois sistemas, não está estabilizada e, por isso, apresenta um perfil de RMSD diferente em relação a análise do monômero sem esta região. Este comportamento é evidenciado pelo maior valor da curva em que a estrutura completa de ambos os sistemas (monômeros em sua forma livre e na organização dimérica) apresentam em relação a curva da análise sem o domínio de oligomerização.

Diferentemente, o comportamento observado no monômero em organização tetramérica apresentou o mesmo perfil na presença e na ausência do domínio de oligomerização. Este comportamento é compatível com esta região não levando a alterações conformacionais na proteína, mantendo-se, portanto, semelhante a estrutura inicialmente submetida a simulação, indicando estabilidade.

A partir da evidência, tanto de dinâmica diferenciada para os monômeros da PAH em diferentes sistemas quanto de interferência da oligomerização nesta dinâmica, análises de raio de giro foram empregadas para caracterizar o grau de compactação dos diferentes sistemas simulados (Figura 11). Observa-se uma maior compactação para a forma monomérica em relação aos estados oligomerizados, indicando a interferência das formas agregadas da proteína em sua estabilidade conformacional. Este comportamento do monômero pode ser melhor explicado ao analisarmos a trajetória da simulação, quando podemos constatar que a longa α -hélice responsável pela oligomerização se direciona ao núcleo da proteína, não permanecendo em sua forma livre como observamos na figura 9. Este movimento da α -hélice causa uma compactação da proteína durante a simulação, o que é retratado no gráfico de raio de giro. Ao realizar a análise do raio de giro dos domínios do monômero da PAH separadamente, nos três sistemas de organização, observamos que, em todos eles, o domínio catalítico se mantém estável e não apresenta alterações durante a trajetória, independente da forma de organização em que o monômero se encontra.

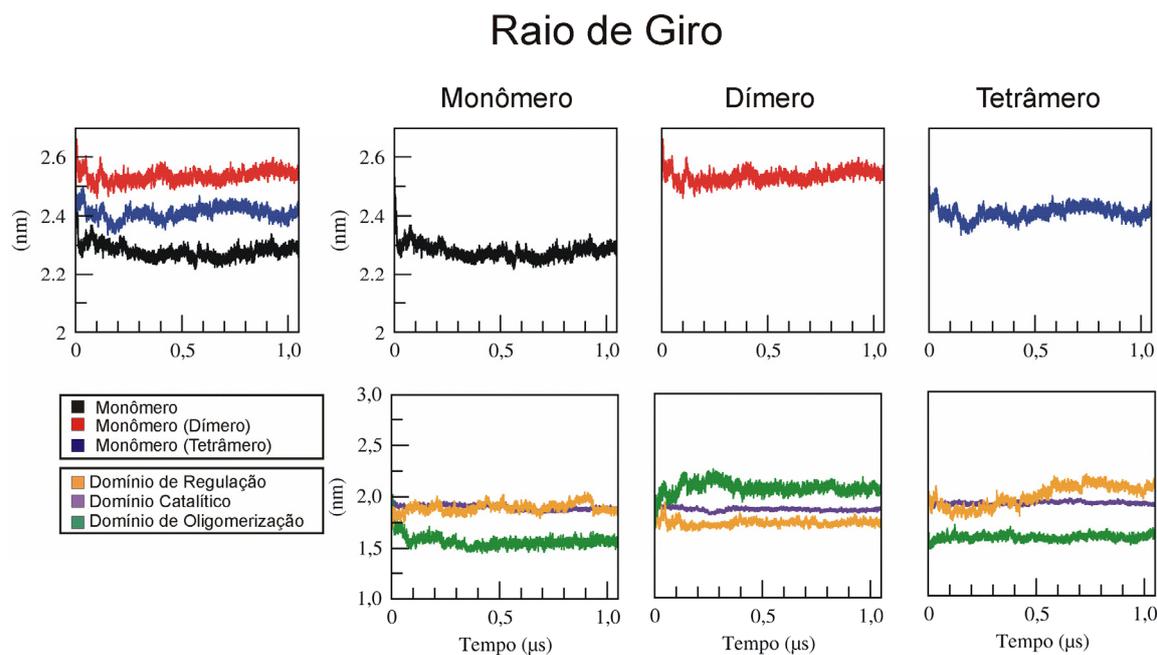


Figura 11. Análises de Raio de Giro. Raio de Giro dos monômeros da PAH em formação monomérica, dimérica e tetramérica em função do tempo (1,05 μ s) da DM-CG. Análise de cada domínio dos sistemas separadamente.

Os perfis de raio de giro semelhantes dos domínios da PAH em organização monomérica e tetramérica ficam evidentes. Porém, como mencionado anteriormente, o monômero livre apresenta uma compactação quando observamos a análise global da proteína, o que não ocorre com o monômero do tetrâmero. Entretanto, ao analisarmos os domínios separadamente, podemos evidenciar que estes domínios estão semelhantes. Mas, de maneira geral, o domínio de oligomerização do monômero livre na proteína está se direcionando ao núcleo, mantendo sua conformação. A diferença geral entre este dois sistemas é visualizada no início da simulação, onde o domínio de oligomerização do monômero livre parece sofrer um “estiramento” inicial seguido de uma compactação, ao contrário deste domínio no monômero em organização tetramérica, que permanece estável durante toda trajetória. As variações no raio de giro global do monômero em organização tetramérica são causadas pela flutuações apresentadas pelo domínio de regulação neste sistema.

O comportamento do domínio de oligomerização do monômero em organização dimérica foi diferente do perfil observado nos outros sistemas, uma vez que, pela análise realizada, um aumento do raio de giro do mesmo estaria ocorrendo. Este fenômeno estaria influenciando o raio de giro global do monômero nesta organização que apresentou um

leve aumento no início da trajetória com algumas flutuações até aproximadamente 0,5 μ s, e estabilizando após este tempo até o final da trajetória, em um raio de giro próximo ao inicial (2,5 nm).

Embora as análises de RMSD e raio de giro permitam obter informações sobre a dinâmica da PAH e de seus diferentes domínios, elas não oferecem informações quanto à flexibilidade dos resíduos de aminoácidos da proteína. Uma ferramenta adicional que permite obter tais informações é o RMSF.

Os dados obtido pela análise de RMSD mostraram que os monômeros em organização monomérica e dimérica apresentam um distanciamento maior da estrutura inicial submetida a simulação na presença do domínio de oligomerização. Por outro lado, o monômero em organização tetramérica não apresentou diferença na presença ou ausência deste domínio. Este resultado, reforçado pela compactação do monômero observada através da análise de raio de giro, nos levou ao uso da análise de RMSF para avaliar a flexibilidade desta região e dos outros domínios da proteína, visando a compreensão do comportamento do monômero em forma dimérica e a confirmação da “imobilização” deste domínio nos monômeros em organização monomérica e tetramérica.

O gráfico de RMSF mostra a flexibilidade dos resíduos da proteína durante a trajetória. Em uma análise global podemos observar que todos os monômeros em diferentes estados de organização apresentam regiões com flexibilidade proeminente parecidas. Podemos destacar o domínio de regulação (1 ao 142) que é bastante flexível em praticamente sua totalidade, apresentando uma região mais rígida entre os aminoácidos 120 e 135, a região que faz a conexão entre o domínio de regulação e o catalítico (135 e 160) e duas regiões no domínio catalítico (250 ao 300 e 340 ao 380) (Figura 12). Por outro lado, a flexibilidade da região responsável pela oligomerização (resíduos 411 a 452) é menor no monômero livre do que nos monômeros em organização dimérica e tetramérica. Este perfil está de acordo com a compactação observada durante a trajetória do monômero livre durante a simulação e com a diminuição do raio de giro do mesmo, uma vez que este domínio ao se posicionar em direção ao núcleo da proteína, perde a flexibilidade de movimento.

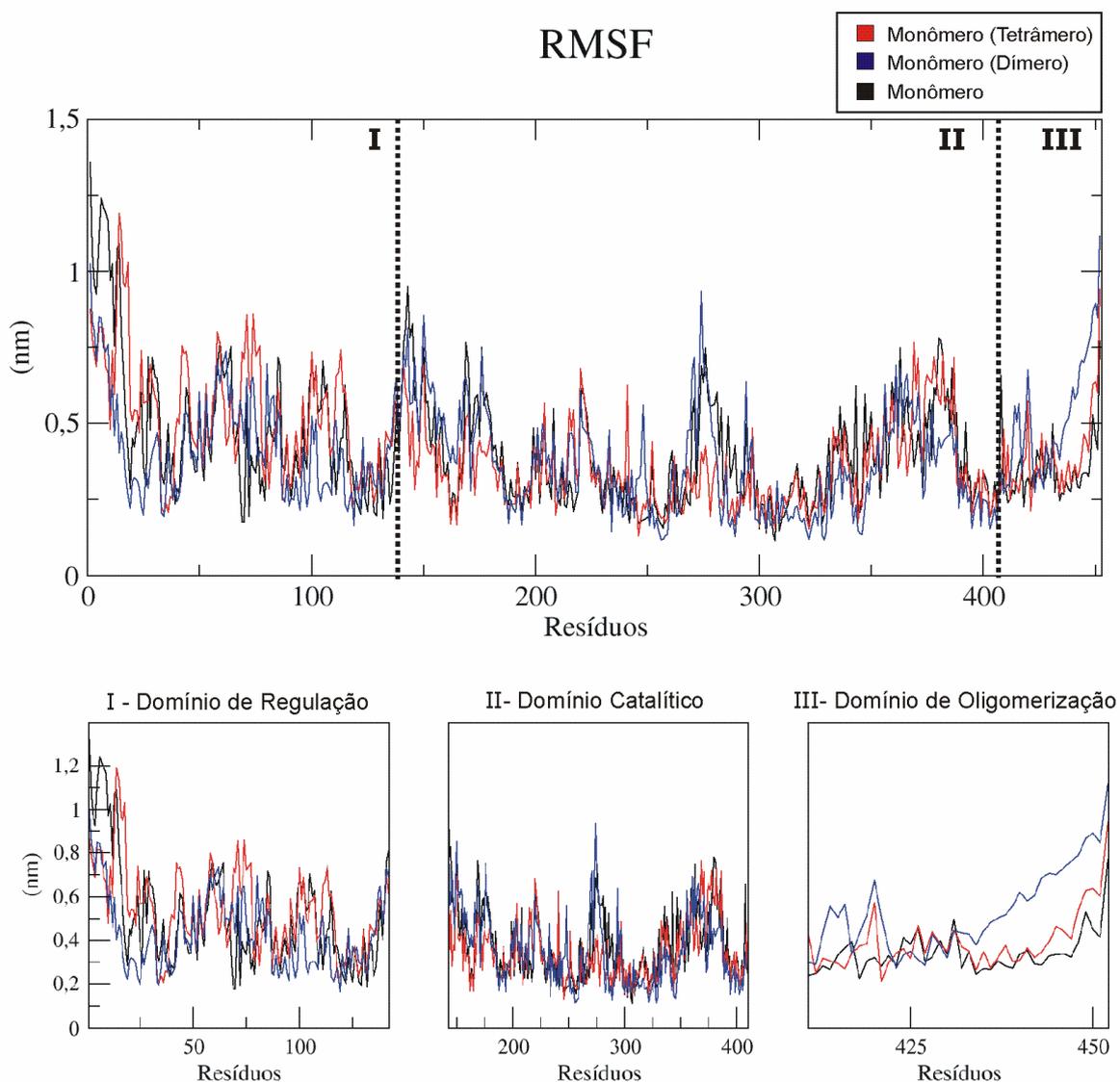


Figura 12. Análise da flexibilidade dos monômeros da PAH. Análise de RMSF dos monômeros da PAH em formação monomérica, dimérica e tetramérica em função do número de resíduos da proteína. Em destaque os domínios de regulação, catalítico e de oligomerização

O domínio de oligomerização do monômero em organização tetramérica também apresenta pouca flexibilidade, mas a explicação para este fenômeno é a imobilização desta α -hélice que está coordenada com outras 3 α -hélices dos monômeros que completam o tetrâmero, impossibilitando o movimento da mesma.

Os monômeros em organização dimérica não atingem este grau de imobilização observado nos monômeros em organização tetramérica. Como podemos observar no gráfico de RMSF, a α -hélice de oligomerização é bastante flexível, nos levando a concluir

que esta região não se mantém estável em organização dimérica, onde apenas 2 α -hélices estão coordenadas.

As diferenças encontradas na presença e na ausência da região de oligomerização através da análise de RMSD devem-se ao fato da alta flexibilidade desta região (α -hélice), que pode ser observada na análise de RMSF (Figura 12). Assim, ao avaliarmos a diferença da estrutura inicial submetida à simulação em relação a estrutura observada durante a trajetória, percebemos o quanto elas se distanciaram e, também, que o distanciamento é diferente na análise sem o domínio de oligomerização, como podemos observar na análise de RMSD. Este comportamento sugere que a oligomerização dos monômeros em organização dimérica, com apenas 2 α -hélices coordenadas, não parece suficiente para imobilizar este sistema e torná-lo estável.

Por outro lado, quando observamos a análise do monômero em organização tetramérica notamos que não há diferença entre o comportamento do mesmo na presença ou na ausência do domínio de oligomerização, este dado confirma nossa teoria de que nesta configuração tetramérica, onde as 4 α -hélices estão coordenadas, formando a região de oligomerização, estas se encontram imobilizadas, sendo pouco flexíveis. Assim, pode-se inferir que a estrutura tetramérica é estável o suficiente para manter os monômeros unidos.

A fim de obter mais dados para confirmar esta compactação observada no monômero livre, usamos uma ferramenta capaz de medir a distância entre regiões da proteína. Os resultados obtidos com esta análise nos permitiram confirmar esta compactação visualizada durante a trajetória da simulação do monômero e extensamente comprovada através das análises (RMSD e raio de giro) realizadas neste trabalho.

A distância entre o centro de massas do núcleo da proteína (resíduos 1 - 411) e último átomo da α -hélice do domínio de oligomerização (Lys) tem um aumento inicial nos primeiros 0,025 μ s, diminuído de ~ 5 nm para ~ 3 nm nos próximos 0,05 μ s permanecendo nesta faixa até o final da simulação onde atinge maior estabilidade (Figura 13). Esta aproximação condiz com a alteração proposta pelos resultados obtidos através da análise de RMSD onde observamos um distanciamento da estrutura inicial quando comparamos o monômero na ausência e na presença do domínio de oligomerização e, também com a compactação da estrutura observada no perfil da análise de raio de giro.

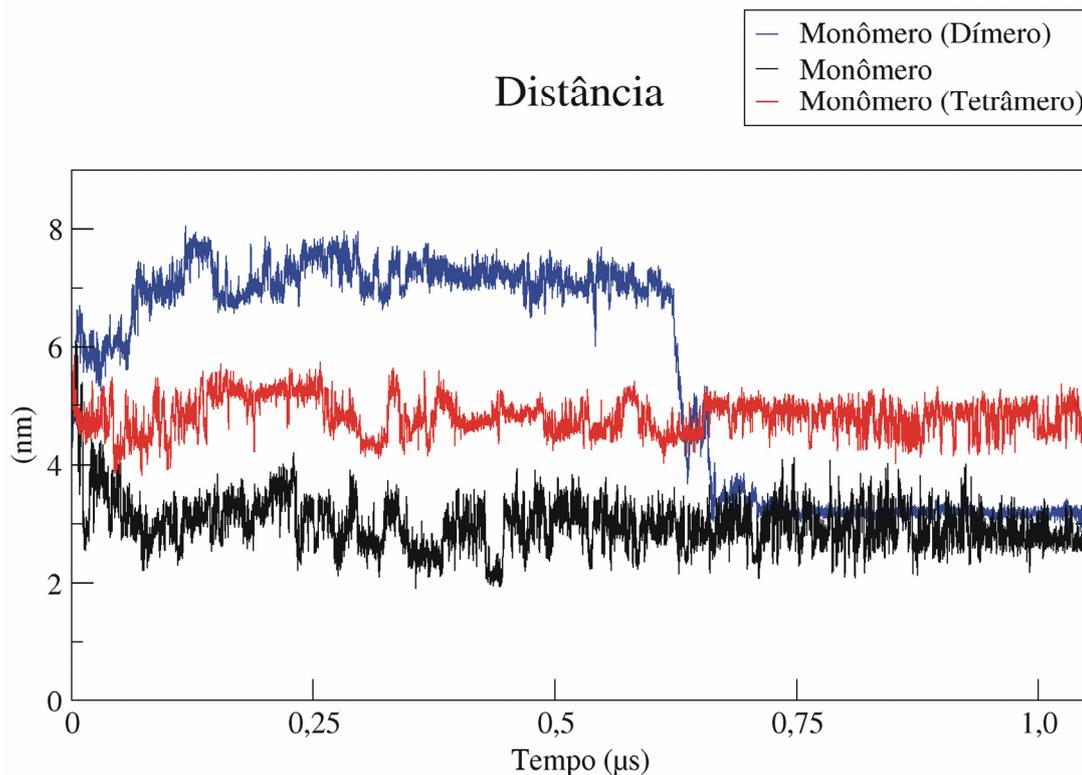


Figura 13. Análise de distância entre o centro de massa do núcleo da proteína (AA 1- 411) e o último átomo da α -hélice do domínio de oligomerização (Lys - 452).

O monômero em organização dimérica apresentou um comportamento compatível com a flexibilidade anteriormente observada nesta região através da análise de RMSF. Em um primeiro momento ocorre um distanciamento desta α -hélice do centro de massas da proteína que perdura até aproximadamente 0,6 μs , passando por um curto período de estabilidade na mesma distância destas regiões no monômero em organização tetramérica, mas logo se desestabilizando e sofrendo um processo semelhante ao monômero livre de aproximação desta região ao núcleo da proteína.

Por fim, esta análise apresenta outro dado interessante, a estabilidade desta distância no monômero em organização tetramérica, que vai ao encontro dos dados obtidos anteriormente, ressaltando a importância da coordenação destas 4 α -hélices para a estabilidade da proteína.

3.2.3. Discussão

O presente estudo permitiu simular através DM o comportamento da PAH em suas formas monomérica, dimérica e tetramérica. Os resultados obtidos mostraram que o perfil da trajetória dos monômeros nestas estruturas é diferente, principalmente pelo comportamento das α -hélices envolvidas na oligomerização da proteína. A α -hélice de oligomerização do monômero livre sofre uma compactação, ou seja, está se agregando ao corpo da proteína, alterando sua flexibilidade e seu raio de giro, e isto é observado logo no início da simulação. Já a α -hélice de oligomerização do monômero em organização dimérica apresenta alta flexibilidade ao longo de toda trajetória mostrando que apenas 2 α -hélices conjugadas parecem não ser suficientes para estabilizar este sistema.

Analisando de outra forma, podemos perceber também que quanto mais simples a organização do sistema mais exposta esta região estará ao solvente, tendo assim maior interferência do mesmo, de forma a desestabilizar esta região, Por isso, ao formar o tetrâmero esta região se torna mais estável uma vez que estará protegida no centro do complexo protéico. A região de oligomerização dos monômeros em organização tetramérica apresenta pouca flexibilidade. A explicação para este fenômeno é a imobilização desta α -hélice que está coordenada com as outras 3 α -hélices dos monômeros que completam o tetrâmero, diminuindo a possibilidade movimento da mesma, ou seja, estas α -hélices interagem imobilizando-se mutuamente, auxiliando na formação do tetrâmero.

Algumas mutações do tipo *missense*, responsáveis por fenótipo clínico da fenilcetonúria, já foram previamente descritas apresentando uma alta atividade enzimática residual *in vitro*, nos levando a concluir que a perda de função nestes casos não seja por um problema na catálise e, sim, por outros mecanismos como, por exemplo, alterações no enovelamento da proteína que podem induzir a agregação e a rápida degradação da mesma (Waters *et al.*, 1998, Waters *et al.*, 2000, Pérez *et al.*, 2005).

Os dados obtidos no presente trabalho vão ao encontro destes mecanismos alternativos a problemas na catálise, já que mostram a diferença de estabilidade entre as formas oligoméricas da enzima. Mutações do tipo *missense* podem levar problema de enovelamento e desestabilização conformacional, segundo análises realizadas através do algoritmo FoldX (Pey *et al.*, 2007). Ensaios *in vitro* evidenciam que a localização da

mutação pode acarretar na formação de até 3 formas oligoméricas em diferentes concentrações e que os distúrbios na oligomerização se manifestam como agregação ou em problemas na formação do tetrâmero (Gersting *et al.*, 2008). Assim, através das diferenças encontradas entre o comportamento das estruturas analisadas neste trabalho, acreditamos que no momento em que ocorra uma mutação no gene *PAH* levando alterações conformacionais na proteína e, posteriormente, dificultando, ou até impedindo a organização dos monômeros em dímeros e dos dímeros em tetrâmeros, estas formas da *PAH* não sejam capazes de permanecer no organismo. Por fim, como visto no monômero livre possam iniciar um processo de agregação e serem destinadas a rápida degradação, ou somente por não atingirem conformação adequada, sejam encaminhadas a esta rota.

Em suma, os resultados deste trabalho auxiliam na compreensão do comportamento desta proteína em suas formas monomérica, dimérica e tetramérica. Estes dados são importantes para ajudar no entendimento de novas estratégias terapêuticas como o uso do cofator natural BH_4 para correção dos efeitos bioquímicos causados por certas mutações no gene *PAH*, considerando que é amplamente descrito que esta molécula possa funcionar como uma chaperona, estabilizando a proteína e protegendo-a contra inativação (Pey *et al.*, 2004, Erlandsen & Stevens *et al.*, 2001).

3.3. Discussão Geral

No presente trabalho, duas diferentes abordagens foram empregadas com a finalidade de aprofundar o conhecimento sobre a PAH e PKU. Em uma das abordagens, foi realizada a identificação das mutações no gene *PAH* responsáveis por pacientes com PKU do sul do Brasil. A aplicação conjunta das técnicas de biologia molecular para identificação de mutações no gene *PAH* permitiu a definição de 83 alelos mutantes (94,3%) de um total de 88 alelos estudados e a identificação do genótipo de 40 pacientes (90,9%) dos 44 incluídos neste trabalho.

Um total de 30 mutações diferentes foram identificadas, sendo que as mais frequentes (p.V388M, p.R408W, p.R158Q, p.I65T, p.E390G, IVS12+1G>A, IVS2+5G>C, p.R252W e p.R261Q), em conjunto, totalizam 60,2% dos alelos mutantes nesses pacientes. O estudo realizado anteriormente pelo nosso grupo com outros pacientes com PKU identificou 8 mutações, incluindo 6 encontradas nesse estudo, como responsáveis por 68,5% total de alelos analisados (Santana da Silva *et al.*, 2003).

A partir destes dados obtidos, podemos concluir que a análise de um maior número de pacientes (44 *versus* 23 pacientes incluídos no estudo realizado anteriormente) permitiu a melhor caracterização do espectro de mutações mais frequentes. Algumas delas permaneceram igualmente prevalentes (p.V388M, p.R408W, p.I65T, IVS12+1G>A, IVS2+5G>C, e p.R261Q).

Analisando a frequência dessas mutações em outras populações, pode-se observar que elas apresentam alta prevalência em populações que colonizaram o sul do Brasil. As mutações p.I65T e p.V388M foram descritas como prevalentes na população portuguesa (5,4% e 8,6%, respectivamente) (Rivera *et al.*, 1998). As mutações p.R408W e IVS12+1G>A, que foram identificadas em 10,2 e 5,7%, respectivamente, dos alelos mutantes, são comuns em paciente com PKU de várias regiões da Alemanha (Guldberg *et al.*, 1996; Hennermann *et al.*, 2000; Aulehla-Scholz & Heilbronner, 2003). A mutação IVS12+1G>A também é bastante comum em pacientes do norte da Itália, característica comum à mutação p.R261Q (Zschocke, 2003).

As diferenças entre as subpopulações do Brasil se refletem no espectro de mutações e na frequência das mesmas. As mutações mais prevalentes no presente estudo foram p.V388M e p.R408W. A mutação p.V388M também foi identificada com alta frequência

em São Paulo e Minas Gerais (9,1 e 21,2%, respectivamente) (Acosta *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2008). Entretanto, a mutação p.R408W é rara nestas populações, o que se pode ser explicado pela origem germânica e pela concentração da imigração desta população no sul do Brasil. Estes dados também podem ser usados para explicar a alta frequência das mutações p.R158Q (9,1%) e IVS12+1G>A (5,7%) em relação as outras regiões (Minas Gerais e São Paulo), já que estas mutações são relativamente comuns em pacientes da Alemanha, Polônia e Itália (Zschocke 2003).

Na abordagem das análises *in silico*, a técnica de DM-CG foi utilizada para investigar o comportamento e a estabilidade da PAH nas organizações monomérica, dimérica e tetramérica. Através dos dados obtidos, um comportamento diferente dos monômeros nestas estruturas foi observado durante a trajetória da simulação, principalmente pelo comportamento das α -hélices envolvidas na oligomerização da proteína.

A α -hélice de oligomerização do monômero livre sofre compactação, ou seja, esta α -hélice se aproxima do núcleo da proteína perdendo sua flexibilidade e alterando a estrutura do monômero. Esse comportamento foi observado desde o início da simulação. A α -hélice de oligomerização do monômero em organização dimérica apresenta um distanciamento inicial, acompanhado de uma aproximação do núcleo da proteína ao final da simulação. Esta região apresenta alta flexibilidade ao longo de toda trajetória, sendo um forte indicio de que apenas 2 α -hélices conjugadas parecem não ser suficientes para estabilizar este sistema. Por fim, o monômero em organização tetramérica apresentou maior estabilidade em todas as análises realizadas e o domínio de oligomerização apresentou baixa flexibilidade e não apresentou diferença em relação a estrutura inicialmente submetida à simulação. Essas observações podem ser explicadas por 2 motivos: (1) pela coordenação deste domínio de oligomerização com outros 3 domínios dos monômeros que completam o tetrâmero e (2) pela menor exposição desta região ao solvente, uma vez que esta região está protegida no centro de 4 monômeros. Assim, estas α -hélices do domínio de oligomerização estão interagindo e estabilizando-se mutuamente, mantendo o tetrâmero intacto.

O comportamento das estruturas analisadas neste trabalho evidencia as diferenças na estabilidade destes oligômeros. Mutações de ponto de sentido trocado (*missense*) podem levar problema de enovelamento e desestabilização conformacional (Pey *et al.*, 2007). A

localização da mutação pode também desestabilizar a proteína como um todo, levando à formação das 3 formas oligoméricas em diferentes concentrações ou até impedindo a formação das formas oligoméricas, como é o caso das mutações p.R408W e p.S310Y em que, em ensaios *in vitro*, não foram capazes de formar nenhuma das formas oligoméricas e se agruparam em agregados protéicos (Gersting *et al.*, 2008). As mutações p.I65S e Y417C apresentaram um comportamento alterado de oligomerização neste mesmo estudo, onde a proteína com a mutação p.I65S forma uma concentração alta de dímeros que não atingem o grau de tetramerização e a proteína com a mutação Y417C apresenta uma concentração de monômeros elevada, o que não é observado na proteína selvagem (Gersting *et al.*, 2008).

Os distúrbios na oligomerização se manifestam como agregação ou como dificuldades na formação do tetrâmero (Gersting *et al.*, 2008). A formação de agregados e/ou proteínas não funcionais com alterações na sua conformação levam a rápida degradação destas proteínas anormais (Erlandsen *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2005). Assim, através dos dados obtidos com a proteína selvagem, essas diferenças na estabilidade dos oligômeros foram evidenciadas produzindo fortes indícios que, na presença de uma mutação que cause alterações conformacionais na proteína, estas se agrupem em agregados protéicos ou se mantenham na forma monômero livre ou dímero, sem conseguir atingir a organização de um tetrâmero, sendo, por fim, destinadas a rápida degradação.

Portanto, os resultados do presente trabalho agregam novas evidências na compreensão dos alelos mutantes responsáveis por PKU através de caracterização adicional do perfil de mutações da população do sul do Brasil, gerando evidências para criação de estratégias de identificação de mutações personalizadas para a região específica (nesse caso, sul do Brasil). Também foram produzidos novos dados que confirmam que um grupo pequeno de mutações são responsáveis pela maioria dos alelos mutantes em PKU, sem esquecer que mutações raras completam esse espectro. A identificação destas mutações servirá como base para análises sobre o efeito das mesmas sobre o funcionamento da proteína, que poderá ser avaliado por estratégias *in silico* usando os diferentes comportamentos das formas oligoméricas submetidas a simulação.

Por fim, os resultados obtidos são importantes para a compreensão e criação de novas estratégias terapêuticas. Atualmente, o uso do cofator BH₄ para correção dos efeitos bioquímicos causados por determinadas mutações no gene *PAH*, que produzem proteínas conformacionalmente instáveis, já está sendo utilizado, uma vez que já foi descrito que

esta molécula (BH_4) pode funcionar como uma chaperona, estabilizando a proteína e protegendo-a contra inativação e/ou degradação (Pey *et al.*, 2004, Erlandsen & Stevens *et al.*, 2001).

5. Conclusões

- A aplicação conjunta das técnicas para identificação de mutações no gene da PAH - PCR em tempo real, RFLP e sequenciamento direto - permitiu a definição de 83 alelos mutantes (94,3%) de um total de 88 alelos estudados e a identificação do genótipo de 40 (90,9%) pacientes com PKU dos 44 inclusos neste trabalho.
- O espectro de mutações foi composto por 30 mutações diferentes, previamente descritas na literatura, incluindo 25 mutações de ponto de sentido trocado (*missense*), 4 mutações em sítios de “*splicing*” e 1 deleção.
- As mutações mais frequentes foram p.V388M (10,2%), p.R408W (10,2%), p.R158Q (9,1%), p.I65T (5,7%), p.E390G (5,7%), IVS12 +1 G> A (5,7%), IVS2 +5 G> C (4,6%) p.R252W (4,6%) e p.R261Q (4,6%).
- Nossos resultados determinam o perfil de mutações na população do sul do Brasil e indicam que os alelos mutantes em pacientes com PKU do sul do Brasil são representado por um pequeno grupo de mutações frequentes e um grande número de mutações raras.
- O perfil de mutações na população do sul do Brasil torna necessário a elaboração de uma estratégia particular para o programa de triagem de mutações, tendo como finalidade alcançar a identificação do maior número das mesmas.
- Os resultados obtidos através das análises *in vitro* contribuem para o aconselhamento genético de famílias em risco, também, para proporcionar a oferta de análises moleculares individualizadas para os mesmo.
- Através dos estudos *in silico* foi possível construir 2 modelos do monômero completo da PAH, a partir de duas estruturas cristalográficas depositadas no PDB, os quais serviram como base para construção da PAH em suas formas dimérica e tetramérica.

- Os três sistemas (monômero, dímero, tetrâmero) foram submetidos a simulações de DM-CG, permitindo a caracterização dos diferentes comportamentos destas estruturas durante a trajetória desenvolvida, principalmente pelo comportamento das α -hélices envolvidas na oligomerização da proteína.
- A α -hélice de oligomerização do monômero livre sofre uma compactação a estrutura, ou seja, está se agregando ao corpo da proteína alterando sua flexibilidade e seu raio de giro e isto é observado desde o início da simulação.
- A α -hélice de oligomerização do monômero em organização dimérica apresenta alta flexibilidade ao longo de toda trajetória, mostrando que apenas 2 α -hélices coordenadas não parecem suficientes para imobilizar este sistema e torná-lo rígido e estável.
- A região de oligomerização do monômero em organização tetramérica apresenta pouca flexibilidade, devido a imobilização desta α -hélice que está coordenada com outras 3 α -hélices dos monômeros que completam o tetrâmero, impossibilitando o movimento da mesma, ou seja, estas α -hélices estão imobilizadas mantendo os monômeros em posição para formação do tetrâmero.
- Por fim, mutações que impeçam a oligomerização da proteína podem formar estas estruturas mais instáveis que, como visto no monômero livre, podem iniciar um processo de agregação e serem destinadas a rápida degradação, ou somente por não atingirem conformação adequada, sejam encaminhadas a esta rota.

6. Referências

- Acosta, A.X.; Silva, W.A. Jr.; Carvalho, T.M.; Zago, M.A. Ten novel mutations in the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) observed in Brazilian patients with phenylketonuria. *Hum Mutat*, 17(1):77, 2001.
- Alvarez, D.L.; Campistol, P.J.; Ribes, R.A.; Riverola, A.T. Phenylalanine metabolites in hyperphenylalaninemic children. *An Esp Pediatr*, 36(2): 371-374, 1992.
- Aulehla-Scholz, C. & Heilbronner, H. Mutational spectrum in German patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat*, 21(4): 399-400, 2003.
- Bhargava, B.L.; Balasubramanian, S.; Klein, M.L. Modelling room temperature ionic liquids. *Chem Commun (Camb)*, 29: 3339-3351, 2008.
- Blau N, Bélanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, Trefz FK, van Spronsen F. Management of phenylketonuria in Europe: survey results from 19 countries. *Mol Genet Metab*, 99(2): 109-15, 2010.
- Bracher, A.; Eisenreich, W.; Schramek, N.; Ritz.; H; Götze, E.; Herrmann, A.; Gutlich, M. Biosynthesis of pteridines. NMR studies on the reaction mechanisms of GTP cyclohydrolase I, pyruvoyltetrahydropterin synthase, and sepiapterin reductase. *J Biol Chem*, 273(43):28132–28141, 1998.
- Brooks, C. L., III; Karplus, M.; Pettitt, B. M. Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure, and Thermodynamics. In: Prigogine, I. & Rice, S.A. *Advances in Chemical Physics*. John Wiley & Sons, New York, 1988.
- Campbell, R.S.; Brearley, G.M.; Varsani, H.; Morris, H.C.; Milligan, T.P.; Hall, S.K.; Hammond, P.M.; Price, C.P. Development and validation of a robust specific enzyme mediated assay for phenylalanine in serum. *Clin Chim Acta*, 210(3):197-210, 1992.
- Carvalho, T.M. Resultados do levantamento epidemiológico da sociedade brasileira de triagem neonatal (SBTN). *Rev Méd Minas Gerais*. 13(12):109-135, 2003.
- Case, D. A.; Cheatham, T. E. 3rd; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M. Jr.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J Comput Chem*, 26(16): 1668-1688, 2005.
- Chace, D.H.; Millington, D.S.; Terada, N.; Kahler, S.G.; Roe, C.R.; Hofman, L.F. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, 39(1):66-71, 1993.

- Champe, P.C. & Harvey, R.A. Lippincotts Illustrated Reviws: Biochemistry 2nd edition. Philadelphia: Lippincotts-Haven, 1994.
- DeLano, W. L. The *PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific, South San Francisco, CA, USA, 2002.
- Derreumau, P. & Mousseau, N. Coarse-grained protein molecular dynamics simulations. *J Chem Phys*, 126: 025101, 2007.
- Eisensmith, R.C. & Woo, S.L. Phenylketonuria and the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol Biol Med*, 8(1): 3-18. 1991.
- Erlandsen, H.; Fusetti, F.; Martinez, A.; Hough, E.; Flatmark, T.; Stevens, R.C. Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nat Struct Biol*, 4(12):995-1000, 1997.
- Erlandsen, H. & Stevens, R. C. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 68(2): 103-125, 1999.
- Erlandsen, H. & Stevens, R.C. A structural hypothesis for BH4 responsiveness in patients with mild forms of hyperphenylalaninaemia and phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis*, 24(2): 213-30, 2001.
- Erlandsen, H.; Patch, M.G.; Gamez, A.; Straub, M.; Stevens, R.C. Structural studies on phenylalanine hydroxylase and implications toward understanding and treating phenylketonuria. *Pediatrics*, 112(6 pt 2): 1557-1565, 2003.
- Erlandsen, H.; Pey, AL.; Gámez, A.; Pérez, B.; Desviat, LR.; Aguado, C.; Koch, R.; Surendran, S.; Tyring, S.; Matalon, R.; Scriver, C.R.; Ugarte, M.; Martínez, A.; Stevens, R.C. Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(48): 16903-16908, 2004.
- Eswar, N.; Marti-Renom, M.A.; Webb, B.; Madhusudhan, M.S.; Eramian, D.; Shen, M.; Pieper, U.; Šali, A. Comparative protein structure modeling with MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*. John Wiley & Sons, Suppl. 15: 1-30, 2000.
- Fiser, A.; Do R.K.G; Sali, A. Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci*, 9: 1753-1773, 2000.
- Fusetti, F.; Erlandsen, H.; Flatmark, T.; Stevens, R.C. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria *J Biol Chem*. 273(27): 16962-16967, 1998.
- Gersting, S.W.; Kemter, K.F.; Staudigl, M.; Messing, D.D.; Danecka, M.K.; Lagler, F.B.; Sommerhoff, C.P.; Roscher, A.A.; Muntau, A.C. Loss of function in

- phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability. *Am J Hu. Genet*, 83(1): 5-17, 2008.
- Greve, L.C.; Wheeler, M.D.; Green-Burgeson, D.K.; Zorn, E.M. Breast-feeding in the management of the newborn with phenylketonuria: a practical approach to dietary therapy. *J Am Diet Assoc*, 94(3): 305-309, 1994.
- Goodwill, K.E.; Sabatier, C.; Marks, C.; Raag, R.; Fitzpatrick, P.F.; Stevens, R.C. Crystal structure of tyrosine hydroxylase at 2.3 Å and its implications for inherited neurodegenerative diseases. *Nat. Struct. Biol*, 4(7): 578–585, 1997.
- Guldberg, P.; Henriksen, K.F.; Sipila, I.; Güttler, F.; de la Chapelle, A. Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterization of mutations in Finland. *J Med Genet*, 32(12): 976–978, 1995.
- Güttler, F. Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. *Acta Paediatr Scand Suppl*, 280: 1-80, 1980.
- Hennermann, J.B.; Vetter, B.; Wolf, C.; Windt, E.; Bührdel, P.; Seidel, J.; Mönch, E.; Kulozik, A.E. Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in eastern Germany: a characteristic molecular profile and 15 novel mutations. *Hum Mutat*, 15(3): 254-60, 2000.
- Hufton, S.E.; Jennings, I.G.; Cotton, R.G. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem J*, 311(Pt 2): 353–366, 1995.
- Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graph*, 14(1): 33-38, 1996.
- Jardim, L.B.; Leite, J.C.L.; Silveira, E.L.; Saraiva-Pereira, M.L.; Giugliani, R. Resultados preliminares de um programa de detecção precoce para aminoacidopatias no Rio Grande do Sul. *Jornal de Pediatria*, 68:189-242, 1992.
- Jorgensen, W.L. & Tirado-Rives, J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *J Am Chem Soc*, 110: 1657-1666, 1988.
- Kaufman, S. The phenylalanine hydroxylating system in phenylketonuria and its variants. *Biochem Med*, 15(1): 42-54, 1976.
- Kitson, D.H. & Hagler, A.T. Theoretical-studies of the structure and molecular dynamics of a peptide crystal. *Biochemistry*, 27(14): 5246-5257, 1988.
- Kobe, B.; Jennings, I.G.; House, C.M.; Michell, B.J.; Goodwill, K.E.; Santarsiero, B.D.; Stevens, R.C.; Cotton, R.G.; Kemp, B.E. Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nat Struct Biol*, 6(5): 442-448, 1999.

- Konecki, D.S.; Wang, Y.; Trefz, F.K.; Lichter-Konecki, U.; Woo, S.L. Structural characterization of the 5' regions of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry*, 31(35): 8363-8368, 1992.
- Kwok, C.M.; Ledley, F.D.; DiLella, A.G.; Robson, J.H.; Woo, L.C. Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry*, 24(3): 556–561, 1985.
- Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947-2948, 2007.
- Laskowski, R.A.; McArthur, M.W.; Moss, D. S.; Thornton, J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst*, 26: 283-291, 1993.
- Leach, A.R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*, 2.ed. Cingapura: Longman, 2001.
- Leandro, P.; Lechner, M.C.; Tavares de Almeida, I.; Konecki, D. Glycerol increases the yield and activity of human phenylalanine hydroxylase mutant enzymes produced in a prokaryotic expression system. *Mol Genet Metab*, 73(2): 173-8, 2001.
- Ledley, F.D.; Grenett, H.E.; DiLella, A.G.; Kwok, S.C.; Woo, S.L. Gene transfer and expression of human phenylalanine hydroxylase. *Science*, 228(4695):77-9, 1985.
- Lichter-Konecki, U.; Hipke, CM.; Konecki, DS. Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol Genet Metab*, 67(4): 308-316, 1999.
- Lidsky, A.S.; Law, M.L.; Morse, H.G.; Kao, F.T.; Rabin, M.; Ruddle, F.H.; Woo, S.L. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82(8): 6221-6225, 1985.
- Longo, N. Distúrbios hereditários do metabolismo e do armazenamento de aminoácidos. In: Braunwald, E.; Fauci, A.S.; Kasper, D.L.; Hauser, S.L.; Longo, D.L.; Jameson, J.L. *Harrison Medicina Interna*. 15^a ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2450-1, 2002.
- Lopez, C.A.; Rzepiela, A.; de Vries, A.H.; Dijkhuizen, L.; Huenenberger, P.H.; Marrink, S.J. The Martini coarse grained force field: extension to carbohydrates. *J Chem Theory Comput*, 5(12): 3195-3210, 2009.
- MacKerell, A. D. Jr.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L. Jr.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E. 3rd; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.;

- Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J Phys Chem B*, 102: 3586-3616, 1998.
- Mardsen, D. & Levy, H. Classification of PKU. In: Blau, N. editor. PKU an BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin. 1st ed. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft, 92-103, 2006.
- Marrink, S.J.; Risselada, H.J.; Yefimov, S.; Tieleman, D.P.; de Vries, A.H. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J Phys Chem B*, 111(27): 7812-7824, 2007.
- Marrink, S.J.; Fuhrmans, M.; Risselada, H.J.; Periolo, J.: The MARTINI force field. In Voth, G. (ed.). *Coarse graining of condensed phase and biomolecular systems*, Boca Raton: CRC Press, 2008.
- Martins, A. Inborn errors of metabolism: a clinical overview. *Sao Paulo Med J*. 117(6): 251-65, 1999.
- Marti-Renom, M.A.; Stuart, A.C.; Fiser, A.; Sanchez, R.; Melo, F.; Šali A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29: 291-325, 2000.
- Matalon, K.M. Developments in Phenylketonuria. *Topics in Clinical Nutrition* 16(4): 41-50, 2001.
- McCammon, J.; Gelin, J.B.; Karplus, M. Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267: 585-590, 1977.
- McCaman, M.W. & Robins, E. Fluorometric method for the determination of phenylalanine in serum. *J of Lab & Clin Med*, 59:885-890, 1962.
- Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16(3): 1215, 1988.
- Mira, V.M. & Márquez, M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Pública*, 34 (1): 86-96, 2000.
- Monticelli, L.; Kandasamy, S.K.; Periolo, X.; Larson, R.G.; Tieleman, D.P.; Marrink, S.J. The MARTINI coarse grained forcefield: extension to proteins. *J. Chem.Theory Comput.*, 4(5): 819-834, 2008.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger Princípios de bioquímica*. 3a ed. Savier, 2002.
- O'Neill, C.A.; Eisensmith, R.C.; Croke, D.T.; Naughten, E.R.; Cahalane, S.F.; Woo, S.L.; Molecular analysis of PKU in Ireland. *Acta Paediatr Suppl*, 407: 43-44, 1994.

- Okano, Y.; Takatori, K.; Kudo, S.; Sakaguchi, T.; Asada, M.; Kajiwara, M.; Yamano, T. Effects of tetrahydrobiopterin and phenylalanine on in vivo human phenylalanine hydroxylase by phenylalanine breath test. *Mol Genet Metab*, 92(4):308-14, 2007.
- Pascual, J.E. La fenilcetonuria: problemas del diagnostico y tratamiento. *Rev Cubana Pediatr* 61: 744-752, 1989.
- Pérez, B.; Desviat, L.R.; Gomez-Puertas, P.; Martí'nez, A.; Stevens, R.C.; Ugarte, M. Kinetic and stability analysis of PKU mutations identified in BH4-responsive patients. *Mol. Genet. Metab.*, 86(1): 11–16. 2005.
- Pey, A.L.; Pérez, B.; Desviat, L.R.; Martínez, M.A.; Aguado, C.; Erlandsen, H.; Gámez, A.; Stevens, R.C.; Thóro'lfsson, M.; Ugarte, M.; Martínez, A. Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Hum. Mutat.*, 24(5): 388-99, 2004.
- Pey, A.L.; Stricher, F.; Serrano, L.; and Martínez, A. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. *Am. J. Hum. Genet.*, 81(5): 1006–1024. 2007.
- Ramachandran, G.N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.*, 7: 95-99, 1963.
- Rivera, I.; Leandro, P.; Lichter-Konecki, U.; Tavares de Almeida, I.; Lechner, M.C. Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. *J Med Genet*, 35(4): 301-4, 1998.
- Santana da Silva, L.C.; Carvalho, T.S.; da Silva, F.B.; Morari, L.; Fachel, A.A.; Pires, R.; Refosco, L.F.; Desnick, R.J.; Giugliani, R.; Saraiva-Pereira, M.L. Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. *Mol Genet Metab.*, 79(1): 17-24, 2003.
- Santos, L.L.; Magalhães, M.C.; Januário, J.N.; Aguiar, M.J.; Carvalho, M.R. The time has come: a new scene for PKU treatment. *Genet Mol Res*. 5(1): 33-44, 2006.
- Santos, L.L.; Castro-Magalhães, M.; Fonseca, C.G.; Starling, A.L.; Januário, J.N.; Aguiar, M.J.; Carvalho, M.R. PKU in Minas Gerais State, Brazil: mutation analysis. *Ann Hum Genet*, 72(6): 774–779, 2008.
- Scriver, C.R. & Kaufman, S. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York. McGraw-Hill: 1667-1724, 2001.
- Scriver, C.R. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum. Mutat.*, 28(9): 831-45, 2007.

- Smith, C.; Marks, A.D.; Lieberman, M. *Bioquímica médica básica de Marks*. 2a ed. Artmed, 2007.
- Smith, I. & Lee, P. The Hyperphenylalaninaemias. In: Fernandes, J.; Saudubray, J.M.; van den Berghe, G. editors. *Inborn Metabolic Diseases*. 3rd ed. Heidelberg: Springer, 171- 84, 2000
- Souza, C.F.; Schwartz, I.V.D.; Giugliani, R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciênc. saúde coletiva*, 7(1): 129-137, 2002.
- Tada, K.; Tateda, H.; Arashima, S.; Sakai, K.; Kitagawa, T.; Aoki, K.; Suwa, S. Follow-up study of a nation-wide neonatal metabolic screening program in Japan. A collaborative study group of neonatal screening for inborn errors of metabolism in Japan. *Eur J Pediatr*, 142: 204–207, 1984.
- Teigen, K.; Froystein, N.A.; Martinez, A. The structural basis of the recognition of phenylalanine and pterin cofactors by phenylalanine hydroxylase: implications for the catalytic mechanism. *J Mol Biol*, 294(3): 807-23, 1999.
- Tessari, P.; Deferrari, G.; Robaudo, C.; Vettore, M.; Pastorino, N.; De Biasi, L.; Garibotto, G. Phenylalanine hydroxylation across the kidney in humans rapid communication. *Kidney Int*, 56(6): 2168-72, 1999.
- Thöny, B.; Auerbach, G.; Blau, N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J*, 347(1): 1-16, 2000.
- Tozzini, V. Multiscale modeling of proteins. *Acc Chem Res*, 43(2): 220-30, 2010.
- van Gunsteren, W.F.; Bakowies, D.; Baron, R.; Chandrasekhar, I.; Christen, M.; Daura, X.; Gee, P.; Geerke, D. P.; Glattli, A.; Hunenberger, P. H.; Kastenholz, M. A.; Oostenbrink, C.; Schenk, M.; Trzesniak, D.; van der Vegt, N. F.; Yu, H. B.: Biomolecular modeling: Goals, problems, perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 45: 4064-4092, 2006.
- van Gunsteren, W.F. & Berendsen, H.J.C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications and Perspectives in Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29: 992-1023, 1990.
- van Gunsteren, W.F.; Billeter, S.R.; Eising, A.A.; Huenenberger, P.H.; Krueger, P.; Mark, A.E.; Scott, W.R. P.; Tironi, I.G. *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*. Zúrique: Vdf Hochschulverlag AG, 1996.
- Waters, P.J.; Parniak, M.A.; Hewson, A.S.; Scriver, C.R. Alterations in protein aggregation and degradation due to mild and severe missense mutations (A104D, R157N) in the human phenylalanine hydroxylase gene (PAH). *Hum.Mutat.*, 12(5): 344-354, 1998.

- Waters, P.J.; Parniak, M.A.; Akerman, B.R.; and Scriver, C.R. Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanism and potential modulation of phenotype. *Mol. Genet. Metab.*, 69(2): 101-110, 2000.
- Waisbren SE, Noel K, Fahrback K, Cella C, Frame D, Dorenbaum A, Levy H. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta-analysis. *Mol Genet Metab.* 92 (1-2):63-70, 2007.
- Zorzi, G.; Thony, B.; Blau, N. Reduced nitric oxide metabolites in CSF of patients with tetrahydrobiopterin deficiency. *J Neurochem*, 80: 362-4, 2002.
- Zschocke, J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat*, 21(4): 345-56, 2003.

6. Apêndices

6.1. Apêndice A

Arquivos de entrada utilizados no programa Modeller 9v7 para construção dos modelos completos da PAH. O arquivo **A1** informa qual é a estrutura-molde, a sequência-alvo e o arquivo de alinhamento alvo-molde, além de informar quantos modelos serão construídos.

O arquivo **A2** é o arquivo de alinhamento da sequência-alvo com a sequência de aminoácidos da estrutura-molde, em formato PIR modificado, conforme requerido pelo programa Modeller.

A1: arquivo *model-default*

```
# Homology modeling by the automodel class
from modeller import *          # Load standard Modeller classes
from modeller.automodel import * # Load the automodel class

log.verbose() # request verbose output
env = environ() # create a new MODELLER environment to build this model in

env.io.atom_files_directory = ['.']

a = automodel(env,
              alnfile = 'alinhamento.ali',
              knowns = ('1PHZ', '2PAH'),
              sequence = 'PAH_A')
a.starting_model = 1 # index of the first model
a.ending_model = 10 # index of the last model
                    # (determines how many models to calculate)
a.make()
```

A2: Arquivo de alinhamento.ali

```

>P1;2PAH
structureX:2PAH:118 :A:452:A: : : :
-----
-----VPWFPRTIQELDRFANQIL-----DADHPGFK
DPVYRARRKQFADIAYNYRHGQPIPRVEYMEEEEKKTWGTVFKTLKSLYKT
HACYEYNHIFPLLEKYCGFHEDNIPQLEDVVSQFLQTCTGFRLRPVAGLLS
SRDFLGGGLAFRVFHCTQYIRHGSKPMYTPEPDICHELLGHVPLFSDRSFA
QFSQEIGLASLGAPDEYIEKLATIIYWFTVEFGLCKQGDSIKAYGAGLLSS
FGELQYCLSEKPKLLPLELEKTAIQNYTVTEFQPLYYYVAESFNDAKEKVR
NFAATIPRPFSVRYDPYTQRIEVLDNTQQLKILADSINSEIGILCSALQK
IK*

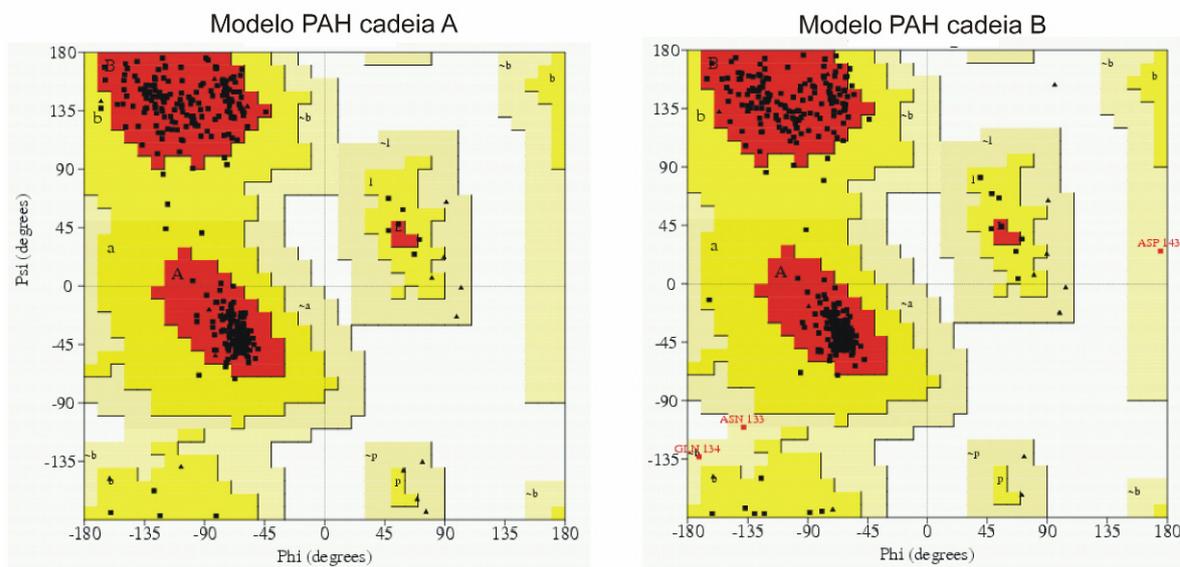
>P1;1PHZ
structureX:1PHZ:19 :A:427 :A: : : :
-----GQETSYIEDNSNQNNGAISLIFSLKEEVGALAK
VLRLFEENDINLTHIESRPSRLNKDEYEFFTYLDRKTKPVLGSIKSLRN
DIGATVHEL SRDKEKNTVPWFPRTIQELDRFANQIL-----DADHPGFK
DPVYRARRKQFADIAYNYRHGQPIPRVEYTEEEKQTWGTVFRTLKALYKT
HACYEHNHIFPLLEKYCGFREDNIPQLEDVVSQFLQTCTGFRLRPVAGLLS
SRDFLGGGLAFRVFHCTQYIRHGSKPMYTPEPDICHELLGHVPLFSDRSFA
QFSQEIGLASLGAPDEYIEKLATIIYWFTVEFGLCKEGDSIKAYGAGLLSS
FGELQYCLSDKPKLLPLELEKTAIQNYTVTEFQPLYYYVAESFSDAKEKVR
TFAATIPRPFSVRYDPYTQRVEVLDNT-----
--*

>P1;PAH
sequence:PAH:1 :A:452:A: : : :
MSTAVLENPGLGRKLSDFGQETSYIEDNCNQNNGAISLIFSLKEEVGALAK
VLRLFEENDVNLTHIESRPSRLKKDEYEFFTHLDRSLPALTNIIKILRH
DIGATVHEL SRDKKKDTVPWFPRTIQELDRFANQILSYGAELDADHPGFK
DPVYRARRKQFADIAYNYRHGQPIPRVEYMEEEEKKTWGTVFKTLKSLYKT
HACYEYNHIFPLLEKYCGFHEDNIPQLEDVVSQFLQTCTGFRLRPVAGLLS
SRDFLGGGLAFRVFHCTQYIRHGSKPMYTPEPDICHELLGHVPLFSDRSFA
QFSQEIGLASLGAPDEYIEKLATIIYWFTVEFGLCKQGDSIKAYGAGLLSS
FGELQYCLSEKPKLLPLELEKTAIQNYTVTEFQPLYYYVAESFNDAKEKVR
NFAATIPRPFSVRYDPYTQRIEVLDNTQQLKILADSINSEIGILCSALQK
IK*

```

6.2. Apêndice B

Avaliação estereoquímica dos modelos construídos através do Mapa de Ramachandran.



Resíduos em regiões mais favoráveis
Resíduos em regiões adicionalmente favoráveis
Resíduos em regiões generosamente favoráveis
Resíduos em regiões não permitidas

Número total de resíduos que não prolina e glicina:
Número de resíduos de glicina (mostrados como triângulos)
Número de resíduos de prolina
Número total de resíduos (incluindo terminais)

| | A | B |
|---|-----------|-----------|
| Resíduos em regiões mais favoráveis | 383 95,3% | 373 92,8% |
| Resíduos em regiões adicionalmente favoráveis | 19 4,7% | 26 6,5% |
| Resíduos em regiões generosamente favoráveis | 0 0% | 3 0,7% |
| Resíduos em regiões não permitidas | 0 0% | 0 0% |
| <hr/> | | |
| Número total de resíduos que não prolina e glicina: | 402 100% | 402 100% |
| Número de resíduos de glicina (mostrados como triângulos) | 25 | 25 |
| Número de resíduos de prolina | 23 | 23 |
| Número total de resíduos (incluindo terminais) | 452 | 452 |

Figura B. Mapa de Ramachandran para os modelos construídos a partir das estruturas cristalográficas 1PHZ e 2PAH baseados nas cadeias A e B desta última estrutura. Vermelho: regiões mais favoráveis, amarelo: regiões adicionalmente favoráveis, amarelo claro: regiões generosamente favoráveis, branco: regiões não permitidas.

6.3 Apêndices C

Arquivos utilizados para definição dos parâmetros nas simulações de dinâmica molecular. Os arquivos serão apresentados na forma de exemplos de arquivos “.mdp” empregados em uma das simulações *coarse-grained* da PAH.

C1: Etapa de minimização de energia empregando o algoritmo *Steepest Descent*:

```

STANDARD MD INPUT OPTIONS FOR MARTINI 2.0

for use with GROMACS 3.3

VARIOUS PREPROCESSING OPTIONS =
title                = Martini
cpp                  = /usr/bin/cpp
define                = -DFLEX_SPC
integrator            = steep
nsteps                = 50000
emtol                 = 100
emstep                = 0.02
nstcomm               = 1
comm-grps             =
nstxout               = 250
nstvout               = 1000
nstfout               = 0
nstlog                = 100
nstenergy             = 100
nstlist               = 10
ns_type               = grid
pbc                   = xyz
rlist                 = 1.3
coulombtype           = shift
rcoulomb_switch       = 0.0
rcoulomb              = 1.2
epsilon_r              = 15
vdw_type              = shift
rvdw_switch           = 0.9
rvdw                  = 1.2
DispCorr              = No
tcoupl                = No
Pcoupl                = NO
compressibility        = 4.5e-5
ref_p                 = 1.0
gen_vel               = no
constraints            = none

```

C2: Etapa de dinâmica sob temperatura constante.

STANDARD MD INPUT OPTIONS FOR MARTINI 2.0

for use with GROMACS 3.3

```
; VARIOUS PREPROCESSING OPTIONS =
title                = Martini
cpp                  = /usr/bin/cp
integrator           = md
tinit                = 0.0
dt                   = 0.02
nsteps               = 15000000
nstcomm              = 1
comm-grps            =
nstxout              = 5000
nstvout              = 5000
nstfout              = 0
nstlog               = 1000
nstenergy            = 100
nstxtcout            = 1000
xtc_precision        = 100
xtc-grps             =
energygrps           = Protein W ION
nstlist              = 10
ns_type              = grid
pbc                  = xyz
rlist                = 1.3
coulombtype          = shift
rcoulomb_switch      = 0.0
rcoulomb              = 1.2
epsilon_r            = 15
vdw_type             = Shift
rvdw_switch          = 0.9
rvdw                 = 1.2
DispCorr             = No
tcoupl               = Berendsen
tc-grps              = Protein W ION
tau_t                = 0.1 0.1 0.1
ref_t                = 300 300 300
Pcoupl               = berendsen
Pcoupltype           = semisotropic
tau_p                = 0.5 0.5 0.5
compressibility       = 4.5e-5 4.5e-5 4.5e-5
ref_p                = 1.0 1.0 1.0
gen_vel              = no
gen_temp              = 310
gen_seed              = 473529
constraints           = none
constraint_algorithm = Lincs
unconstrained_start  = no
lincs_order          = 4
lincs_warnangle      = 30
```

Juliana Casagrande Ceolato

Curriculum Vitae adaptado da plataforma Lattes

Dados Pessoais

Nome: Juliana Casagrande Ceolato

Nome em citações bibliográficas: CEOLATO, J.C.; Ceolato, J.C.

Formação Acadêmica/Titulação

- 2007** Especialização em Habilitação Farmácia Industrial.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Farmácia Industrial
- 2003 - 2007** Graduação em Farmácia.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Avaliação molecular da alteração V30M no gene da transtirretina e o diagnóstico da polineuropatia amiloidótica familiar (PAF)
Orientador: Maria Luiza Saraiva-Pereira

Formação complementar

- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Escola Latino Americana de Genética Humana e Médic.
Rede Latino Americana de Genética Humana, RELAGH, Caxias, RS, Brasil.
Bolsista do(a): Rede Latino Americana de Genética Humana
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Sexologia Forense.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Aspectos Tecnológicos inseridos no ciclo produtivo.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Terapias avançadas - Terapias Gênicas e Celular e.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Prêmios e títulos

- 2007** Destaque do Salão de Iniciação Científica, UFRGS
- 2005** Destaque do Salão de Iniciação Científica, UFRGS

Produção bibliográfica**Artigos completos publicados em periódicos**

1. SEIXAS, ADRIANA, ESTRELA, ANDRÉIA B., CEOLATO, JULIANA C., PONTES, EMERSON G., LARA, FLÁVIO, GONDIM, KATIA C., TERMIGNONI, CARLOS
Localization and function of Rhipicephalus (Boophilus) microplus vitellin-degrading cysteine endopeptidase. Parasitology (London. Print). , p.1 - 13, 2010.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital, Home page: [doi:10.1017/s0031182010000624]

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Ceolato J.C., Vaccaro, T., Schwartz, I.V.D., Giugliani, R., Saraiva-Pereira, M. L.
DISTRIBUIÇÃO DE MUTAÇÕES COMUNS NO GENE DA PAH EM PACIENTES COM FENILCETONÚRIA In: 30 Semana científica do Hospital de Clínica de Porto Alegre, 2010, Porto Alegre.
Livro de resumos. , 2010.
2. Simon, L., Bock, H., Ceolato J.C., Fitarelli-Kiehl, M., Giugliani R., Vargas, P. R., Saraiva-Pereira, M. L.
IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES FREQUENTES PARA FENILCETONÚRIA E FIBROSE CÍSTICA POR PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS PROVENIENTES DA TRIAGEM NEONATAL. In: VI Congresso Brasileiro de Triagem Neonatal / XXII Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2010, Salvador, BA.
Livro de resumos. , 2010.
3. Simon, L., Bock, H., Ceolato J.C., Vaccaro, T., Giugliani, R., Vargas, P. R., Saraiva-Pereira, M. L.
IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES FREQUENTES NO GENE DA FENILALANINA HIDROXILASE POR PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS PROVENIENTES DA TRIAGEM NEONATAL In: XXI Salão de iniciação científica XVIII Feira de iniciação científica IV Salão Jovem, 2009. Porto Alegre, RS.
Livro de resumos. , 2009.
4. Ceolato J.C., Fitarelli-Kiehl, M., Saraiva-Pereira, M. L.
IDENTIFICATION OF P.V388M MUTATION IN THE PAH GENE IN PHENYLKETONURIA PATIENTS FROM SOUTH BRAZIL In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia, SP.
Livro de resumos. , 2009.
5. Ceolato J.C., Vaccaro, T., Furtado, G. V., Rodrigues, G. F., Fitarelli-Kiehl, M., Giugliani, R., Saraiva-Pereira, M. L.
INCIDÊNCIA DE MUTAÇÕES COMUNS NO GENE DA PAH EM PACIENTES COM FENILCETONÚRIA DO SUL DO BRASIL In: 29 Semana científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2009. Porto Alegre, RS.
Livro de resumos. , 2009.
6. Ceolato J.C., Kiss, A., Jardim L.B., Saraiva-Pereira, M. L.
AVALIAÇÃO MOLECULAR DA ALTERAÇÃO V30M NO GENE DA TRANSTIRRETINA E O DIAGNÓSTICO DA POLINEUROPATIA AMILOIDÓTICA FAMILIAR (PAF) In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA MÉDICA III CONGRESSO BRASILEIRO DE ENFERMAGEM EM GENÉTICA, 2008, Gramado, RS..
Livro de Resumos. , 2008.
7. Ceolato J.C., Seixas A., Estrela A., Teixeira, V. O. N., Termignoni, C.
A TRYPSIN INHIBITOR FROM RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS EGGS In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference., 2007, Salvador, BA.
Livro de Resumos. , 2007.
8. Teixeira, V. O. N., Estrela A., Ceolato J.C., Seixas A., Termignoni, C.
ATIVIDADE DE DEGRADAÇÃO DE IgG DO INTESTINO DE RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS In: XIX Salão de Iniciação Científica, 2007, Porto Alegre, RS..
Livro de Resumo. , 2007.
9. Estrela A., Seixas A., Ceolato J.C., Teixeira, V. O. N., Termignoni, C.
DIGESTIVE ENZYME ASSOCIATION IN CATTLE TICK RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS MIDGUT In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference., 2007, Salvador, BA..
Livro de Resumos. , 2007.
10. Ceolato J.C., Seixas A., Termignoni, C.
IDENTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE A VTDCE NA HEMOLINFA DE

RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS In: XIX Salão de Iniciação Científica, UFRGS., 2007, Porto Alegre, RS.

Livro de Resumos. , 2007.

11. Teixeira, V. O. N., Estrela A., Ceolato J.C., Seixas A., Termignoni, C.

IGG-DEGRADING ACTIVITY OF RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS MIDGUT In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference., 2007, Salvador, BA.

Livro de Resumos. , 2007.

12. Ceolato J.C., Seixas A., Termignoni, C.

A HEMOLINFA DO CARRAPATO BOVINO BOOPHILUS MICROPLUS TRANSPORTA A VTDCE (UMA CISTEÍNO ENDOPEPTIDASE) In: XXVII Concurso Acadêmico de Pesquisa Científica – CAPEC, XXXII Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos – SAEF., 2006, Porto Alegre.

Livro de Resumos. , 2006.

13. Ceolato J.C., Seixas A., Termignoni, C.

IDENTIFICAÇÃO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA EM OVOS DE RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS In: XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre, RS.

Livro de Resumos. , 2006.

14. Ceolato J.C., Estrela A., Seixas A., Termignoni, C.

THE ROLE OF BOOPHILUS MICROPLUS HEMOLYMPH IN VTDCE TRANSPORTATION In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006, Águas de Lindóia, SP.

Livro de resumos. , 2006.

15. Ceolato J.C., Seixas A., Termignoni, C.

A HEMOLINFA DO CARRAPATO BOVINO BOOPHILUS MICROPLUS TRANSPORTA A VTDCE (UMA CISTEÍNO ENDOPEPTIDASE) In: XVII Salão de Iniciação Científica, 2005, Porto Alegre, RS.

Livro de Resumos. , 2005.

16. Seixas A., Estrela A., Ceolato J.C., Termignoni, C.

BOOPHILUS MICROPLUS LARVAE CYSTEINE ENDOPEPTIDASE: AN IMPROVED PURIFICATION PROTOCOL In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Águas de Lindóia. SP.

Livro de resumos. , 2005.

17. Ceolato J.C., Seixas A., Termignoni, C.

CARACTERIZAÇÃO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DE OVOS DE B. MICROPLUS E SUA RELAÇÃO COM A VTDCE In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005, Porto Alegre, RS.

Livro de Resumos. , 2005.

Demais produções técnicas

1. Ceolato J.C. **Curso de Férias**, 2010. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Referências adicionais : Brasil/Português. 60 horas. Meio de divulgação: Vários

Atuação como monitora do curso, participando da organização de todo evento.