**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

LAYARA AKEMI ABIKO

**Estudo da dinâmica funcional dos domínios
regulatórios do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de *Drosophila*
melanogaster por Ressonância Magnética Nuclear
em Solução**

Versão corrigida da tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
10/02/2015

LAYARA AKEMI ABIKO

**Estudo da dinâmica funcional dos domínios
regulatórios do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de *Drosophila*
melanogaster por Ressonância Magnética Nuclear
em Solução**

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr . Roberto Kopke Salinas

Co-orientador: Prof. Dr . Ernani Abicht Basso

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Abiko, Layara Akemi
A148e Estudo da dinâmica funcional dos domínios regulatórios do
trocaador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de *Drosophila melanogaster* por ressonância
magnética nuclear em solução / Layara Akemi Abiko. -- São
Paulo 2015.
144p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Salinas, Roberto Kopke

1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear : Química
orgânica I. T. II. Salinas, Roberto Kopke, orientador.

547.129 CDD

**Aos meus três pilares de sustentação,
Meus pais, Clemar e Mario
e minha batiã, dona Maria
com todo amor do mundo**

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Clemar, por ter me incentivado desde muito cedo à leitura, pelo café nas madrugadas de estudo, por ter me ensinado a honrar meus compromissos e a ter fé em Deus, pelo amor incondicional.

Ao meu pai, Mario, por ter sido o abraço que me esperava no aeroporto a cada volta, sem exceção, por se preocupar com meu bem estar mais do que qualquer pessoa, pelo suco de laranja na cama, pelo amor incondicional.

Às minhas irmãs, Miriam e Priscila, que me apoiam em todas as circunstâncias e pela alegria e segurança que me trazem.

À minha batinha, dona Maria, por cuidar de mim com tanto carinho, por me ensinar sobre a bondade e a serenidade, meu exemplo de vida.

À todos das famílias Abiko e Sponchiado, minha família, apoio, incentivo e porto seguro.

Ao meu orientador, prof. Dr. Roberto Salinas, pelos ensinamentos, pela paciência, compreensão e presença constante no desenvolvimento desta tese.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Ernani Basso, por ter me proporcionado uma base científica sólida e por ter me apresentado à RMN.

Ao professor Dr. Rafael Brüsweiler e à Dra. Lei Bruschweiler-Li pelo auxílio constante ao longo do projeto e pelos experimentos realizados.

Aos professores Dr. Chuck Farah, Dr. Hernan Chaimovich, Dra. Iolanda

Cuccovia, e Dra. Flavia Meotti, por terem aberto as portas de seus laboratórios para mim e pelas discussões sempre muito produtivas.

Aos colegas de laboratório dos blocos 0 e 10, pelo companheirismo e por tornarem a rotina mais agradável. Ao Phelipe Vitale e a Pricila Hauk principalmente por terem me auxiliado nos experimentos de biologia molecular.

À Camila (Camilosa) e à Ilda, não só pelo auxílio no laboratório, mas principalmente pela amizade e pelo apoio em cada momento que precisei.

Ao Raphael Teixeira, por muitas vezes ter enxugado minhas lágrimas, e tantas outras ser o motivo do meu sorriso.

À Eliziane e à Bianca, minhas irmãs paulistanas, pelos conselhos, companheirismo e por cuidarem de mim.

Aos meus amigos maringaenses em São Paulo: Thaís, Leandro, Heitor e André (Tupã), por terem me acolhido nesta selva de pedra, Tayana (xuxu) e Tiago (borra), pela companhia agradável em todos os momentos e Denize, pelo auxílio no RMN e principalmente por ser uma irmã para mim.

Aos amigos maringaenses, Thiago (gordinho), Ulisses (Uli), Kelly, Amanda (morcega), Elizângela (lila) e Jamile (Jam) pela amizade e incentivo desde sempre.

Aos amigos de São Paulo, Gisele Souza, Tulio Rossi, Thiago Silveira, Silvinha Oliveira, Fernanda Nogales, Caterina Gruenwaldt, Marcus Prates e Joaquim (Joca): sobreviver nesta cidade seria impossível sem eles.

À central analítica do IQ-USP, por proporcionar a realização dos

experimentos de massas e de RMN.

À CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

À FAPESP (2011/08301-4) pela bolsa concedida durante meu primeiro ano de doutorado.

À FAPESP (2013/17883-2) por subsidiar o projeto de pesquisa.

*" Mas é preciso ter força
É preciso ter raça
É preciso ter gana sempre
Quem traz no corpo uma marca*

...

*Mas é preciso ter manha
É preciso ter graça
É preciso ter sonho sempre
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania
De ter fé na vida"*

(Milton Nascimento e Fernando Brant)

RESUMO

Abiko, L.A. **Estudo da dinâmica funcional dos domínios regulatórios do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de *Drosophila melanogaster* por Ressonância Magnética Nuclear em Solução**. 2015. 144p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) constitui um dos principais mecanismos de extrusão de Ca^{2+} intracelular em células excitáveis. Foi demonstrado que alterações no funcionamento do NCX estão relacionadas a diversas situações patológicas. Por este motivo, o entendimento do mecanismo molecular da manutenção da concentração de Ca^{2+} intracelular via NCX é importante para a compreensão do funcionamento do trocador, bem como para o desenvolvimento de fármacos.

Além de transportar Na^+ e Ca^{2+} , o NCX também é regulado por esses íons. Este trocador é composto por dois domínios transmembranares, cada um deles contendo 5 α -hélices (TM), e uma grande alça intracelular que conecta as hélices TM5 e TM6. O domínio transmembranar é responsável por catalisar o transporte de Na^+ e Ca^{2+} através da bicamada lipídica, enquanto que a alça citoplasmática está envolvida com a regulação do trocador. Esta alça contém dois domínios sensores de Ca^{2+} adjacentes, denominados CBD1 e CBD2.

Apesar da importância fisiológica do NCX, o mecanismo de regulação alostérica do trocador por Ca^{2+} intracelular permanece desconhecido. Neste trabalho, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de alta resolução foi utilizada para investigar a conformação e a dinâmica de CBD1 e CBD2 do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de *Drosophila melanogaster* (CALX), isolados ou conectados covalentemente em uma construção denominada CBD12. Um total de 98% das ressonâncias da cadeia principal de CBD1 isolado na presença de Ca^{2+} foi assinalado, enquanto que na ausência de Ca^{2+} , assinalamentos para apenas uma

parte da cadeia principal puderam ser obtidos. Os assinalamentos adquiridos para CBD12 foram baseados na análise de um conjunto de espectros de RMN tridimensional heteronuclear e por comparação com os espectros dos domínios isolados. Uma análise preliminar dos deslocamentos químicos e dos parâmetros de relaxação de ^{15}N obtidos para CBD1 indicou que este domínio é flexível na ausência de Ca^{2+} , mas torna-se rígido após a adição deste íon. As medidas das velocidades de relaxação de ^{15}N e de acoplamentos dipolares residuais (RDCs) de ^1H - ^{15}N realizadas para CBD12 nas formas apo e holo indicaram que a ligação de Ca^{2+} em CBD1 estabiliza uma orientação rígida entre os domínios. A análise dos RDCs de ^1H - ^{15}N mostrou ainda que a orientação média entre CBD1 e CBD2 é praticamente linear na ausência de Ca^{2+} , enquanto que um ângulo menor é assumido após a adição deste íon.

Os dados descritos nesta tese suportam um modelo de regulação alostérica em que a modulação da plasticidade de CBD12 pela ligação de Ca^{2+} no domínio CBD1 controla a abertura e o fechamento do trocador.

Palavras-chave: RMN em solução, Dinâmica de Proteínas, Trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Relaxação de ^{15}N , Acoplamentos Dipolares Residuais.

ABSTRACT

Abiko, L.A. **Functional Dynamics of the regulatory domains from the *Drosophila melanogaster*'s Na⁺/Ca²⁺ exchanger by Nuclear Magnetic Resonance in solution.** 2015. 144p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) is a major mechanism for the extrusion of intracellular Ca²⁺ in excitable cells. It was demonstrated that altered functioning of this protein is related to various pathological situations. Therefore, the understanding of the molecular mechanism for maintaining the intracellular Ca²⁺ concentration by means of the NCX is important to understand the functioning of the exchanger and to develop drug-based therapies.

Besides transporting Na⁺ and Ca²⁺, the exchanger is also regulated by these ions. The NCX is composed of two transmembrane domains, each of them containing 5 transmembrane alpha-helices (TM), and a very large cytosolic loop that connects TM5 to TM6. The transmembrane domains are responsible for catalyzing the transport of Na⁺ and Ca²⁺ ions across the lipid bilayer, while the cytosolic loop is involved in regulation of the exchanger activity. It contains two regulatory Ca²⁺-binding domains, called CBD1 and CBD2, that appear in tandem.

Despite the physiological importance of the NCX, the mechanism of allosteric regulation of the exchanger by intracellular calcium remains unclear. In this work we used high-resolution NMR spectroscopy to study the conformation and the dynamics of the two Ca²⁺-binding regulatory domains of *Drosophila*'s Na⁺/Ca²⁺ exchanger (CALX), CBD1 and CBD2, in isolation as well as in a covalent construct called CBD12. Complete backbone NMR resonance assignments were obtained for the isolated CBD1 domain in the Ca²⁺-bound state, while partial assignments were obtained for CBD1 in the free state. Partial backbone NMR resonance assignments

were obtained for the CBD12 construct through the analysis of a standard set of triple resonance NMR spectra. Additional assignments were obtained by comparison with the isolated CBD1 and CBD2 domains. A preliminary analysis of NMR chemical shifts and ^{15}N relaxation data obtained for CBD1 indicates that this domain displays considerable amount of flexibility in the free state, but becomes more rigid upon Ca^{2+} -binding. NMR ^{15}N relaxation rates and ^1H - ^{15}N residual dipolar couplings (RDCs) obtained for the Apo and Ca^{2+} -bound states of the CBD12 domain indicate that calcium binding stabilizes a rigid inter-domain orientation. Analysis of ^1H - ^{15}N RDCs further shows that *Drosophila*'s CBD12 domain assumes an almost linear inter-domain orientation in the absence of Ca^{2+} , while a smaller inter-domain angle was found in its presence. These findings support a model in which modulation of CBD12 plasticity by the binding of Ca^{2+} to the CBD1 domain controls the opening and closing of the exchanger.

Keywords: Solution NMR, Protein Dynamics, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, ^{15}N relaxation, Residual Dipolar Couplings.

SUMÁRIO

1) Introdução	15
1.1) Ressonância Magnética Nuclear de proteínas	15
1.1.1) Uma breve introdução sobre o fenômeno de RMN	16
1.1.2) O deslocamento químico (d)	20
1.1.3) O Acoplamento escalar (J)	21
1.1.4) O fenômeno da relaxação de spins (T_1 e T_2)	22
1.1.5) O experimento de ^1H - ^{15}N HSQC	27
1.1.6) Assinalamento das ressonâncias da cadeia principal	28
1.1.7) Acoplamento dipolar residual (RDC)	31
1.1.8) Medidas paramagnéticas em RMN (pseudocontact shifts - PCS e paramagnetic relaxation enhancement - PRE)	36
1.2) Proteínas trocadoras de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	39
1.2.1) Manutenção da concentração intracelular de Ca^{2+}	39
1.2.2) Por que o cálcio foi escolhido como mensageiro intracelular?	40
1.2.3) Trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)	41
1.2.4) O trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de <i>Drosophila melanogaster</i> (CALX)	44
1.2.5) Avanços estruturais	48
1.2.6) Mecanismo de regulação alostérica	51
2) Objetivos	58
3) Materiais e Métodos	59
3.1) Clonagem e expressão das proteínas de interesse	59
3.1.1) Reagentes	59
3.1.2) Desenho dos clones de CBD12, CBD1 e CBD2	59
3.1.3) Clonagem da isoforma 1.1 de CBD12	63
3.1.4) Clonagem dos mutantes de CBD12	65
3.1.5) Clonagem da isoforma 1.2 de CBD12	68
3.1.6) Clonagem dos domínios CBD1, CBD2-1.1 e CBD2-1.2	68
3.1.7) Otimização da expressão de CBD12	69
3.2) Análises por Espectrometria de Massas	72
3.3) Produção de amostras isotopicamente enriquecidas	73
3.4) Ensaio com a sonda paramagnética Cisteinil-fenil-triaminohexaacetato (Cys-Ph-TAHA)	76
3.5) Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear	77
3.5.1) Espectros de correlação ^1H - ^{15}N (HSQC)	78
3.5.2) Espectros de tripla ressonância	78
3.5.3) Medidas de velocidades de relaxação de ^{15}N	79
3.5.4) Medidas de coeficiente de difusão translacional	80
3.5.5) Preparo dos meios de alinhamento para medir RDCs	81
3.5.6) Medidas e análise de dados de RDCs	82
4) Resultados e discussões	85
Capítulo 1) CBD12-1.1	85
4.1) Assinalamento das cadeias polipeptídicas	87
4.2) Medidas de R_1 e R_2 de ^{15}N	93
4.3) Testes preliminares com a sonda paramagnética Cys-Ph-TAHA	97
4.4) Medidas de RDCs	104
4.5) Conclusão	113
Capítulo 2) CBD12-1.2	115
4.6) Análise dos experimentos de ^1H - ^{15}N HSQC	116

4.7) Experimentos realizados com CBD12-1.2 na presença de Ca^{2+}	120
4.8) Conclusão	121
Capítulo 3) Domínios isolados: CBD1 e CBD2	123
4.8) CBD1	123
4.9) CBD2	131
4.10) Conclusão	133
5) Conclusões	134
6) Bibliografia	136
Lista de Anexos	144

1) Introdução

1.1) Ressonância Magnética Nuclear de proteínas

Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é a única técnica espectroscópica capaz de resolver a estrutura de macromoléculas biológicas em solução e com resolução atômica. O uso de RMN para determinar a estrutura de proteínas em solução está ao mesmo tempo bem estabelecido, e em pleno desenvolvimento. RMN também fornece informações detalhadas acerca dos movimentos internos de macromoléculas (dinâmica) em diferentes escalas de tempo, e é extremamente poderosa para o estudo de aspectos termodinâmicos, cinéticos e conformacionais de interações entre proteínas ou entre proteínas e outras moléculas como ácidos nucleicos, açúcares, ou metabólitos (Wüthrich 2003). Nos experimentos de RMN em solução, condições como temperatura, pH e concentração de sal podem ser ajustadas para mimetizar o ambiente fisiológico no qual as proteínas exercem suas funções e, da mesma forma, também podem ser alteradas para condições extremas a fim de estudar, por exemplo, o processo de desnaturação. Todas estas características fazem da RMN uma técnica excepcionalmente adequada para investigar a interação entre estrutura, dinâmica e função de macromoléculas.

1.1.1) Uma breve introdução sobre o fenômeno de RMN

RMN baseia-se na detecção de transições de energia entre estados do spin nuclear na presença de um campo magnético externo. A presença de uma carga líquida positiva e de um momento angular de spin diferente de zero faz com que o núcleo atômico possua momento magnético, μ , e comporte-se de forma análoga a um pequeno dipolo magnético (Cavanagh 2007). Dipolos magnéticos, quando colocados na presença de um campo magnético externo ($\mathbf{B}=(0,0,B)$), interagem com este campo. A energia de interação entre um dipolo magnético e o campo externo é dada pelo produto escalar entre μ e $\mathbf{B}$:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}, \quad (1)$$

Núcleos que apresentam número quântico de spin (I) $1/2$ (por exemplo ^{13}C , ^{15}N , ^1H), assumem dois estados de energia ($S=2I+1$) (**Equação 2**), conhecidos como α ($m=+1/2$) e β ($m=-1/2$), e cujas energias na presença de $\mathbf{B}$ dependem da orientação do momento magnético μ em relação ao campo magnético (**Figura 1**):

$$E_{\alpha} = -\frac{1}{2}\hbar\gamma B; E_{\beta} = +\frac{1}{2}\hbar\gamma B, \quad (2)$$

onde γ é a razão giromagnética, uma constante de proporcionalidade entre o momento magnético e o momento angular de spin, característica de cada núcleo, e $\hbar$ é a constante de Planck reduzida. Núcleos que não apresentam spin (possuem número de massa e número atômico pares) como o ^{12}C , não são ativos na RMN. Enquanto que núcleos com número quântico de spin maior que $1/2$, como por exemplo o isótopo mais abundante do nitrogênio (^{14}N ,

spin=1), apresentam mais de dois estados de energia e, conseqüentemente, espectros de RMN mais complexos.

Figura 1. Representação dos estados de baixa energia (α) e alta energia (β) resultantes do acoplamento entre um núcleo de spin $\frac{1}{2}$ e o campo magnético externo **B**.

As considerações feitas acima para um spin na presença de um campo magnético externo são válidas para um conjunto de spins (*ensemble*). Neste caso, a presença do campo magnético externo, **B**, induz a formação de um pequeno excesso de spins no estado de menor energia, o qual pode ser representado por um vetor magnetização **M**, que é formado após o equilíbrio térmico ser estabelecido na presença de **B** (**Figura 2**).

Figura 2. Representação de um conjunto de spins na presença de um campo magnético **B**, após o estabelecimento do equilíbrio térmico. A seta cinza representa o vetor magnetização resultante. Retirado de (Levitt 2001).

O grau de polarização é proporcional à diferença de energia entre os estados α e β que por sua vez, é diretamente proporcional à razão giromagnética (γ) e à magnitude do campo externo (**Equação 3 e Figura 3**).

Esta diferença de energia, quando expressa em unidades de frequência, corresponde à frequência de ressonância do núcleo, ω_0 , também conhecida como frequência de precessão ou frequência de Larmor:

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \hbar \gamma B$$

$$\frac{\Delta E}{\hbar} = \gamma B = \omega_0, \quad (3)$$

Figura 3. Efeito Zeeman: dependência da diferença de energia (ΔE) dos estados α e β com a intensidade do campo magnético externo $\mathbf{B}$.

A energia de acoplamento entre o momento magnético nuclear e o campo externo é muito pequena quando comparada à energia térmica. Por exemplo, a diferença de energia magnética entre as duas orientações do momento magnético do núcleo de hidrogênio em um campo de 11,74 T é $3,3 \times 10^{-25}$ J, enquanto que a energia térmica a temperatura ambiente é $k_B T = 4,1 \times 10^{-21}$ J, em que k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura (Levitt 2001). Esta comparação demonstra que a polarização dos spins nucleares é um efeito de magnitude muito pequena e por isso difícil de detectar. Por este motivo a técnica de RMN é pouco sensível quando comparada a outras técnicas espectroscópicas, e exige maior quantidade de amostra (concentrações da ordem de 0,2 a 1 mM de proteínas). A baixa sensibilidade da RMN, aliado ao interesse em realizar estudos estruturais de

amostras biológicas que quase sempre são obtidas em baixas concentrações, é um dos principais estímulos ao desenvolvimento de magnetos supercondutores cada vez mais potentes. O maior campo magnético obtido em instrumentos comerciais atualmente é de 23,5T, onde um núcleo de ^1H apresenta uma frequência de Larmor de 1000 MHz.

Para que ocorram transições de energia entre o estado de menor energia para o estado de maior energia é necessário a aplicação de pulsos de radiofrequência (r.f., da ordem de MHz), cuja frequência depende do núcleo a ser excitado (razão giromagnética) e da intensidade do campo magnético **B**. Este pulso perturba o estado de equilíbrio, e quando é interrompido, o sistema retorna ao estado estacionário por um processo denominado relaxação, dissipando a radiação eletromagnética absorvida para os spins vizinhos (emissão induzida).

Do ponto de vista clássico, o estado de equilíbrio corresponde ao vetor magnetização estático, paralelo ao campo **B** e portanto paralelo ao eixo “z” do laboratório (**Figura 4a**). O pulso de radiofrequência, que corresponde a um campo magnético oscilante aplicado perpendicularmente a **B**, tem o efeito de retirar **M** de sua posição de equilíbrio trazendo-o para o plano xy (**Figura 4b**). Desligado o pulso, **M** retorna à posição de equilíbrio fazendo um movimento de precessão ao redor do campo **B** com frequência ω_0 (**Figura 4c**). Este movimento induz uma corrente oscilatória nas bobinas de detecção conhecida como decaimento livre de indução (FID, “free induction decay”), e que corresponde ao sinal de RMN (**Figura 4d**).

No caso de uma molécula, cada núcleo excitado emite uma frequência distinta, simultaneamente. O FID contém todas estas frequências. Este sinal

é adquirido em domínio temporal, e a aplicação da transformada de Fourier decodifica o sinal oscilatório nas frequências de precessão dando origem aos sinais típicos de RMN (domínio de frequências) (**Figura 4e**).

Figura 4. Experimento de um pulso de radiofrequência. No estado de equilíbrio o vetor magnetização $\mathbf{M}$ é paralelo ao campo magnético externo $\mathbf{B}$ e, portanto, paralelo ao eixo z do laboratório (a). Após um pulso de r.f., o vetor $\mathbf{M}$ é retirado da posição de equilíbrio e levado ao plano x-y (b). Quando o pulso é desligado, a magnetização tende a retornar ao estado de equilíbrio em movimento de precessão (c), induzindo a formação de correntes elétricas nas bobinas de detecção (FID) (d). A aplicação da transformada de Fourier sobre o FID gera um sinal no domínio de frequências, típico dos experimentos de RMN (e). Figura retirada de (Levitt 2001).

1.1.2) O deslocamento químico (δ)

Os spins sentem campos magnéticos locais ligeiramente diferentes de $\mathbf{B}$. Este efeito é devido à conformação e à estrutura química da molécula que modificam a distribuição eletrônica local. O campo magnético externo induz movimentos dos elétrons nas nuvens eletrônicas locais levando ao surgimento de campos magnéticos induzidos que são orientados na direção oposta ao campo externo. O campo magnético resultante corresponde à

soma do campo magnético externo e do campo magnético induzido. Dessa forma os diferentes spins nucleares em uma molécula apresentam frequências de ressonância ligeiramente diferentes de acordo com a conformação e a estrutura química. Este fenômeno dá origem ao deslocamento químico, o qual fornece informações muito importantes a respeito da estrutura molecular, conformação e estereoquímica.

A fim de comparar medidas realizadas em campos magnéticos diferentes, as frequências de ressonância são geralmente expressas na forma de deslocamentos em relação a uma frequência de referência. O deslocamento químico é expresso em unidades de *partes por milhão*, ou ppm:

$$\delta = \frac{\omega_0 - \omega_{rf}}{\omega_{rf}} \times 10^6, \quad (4)$$

onde ω_0 é a frequência de ressonância do spin nuclear em questão e ω_{rf} é a frequência de referência.

1.1.3) O Acoplamento escalar (J)

O aspecto de um espectro de RMN é influenciado não apenas pela separação dos sinais devido aos deslocamentos químicos, mas também pelos desdobramentos provocados pelo acoplamento escalar (J) e pelas propriedades de relaxação dos spins em questão, as quais serão discutidas separadamente.

O acoplamento escalar (J) é um efeito de origem quântica que surge devido a uma interação entre dois spins, I e S, que estão a poucas ligações químicas de distância um do outro (Rule e Hitchens 2006). Dessa forma a

transição de energia do spin I será desdobrada em duas, cujas frequências dependem do fato de o spin S encontrar-se no estado α ou β . O mesmo desdobramento é observado para as transições do spin S (**Figura 5**). A diferença de frequência entre as duas linhas é chamada de *constante de acoplamento escalar*, J. Esta constante permite inferir a conectividade entre núcleos via ligações químicas. A magnitude de J é independente do campo magnético externo, mas depende da natureza dos núcleos envolvidos, do número de ligações que os separam, além do ângulo entre estas ligações. A presença deste acoplamento dá origem a multipletos no espectro.

Figura 5. O Acoplamento escalar. As possíveis transições de energia para dois spins nucleares acoplados (esquerda) e o padrão de separação de linhas para este acoplamento (direita).

1.1.4) O fenômeno da relaxação de spins (T_1 e T_2)

O mecanismo pelo qual a magnetização retorna ao estado de equilíbrio após ser perturbada por um pulso de radiofrequência é chamado *relaxação*. Em RMN, o processo de relaxação é lento quando comparado a outras técnicas espectroscópicas. Por exemplo, o estado eletrônico excitado possui um tempo de vida da ordem de nanossegundos (na fluorescência), enquanto que o estado de equilíbrio em RMN pode levar de milissegundos a

segundos para se estabelecer. É este fato que faz com que seja possível gerar, manipular e observar a magnetização transversal, gerando espectros com alta resolução. Existem dois processos independentes de relaxação em RMN: a *relaxação da magnetização longitudinal*, que ocorre com uma constante de tempo característica conhecida como T_1 , e a *relaxação da magnetização transversal*, a qual corresponde à constante de tempo característica denominada T_2 . Estes dois parâmetros são extremamente importantes em RMN, e dependem do tamanho da molécula na forma do tempo de correlação rotacional (**Figura 6**).

Figura 6. Dependência dos tempos de relaxação da magnetização longitudinal (T_1 , vermelho) e transversal (T_2 , azul) com o tempo de correlação rotacional (τ_c).

A relaxação da magnetização longitudinal é o processo pelo qual os spins retornam para o equilíbrio térmico por meio da redistribuição das populações dos estados do spin nuclear. Sob o ponto de vista vetorial, T_1 é responsável pela regeneração do vetor magnetização resultante ao longo do eixo z, paralelo a **B** reestabelecendo o equilíbrio de Boltzmann (**Figura 7A**). O tempo T_1 é de extrema importância porque ele limita o tempo mínimo o qual é preciso esperar para repetir os experimentos de modo que não ocorra perda de intensidade de sinal.

Em contrapartida, a relaxação transversal corresponde ao desaparecimento da magnetização no plano transversal pela defasagem da magnetização neste plano (perda de coerência de **M** no plano xy) (**Figura 7B**). Desta forma, T_2 define o tempo de aquisição do FID. Mais importante, a largura dos sinais de RMN é diretamente proporcional a $1/T_2$. Moléculas grandes possuem T_2 muito curto (**Figura 6**) e, portanto, linhas alargadas até o limite em que o sinal não pode mais ser detectado (Rule e Hitchens 2006). Este fenômeno explica porque é difícil estudar proteínas grandes por RMN em solução

A)

B)

Figura 7. Representação vetorial dos processos de relaxação longitudinal (A) e transversal (B) do spin nuclear. Figura retirada de (Claridge 1999)

Ambos os processos de relaxação ocorrem devido à existência de campos magnéticos locais, que variam randomicamente em magnitude e direção à medida que a molécula se reorienta em solução. Esta variação do campo magnético deve ocorrer em frequência apropriada para que leve a

transições entre estados de spins. A flutuação dos campos magnéticos locais em função do tempo é gerada por dois mecanismos principais para $I=1/2$: a anisotropia do deslocamento químico do spin e o acoplamento dipolar entre spins próximos. A anisotropia do deslocamento químico depende do núcleo em questão e é resultante da distribuição não uniforme de elétrons em torno dele. Uma vez que os elétrons blindam o núcleo do campo magnético externo, atenuando o campo efetivo, uma densidade eletrônica anisotrópica faz com que o campo magnético efetivo dependa da orientação da molécula com relação a **B** e, portanto, flutue conforme a molécula se movimenta em solução (**Figura 8**).

O acoplamento dipolar será discutido em maiores detalhes na seção sobre *acoplamentos dipolares residuais* (1.1.7). De maneira sucinta, o acoplamento dipolar resulta da interação entre o campo magnético gerado por um núcleo com o campo magnético gerado por outro núcleo próximo via espaço. Essa interação depende da orientação e da distância entre os dois núcleos e se essas propriedades variam com o tempo, o campo magnético efetivo nos núcleos também sofrerá variações (**Figura 9**).

A relaxação de spins de ^{15}N em proteínas é dominada pela interação dipolar com o ^1H ao qual ele está ligado covalentemente, e pela anisotropia do deslocamento químico do ^{15}N .

Figura 8. Representação esquemática da anisotropia do deslocamento químico. O campo magnético efetivo (B_{ef}) no núcleo I depende da sua orientação em relação ao campo magnético estático, B , devido à distribuição eletrônica não uniforme.

Figura 9. Representação esquemática do acoplamento dipolar entre dois spins I e S . B é o vetor que representa o campo magnético externo, r_{IS} a distância inter-nuclear e θ o ângulo entre esses dois vetores.

Os tempos de relaxação (T_1 e T_2) dependem não apenas do tombamento global da molécula mas também da dinâmica interna, ou seja, dos movimentos internos que a molécula experimenta em escalas de tempo mais rápidas. Dessa forma, medidas de parâmetros de relaxação de RMN

podem ser utilizadas para obter informações movimento, constituindo uma ferramenta ideal para explorar o ambiente químico dos núcleos bem como a natureza dos movimentos que as proteínas experimentam.

1.1.5) O experimento de ^1H - ^{15}N HSQC

O ^{15}N -HSQC (*heteronuclear single quantum correlation*) é um espectro bidimensional que contém os sinais dos hidrogênios HNs separados em uma segunda dimensão correspondente à frequência de ^{15}N (**Figura 10**). Assim, cada pico no espectro de ^{15}N -HSQC possui duas frequências, a do hidrogênio ^1HN e a frequência do núcleo de ^{15}N ao qual ele está diretamente ligado. Portanto, o espectro de ^{15}N -HSQC apresentará um pico para cada grupo HN presente na proteína, ou seja, um pico para cada aminoácido com exceção da prolina, e um pico para cada grupo NH presente nas cadeias laterais de Asp, Asn, Arg, Lys, His e Trp.

Figura 10. Espectro 2D de ^1H - ^{15}N HSQC do domínio CBD2 do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de *Drosophila melanogaster*.

O espectro de ^1H - ^{15}N HSQC é considerado a impressão digital de uma proteína. A qualidade do espectro permite avaliar a adequação da amostra para estudos estruturais por RMN em solução. Um dos pré-requisitos para uma boa amostra é apresentar dispersão de deslocamentos químicos. A boa dispersão dos picos ao longo da dimensão do hidrogênio (^1H) é a primeira indicação de que a proteína está bem enovelada. Proteínas desenoveladas apresentam picos de correlação ^1H - ^{15}N agrupados em torno de 8 ppm na dimensão de ^1H , como se o espectro correspondesse à soma dos picos dos aminoácidos constituintes da cadeia polipeptídica da proteína. A estrutura terciária das proteínas gera diversidade no ambiente eletrônico local de cada resíduo de aminoácido, o que aumenta a diferenciação dos deslocamentos químicos de resíduos que possuem cadeias laterais idênticas.

O segundo pré-requisito para uma boa amostra é que todos os picos esperados devem ser observados no espectro de ^1H - ^{15}N HSQC. A ausência de picos para alguns aminoácidos, em geral, indica a presença de equilíbrio conformacional em escala de tempo próxima à coalescência. Neste caso, parâmetros como temperatura, pH e condições do tampão podem ser variados com o objetivo de estabilizar a estrutura e observar o número de picos esperado no espectro.

1.1.6) Assinalamento das ressonâncias da cadeia principal

A informação mais importante para a caracterização estrutural e dinâmica de uma proteína por RMN inicia-se com a identificação dos picos no espectro de ^1H - ^{15}N HSQC. Esta é a primeira etapa para o estudo de qualquer propriedade da proteína por RMN. A atribuição das ressonâncias dos átomos

da cadeia principal costuma ser realizada através da análise de espectros multidimensionais heteronucleares. Os experimentos principais são HNCO e HN(CA)CO, HNCA e HN(CO)CA, HNCACB e CBCA(CO)NH tridimensionais, cujas dimensões correspondem às frequências de ^1H , ^{13}C e ^{15}N . A aquisição destes espectros requer uma amostra duplamente enriquecida com ^{15}N e ^{13}C .

A nomenclatura adotada para os experimentos de tripla ressonância indica os núcleos cujas frequências serão correlacionadas no espectro e o caminho da transferência de magnetização entre os diferentes núcleos. O HNCO, por exemplo, inicia-se com a excitação de ^1H , em seguida, a magnetização é transferida para o ^{15}N via acoplamento escalar ($^1J_{\text{HN}}$), e posteriormente para o spin ^{13}CO do aminoácido anterior via acoplamento escalar ($^1J_{\text{NCO}}$) (**Figura 11**). O resultado é um espectro tridimensional, cujas dimensões correspondem aos deslocamentos químicos de ^1HN e ^{15}N de um aminoácido e ^{13}CO do aminoácido vizinho. Os spins listados entre parêntesis não correspondem a uma dimensão de frequência, mas são utilizados para transferir magnetização entre diferentes spins. Por exemplo, o espectro de HN(CA)CO contém correlações entre os spins ^1HN , ^{15}N de um aminoácido e ^{13}CO dele mesmo (i) e do aminoácido vizinho (i-1). O spin de $^{13}\text{C}\alpha$ (CA) é mostrado entre parêntesis porque ele é utilizado para transferir magnetização do spin de ^{15}N para o spin de ^{13}CO do aminoácido anterior, sendo que a frequência do spin de $^{13}\text{C}\alpha$ não aparece no espectro. A Análise do HN(CA)CO em conjunto com o HNCO permite identificar as ressonâncias do grupo ^{13}CO de cada aminoácido e, muitas vezes, também do seu vizinho anterior (**Figura 11**). Dessa forma é possível encontrar correlações

sequenciais ao longo de toda a cadeia polipeptídica até a presença de uma prolina.

Figura 11. Representação esquemática dos experimentos HNCO e HN(CA)CO. O caminho de transferência da magnetização está indicado em azul para o HN(CA)CO e em vermelho para o HNCO (esquerda). Planos dos espectros de HNCO e HN(CA)CO correspondentes à frequência $\omega_{15N} = 116.79$ ppm em ω_3 estão sobrepostos à direita. Os picos devido às carbonilas dos aminoácidos “*i*” e seus vizinhos estão indicados.

Ainda que sequências de picos 1H - ^{15}N HSQC correspondentes a aminoácidos adjacentes tenham sido identificadas pelo procedimento descrito acima, é difícil conectar esta informação à sequência de aminoácidos da proteína. Esta conexão pode ser estabelecida conhecendo-se o tipo de aminoácido para cada pico no espectro 1H - ^{15}N HSQC. Deslocamentos químicos de $^{13}C_\alpha$ e $^{13}C_\beta$ são característicos para cada aminoácido e, portanto, muito úteis neste processo de identificação. Esta informação pode ser obtida por meio da análise conjunta dos experimentos CBCA(CO)NH e HNCACB, os quais permitem conectar os assinalamentos existentes para a cadeia principal com as ressonâncias do $^{13}C_\beta$ da cadeia lateral de um aminoácido e seu vizinho, e também dos experimentos HNCA e HN(CO)CA,

que de maneira análoga, permitem identificar as ressonâncias dos $^{13}\text{C}\alpha$ ao longo da cadeia polipeptídica.

1.1.7) *Acoplamento dipolar residual (RDC)*

Conforme mencionado anteriormente, o acoplamento escalar mediado por ligações químicas fornece informações conformacionais valiosas, e é a base da transferência de magnetização utilizada em experimentos de tripla ressonância. Além do acoplamento escalar existe outra forma de acoplamento, que ocorre via espaço, e que também é uma fonte de informação estrutural muito importante, o acoplamento dipolar (D).

O acoplamento dipolar ocorre quando o campo magnético gerado por um determinado núcleo (I) interage com o campo magnético gerado por outro núcleo (S) que está próximo não necessariamente via ligações, mas no espaço. A magnitude deste tipo de acoplamento depende dos núcleos envolvidos (γ_I e γ_S), da distância entre eles (r_{IS}) e do ângulo θ entre o vetor internuclear e o campo magnético externo, conforme descrito pela **equação 5** na qual a notação de “bra-ket” refere-se à média sobre o *ensemble*:

$$D \propto \langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle \quad (5)$$

No estudo de proteínas, o acoplamento dipolar pode, em princípio, ser utilizado para determinar distâncias entre resíduos e para estudar a orientação de vetores internucleares com relação a **B**. No caso de proteínas com mais de um domínio este tipo de informação é crucial para avaliar a orientação entre os domínios, e até mesmo a flexibilidade entre eles (Tolman 2001; Fushman et al. 2004). Neste tipo de estudo, no qual são utilizados vetores ^1H - ^{15}N de ligações peptídicas, r_{IS} possui um valor fixo (1,08 Å) e,

portanto, a dependência da distância internuclear é inexistente (Rule e Hitchens 2006).

Em uma solução isotrópica, em que as moléculas tombam aleatoriamente em todas as direções, θ pode assumir qualquer valor, e o acoplamento dipolar resultante é zero. Em contrapartida, considerando um dipolo ^1H - ^{15}N com uma orientação fixa e o valor máximo de $\cos\theta$, o valor do desdobramento das linhas espectrais devido ao acoplamento dipolar poderia chegar a 21,7 kHz, inviabilizando a análise do espectro (Rule e Hitchens 2006). Portanto, para que o espectro mantenha as características de linhas de alta resolução, é necessário uma orientação residual das moléculas, em que somente ~ 1 a cada 10000 delas estejam em uma orientação preferencial, para que desdobramentos ideais da ordem de ~ 10 a 20 Hz. Deste modo, o espectro resultante ainda é simples, e os acoplamentos dipolares podem ser medidos através da diferença entre a separação das linhas do duplete de ^{15}N em espectros de ^1H - ^{15}N HSQC (sem desacoplamento em ω_1) da amostra isotrópica e parcialmente alinhada. No espectro de ^1H - ^{15}N HSQC da amostra anisotrópica, o desdobramento das linhas corresponde a $J+D$ (**Figura 12**). Outra forma para calcular D_{NH} é adquirir um par de espectros ^1H - ^{15}N HSQC e ^1H - ^{15}N TROSY para condição isotrópica e outro par para a condição anisotrópica. Neste caso, ao invés de obter valores de J e $J+D$, obtém-se $\frac{1}{2} J$ e $\frac{1}{2} (J+D)$ para as condições isotrópica e anisotrópica, respectivamente.

Figura 12. Espectro ^1H - ^{15}N HSQC de uma amostra isotrópica (b) com respectivos $J(^1\text{H}$ - $^{15}\text{N})$ e o espectro ^1H - ^{15}N HSQC correspondente à mesma amostra na presença de um meio de alinhamento (a). Neste último caso a separação dos picos corresponde a $J+D$. Figura retirada de (Nico Tjandra 2013).

O alinhamento residual pode ser obtido na presença de bicelas, bacteriófagos (Pf1), fases nemáticas, géis de poliacrilamida ou através da introdução de um centro paramagnético (N. Tjandra e Bax 1997; Hansen, Mueller, e Pardi 1998; Sass et al. 2000; Peters et al. 2011). Na maioria dos meios de alinhamento, a orientação das moléculas se dá por restrição espacial (bicelas, bacteriófagos, fases nemáticas e géis de poliacrilamida). No caso do uso de bacteriófagos (Pf1), a superfície deste vírus é carregada negativamente e, conseqüentemente, o alinhamento das proteínas pode ocorrer também por interação eletrostática com regiões positivamente carregadas. Já a orientação de proteínas por meio de sondas paramagnéticas complexadas com metais lantanídeos é reflexo do

alinhamento parcial da sonda com relação ao campo magnético externo devido à anisotropia de susceptibilidade magnética do metal.

Os RDCs contém informações orientacionais na forma do ângulo θ entre o vetor internuclear ^1H - ^{15}N e o campo magnético externo. O uso de RDCs para a obtenção de informações estruturais requer a determinação da matriz de ordem, também chamada de tensor de alinhamento. O cálculo deste tensor pode ser realizado conhecendo-se as coordenadas da estrutura, de modo que valores dos componentes principais do tensor de alinhamento (A_{xx} , A_{yy} e A_{zz}) e a sua orientação (**Figura 13**) são randomizados até que RDCs calculados de acordo com a **equação 6** estejam de acordo com as medidas experimentais:

$$D(\theta, \phi) = -\frac{\gamma_I \gamma_S \mu_0 \hbar}{8\pi^3 r_{IS}^3} S (A_{zz} \cos^2 \theta + A_{xx} \sin^2 \theta \cos^2 \phi + A_{yy} \sin^2 \theta \sin^2 \phi), \quad (6)$$

$$|A_{xx}| \leq |A_{yy}| \leq |A_{zz}|$$

Figura 13. Representação dos ângulos θ e ϕ que orientam o vetor internuclear ^1H - ^{15}N (r_{IS}) em relação ao tensor de alinhamento. O parâmetro S reflete a influência da dinâmica interna sobre o valor do acoplamento dipolar, enquanto que γ , μ_0 e $\hbar$ são, respectivamente, a razão giromagnética dos núcleos I ou S , a permeabilidade magnética do vácuo e a constante de Planck.

Dados de RDCs são utilizados para obter a orientação entre domínios em proteínas da seguinte forma (**Figura 14**): a orientação e a magnitude dos componentes principais do tensor de alinhamento é determinada para cada

domínio separadamente, utilizando as medidas de RDCs obtidas para a proteína completa e as coordenadas cristalográficas de cada domínio. Esta orientação é caracterizada por três ângulos (ângulos de Euler, α, β, γ) que orientam os eixos do tensor de alinhamento com relação aos eixos do sistema de referências da molécula (coordenadas do PDB). Em seguida, as coordenadas de cada domínio são rotacionadas de modo que o sistema de referências da molécula e o tensor de alinhamento tornem-se coaxiais, resultando na orientação entre os domínios (Fushman et al. 2004). Esta abordagem assume que esta orientação é rígida, caso contrário, obtém-se a orientação média sobre o *ensemble* e o tempo. Como os RDCs são invariantes a rotações de 180° ao redor dos eixos do tensor de alinhamento, este cálculo gera quatro orientações simétricas, algumas das quais poderão ser eliminadas por gerarem estruturas que apresentam sobreposição de átomos.

Figura 14. Ilustração do processo de alinhamento de domínios em um sistema multi-domínios baseado na orientação de tensores de difusão ou de alinhamento para cada domínio. Retirado de (Fushman et al. 2004)

1.1.8) Medidas paramagnéticas em RMN (*pseudocontact shifts* - PCS e *paramagnetic relaxation enhancement* - PRE)

Informações estruturais valiosas podem ser obtidas explorando efeitos paramagnéticos em RMN como por exemplo PRE (*Paramagnetic Relaxation Enhancement*) e PCS (*Pseudocontact Shifts*) (I Bertini e Luchinat 1999; Rodriguez-Castañeda et al. 2006; Pintacuda et al. 2007). Estes efeitos manifestam-se como um aumento da taxa de relaxação (no caso de PRE) ou alterações do deslocamento químico (no caso de PCS) devido à presença de um centro paramagnético, usualmente um íon lantanídeo (**Figura 15**). Essas medidas são feitas adquirindo um par de espectros ^1H - ^{15}N HSQC (um da amostra diamagnética e outro da amostra paramagnética) e medindo a diferença de deslocamento químico no caso de PCS ou de velocidade de relaxação para PRE.

Esses dois efeitos fornecem informações sobre distâncias de longo alcance (geralmente até 40 Å) que são muito úteis para refinar a estrutura de uma proteína e para auxiliar a estabelecer a orientação entre domínios no caso de proteínas multi-domínios (Su e Otting 2010).

Figura 15. Representação esquemática dos efeitos de *pseudocontact shift* (PCS, a esquerda) e *paramagnetic relaxation enhancement* (PRE, a direita). “dia” refere-se ao espectro diamagnético e “para” ao espectro paramagnético. Figura retirada de (Carlomagno 2012).

Proteínas raramente ligam metais lantanídeos especificamente, portanto a obtenção dos dados de PCS ou PRE depende de marcação sítio-

específica com reagentes quelantes de lantanídeos (Keizers e Ubbink 2011; Su e Otting 2010). Neste sentido estudos recentes têm focado o planejamento e a síntese de sondas que na maioria das vezes são conectadas a proteínas através de uma ou duas ligações dissulfeto (Man et al. 2010; Jia, Maleckis, et al. 2011; Graham et al. 2011; Jia, Yagi, et al. 2011; Q.-F. Li et al. 2012). O critério para a escolha da sonda mais adequada pode ser a afinidade com os metais lantanídeos ou o grau de homogeneidade estereoquímico de forma que ocorra apenas uma única conformação, o que simplifica a interpretação dos dados de RMN. Tipos diferentes de sondas têm sido propostos, as principais são derivadas do ácido dipicolínico (DPA) (Jia, Maleckis, et al. 2011; Man et al. 2010; Su et al. 2008), do reagente de contraste DOTA (Woods et al. 2005; Keizers et al. 2007; Häussinger, Huang, e Grzesiek 2009; Graham et al. 2011), do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Peters et al. 2011) e de ácido iminodiacético (IDA) (Swarbrick et al. 2011) (**Tabela 1**). Um exemplo é a sonda Cys-Ph-TAHA utilizada neste trabalho (**Tabela 1**).

Tabela 1. Sondas derivadas do ácido dipicolínico (DPA), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e do ácido iminodiacético (IDA).

Nome	Estrutura	Nome	Estrutura
CLaNP-5.2		4MMDPA
(R)-M8-SPy		L1
DOTAMPh		Cys-Ph-TAHA

1.2) Proteínas trocadoras de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

1.2.1) *Manutenção da concentração intracelular de Ca^{2+}*

O Ca^{2+} intracelular possui um importante papel como sinalizador em diversos processos bioquímicos (Berridge, Lipp, e Bootman 2000). A grande diferença de concentração de Ca^{2+} intra e extracelular (da ordem de milimolar nos reservatórios extracelulares e de submicromolar dentro das células) resulta em uma força eletroquímica que é conveniente para o papel de cálcio como regulador intracelular, uma vez que mesmo pequenas mudanças na permeabilidade da membrana plasmática a estes íons, induzidas por estímulos fisiológicos, são capazes de produzir flutuações significativas na concentração de Ca^{2+} citosólico (Carafoli 1987).

Outra vantagem da baixa concentração de Ca^{2+} intracelular (sub-micromolar) é permitir o uso de combustíveis metabólicos que contém fóstato. Como compostos fosforilados são continuamente degradados para liberar energia, e ressintetizados para armazená-la, sempre existe uma alta concentração de fóstato inorgânico no interior da célula, o que seria incompatível com uma alta concentração de Ca^{2+} .

Uma vez que o cálcio não pode ser metabolizado, o controle da sua concentração dentro da célula requer um mecanismo diferente. Uma possibilidade é a formação de complexos reversíveis com ligantes específicos. Neste caso o ligante deve ter grande especificidade, pois deve ser seletivo a Ca^{2+} em detrimento de outros íons que se encontram em concentrações muito maiores no interior da célula. Uma interação tão

específica requer alta complexidade estrutural, o que é uma característica das proteínas.

Existem duas classes de proteínas que ligam Ca^{2+} : as proteínas solúveis (citosólicas) e as proteínas de membrana. Estas duas classes de proteínas contribuem para manter a homeostase de Ca^{2+} intracelular, mas a quantidade de Ca^{2+} que pode ser transportada por proteínas solúveis é limitada pela quantidade de proteína disponível, enquanto que no caso das proteínas de membrana, os íons são complexados e transportados de modo que a proteína sempre retorna intacta para um novo ciclo de transporte. Por este motivo, considera-se que o movimento de Ca^{2+} através das membranas é o meio mais eficiente de regular a concentração deste íon nas células.

1.2.2) Por que o cálcio foi escolhido como mensageiro intracelular?

Uma explicação plausível é a necessidade do mensageiro ligar forte e especificamente ao seu receptor. Na^+ , K^+ e os demais íons monovalentes não seriam ideais já que devido ao raio iônico grande e à pouca carga que possuem, costumam formar complexos fracos com proteínas (Carafoli 1987). Ânions poliatômicos grandes como fosfato e bicarbonato também seriam incompatíveis pois demandariam um arranjo entropicamente desfavorável de muitas cadeias laterais de carga positiva.

O Mg^{2+} é muito menor do que o Ca^{2+} , necessitando de uma aproximação maior dos oxigênios coordenantes provenientes da proteína (normalmente 6), o que forçaria a formação de um sítio de ligação com geometria octaédrica regular mas de dimensões pequenas (Williams 1970).

Como a cadeia peptídica da proteína não é suficientemente flexível para formar cavidades pequenas e regulares, o Mg^{2+} satisfaz parte de sua esfera de coordenação com moléculas de água, enfraquecendo a força de ligação com a proteína. Desta forma, o íon Ca^{2+} é ideal para a formação de complexos fortes e específicos com proteínas porque é divalente, proporcionando interações suficientemente fortes, e possui um raio atômico médio que proporciona uma geometria de coordenação ideal com a proteína, a qual envolve cadeias laterais de aspartatos e glutamatos que formam uma cavidade octaédrica regular.

1.2.3) Trocadores de Na^+/Ca^{2+} (NCX)

Os trocadores de Na^+/Ca^{2+} (NCX) são proteínas de membrana que catalisam o co-transporte de íons Na^+ e Ca^{2+} através da membrana plasmática utilizando para isso o gradiente eletroquímico de Na^+ . O modo de troca (influxo ou efluxo de Ca^{2+}) depende das concentrações dos íons e do potencial de membrana. Deste modo, os NCX possuem um papel crucial para a manutenção da homeostase de Ca^{2+} em vários tipos de células (Philipson e Nicoll 2000; Reeves e Condrescu 2008; Khananshvili 2014). Por exemplo, o NCX é a principal via de extrusão de Ca^{2+} em células cardíacas (Crespo, Grantham, e Cannell 1990; Philipson e Nicoll 2000; Khananshvili 2014), e o mau funcionamento desta proteína está relacionado com condições patológicas como acidente vascular cerebral, hipertensão, isquemia e esclerose múltipla (Craner et al. 2004; Khananshvili 2014). Em todos estes casos, NCX opera predominantemente no modo reverso, importando ao

invés de exportar Ca^{2+} das células. O excesso de cálcio intracelular resultante causa a ativação de proteases dependentes deste íon, como calpaínas e caspases (Bano et al. 2005), levando à apoptose. Assim sendo, moléculas que inibem especificamente o modo reverso do NCX tem sido testadas para reverter estes danos (Annunziato, Pignataro, e Renzo 2004; Takahiro Iwamoto 2004; T. Iwamoto, Watano, e Shigekawa 1996).

As proteínas NCX consistem de uma porção transmembranar, responsável pelo transporte de íons, e uma alça intracelular que é responsável pela regulação do trocador (Nicoll et al. 2006a; D W Hilgemann 1990) (**Figura 16**). A região transmembranar consiste de dois domínios, cada um formado por 5 α -hélices transmembranares (TM), que são separados pela alça citosólica, composta por aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos, a qual conecta as α -hélices TM5 e TM6 e contém dois domínios de ligação de Ca^{2+} , CBD1 e CBD2 (CBD - *Calcium Binding Domain*) (**Figura 16**) (Nicoll et al. 1999; Liao et al. 2012; Ren e Philipson 2013).

Os trocadores NCX são expressos de maneira específica para cada tipo de tecido celular. Esta diferenciação é possível pela presença de um segmento de *splicing* alternativo presente no domínio CBD2, o qual se origina da combinação de seis éxons, A, B, C, D, E, e F (Khananshvili 2014). Acredita-se que o éxon A seja expresso em isoformas exclusivas de tecidos excitáveis, como por exemplo do coração (éxons ACDEF, NCX 1.1) e cérebro (éxons AD, NCX 1.4), enquanto que a presença do éxon B seria exclusiva de tecidos não excitáveis, como rim (éxons BD, NCX 1.3) e pâncreas (éxons BDF, NCX 1.7). Os níveis de expressão de cada variante de NCX também estão relacionados com estados patológicos distintos, desta

forma, o desenvolvimento de fármacos específicos para cada isoforma representam um desafio para a busca de estratégias terapêuticas via NCX.

No modo de transporte principal o NCX catalisa a troca de três íons sódio por um íon cálcio. Além de transportar sódio e cálcio, o trocador NCX também é regulado por estes íons. Na maior parte dos organismos, o trocador assume uma conformação inativa na ausência de Ca^{2+} sendo ativado quando a concentração de Ca^{2+} intracelular aumenta para níveis micromolares (Philipson e Nicoll 2000; Khananshvili 2014). A ligação de Ca^{2+} intracelular em dois domínios C2 adjacentes, CBD1 e CBD2, localizados na alça intracelular, ativa o trocador (**Figura 16**) (Besserer et al. 2007; John et al. 2011; Ottolia, Nicoll, e Philipson 2009a). Os domínios CBDs são conectados por um pequeno *linker* formado por 3 aminoácidos. O domínio CBD1 é considerado o sensor primário de Ca^{2+} dos NCX porque liga cálcio com maior afinidade, no entanto, foi demonstrado por experimentos de eletrofisiologia que a ligação de íons cálcio em CBD2 também é essencial para a regulação alostérica dos NCX (Nicoll et al. 2006b; Besserer et al. 2007; Chaptal et al. 2007; Chaptal et al. 2009).

Experimentos de *patch-clamp* mostraram que um aumento na concentração de Na^+ citosólico provoca o estímulo dos NCX eucarióticos devido à interação com os sítios transportadores, seguido de uma inativação lenta até a estabilização de uma corrente estacionária (D W Hilgemann 1990; D. W. Hilgemann et al. 1992). Esta inativação dependente de Na^+ possui cinética característica para cada variante de NCX (C. Dyck et al. 1999; Dunn et al. 2002), sendo que a elevação da concentração de Ca^{2+} alivia o efeito desta inativação (D. W. Hilgemann et al. 1992; L. Hryshko 2008). A inativação

dependente de Na^+ não pode ser explicada por interação deste íon com os sítios de ligação de Ca^{2+} presentes em CBD1 e CBD2 porque o sódio não tem efeito sobre a ligação de cálcio nestes sítios regulatórios conforme demonstrado para CBD1, CBD2 ou CBD12 (Boyman et al. 2009; Giladi et al. 2010; Giladi e Khananshvili 2013). Foi sugerido que íons sódio interagem com outros domínios do trocador levando à inativação (Hilge, Aelen, e Vuister 2006a; D W Hilgemann 1990; L. Hryshko 2008), entretanto, até o momento não existe nenhuma evidência experimental e o mecanismo por trás da inativação dependente de sódio permanece desconhecido.

Figura 16. Representação esquemática dos NCX.

1.2.4) O trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de *Drosophila melanogaster* (CALX)

Embora a sequência de aminoácidos das regiões da proteína associadas com regulação iônica seja altamente conservada entre os trocadores de organismos diferentes (por exemplo, os trocadores de *Canis familiaris* e *Drosophila melanogaster* possuem 44% de identidade de sequência de aminoácidos) (**Figura 17**), um fenótipo distinto foi descrito para CALX, um análogo de NCX encontrado em células sensoriais neuronais da

mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*). Em contraste com os outros trocadores, CALX é ativo na ausência de Ca^{2+} intracelular, enquanto que o aumento da concentração destes íons dentro da célula inibe este trocador.

Assim como os NCX, CALX possui uma região de *splicing* alternativo localizada em uma alça do domínio CBD2 (alça FG) (**Figura 18**), apresentando duas isoformas: CALX 1.1 e CALX 1.2. Apesar de que estas duas isoformas diferem em apenas cinco resíduos de aminoácidos (**Figura 18**), elas exibem respostas distintas à ligação de Ca^{2+} regulatório (Omelchenko et al. 1998): CALX 1.1 é inibido pela ligação de Ca^{2+} em CBD1, enquanto que CALX 1.2 é praticamente insensível à regulação por este íon (L. V. Hryshko et al. 1996).

A estrutura cristalográfica de uma construção chamada CBD12 e que contém os domínios CBD1 e CBD2 das duas isoformas de CALX foi resolvida em 2011 (Wu et al. 2011). Assim como no caso do NCX (Giladi et al. 2012), o domínio CBD12 do CALX forma uma estrutura em forma de “V” aberto, com um ângulo de $\sim 109^\circ$ entre os dois CBDs (**Figura 18**).

Além de diferenciar-se dos NCX pela regulação alostérica oposta, CALX também se diferencia pelo número de sítios de ligação de Ca^{2+} . Da mesma forma que em NCX, 4 íons cálcio ligam-se exclusivamente no domínio CBD1, entretanto, CBD2 de *Drosophila* não é capaz de ligar Ca^{2+} (Wu et al. 2009; Wu et al. 2010; Wu et al. 2011) em contraste com os domínios CBD2 dos outros NCX que possuem 2 sítios de ligação de Ca^{2+} . Embora o domínio CBD2 do CALX não ligue Ca^{2+} , uma pequena mutação (G555P) no *linker* entre CBD1 e CBD2 extingue a regulação do trocador por Ca^{2+} (C Dyck et al. 1998).

Cyto1

CLD (verde)

CBD12
(alaranjado)

Cyto2

Figura 17. Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos da região intracelular dos trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de diferentes espécies: cão doméstico P23685; peixe-zebra Q2TDX0; lula O02196; mosca da fruta O18367. Os domínios CLD e CBD12 estão representados em verde e alaranjado, respectivamente, enquanto que a região XIP está destacada em rosa.

A)

B)

Figura 18. Representação em fita da estrutura cristalográfica do domínio CBD12 de CALX. Os íons Ca^{2+} ligados a CBD1 estão representados como esferas verdes. **A)** Isoforma 1.1 (PDB 3RB5); **B)** Isoforma 1.2 (PDB 3RB7). A alça FG está destacada em azul enquanto que a região que sofre *splicing* alternativo está destacada em magenta e com as cadeias laterais representadas explicitamente.

1.2.5) Avanços estruturais

Nos últimos anos, muitos avanços na caracterização estrutural dos NCX foram alcançados. A primeira estrutura cristalográfica obtida para o domínio transmembranar de um NCX foi a do trocador da archaeobactéria *Methanococcus jannaschii* (NCX-Mj) (Liao et al. 2012). Embora NCX-Mj não tenha homologia de sequência com os NCX de mamíferos e não possua a alça intracelular, ele é considerado um bom modelo para a porção transmembranar dos trocadores NCX em geral, pois embora não haja uma estrutura cristalográfica para um NCX eucariótico, existem evidências de que o número de α -hélices, bem como o arranjo na membrana seja muito similar com aquele observado para o NCX-Mj (Ren e Philipson 2013).

Estruturas cristalográficas e em solução dos domínios CBD1 e CBD2 isolados de NCX de mamíferos indicaram que eles correspondem a domínios C2 e que CBD1 possui 4 sítios de ligação de Ca^{2+} (Ca1, Ca2, Ca3 e Ca4), enquanto que CBD2 possui apenas 2 (Ca1 e Ca2) (**Figura 19**). Estudos cinéticos e de eletrofisiologia mostraram que os dois sítios de maior afinidade (Ca3 e Ca4 – $K_d < 0,3\mu\text{M}$) (em CBD1) funcionam como sensores primários (Ottolia, Nicoll, e Philipson 2009), enquanto que o sítio de média afinidade (Ca1 – $K_d \sim 2-10\mu\text{M}$) (em CBD2) permite sustentar a ativação do NCX aliviando a inativação dependente de Na^+ (Besserer et al. 2007). Recentemente demonstrou-se que os sítios de baixa afinidade (Ca1, Ca2 em CBD1 e Ca2 em CBD2 – $K_d > 10\mu\text{M}$) são sítios que ligam Mg^{2+} e desta forma regulam a afinidade dos outros sítios, a fim de manter a sensibilidade dos CBDs na faixa fisiológica de oscilação de $[\text{Ca}^{2+}]$ (Giladi et al. 2013).

Além disso, dados de difração de raio-X e de RMN em solução obtidos para CBD12, uma construção contendo os domínios CBD1 e CBD2 conectados pelo *linker* de 3 resíduos, mostrou que esta proteína assume uma orientação inter-domínio estendida tanto no estado livre quanto no estado ligado a Ca^{2+} (Wu et al. 2011; Salinas, Bruschweiler-Li, Johnson, e Bruschweiler 2011; Giladi et al. 2012).

Figura 19. Estrutura e sítios de coordenação de Ca^{2+} dos domínios CBD1 e CBD2 de NCX-1.4. Representação em fita da estrutura cristalográfica de CBD1 (PDB 2DPK) e CBD2 (PDB 2QVM) (acima) e ampliação mostrando os sítios de coordenação de Ca^{2+} (abaixo). As cadeias laterais de aspartatos e glutamatos que participam da coordenação de Ca^{2+} estão representadas explicitamente. Moléculas de água que completam a esfera de coordenação de alguns íons Ca^{2+} estão representadas por esferas vermelhas.

Na ausência de informação estrutural a respeito das outras regiões da alça citoplasmática, análises a partir da sequência de aminoácidos foram realizadas a fim de caracterizar a tendência estrutural para a alça completa do trocador NCX 1.4 canino (Abiko et al., em preparação, **Anexo E**). O segmento próximo à membrana e que segue a hélice TM5 (aminoácidos 219-

237 em NCX 1.4 canino, equivalentes aos resíduos 301-318 em CALX), é chamado de XIP (*exchanger inhibitory peptide*), porque um peptídeo exógeno, com a mesma sequência de aminoácidos, é um inibidor eficiente da atividade do trocador (Z. Li et al. 1991). Esta região é rica em cargas positivas provenientes de resíduos de arginina e lisina. XIP contém 7 cargas positivas em NCX e 6 em CALX (**Figura 17**). Posteriormente à região XIP, existe um segmento de aproximadamente 46 aminoácidos (37 em CALX), o qual foi chamado Cyto 1 (Abiko et al., em preparação, **Anexo E**). De acordo com a análise de sequência de aminoácidos, esta região possui alta propensão para desordem (**Figura 20**). Em seguida a Cyto 1, existe um segmento de ~ 90 aminoácidos que apresenta alta probabilidade de formar α -hélices, o qual supostamente formaria um domínio bem enovelado chamado de CLD (*catenin-like-domain*) (Hilge, Aelen, e Vuister 2006). A extremidade C-terminal do CLD conecta-se ao domínio CBD1, o qual, juntamente com CBD2, forma um domínio regulatório de aproximadamente 300 aminoácidos (CBD12) (**Figura 17**).

Os domínios de regulação CBDs constituem o único segmento da alça citoplasmática que é estruturalmente bem caracterizado atualmente. O segmento que conecta CBD2 à TM6 (aminoácidos 692 – 764 no NCX1.4 e 701 – 776 em CALX, **Figura 17**), é denominado Cyto 2 (Abiko et al., em preparação, **Anexo E**). A região N-terminal deste segmento possui predição significativa para formar 2 α -hélices, as quais são seguidas por uma região carregada negativamente, provavelmente desenovelada (**Figura 20**). Esta região carregada negativamente contém 9 resíduos de glutamato e aspartato

e 10 em CALX, resultando em uma carga líquida de -9 (NCX) e -10 (CALX) se considerarmos ionização completa das cadeias laterais em pH neutro.

Figura 20. Topologia do trocador NCX e análise de sequência de aminoácidos para Cyto1 e Cyto2. **A)** Sequência de aminoácidos e representação esquemática dos elementos de estrutura secundária do NCX1 canino. As numerações dos aminoácidos das isoformas cardíaca (CBD12-ACDEF) e cerebral (CBD12-AD) estão indicadas. **B)** Predição de estrutura secundária (JPRED e PredictProtein) para as regiões Cyto 1 e Cyto2. As α -hélices estão representadas por cilindros. Predição de desordem (DisMeta). Os segmentos desordenados estão sublinhados e o esquema de numeração corresponde a isoforma NCX 1.4 (AD).

1.2.6) Mecanismo de regulação alostérica

Apesar da grande quantidade de informação estrutural, termodinâmica e cinética obtida a respeito de diversas regiões dos NCX ao longo dos últimos anos, o mecanismo que explica como a ligação de Ca^{2+} em CBD1 e CBD2 regula a atividade destes trocadores permanece desconhecido. Os principais mecanismos propostos estão resumidos a seguir.

Em analogia aos domínios C2 da proteína quinase C, foi sugerido que o domínio CBD2 seria recrutado pela membrana plasmática ou por outra região do próprio trocador de uma maneira dependente da concentração de Ca^{2+} (Chaptal et al. 2007), porém não há nenhuma evidência experimental para este modelo.

Posteriormente, Hilge e colaboradores propuseram, por meio de análise de SAXS e de estudos teóricos envolvendo a construção CBD12, que a ligação de Ca^{2+} em CBD1 causaria um aumento no potencial eletrostático (tornando-o mais positivo), especialmente na região de ligação de Ca^{2+} , induzindo uma orientação mais compacta entre CBD1 e CBD2 (**Figura 21**) (Hilge et al. 2009). Este rearranjo estrutural reduziria a tensão nas regiões N- e C-terminais, as quais conectam CBD12 a outras regiões da alça intracelular, induzindo a transdução do sinal até a região transmembranar. Entretanto, dados de acoplamentos dipolares residuais de RMN e de ressonância dupla elétron-elétron de EPR (*elétron paramagnetic resonance*) revelaram que, tanto na presença quanto na ausência de Ca^{2+} , CBD12 assume uma conformação estendida (Salinas, Bruschweiler-Li, Johnson, e Bruschweiler 2011; Dixit et al. 2013).

Figura 21. Mecanismo hipotético de regulação do NCX por interruptor eletrostático dual. **A)** Estado inativo, livre de Ca^{2+} , em conformação estendida. **B)** Concentração sub-micromolar de Ca^{2+} induz mudança conformacional via mudança do potencial eletrostático de superfície de CBD1, a qual resulta em uma compactação de CBD12, reduzindo a tensão dos *linkers* entre CBD12 e demais regiões, como o domínio CLD. **C)** A ligação de Ca^{2+} em CBD2 permite que o trocador se mantenha ativo, removendo o efeito da inativação dependente de Na^+ . Retirado de (Hilge et al. 2009)

A partir da resolução das estruturas cristalográficas de CBD12 na presença de Ca^{2+} para as duas isoformas do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de *Drosophila melanogaster* (CALX 1.1 e CALX 1.2), propôs-se que o movimento inter-domínio seria a chave para a regulação de CALX, e que pequenas mudanças no ângulo entre CBD1 e CBD2 seriam responsáveis pelas respostas distintas das duas isoformas (**Figura 22**) (Wu et al. 2011). Neste caso, estruturas de alta resolução de CBD12 não ligado a Ca^{2+} seriam essenciais para validar o modelo. Além disso, uma análise detalhada de dados de SAXS obtidos para CBD12 de CALX 1.1 e 1.2 na presença de Ca^{2+} em solução mostrou que as duas variantes experimentam a mesma distribuição de orientações entre CBD1 e CBD2 (Giladi et al. 2013). Outra observação importante é que na presença de Ca^{2+} , o ângulo inter-domínio de CBD12 é muito similar para NCX 1.4 e CALX 1.1 ($117,4^\circ$ e $117,7^\circ$, respectivamente; **Figura 23**) (Giladi et al. 2012), levando a crer que o ângulo

entre CBD1 e CBD2, ou a distância entre esses dois domínios, não pode ser a explicação para a diversidade de fenótipo entre as duas espécies.

Estudos de relaxação de ^{15}N por RMN mostraram que CBD12 de NCX 1.4 é flexível na forma livre e que a adição de Ca^{2+} restringe a flexibilidade do *linker* entre CBD1 e CBD2, estabilizando uma conformação rígida e alongada, mas sem mudanças globais de orientação entre os domínios (Salinas, Bruschweiler-Li, Johnson, e Bruschweiler 2011). Em concordância com este estudo, a resolução da estrutura cristalográfica de CBD12-E454K de NCX 1.4, um mutante que estabiliza CBD1 por formação de pontes salinas com CBD2 e que é fisiologicamente regulado por Ca^{2+} da mesma maneira que a proteína selvagem, juntamente com análise de dados de SAXS de mutantes de CBD12 e da proteína selvagem, resultou na proposta de que a ligação de Ca^{2+} nos sítios de alta afinidade Ca3 e Ca4 (em CBD1) resulta em uma transição do tipo ordem-desordem. A complexação de Ca^{2+} nestes sítios estruturaria a região de interface de CBD1, favorecendo interações de pontes salinas entre os dois domínios, restringindo a flexibilidade da proteína (Giladi et al. 2012).

Figura 22. Modelo hipotético do mecanismo de regulação alostérica do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de *Drosophila melanogaster* (CALX). **A)** Modelo em três etapas para o mecanismo regulatório de CALX. **B)** As duas isoformas, 1.1 e 1.2, apresentariam ângulos diferentes entre CBD1 e CBD2. A flecha cinza indica uma mudança conformacional hipotética. Retirado de (Wu et al. 2011)

Figura 23. Sobreposição de CBD12 de NCX e CALX. A estrutura cristalográfica de CBD12-E454K de NCX 1.4 está representada em cinza e CBD12 de CALX 1.1 em magenta.

Em acordo com as observações de que o ângulo entre CBD1 e CBD2 não se altera após a ligação de Ca^{2+} e que interações entre domínios seriam essenciais para a regulação do trocador, estudos de EPR envolvendo CBD12 de NCX 1.1 revelaram que as alças F-G de CBD1 e de CBD2, bem como as regiões N- e C-terminais, sofrem mudanças de dinâmica após a ligação de Ca^{2+} (Dixit et al. 2013). A alça F-G de CBD2, onde ocorre o *splicing* alternativo, torna-se altamente imobilizada após a ligação de Ca^{2+} , sugerindo

que interações desta alça com CBD1 poderiam resultar na modulação da atividade do trocador. Da mesma forma, considerando a proximidade da alça F-G de CBD1 com o domínio CLD (*α -Catenin like domain*), este domínio poderia ser requerido não só para o posicionamento de CBD12, mas para a transmissão da informação das mudanças de dinâmica de CBD12 até as regiões transmembranares (Dixit et al. 2013). Um contraponto desta proposta é o fato de que, mesmo na presença de Ca^{2+} , a alça F-G de CBD2 é altamente desestruturada em CBD12 de NCX 1.4, conforme demonstrado anteriormente por RMN e cristalografia de raios-X (Giladi et al. 2012; Salinas, Bruschweiler-Li, Johnson, e Bruschweiler 2011).

Por fim, em concordância com as informações sobre a dinâmica obtidas por RMN para CBD12 de *Canis familiaris*, a análise de dados SAXS de CBD12 pelo método de otimização de *ensembles* (*ensemble optimization method* - EOM) revelou que os domínios CBD1 e CBD2 são altamente flexíveis tanto na forma apo (livre de Ca^{2+}) quanto na presença de íons Mg^{2+} , populando várias conformações de energias parecidas, e que uma conformação estendida e rígida é selecionada quando os sítios de maior afinidade (Ca3 e Ca4) em CBD1 ligam Ca^{2+} , um processo chamado de deslocamento de populações (*population shift*) (Giladi et al. 2013a). Com base neste processo e na investigação do papel de cada um dos seis sítios de ligação a Ca^{2+} , e considerando a presença de Mg^{2+} intracelular, propôs-se um outro modelo o qual encontra-se ilustrado na **Figura 24** (Giladi et al. 2013a). Este modelo propõe que o domínio CBD12 encontra-se flexível na ausência de Ca^{2+} e que a ocupação gradual dos sítios de ligação de Ca^{2+} em CBD1 e CBD2 torna CBD12 rígido ativando o trocador.

Figura 24. Modelo para regulação dos trocadores NCX proposto por Giladi et al. (2013). Na forma apo, todos os sítios estão desocupados; Em condições fisiológicas, íons Mg^{2+} ocupam os sítios de baixa afinidade (esferas roxas) e modulam a afinidade dos sítios remanescentes. Com o aumento de concentração de cálcio intracelular, os sítios de maior afinidade são ocupados (esferas verdes) tornando CBD12 rígido e ativando o NCX. Quando a concentração de Ca^{2+} torna-se ainda maior, o sítio de afinidade intermediária (CaI) é ocupado e alivia a inativação dependente de Na^+ , preservando o estado ativo de NCX. Retirado de (Giladi et al. 2013a)

Apesar da grande quantidade de modelos já propostos para a regulação alostérica dos trocadores NCX com base em estudos contemplando as mais modernas e diversas técnicas de análise estrutural e de dinâmica, nenhum deles é capaz de explicar como a ligação de Ca^{2+} em CBD12 regula o trocador de maneira diferente em NCX e em CALX.

2) Objetivos

Até hoje o mecanismo de regulação alostérica dos NCX por Ca^{2+} não é conhecido. Como a ligação de Ca^{2+} em CBD1 regula a atividade do trocador? De que maneira o mesmo evento (ligação de Ca^{2+} em CBD12) causa respostas distintas pelos trocadores de *Drosophila melanogaster* e *Canis familiaris*?

Esta tese pretende contribuir para a compreensão dessas questões utilizando como modelo os domínios de ligação de Ca^{2+} (CBD1 e CBD2) do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de *Drosophila melanogaster* (CALX) e RMN em solução como ferramenta para caracterizar a dinâmica e orientação entre os domínios. Para tanto, serão utilizadas medidas de tempos de relaxação de ^{15}N e de acoplamentos dipolares residuais (D_{NH}).

Os resultados obtidos serão comparados com os dados descritos na literatura para CBD12-canino, a fim de propor um modelo para a regulação alostérica por Ca^{2+} em trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

3) Materiais e Métodos

3.1) Clonagem e expressão das proteínas de interesse

3.1.1) Reagentes

O cDNA de *CALX-1.1-Drosophila melanogaster* foi obtido comercialmente do centro de pesquisa *Drosophila Genomics Resource Center* – *Indiana University* (EUA). Os oligonucleotídeos (*primers*) desenhados para amplificação de fragmentos do CALX (**Tabela 2**) foram obtidos comercialmente da empresa Exxtend (Brasil). Os vetores de clonagem e expressão utilizados foram obtidos comercialmente das empresas Promega (Brasil) (pGEM-T Easy) e Novagen (Brasil) (pET-28a). O vetor de expressão pAE (Ramos et al. 2004) foi desenvolvido no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan e foi cedido pelo professor Dr. Paulo Lee Ho. As cepas de *Escherichia coli* utilizadas para clonagem e expressão foram obtidas comercialmente (Stratagene, EUA). Compostos isotopicamente enriquecidos ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ^{13}C -glicose, $^2\text{H}_2\text{O}$, e $^{13}\text{C},^2\text{H}$ -glicose) foram obtidos comercialmente da Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL, EUA).

3.1.2) Desenho dos clones de CBD12, CBD1 e CBD2

A **Figura 25** apresenta as sequências de aminoácidos das construções de CBD1, CBD2-1.1 e CBD12-1.1 desenhadas para os estudos de RMN. Estes fragmentos foram baseados na construção utilizada por Wu et. al. (Wu et al. 2011) para obter a estrutura cristalográfica de CBD12-1.1

(PDB 3RB5) (**Figura 18A**). Conforme indicado em caixas alaranjadas, as regiões N- e C-terminais não apresentam densidade eletrônica, o que pode ser indicativo de flexibilidade. Desta forma, ao planejarmos a região da proteína a ser clonada para os estudos de RMN, os 33 resíduos da extremidade C-terminal foram excluídos a fim de evitar a presença de sinais muito intensos nos espectros de CBD2-1.1 e CBD12-1.1. No caso da região N-terminal, como a sequência de resíduos que não apresentam densidade eletrônica forma uma região negativamente carregada, estes resíduos foram preservados, a fim de verificar se formariam um sítio adicional de coordenação de íons Ca^{2+} (CBD1 e CBD12-1.1). Nota-se que, dependendo do vetor em que cada DNA foi sub-clonado, sequências de 9 aminoácidos (no caso de CBD12-1.1 clonado no vetor pAE) ou de 21-22 aminoácidos (no caso de CBD1 e CBD2-1.1 clonados no vetor pET28-a) estão inseridas na região N-terminal, as quais incluem 6 histidinas sequenciais que possibilitam a purificação das proteínas por cromatografia de afinidade, seguidas de uma sequência de reconhecimento por trombina (apenas no vetor pET-28a).

3RB5	-----GDDEEADDP-----	IRMYFEPGHYTMENCGEFEVRVRRGDISTYASVEYE	490
CBD12-1.1	-----MHHHHHHLE-----	DDEEADDPIMYFEPGHYTMENCGEFEVRVRRGDISTYASVEYE	55
CBD1	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM	DDEEADDPIMYFEPGHYTMENCGEFEVRVRRGDISTYASVEYE	67
CBD2-1.1	-----	-----	-
3RB5	TQDGTASAGTDFVGRKGLLSFPPGVDEQRFRIEIDDDVFEEDEC FYIRLFNPSEG VKLAVPMIATVMILD		550
CBD12-1.1	TQDGTASAGTDFVGRKGLLSFPPGVDEQRFRIEIDDDVFEEDEC FYIRLFNPSEG VKLAVPMIATVMILD		126
CBD1	TQDGTASAGTDFVGRKGLLSFPPGVDEQRFRIEIDDDVFEEDEC FYIRLFNPSEG VKLAVPMIATVMILD		138
CBD2-1.1	-----MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMA		22
3RB5	DDHAGIFAF TDSVFEITESVGRFELKVMRYSGARGTVIVPYWTENDTATES	KDYE GARGELVFENNESEK	585
CBD12-1.1	DDHAGIFAF TDSVFEITESVGRFELKVMRYSGARGTVIVPYWTENDTATES	KDYE GARGELVFENNESEK	196
CBD1	DDHAG-----	-----	143
CBD2-1.1	SDHAGIFAF TDSVFEITESVGRFELKVMRYSGARGTVIVPYWTENDTATES	KDYE GARGELVFENNESEK	92
3RB5	FIDLF-----ILEESSYEK-----	DVSFKVHIGEPRLAPDDELA AKI KEVEKKPVQDL TELDRILLLSKPRNGELTTAYVRIRE	671
CBD12-1.1	FIDLF-----ILEESSYEK-----	DVSFKVHIGEPRLAPDDELA AKI KEVEKKPVQDL TELDRILLLSKPRNGELTTAYVRIRE	270
CBD1	-----	-----	-
CBD2-1.1	FIDLF-----ILEESSYEK-----	DVSFKVHIGEPRLAPDDELA AKI KEVEKKPVQDL TELDRILLLSKPRNGELTTAYVRIRE	166
3RB5	SQEFKATVDKLVAKANVSAVLGTSSWKEQFKDALT		730
CBD12-1.1	SQE-----	-----	273
CBD1	-----	-----	-
CBD2-1.1	SQE-----	-----	169

Figura 25. Sequência de aminoácidos da construção CBD12-1.1 cristalizada (PDB 3RB5) em comparação com as sequências de aminoácidos dos fragmentos clonados para os estudos de RMN, CBD12-1.1, CBD1, e CBD2-1.1. Os aminoácidos destacados por caixas alaranjadas não apresentam densidade eletrônica na estrutura cristalográfica (PDB 3RB5). As sequências destacadas em caixas verdes pertencem aos vetores de expressão e não codificam aminoácidos de CALX.

Tabela 2: Oligonucleotídeos (*primers*) desenhados para clonagem de CBD12 selvagem ou mutante em pET-28a e em pAE.

Construção	Oligonucleotídeo*	TM (°C)	n° bases
CBD12-1.1 (pET-28a)	F: ctgcatattaatgatgacgaggaggcgacgatccc	67,7	36
	R: cggatccttattcctggctctcgaatgcgcacata	67,4	37
CBD12-1.1 (pAE)	F: ctgcatctcgaggatgacgaggaggcgacgatccc	63,1	36
	R: cgaattctcattcctggctctcgaatgcgcacata	62,1	37
C457T	F:cactacaccgtcatggagaacaccggcgagtttgaggtgcgcgtg	73,4	45
	R:cacgcgcacctcaaaactcgccggtgttctccatgacggtgtagt	73,4	45
C457T_C524T	F: gtattgaggaggacgagacctctacattcgactcttc	66,0	39
	R: gaagagtcgaatgtagaaggctcgtctcctcaatac	66,0	39
C457T_C524T_Q666C	F:gaggtcgagaaaaaacccgtttgcgatctgaccgaactggatcgc	70,7	45
	R: gcgatccagttcggtcagatcgcaaacgggtttttctcgacctc	70,7	45
C457T_C524T_S562C	F:ggcatctttgccttcacagactcgtattcgagatcacggagtcc	70,7	45
	R: ggactccgtgatctcgaatacgcagctctgtgaaggcaaagatgcc	70,7	45
C457T_C524T_T560C	F:cacgcgggcatctttgccttctgcgactcggattcgagatcacg	72,5	45
	R:cgtgatctcgaataccgagtcgcagaaggcaaagatgcccgctg	72,5	45
C457T_C524_E670C	F: cccgttcaggatctgacctgcctggatcgcatcctgctg	72,3	39
	R: cagcaggatgcgatccaggcaggtcagatc ctgaacggg	72,3	39

* F e R significam “forward” e “reverse”.

TM: Temperatura de fusão considerando 50nM de NaCl no meio, calculada pelo programa OligoAnalyzer 3.1 (IDT – Integrated DNA Technologies)

3.1.3) Clonagem da isoforma 1.1 de CBD12

Os protocolos utilizados para as clonagens e manipulação de DNA foram realizados segundo métodos bem estabelecidos (Sambrook e Russell 2001). Os sequenciamentos de DNA foram realizados pelo serviço de sequenciamento do IQ-USP (SSDNA-IQUSP) utilizando o kit BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). As amostras para sequenciamento foram preparadas segundo protocolos sugeridos pelo SSDNA.

O gene que codifica CBD12 foi amplificado a partir do cDNA de CALX-1.1 por meio de uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando temperatura de anelamento de 67°C (tempo de extensão de 1 minuto por kbase) (Sambrook e Russell 2001). A amplificação foi confirmada pela observação de uma banda de tamanho esperado (792 pb) no gel de eletroforese (agarose 1%) (**Figura 26**).

Figura 26. Amplificação do fragmento CBD12 a partir do cDNA do CALX 1.1. Padrão de número de pares de base de DNA O' Gene ruller (esquerda), e gel de agarose 1% (direita). A banda correspondente a CBD12 está destacada. A primeira canaleta contém um padrão de número de pares de base.

Antes de clonar o inserto em um vetor de expressão, optou-se por adenilar o fragmento amplificado a fim de ligá-lo em pGEM-T Easy, um vetor de clonagem aberto de alto número de cópias, com as duas extremidades contendo timinas 3'-T (**Figura 27**), o que aumenta a eficiência da ligação do produto de PCR no plasmídeo porque previne a recircularização do vetor. Além disso, devido à diferença de migração eletroforética do pGEM-T Easy aberto e fechado (após a ligação do inserto), é possível constatar com facilidade o sucesso da reação de ligação, bem como da clivagem com as enzimas de restrição para liberação do inserto.

Na primeira tentativa de clonagem de CBD12-1.1 em um vetor de expressão, utilizamos o vetor pET-28a (**Figura 28**), pois este foi o vetor utilizado pelo grupo que cristalizou esta proteína (Wu et al. 2011). Infelizmente nenhuma das tentativas de ligar CBD12-1.1 diretamente em pET-28a funcionou. Provavelmente perdia-se muita quantidade de plasmídeo durante a purificação do vetor linearizado, e não era possível obter quantidade suficiente para efetuar a reação de ligação com CBD12-1.1. Um fator complicador é que o plasmídeo pET-28a é de baixo número de cópias.

Figura 27. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy.

Tendo em vista a dificuldade para clonar em pET-28a, utilizou-se o vetor de expressão pAE (**Figura 28**). A principal diferença entre esses dois vetores é que pAE é menor (2,8 kb, versus 5,3 kb de pET-28a), o que diminui a probabilidade de pareamento inespecífico dos oligonucleotídeos, e possui elevado número de cópias (200-250 cópias por célula) (Ramos et al. 2004). A ligação de pAE com o inserto que codifica CBD12-1.1 foi confirmada por sequenciamento.

Figura 28. Mapa dos vetores de expressão pET-28a (esquerda) e pAE (direita).

3.1.4) Clonagem dos mutantes de CBD12

Para poder realizar os estudos de RMN envolvendo efeitos paramagnéticos com compostos orgânicos quelantes de metais lantanídeos planejou-se cinco mutantes, cada qual contendo apenas uma única cisteína nas posições 524, 666, 562, 560 ou 670 (**Figura 29**). As posições das mutações foram escolhidas de forma a maximizar o número de distâncias entre os domínios CBD1 e CBD2 que poderiam ser monitoradas através de medidas de PCS, ou para refletir a flexibilidade entre os dois domínios.

Como a proteína possui 2 cisteínas (C457 e C524), foi necessário construir um duplo mutante C457T_C524T para em seguida inserir uma cisteína em uma posição desejável. Estas cisteínas pré-existentes foram substituídas por resíduos de treonina ou serina devido à similaridade entre as características físico-químicas das cadeias laterais. Para isso, os seguintes triplos mutantes (cada qual contendo apenas uma única cisteína) foram desenhados: C457T_C524T_Q666C, C457T_C524T_S562C, C457T_C524T_T560C e C457T_C524T_E670C.

As mutações foram feitas sobre a construção CBD12-1.1_pGEM-T easy, utilizando a técnica de sobreposição (*overlapping*) (Heckman e Pease 2007), a qual envolve três reações de PCR: a primeira (PCR 1) utilizando o *primer forward* do gene (CBD12-1.1 (pAE)) e o *primer reverse* desenhado com a mutação desejada; a segunda (PCR 2) utilizando o *primer forward* contendo a mutação desejada e o *reverse* do gene; e a terceira com os *primers forward* e *reverse* do gene para unir os fragmentos obtidos por meio dos PCRs 1 e 2. A temperatura de anelamento utilizada nas três etapas foi de 65°C. No caso de PCR 3, utilizou-se quantidades equivalentes de cada fragmento obtido de PCR1 e de PCR2.

No caso do mutante C457T o DNA molde para as reações de PCR 1 e 2 foi a construção CBD12 clonada em pGEM-T easy, e no caso dos triplo mutantes C457T_C524T_Q666C, C457T_C524T_S562C, C457T_C524T_T560C e C457T_C524T_E670C, o DNA molde foi a construção C457T_C524T clonada também em pGEM-T easy. Os produtos do PCR 3 foram purificados, adenilados, ligados no vetor pGEM-T easy e sequenciados.

A construção C457T + pGEM-T easy foi digerida com as enzimas XhoI e EcoRI e ligada no vetor de expressão pAE conforme descrito para CBD12-1.1. A sequência de DNA do fragmento clonado em pAE foi confirmada por meio de sequenciamento.

Figura 29. Mutantes de CBD12 clonados para estudos de PCS, PRE e RDCs (PDB 3RB5). Os íons Ca²⁺ estão representados por esferas verdes, as cisteínas pré-existent na sequência nativa estão representadas por esferas vermelhas, enquanto que as que participarão da reação com a sonda paramagnética estão representadas por esferas azuis.

3.1.5) Clonagem da isoforma 1.2 de CBD12

As duas isoformas de CALX diferem-se apenas na sequência de um pequeno segmento de 5 aminoácidos localizado na alça FG de CBD2 (**Figura 18**). A sequência de DNA que codifica a isoforma 1.2 de CBD12 foi obtida a partir da substituição da sequência DELAA por STHYP através da técnica de sobreposição, conforme descrito na seção anterior, utilizando como DNA molde a isoforma 1.1 de CBD12 inserida no vetor pGEM T-easy (Promega). Os oligonucleotídeos utilizados para a clonagem estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para clonagem de CBD12-1.2 pela técnica de sobreposição.

Construção	Oligonucleotídeo*	TM (°C)	n° bases
CBD12-1.1 (pAE)	F: ctgcatctcgaggatgacgaggaggcgacgatccc	63,1	36
	R: cgaattctcattcctggctctcgaatgcgcacata	62,1	37
CBD12-1.2	F: cctcgattggcgccagacagtacacactatcccaaatcaaggaggtcgag	71,8	51
	R: ctgcacctcctgattttgggatagtggtactgtctggcgccaatcgagg	71,8	51

* F e R significam “forward” e “reverse”. TM: Temperatura de fusão considerando 50nM de NaCl no meio, calculada pelo programa OligoAnalyzer 3.1 (IDT – Integrated DNA Technologies)

3.1.6) Clonagem dos domínios CBD1, CBD2-1.1 e CBD2-1.2

Os genes que codificam os domínios CBD1 e CBD2 isolados foram obtidos a partir da amplificação das sequências de DNA correspondentes utilizando como molde a construção CBD12-1.1_pGEM-T easy no caso de CBD1 e CBD2-1.1 enquanto que a construção CBD12-1.2_pGEM-T easy foi

utilizada como molde no caso de CBD2-1.2. Os oligonucleotídeos utilizados para as clonagens estão descritos na **Tabela 4**. Os genes amplificados foram sub-clonados no vetor de expressão pET-28a e confirmados por sequenciamento de DNA.

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para clonagem de CBD1, CBD2-1.1 e CBD2-1.2 pela técnica de sobreposição.

Construção	Oligonucleotídeo*	TM (°C)	n° bases
CBD12-1.1 (pET-28a)	F: ctgcatattaatgatgacgaggaggcggacgatccc	67,7	36
	R: cggatccttattcctggctctctcgaatgcgcacata	67,4	37
CBD1 (pET-28a)	F: catcaccatcaccatatggatgacgaggaggcg	67,1	33
	R: gtctgtgaactcgagtcagcccgctg	67,2	27
CBD2 (pET-28a)	F: atgatcctggctagcgaccacgcg	65,0	24
	R: tagtgattcggatcctcattcctggctctctcg	64,2	33

* F e R significam “forward” e “reverse”. TM: Temperatura de fusão considerando 50nM de NaCl no meio, calculada pelo programa OligoAnalyzer 3.1 (IDT – Integrated DNA Technologies)

3.1.7) *Optimização da expressão de CBD12*

Foram feitos testes de expressão de CBD12_1.1_pAE primeiramente em meio rico 2xTY variando-se a cepa de *E. coli*, a concentração de IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalatopiranosídeo), a densidade óptica (D.O.) de indução, e o tempo de indução (**Tabela 5**).

A melhor condição encontrada foi com a cepa STAR (**Tabela 5**). A expressão foi induzida por adição de 0,4 mM de IPTG quando a cultura

atingiu densidade óptica de 0,8 a 600nm, sendo que o tempo de indução foi de 4 horas. Porém, ao se transferir esta mesma condição para expressão em meio mínimo, não se obteve êxito. Por este motivo, outras condições foram testadas e a melhor delas foi com o uso da cepa RP (indução de 4 horas com adição de 0,4 mM de IPTG a D.O 600nm de 1,2), condição na qual obteve-se maior quantidade de proteína (**Figura 30 e Tabela 6**). A cepa RP trata-se de uma *E. coli* BL21-codon plus (Agilent Technologies), a qual foi projetada para conter cópias extras do gene que codifica os t-RNAs contendo códons raros para arginina e prolina. A expressão de genes que contêm códons raros em *E. coli* frequentemente limita a tradução de proteínas heterólogas.

Tabela 5. Condições utilizadas em testes de expressão de CBD12 em meio rico.

Cepa	[IPTG] (mM)	D.O 600nm de indução	T _{indução} (hr)	Expressão
BL21(DE3)	1	0,6	4	x
BL21(DE3)	0,4	0,45	4	x
BL21(DE3) RIL	1	0,6	4	x
BL21(DE3) RP	1	0,6	4	x
BL21(DE3)STAR	1	1,4	4	x
BL21(DE3)STAR	1	1,0	5	✓
BL21(DE3)STAR	0,4	0,8	4	✓

Tabela 6. Condições utilizadas em testes de expressão de CBD12 em meio mínimo

Cepa	[IPTG] (mM)	D.O 600nm de indução	T _{indução} (hr)	Expressão
BL21(DE3)STAR	0,4	0,8	4	✗
BL21(DE3)	0,4	1,1	4	✗
BL21(DE3)RP	0,4	1,2	4	✓
BL21(DE3)RIL	0,4	1,3	4	✓
BL21(DE3)PlysS	0,4	1,1	4	✓
BL21(DE3)C43	0,4	1,2	4	✓

Após a purificação do sobrenadante do lisado (conforme descrito na seção 3.3) obtido por expressão na cepa RP ([IPTG]=0,4mM, 4 hrs) observou-se que a proteína era expressa razoavelmente em meio rico e que apresenta-se solúvel. A fração supostamente correspondente a CBD12-1.1 foi submetida a análise por espectrometria de massas, o que confirmou o peso molecular esperado para o monômero, 32 kDa.

A mesma condição de expressão otimizada para CBD12-1.1 foi utilizada para todas as outras proteínas de interesse neste estudo, inclusive para a produção de amostras isotopicamente enriquecidas, como descrito detalhadamente no item 3.3.

Figura 30. Testes de expressão em meio mínimo M9. Géis de SDS-PAGE (Tris-Glicina 15%) mostrando o padrão de migração das proteínas do lisado bacteriano antes e após indução. As massas moleculares foram estimadas por comparação com o marcador de massa molecular (MW) (Fermentas) (última canaleta em cada gel); as bandas correspondentes à expressão de CBD12 estão indicadas com setas.

3.2) Análises por Espectrometria de Massas

As análises de espectrometria de massas foram feitas por meio de LC-MS em equipamento MALDI TOF-TOF (Ultraflextreme - Bruker) com matriz 2,5-DHB (ácido 2,5-dihidróxi benzóico) em tampão TA30 (30% acetronitrila, 70% água e 0,1% ácido trifluoroacético).

3.3) Produção de amostras isotopicamente enriquecidas

Para uso em RMN, proteínas devem ser super-expressas em meio mínimo para permitir a incorporação de isótopos que possuem spin $\frac{1}{2}$, convenientes para estudos de ressonância mas que, no entanto, possuem baixa abundância natural, como por exemplo ^{15}N (0,37%) e ^{13}C (1,1%) (Levitt 2001). O meio M9 tem sido largamente empregado com esta finalidade (Serrano et al. 2013; Skora et al. 2013; Salinas, Bruschweiler-Li, Johnson, e Bruschweiler 2011). Este meio contém sais de fosfato (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4) para garantir a tamponação do meio, cujo pH deve manter-se em pH 7,0; NaCl, para regular a força iônica; MgSO_4 , glicose, NH_4Cl e CaCl_2 , como únicas fontes de magnésio, carbono, nitrogênio e cálcio, respectivamente; e tiamina, que auxilia o crescimento de bactérias.

Amostras enriquecidas uniformemente com ^{15}N foram obtidas por meio de expressão em *E. coli* - *codon plus* (RIL) em meio mínimo (M9), contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (1 g/L) como única fonte de nitrogênio. No caso de amostras enriquecidas uniformemente com ^{15}N e ^{13}C , e fracionalmente com ^2H , as bactérias foram crescidas em M9 preparado em D_2O e contendo ^{15}N - NH_4Cl (1 g/L) como fonte de nitrogênio, e glicose- ^{13}C (4g/L) como única fonte de carbono. CBD12-1.1 enriquecida uniformemente com ^{15}N , ^{13}C e ^2H foi produzida de forma análoga ao descrito acima, porém utilizando glicose uniformemente enriquecida com ^{13}C e ^2H como única fonte de carbono.

No caso de marcação isotópica com ^{15}N ou ^{15}N e ^{13}C , a expressão da proteína foi induzida após a cultura de células atingir a densidade óptica (600nm) (D.O.) de 1,2, pela adição de 0,4 mM de IPTG (Isopropil β -D-1-

tiogalatopiranosídeo). A expressão foi realizada a 37°C durante 4 horas. Dado este período, as células foram coletadas por centrifugação (10 min, 5000 RPM), e os *pellets* armazenados a -20°C. As células foram lisadas através de uma prensa francesa (SLM Instruments, Inc.) por 4 ciclos de lise sob a pressão de 2000 Psig.

No caso de proteínas enriquecidas isotopicamente com ^2H , ^{15}N e ^{13}C , foi necessário introduzir uma etapa de adaptação das bactérias ao meio mínimo deuterado da seguinte maneira: um pré-inóculo era preparado em 5,0 mL de meio rico, até atingir a D.O. de 0,6. Em seguida, 2,0 mL deste pré-inóculo eram retirados e centrifugados, o precipitado resultante era ressuspenso em 100 mL formando um segundo pré-inóculo, desta vez em meio mínimo contendo ^2H , que era incubado a 37 °C sob agitação até atingir D.O. de 0,6. Este segundo pré-inóculo era então inoculado em mais 900 mL do meio mínimo deuterado, e este era incubado sob agitação a 37°C até atingir a D.O. correspondente à metade da D.O. máxima que pode ser atingida por este sistema em $^2\text{H}_2\text{O}$ (~ 1,0) para então induzir a expressão das proteínas pela adição de IPTG, da mesma forma que mencionado acima. O mais importante nesta etapa de adaptação das células era mantê-las sempre jovens, desta forma, um controle rigoroso da D.O. era essencial. Curvas de crescimento foram construídas e estão representadas na **Figura 31**. Observou-se que a presença no plasmídeo não influencia o crescimento da bactéria, porém o meio mínimo contendo os isótopos ^2H , ^{15}N e ^{13}C retarda drasticamente o crescimento além de influenciar na quantidade de bactérias obtidas.

Figura 31. Curvas de crescimento para *E. coli* códon plus (RIL). **A)** Bactéria sem nenhum plasmídeo em meio rico (2XTY). **B)** Bactérias contendo o plasmídeo com a sequência que codifica CBD12-1.1 em meio rico (2XTY). **C)** Bactérias contendo o plasmídeo com a sequência que codifica CBD12-1.1 em meio mínimo deuterado (M9 $^2\text{H}_2\text{O}$, $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ^{13}C , ^2H -glicose). **D)** Comparação entre as curvas de crescimento de bactérias contendo o plasmídeo com a sequência que codifica CBD12-1.1 em meio mínimo deuterado e em meio rico.

Conforme descrito anteriormente, as proteínas foram clonadas em fusão com uma sequência de 6-histidinas do vetor pAE ou pET-28a para possibilitar a purificação por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA. As purificações por FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) foram realizadas em um equipamento ÄKTA FPLC (GE Healthcare) com uma coluna de níquel Ni-NTA-HiTrap (GE Healthcare), e um gradiente linear de 0 a 500 mM de Imidazol. Para a obtenção da proteína com maior pureza, uma segunda etapa de purificação foi realizada por meio de cromatografia de troca aniônica (coluna Mono-Q 10/10) com gradiente de 0 a 100% de NaCl 1M. A fração

contendo a proteína de interesse foi coletada e concentrada por centrifugação em Amicon[®] Ultra (corte de MM=3000), Millipore, até concentração final de 250 μ M. Na etapa de concentração com Amicon, o tampão da amostra foi trocado para o tampão utilizado nos experimentos de RMN, o qual consiste de Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 200mM, 2-mercaptoetanol 5mM, e 2mM de EDTA (amostra sem Ca^{2+}), condição na qual as análises subsequentes foram realizadas. A pureza das proteínas obtidas foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A quantificação foi realizada medindo a absorção a 280 nm e utilizando o valor de coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{280\text{nm}} = 25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) calculado através do programa ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>), a partir da sequência primária da proteína estudada.

3.4) Ensaio com a sonda paramagnética Cisteinil-fenil-triaminohexaacetato (Cys-Ph-TAHA)

O composto Cys-Ph-TAHA (Peters et al. 2011) foi cedido pelo professor Dr. Christian Griesinger do Instituto Max Planck de Química Biofísica - Göttingen, Alemanha. Os sais de lantanídeo (LnCl_3) foram sintetizados no Laboratório dos Elementos do Bloco-f do Instituto de Química-USP, e cedidos pelo professor Dr. Hermi Felinto de Brito.

A sonda foi complexada com lutécio ou térbio por meio de reação com o cloreto do metal correspondente (razão molar sonda:metal de 1:2) sob agitação constante em pH 6,0 durante 2 horas e meia à temperatura ambiente. O excesso de lantanídeo foi removido por formação de hidróxido

de lantanídeo, totalmente insolúvel em água, induzida pelo aumento do pH com adição de hidróxido de sódio. O precipitado foi removido por centrifugação, e o sobrenadante foi submetido à reação de acoplamento com a proteína CBD12-1.1 (C457T/C524T/T560C).

Antes da reação de acoplamento com Cys-Ph-TAHA-Tb, o mutante foi encubado durante uma noite com o agente redutor ditioneitol (DTT, 10mM), o qual foi retirado por diálise imediatamente antes da reação de acoplamento, para que não reagisse com o grupo tiol da sonda. A reação de acoplamento da proteína com Cys-Ph-TAHA foi feita em tampão Tris 20mM, pH 8,0, utilizando razão molar de 1:10 (proteína:Cys-Ph-TAHA), durante 4 horas à temperatura ambiente. A sonda livre foi removida por centrifugação em filtro Amicon[®] Ultra (corte de MM=3000, Millipore) e a proteína foi concentrada até concentração final de 250 µM de proteína acoplada com Cys-Ph-TAHA (4000 rpm durante 30 minutos). Uma tentativa de caracterização do produto desta reação foi feita através de análises por espectrometria de massas.

3.5) Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear

Todos os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III equipado com uma sonda resfriada TCI e operando à frequência de 800MHz para o núcleo de hidrogênio, pertencente à Central Analítica do IQ-USP. As amostras de RMN de CBD12, CBD1 ou CBD2 continham aproximadamente 250 µM de proteína em tampão contendo Tris 20mM pH 7,4, 200mM de NaCl, 5mM de 2-mercaptoetanol, 2mM de EDTA e 5% de ²H₂O. No caso das análises com íons cálcio, as medidas

foram realizadas na presença de 20mM de CaCl_2 . Os experimentos foram adquiridos a 37°C (temperatura calibrada), com exceção dos experimentos de difusão (DOSY), os quais foram adquiridos a 27.7°C (temperatura calibrada).

3.5.1) Espectros de correlação ^1H - ^{15}N (HSQC)

Os espectros de ^1H - ^{15}N HSQC foram adquiridos com pulsos de *flip back* aplicados sobre a água a fim de manter a sua magnetização em “z” durante todo o experimento, e *watergate* para supressão do sinal da água (*fast HSQC*) (Mori et al. 1995). Todos os espectros foram processados com uma função cosseno (apodização) nas duas dimensões e preenchidos com zeros até completar uma matriz de 2048x512 pontos (real+imaginário) (ou 8192x8192 no caso de medidas de RDCs) a fim de aumentar a resolução digital.

3.5.2) Espectros de tripla ressonância

Os assinalamentos dos deslocamentos químicos de ^1H , ^{15}N , $^{13}\text{C}\alpha$ e ^{13}CO do esqueleto polipeptídico e $^{13}\text{C}\beta$ das cadeias laterais de CBD12-1.1 e CBD1 foram realizados através da análise de experimentos de ressonância tripla implementados na forma de ^1H - ^{15}N HSQC e com desacoplamento em ^2H cada vez que a magnetização se encontrava em ^{13}C . A amostra de CBD12-1.1 utilizada foi enriquecida uniformemente com ^{15}N e ^{13}C , e fracionalmente com ^2H , e as proteínas menores, CBD1 e CBD2-1.1, foram

enriquecidas uniformemente com ^{15}N e ^{13}C . Os seguintes experimentos tridimensionais foram adquiridos: HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HN(CA)CO, HNCACB e HN(CO)CACB (Cavanagh 2007).

3.5.3) Medidas de velocidades de relaxação de ^{15}N

As velocidades de relaxação transversal (R_2) de ^{15}N foram obtidas por meio de medidas de $R_{1\rho}$ (velocidade de relaxação no referencial girante) de ^{15}N (Rule e Hitchens 2006). O experimento foi adquirido na forma de um pseudo-3D, em que a terceira dimensão corresponde ao tempo de relaxação e as outras duas dimensões correspondem às frequências de ^1H e ^{15}N . Os valores de $R_{1\rho}$ foram obtidos pelo ajuste das curvas de decaimento da intensidade dos sinais nos espectros de ^1H - ^{15}N HSQC devido à relaxação no referencial girante, a uma função exponencial contendo dois parâmetros: a velocidade de decaimento e a intensidade no tempo igual a zero. As incertezas nos valores de $R_{1\rho}$ foram calculadas por 100 simulações de Monte Carlo (Rule e Hitchens 2006), sendo que a incerteza das medidas de intensidade foi dada pelo nível do ruído do espectro. Os valores de R_2 foram obtidos considerando que:

$$R_{1\rho} = R_1 \cos^2 \theta + R_2 \sin^2 \theta, \quad (7)$$

sendo $R_2 = \frac{1}{T_2}$ e $\tan \theta = \frac{\gamma B_1}{2\pi \Delta \nu}$, onde γ =razão giromagnética; B_1 =campo magnético de *spin-lock*; $\Delta \nu$ =*offset* em Hz. O campo de *spin-lock* utilizado no experimento foi de 1,9kHz. Os tempos de relaxação utilizados foram: 0,004; 0,008; 0,016; 0,024; 0,036; 0,048; 0,052; 0,072; 0,084 e 0,092 ms.

As medidas de velocidade de relaxação longitudinal (R_1) de ^{15}N foram

feitas através de um experimento de inversão-recuperação adquirido na forma de um pseudo-3D, onde para cada experimento de ^1H - ^{15}N HSQC o tempo de relaxação T é incrementado (Rule e Hitchens 2006). Durante o período T , a magnetização de ^{15}N retorna ao estado de equilíbrio térmico proporcional a γ_{H} . Os valores do período de relaxação, T , foram: 0,15; 0,3; 0,45; 0,6; 0,9; 1,25; 1,5; 1,8; 2,0; 2,25 e 2,5s. Os valores de R_1 foram obtidos a partir do ajuste de curvas de decaimento da intensidade dos picos do espectro de ^1H - ^{15}N HSQC, devido à relaxação longitudinal, a uma equação de decaimento exponencial de forma análoga ao que foi realizado para extrair o valor de $R_{1\rho}$.

3.5.4) Medidas de coeficiente de difusão translacional

Os coeficientes de difusão translacional (D_t) foram obtidos através da análise de experimentos de *Diffusion-Ordered Spectroscopy* (DOSY) de eco-estimulado (STE) (Johnson 1999). Os coeficientes foram extraídos pelo ajuste da curva de decaimento devido à difusão da intensidade dos sinais de ^1H a uma função exponencial contendo dois parâmetros (a velocidade de decaimento, e a intensidade no tempo igual a zero). As incertezas nos valores de coeficiente de difusão translacional correspondem ao desvio padrão dos coeficientes medidos para vários picos diferentes ao longo da região das metilas no espectro 1D de ^1H . O experimento foi realizado a $27,7^\circ\text{C}$ para evitar efeitos de convecção, com um pulso de gradiente de 2,5 ms, e intervalo de difusão de 200ms para CBD12-1.1 ou de 150ms para CBD12-1.2.

3.5.5) Preparo dos meios de alinhamento para medir RDCs

- PEG (*n*-alquil-poli(etilenoglicol) ($C_{12}E_5$) + *n*-alquil-álcool (*n*-hexanol))

A fase lamelar ($L\alpha$) foi preparada segundo Rückert e Otting (Rückert e Otting 2000), dissolvendo $C_{12}E_5$ em uma solução aquosa de tampão (pH 7,4) contendo a proteína de interesse e 10% de D_2O , sendo a porcentagem em massa de $C_{12}E_5$ / H_2O+D_2O igual a 3%. O *n*-hexanol foi adicionado em etapas de 1 μ L sob agitação vigorosa até atingir a razão molar $C_{12}E_5$ / *n*-hexanol de 0,96. A fase $L\alpha$ é relativamente viscosa e transparente. Em baixas concentrações de álcool a solução apresentava-se bifásica, e tornava-se instantaneamente opalescente quando ultrapassado o limite da fase $L\alpha$.

- Géis comprimidos de poliacrilamida

Os géis de poliacrilamida foram preparados segundo Sass et al (Sass et al. 2000) conforme descrito a seguir: um tubo de vidro cilíndrico, de 5mm de diâmetro, teve uma extremidade vedada com parafilme. Uma solução de 40% poliacrilamida foi preparada utilizando a proporção acrilamida:N,N'-metilenobisacrilamida igual a 37,5:1. Esta solução de acrilamida foi diluída em água (6% acrilamida), e em seguida adicionou-se N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED) (0,1% m/v) e persulfato de amônio (0,1% m/v) para iniciar o processo de polimerização. Esta solução foi transferida ao tubo de vidro previamente preparado antes que a polimerização iniciasse. Após a completa polimerização, o gel foi retirado do tubo pela aplicação de pressão mecânica branda com um jato de água. O gel foi lavado exaustivamente com água (durante a noite) para retirar o excesso de acrilamida, cortado em segmentos de 3 cm e, em seguida, seco em uma

estufa a 37°C durante 12 horas, de modo que o diâmetro do gel fosse reduzido para 1-2mm. O gel seco foi colocado em um tubo shigemi (Shigemi, Inc.), em seguida um volume de 300 uL de uma solução contendo 250uM de proteína foi adicionada, e o êmbolo do tubo shigemi foi ajustado para uma altura de 18mm. Desta maneira, o gel entumeceu na presença da proteína e sob pressão, de modo a gerar acoplamentos dipolares de até 20 Hz.

- *Bacteriófagos (Pf1)*

Os bacteriófagos Pf1 utilizados para induzir alinhamento dipolar residual foram adquiridos comercialmente (Asla Biotech) em 20 mM de tampão Tris pH 7.4. As soluções anisotrópicas foram preparadas pela adição de 14mg/mL de Pf1 a uma solução 160μM de CBD12-1.1 uniformemente marcado com ^2H , ^{15}N e ^{13}C , e na presença ou na ausência de 1 mM of CaCl_2 .

3.5.6) *Medidas e análise de dados de RDCs*

Os desdobramentos das frequência de nitrogênio (^{15}N) devido ao acoplamento escalar ($^1\text{J}_{\text{NH}}$, situação isotrópica) ou ao acoplamento escalar e dipolar ($^1\text{J}_{\text{NH}} + \text{D}_{\text{NH}}$, situação anisotrópica) foram obtidos a partir da aquisição de um par de espectros de ^1H - ^{15}N HSQC e ^1H - ^{15}N TROSY na ausência ou presença do meio de alinhamento. A diferença entre a posição dos picos na dimensão de ^{15}N nos espectros de HSQC e TROSY é equivalente à metade do desdobramento total devido ao acoplamento escalar (amostra isotrópica) ou acoplamento escalar e dipolar (amostra anisotrópica). Os centros dos picos nos espectros ^1H - ^{15}N HSQC e ^1H - ^{15}N TROSY foram determinados a

partir de um ajuste do formato dos picos à uma função Gaussiana por meio do software Analysis CcpNmr.

O tensor de alinhamento foi calculado ajustando-se os dados experimentais de acoplamentos dipolares residuais (D_{NH}) às coordenadas de CBD1, CBD2 ou CBD12 obtidas a partir da estrutura cristalográfica de CBD12 (3RB5), ou dos domínios CBD1 (3E9T) e CBD2 (3E9U) isolados, por *singular-value decomposition* (Losonczi et al. 1999). Este ajuste permite obter os componentes principais do tensor de alinhamento da molécula (D_{xx} , D_{yy} e D_{zz}), e também rodar as coordenadas de forma que o sistema de referência da molécula coincida com os eixos principais do tensor.

A modelagem de CBD12-1.1 baseada nos dados de RDC foi feita pelo cálculo de dois tensores de alinhamento, um para cada domínio, seguido da rotação dos domínios CBD1 e CBD2, isoladamente, de modo que as coordenadas de referência de cada um deles coincidissem com os respectivos tensores de alinhamento. Após as rotações, CBD2 foi submetido a operações de translação em relação à CBD1, até que as coordenadas do $C\alpha$ da H553, presente no *linker* entre CBD1 e CBD2, fossem coincidentes nos dois domínios. Tendo em vista que os RDCs são invariantes a rotações de 180° ao longo dos eixos x, y e z, esta análise gerou 16 estruturas simétricas, 4 delas únicas. Estruturas que apresentavam impedimento estérico foram excluídas.

A concordância entre os valores de RDCs calculados a partir da estrutura e os dados experimentais foi avaliada através do fator de qualidade Q. Este fator é calculado pelo desvio quadrático médio (RMSD) da diferença

entre os dados calculados e experimentais em relação ao desvio quadrático médio dos dados experimentais de acordo com a expressão **8**:

$$Q = \frac{\text{norma}(\vec{d}_{calc} - \vec{d}_{exp})}{\text{norma}(\vec{d}_{exp})} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^N (d_{calc}^i - d_{exp}^i)^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (d_{exp}^i)^2}} \quad (8)$$

em que N é o número de medidas de acoplamento (d). O valor de Q pode variar de 0 (idêntico) ou maior que 1 (ausência de correlação). Salvo onde previamente mencionado, todos os dados de RMN foram analisados por scripts criados em nosso laboratório para Matlab (MathWorks, Inc).

4) Resultados e discussões

Capítulo 1) CBD12-1.1

CBD12 é bem enovelada tanto na ausência quanto na presença de Ca^{2+}

Os espectros de RMN de correlação ^1H - ^{15}N HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) adquiridos para a CBD12-1.1 na presença e na ausência de Ca^{2+} estão ilustrados na **Figura 32**. Estes espectros apresentam picos bem dispersos, o que é consistente com proteínas bem enoveladas. Menos picos foram observados do que o esperado: CBD12-1.1 possui 273 resíduos de aminoácidos, dos quais 11 são prolinas, deste modo, esperava-se observar 262 picos correspondentes a pares ^1H - ^{15}N amídicos da cadeia principal, entretanto, apenas 178 picos foram observados para CBD12-1.1 apo e 227 para a proteína ligada a Ca^{2+} . Esta falta de correlações no espectro de HSQC pode ser consequência de trocas conformacionais na escala de tempo de milissegundos, as quais levam ao alargamento de linhas e coalescência de sinais. Outro fator que poderia colaborar para a ausência de alguns picos é que devido a amostra ser fracionalmente deuterada, pode ser que haja alguns grupos $^{15}\text{N}^2\text{Hs}$ mais internos, menos acessíveis ao solvente, e que levam um tempo maior para trocar o deutério por hidrogênio, portanto o sinal correspondente a esses grupos não é observado no ^1H - ^{15}N HSQC.

Após a adição de Ca^{2+} , alguns picos sofreram mudanças de deslocamento químico, outros desapareceram, enquanto novos picos surgiram (**Figura 32**). Isso mostra que a proteína recombinante é funcional

pois preserva sua capacidade de ligar Ca^{2+} . Além disso, foi observada sobreposição espectral significativa na região de $\sim 8,5$ ppm (dimensão de ^1H), a qual é menos severa na presença de íons cálcio, sugerindo que CBD12-1.1 torna-se mais ordenada após a ligação de Ca^{2+} . Uma vez que CBD2 não liga Ca^{2+} , os efeitos espectrais observados são devidos apenas à ligação de Ca^{2+} em CBD1.

Figura 32. Sobreposição dos espectros de ^1H - ^{15}N HSQC de CBD12-1.1 livre (preto) e de CBD12-1.1 na presença de 20mM de CaCl_2 (vermelho). O espectro adquirido na presença de Ca^{2+} está apresentado com apenas duas linhas de contorno para melhorar a clareza da figura. As amostras continham $\sim 250\mu\text{M}$ de proteína.

4.1) Assinalamento das cadeias polipeptídicas

Conforme descrito na seção de materiais e métodos, para assinalar as ressonâncias de CBD12-1.1 foi adquirido um conjunto de experimentos de RMN tridimensional heteronuclear (HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HN(CA)CO, HNCACB e HN(CO)CACB) com uma amostra enriquecida uniformemente com ^{15}N e ^{13}C e parcialmente com ^2H , na ausência de Ca^{2+} . A análise desses espectros permitiu o assinalamento de 52 dos 178 picos identificados no espectro de ^1H - ^{15}N HSQC. Dos 52 picos assinalados, 47 pertencem ao domínio CBD2 (**Figura 33**). A sequência EEADD assinalada em CBD1 não apresenta densidade eletrônica na estrutura cristalográfica de CBD12-1.1 e, portanto, não está representada na **Figura 33**. As principais razões para o baixo número de assinalamentos são a falta de correlações nos espectros de tripla ressonância (pouca sensibilidade), e a grande sobreposição de ressonâncias no espectro de ^1H - ^{15}N HSQC (complexidade espectral). Estas limitações estão diretamente relacionadas à elevada massa molar da proteína em questão (32kDa).

MHHHHHHLEDDEEADDPIRMYPFEPGHYTMENCGEFEVRVV
 RRGDISTYASVEYETQDGTASAGTDFVGRKGLLSFPPGVDEQR
 FRIEVIDDDVFEEDECFYIRLFNPSEGVKLAVPMIATVMILDDD
 HAGIFAFTDSVFEITESVGRFELKVMRYSGARGTVIVPYWTEN
 DTATESKDYEGARGELVFENNESEKFIDLFIEESSYEKDVSEKVV
 HIGEPRLAPDDELAAKIKEVEKKPVQDLTELDRIILLSKPRNGEL
TTAYVRIRESQE

Figura 33. Os resíduos de CBD12-1.1 assinalados a partir da análise de dados obtidos com CBD12 marcada uniformemente com ^{15}N e ^{13}C e fracionalmente com ^2H , na ausência de Ca^{2+} , estão destacados em vermelho tanto na sequência primária de CBD12-1.1 (acima) quanto na estrutura cristalográfica da proteína (abaixo) (PDB 3RB5).

Um outro fator que contribuiu para a dificuldade em adquirir bons espectros foi o fato de que a amostra não era estável e agregava com o tempo. A composição do tampão e as condições de temperatura utilizadas (vide materiais e métodos) foram baseadas em trabalhos anteriores envolvendo o domínio CBD12 do CALX e do NCX (Salinas, Bruschweiler-Li, Johnson, e Brüschweiler 2011; Wu et al. 2011). Na tentativa de otimizar estas condições e obter uma amostra mais estável, foram feitos testes utilizando pH mais baixo (tampão MES, pH 6,0) e menor temperatura (25°C), entretanto, nenhuma melhora na estabilidade da amostra foi observada e as condições iniciais foram mantidas.

Uma estratégia para aumentar o número de assinalamentos foi a produção de CBD12-1.1 perdeuterada, ou seja, uniformemente marcada com ^2H , ^{15}N e ^{13}C . Esperava-se, desta forma, obter espectros heteronucleares com maior sensibilidade, já que a contribuição das interações dipolares ^{13}C -

^1H à velocidade de relaxação da magnetização transversal (R_2) de ^{13}C seria minimizada a partir da substituição de hidrogênios alifáticos e aromáticos por deutério.

A princípio, a perdeuteração funcionou, pois a partir do espectro de ^1H foi possível ver uma diminuição significativa dos sinais de hidrogênios alifáticos ($\sim 1\text{ppm}$) e aromáticos ($\sim 7\text{ppm}$) (**Figura 34 A**). Entretanto, a amostra perdeuterada apresentou-se menos estável em solução e agregou após 48 horas de experimento mesmo a menores concentrações de proteína ($\sim 120\mu\text{M}$), tornando a aquisição de espectros de tripla ressonância inviável (**Figura 34 B**).

Outra estratégia para completar o assinalamento do maior número de resíduos de aminoácidos possível foi obter assinalamentos para os domínios CBD1 e CBD2 isolados para que, caso estas proteínas mantivessem a mesma conformação que apresentam em CBD12 e os picos apresentassem as mesmas frequências no espectro de ^1H - ^{15}N HSQC, estes assinalamentos fossem transferidos para os espectros de CBD12. Era esperado que o assinalamento de CBD1 e CBD2 fosse uma tarefa mais fácil pelo fato de possuírem metade da massa molar de CBD12, o que geraria menor sobreposição espectral, e também picos mais intensos porque o tempo de relaxação transversal (T_2) é maior para essas proteínas menores. O capítulo 3 tratará dos resultados obtidos para os domínios CBD1 e CBD2.

De fato, a obtenção dos assinalamentos de CBD1 isolado foi muito útil para ampliar o número de assinalamentos de CBD12, pois todos os assinalamentos adquiridos para CBD1 isolado puderam ser transferidos para

CBD12. Para CBD12 apo, este número foi ampliado de 52 para 117 picos assinalados (**Figura 35 e Anexo A**).

A)

B)

Figura 34. Marcação isotópica de CBD12-1.1 com deutério. **(A)** Comparação entre espectros de ^1H obtidos para CBD12-1.1 marcada fracionalmente (vermelho) e uniformemente (azul) com ^2H . **(B)** Comparação entre espectros de CBD12-1.1 perdeuterada no início dos experimentos (t_0 , em azul) e após 48 horas ($t=48\text{h}$, em vermelho).

MHHHHHHLEDDEEADDPIRMYFEPGHYTMENCGEFEVRVV
RRGDISTYASVEYETQDGTASAGTDFVGRKGLLSFPPGVDEQR
 FRIEVIDDDVFEEDECFYIRLFNPSEGVKLAVPMIATVMILDDD
HAGIFAFTDSVFEITESVGRFELKVMRYSGARGTVIVPYWTEN
 DTATESKDYEGARGELVFENNESEKFIDLFIEESSYEKDVSFKV
 HIGEPRLAPDDELAAKIKEVEKKPVQDLTELDRILLLSKPRNGEL
TTAYVRIRESQE

Figura 35. Resíduos de CBD12-1.1 assinalados na ausência de Ca^{2+} após transferir os assinalamentos obtidos a partir da análise dos espectros de CBD1 isolado. Os resíduos assinalados estão destacados em vermelho tanto na sequência primária de CBD12 (acima) quanto na estrutura cristalográfica da proteína (abaixo) (PDB 3RB5).

Espectros heteronucleares tridimensionais não foram adquiridos no caso de CBD12 ligada a Ca^{2+} , no entanto, foi possível obter o assinalamento de 75 resíduos (**Figura 36 B**) por meio da transferência de assinalamentos de CBD1 ligado a Ca^{2+} e de CBD12 apo para picos coincidentes nos espectros ^1H - ^{15}N HSQC de CBD12 (**Figura 36 A**).

A)

B)

Figura 36. Resíduos de CBD12 assinalados na presença de Ca^{2+} . O assinalamento foi realizado por meio da transferência dos assinalamentos obtidos POR sobreposição dos espectros de CBD1 ligado a Ca^{2+} e CBD12 livre **(A)**. Os resíduos assinalados estão destacados em vermelho na estrutura cristalográfica da proteína (PDB 3RB5) **(B)**.

A ligação de Ca^{2+} em CBD1 reduz movimentos inter-domínios em CBD12 de CALX

4.2) Medidas de R_1 e R_2 de ^{15}N

Movimentos na escala de tempo de ps a ns podem ser caracterizados utilizando medidas de velocidades de relaxação da magnetização longitudinal (R_1) e transversal (R_2) de ^{15}N e do NOE heteronuclear ($\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}$), sendo estas medidas comumente utilizadas para obter informação acerca da dinâmica interna de proteínas. R_1 e R_2 estão relacionados com o tempo de correlação rotacional (τ_c) da molécula (**Figura 37**), o qual é diretamente proporcional à massa molecular da molécula.

Figura 37. Dependência de R_1 e R_2 com τ_c para um spin de ^{15}N de um grupo NH em uma molécula esférica a 800 MHz.

Velocidades de relaxação da magnetização transversal e longitudinal foram medidas para cada spin de ^{15}N ao longo do esqueleto polipeptídico de CBD12-1.1 com e sem Ca^{2+} . Os dados de R_2 e R_1 foram adquiridos com a mesma amostra para garantir que a viscosidade da solução fosse a mesma. A concentração de proteína utilizada foi 250 μM para minimizar agregação durante os experimentos.

Foram realizadas análises qualitativas através da distribuição de R_2 e R_1 de diferentes picos (**Figura 38**) em que se observou, após a adição de Ca^{2+} a CBD12, uma diminuição do valor médio de R_1 acompanhado do aumento do valor médio de R_2 .

Figura 38. Distribuição de R_1 e R_2 de ^{15}N para as CBD12 livre (apo) e ligado a Ca^{2+} .

Enquanto que R_2 e R_1 de ^{15}N dependem da dinâmica local de cada vetor de ligação ^1H - ^{15}N e do tempo de correlação global (τ_c), a razão entre R_2/R_1 é dependente apenas do tensor de difusão rotacional (Kay, Torchia, e Bax 1989). Uma análise mais detalhada indicou um aumento significativo das razões R_2/R_1 de ^{15}N ao longo da cadeia polipeptídica de CBD12-1.1 após a adição de Ca^{2+} a CBD1 (**Figura 39**). O tempo de correlação rotacional médio estimado a partir da razão R_2/R_1 de ^{15}N , assumindo difusão isotrópica, aumentou de 14 ns no estado livre para 20 ns para a proteína ligada a Ca^{2+} (**Figura 39**). Além disso, analisando estes dados separadamente para CBD1 e CBD2, observou-se que os valores de τ_c são bastante homogêneos para os dois domínios, o que é esperado, uma vez que CBD1 e CBD2 possuem massas molares muito próximas (16,1 kDa e 19,2 kDa, respectivamente).

Figura 39. Comportamento da razão de R_2/R_1 de ^{15}N ao longo da cadeia polipeptídica de CBD12-1.1-CALX na ausência (azul) ou na presença (vermelho) de Ca^{2+} . Os valores médios para os tempos de correlação isotrópicos (τ_c) estão indicados.

Tendo em vista a maneira pela qual R_1 e R_2 se relacionam com τ_c (**Figura 37**), pode-se concluir que o comportamento observado indica que CBD12 tomba como uma molécula maior após a adição de Ca^{2+} . Este comportamento é análogo ao descrito para CBD12 do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ canino (Salinas, Bruschweiler-Li, Johnson, e Bruschweiler 2011).

A fim de avaliar se esse aumento de tamanho aparente após a adição de Ca^{2+} era devido à agregação da amostra, foram realizadas medidas do coeficiente de difusão translacional (D_t) de CBD12 livre e ligado a Ca^{2+} . A difusão das formas apo e holo de CBD12 1.1 e da forma holo de CBD12 1.2 (**Tabela 7**) foi investigada por DOSY (*Difusion-Ordered Spectroscopy*). Os valores de D_t obtidos tanto na presença quanto na ausência de íons cálcio são consistentes com uma proteína de 32 kDa, monomérica (~7,50 no caso de CBD12-1.1, **Tabela 7**), e com o valor descrito na literatura para CBD12

canino (Salinas, Bruschweiler-Li, Johnson, e Bruschweiler 2011). Os valores experimentais também coincidem com valores calculados a partir da estrutura cristalográfica de CBD12-1.1 por meio de modelos hidrodinâmicos incorporados nos programas SOMO e HYDROPRO (Rai et al. 2005; Ortega, Amorós, e García de la Torre 2011) (**Tabela 7**).

Tabela 7. D_t médio ($10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) experimental de CBD12-1.1, CBD12-1.2 e CBD12 canino (Salinas, Bruschweiler-Li, Johnson, e Bruschweiler 2011) e calculado (SOMO e HYDROPRO) para CBD12-1.1.

Medida	Apo	Ligado a Ca^{2+}
CBD12-1.1*	$7,68 \pm 0,28$	$7,38 \pm 0,45$
CBD12-1.1 SOMO		8,04
CBD12-1.1 HYDROPRO		7,92
CBD12 canino**	$7,33 \pm 0,40$	$7,81 \pm 0,31$
CBD12-1.2***	-	$7,69 \pm 0,27$

*Dados adquiridos a 25°C com intervalo de difusão de 200 ms ** Dados adquiridos a 25°C, com intervalo de difusão de 500 ms ***Dados adquiridos a 25°C, com intervalo de difusão de 150 ms

Adicionalmente, o estado oligomérico de CBD12-1.1 nos estados livre e ligado a Ca^{2+} foi investigado através de cromatografia por exclusão de tamanho (**Figura 40**). Conforme observado no cromatograma, o volume de eluição de CBD12-1.1 é o mesmo para as formas apo e holo, indicando que o estado oligomérico é o mesmo nos dois casos e, portanto, corroborando os dados obtidos por DOSY. Portanto, o aumento de R_2 com a adição de cálcio não se deve à agregação da proteína.

É possível explicar a diferença nos valores de R_2 e R_1 das formas apo e holo por analogia com o CBD12 canino: na ausência de Ca^{2+} os domínios CBD1 e CBD2 movimentam-se de forma independente, enquanto que na forma holo, a ligação de Ca^{2+} em CBD1 faz com que os dois domínios movimentem-se juntos como um corpo único (rígido), resultando em um tempo de relaxação consistente com uma proteína maior. Ou seja, na

ausência de Ca^{2+} , CBD12 é mais flexível, permitindo maior movimentação de CBD1 com relação a CBD2 do que quando a proteína está ligada a Ca^{2+} .

Figura 40. Cromatografia por exclusão de tamanho para CBD12-1.1 nas formas apo (em azul) e holo (em vermelho). Coluna utilizada: Superdex-75 HR-10/30 (GE Healthcare) (23mL); fluxo: 0,5mL/min.

4.3) Testes preliminares com a sonda paramagnética Cys-Ph-TAHA

No caso de proteínas com mais de um domínio a forma mais direta de obter informações a respeito da flexibilidade e orientação entre os domínios é a marcação de um deles com um centro paramagnético (Ivano Bertini et al. 2009; Russo et al. 2013). A introdução de uma sonda carregada com um íon paramagnético induz um alinhamento parcial da proteína em relação a **B**. Neste caso, o alinhamento induzido do domínio marcado é diferente do alinhamento dos demais domínios da proteína, gerando RDCs de magnitudes bem distintas a menos que não haja flexibilidade entre esses domínios (**Figura 41**) (Ivano Bertini et al. 2008). Além disso, a marcação de um dos domínios com sondas paramagnéticas permite, por meio de medidas

medidas de PCS (*pseudocontact shifts*) e PRE (*paramagnetic relaxation enhancement*), determinar distâncias inter-resíduos de até 40Å, úteis para determinar a orientação média entre os domínios.

Figura 41. Distribuição relativa de RDCs obtidos pela marcação do domínio A com uma sonda paramagnética no caso de um sistema rígido (esquerda) ou de um sistema flexível (direita). Figura retirada de (Ivano Bertini et al. 2008)

Neste intuito, foram feitos testes com a sonda Cys-Ph-TAHA (**Figura 42**), fornecida pelo professor Dr. Christian Griesinger do Instituto Max Planck de Química Biofísica - Göttingen, Alemanha. Nesta sonda, os sítios de coordenação do lantanídeo compreendem seis grupos carboxilatos e os três nitrogênios da molécula, enquanto que o sítio de ligação da sonda à proteína corresponde ao grupo $\text{S-SO}_2\text{CH}_3$ (**Figura 42**) que reage com grupos tióis de cisteínas livres provavelmente via mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$.

Figura 42. Estrutura de Cisteinil-fenil-triaminohexaacetato (Cys-Ph-TAHA).

Conforme descrito na seção de materiais e métodos, para a realização dos testes a sonda foi complexada com dois metais lantanídeos: o lutécio, diamagnético, e o térbio, paramagnético. A presença de um íon diamagnético não gera PRE ou PCS, mas é importante porque permite medidas com maior precisão, uma vez que trata-se um “branco” que, assim como a amostra paramagnética, possui a molécula de Cys-Ph-TAHA ligada no mesmo resíduo, provocando os mesmos efeitos sobre os deslocamentos químicos.

Foram realizadas análises de espectrometria de massas (**Figura 43**) e de RMN de ^1H (**Figuras 44**) com a sonda antes e após a complexação com os íons lantanídeos, com o objetivo de avaliar a integridade do reagente recebido e a efetividade da reação de complexação. Estas análises indicaram que antes da reação com os lantanídeos, a sonda encontrava-se íntegra e pura.

A partir das análises de cromatografia líquida de alta eficiência por hidrofobicidade após as reações de complexação, notou-se a ausência do pico de retenção do composto de partida (~15min) no cromatograma (**Figura 43A**). Em contrapartida, um novo pico surgiu com um maior tempo de retenção (~42 min) (**Figura 43A**). Isso indica que a reação procedeu e que os complexos formados interagem mais fortemente com a coluna de hidrofobicidade (C18), o que é esperado tendo em vista que a sonda livre possuía grupos carboxilatos livres, cujas cargas são neutralizadas após a complexação com Tb^{3+} ou Lu^{3+} .

Após a complexação com lutécio ou térbio, não foi possível identificar o íon molecular da molécula Cys-Ph-TAHA livre ($m/z=753,2$) nos espectros de massa (**Figura 43B**) sugerindo que houve complexação com o metal, por

outro lado o íon molecular esperado para os complexos ($m/z=928,2$ no caso da complexação com lutécio) também não foi observado.

A análise dos espectros de ^1H do produto de reação da sonda com Lu^{3+} é complexa, mas a existência de picos mais blindados do que aqueles observados no espectro do produto de partida sugere que a reação de complexação ocorreu (**Figura 44D**).

Como esperado no caso da reação com térbio, observou-se um grande alargamento de todas as linhas no espectro de ^1H , inviabilizando a análise dos sinais (**Figura 44E**). Não foi possível analisar se este alargamento era devido somente à complexação da sonda com um íon térbio, ou se mesmo após a precipitação com NaOH ainda havia íons Tb^{3+} livres em solução.

Mesmo sem conseguir caracterizar os complexos, realizou-se a reação destes com o mutante CBD12-1.1-T560C (**Figura 29**, vide materiais e métodos), uma vez que este foi o primeiro a ser produzido com sucesso entre os mutantes desenhados e clonados. Para testar a efetividade da reação entre a sonda complexada com os lantanídeos e a proteína, adquiriu-se espectros de massas antes e após a reação (**Figura 45**). Esses espectros indicaram que a reação de acoplamento entre a sonda e a proteína não ocorreu, pois observou-se exatamente os mesmos íons moleculares (m/z 31075) nos dois espectros. O motivo para a reação não ter funcionado pode ser o estado de oxidação da cisteína ou o fato deste resíduo não estar suficientemente exposto.

Não foi possível otimizar a reação entre a proteína e o complexo sonda+lantanídeo porque não havia quantidade suficiente de sonda para

repetir o experimento. Por esta razão, optou-se por realizar medidas de RDCs utilizando meios de alinhamento (seção a seguir).

A)

B)

Figura 43. Análises de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massas de Cys-Ph-TAHA. **A)** Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) antes (acima) e após (abaixo) a reação com Lu³⁺. Coluna Phenomenex Gemini C-18 (250x4.6 mm – 5µm); Solvente A: H₂O, 0,1 % ácido fórmico, solvente B: acetonitrila, gradiente: 0,01min 5% B, 40min 70%B, 60 min 100%B **B)** Espectrometria de massas antes (acima) e após (abaixo) a reação com Lu³⁺. Cys-Ph-TAHA (C₂₇H₃₇N₄O₁₇S₂): ESI-MS m/z (H₂O, modo positivo)= 753,2.

Figura 44. RMN de ^1H de Cys-Ph-TAHA livre (**A**, **B** e **C**). **A** e **B** são expansões dos sinais. **C)** Espectro de ^1H completo. RMN ^1H (500MHz, $\text{H}_2\text{O}+5\% \text{ } ^2\text{H}_2\text{O}$, δ): 7.81 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, arom. H-3, H-5), 7.66 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, arom. H-2, H-6), 4.86-4.95 (m, 1H, SCH_2CH), 3.83 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H, SCHaHb), 3.69-3.61 (m, 7H, SCHaHb , 3 x C- α CH_2), 3.56 (s, 12H, 6 x $\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 3.42 (s, 3H, CH_3) ppm. Espectros de ^1H de Cys-Ph-TAHA-Lu (**D**) e de Cys-Ph-TAHA-Tb (**E**).

Figura 45. Espectros de massas (MALDI-TOF) do mutante T560C de CBD12-1.1 antes (acima) e após (abaixo) a reação de acoplamento com a sonda Cys-Ph-TAHA complexada com Tb³⁺. Matriz: ácido sinapínico. Amostra diluída 50 x em 0.1% TFA e aplicada na proporção 2ul : 4ul de matriz. Na placa foi aplicado 1ul da mistura. Modo de aquisição: positivo.

4.4) Medidas de RDCs

Medidas de acoplamentos dipolares residuais (RDCs) podem ser utilizadas para determinar a orientação de vetores inter-atômicos em relação ao campo magnético externo (**B**) e também para obter informação a respeito de movimentos internos em escala de tempo de até milissegundos. A fim de caracterizar movimentos inter-domínios entre CBD1 e CBD2, RDCs de ^1H - ^{15}N foram medidos para CBD12-1.1 na presença e na ausência de Ca^{2+} .

O alinhamento parcial das moléculas de CBD12 foi obtido utilizando três meios de alinhamento diferentes: uma fase nemática de n-alkil-poli(etilenoglicol) (PEG, C_{12}E_5 + hexanol), géis de poliacrilamida e bacteriófagos (Pf1), conforme descrito na seção de materiais e métodos. O desdobramento das frequências de ressonância de spins ^{15}N devido ao alinhamento nestes três meios foi da ordem de 5 a 20 Hz. No caso de CBD12 ligada a Ca^{2+} , não foi possível realizar as medidas com PEG porque a presença de íons cálcio perturba a fase nemática, de forma que uma fase única, de cristal líquido, não pode ser obtida. Na ausência de Ca^{2+} o espectro obtido para CBD12-1.1 com PEG foi de boa qualidade e permitiu medir o acoplamento dipolar para 18 resíduos (**Figura 46A**). Os espectros obtidos na presença de géis de poliacrilamida foram de baixa qualidade porque este meio aumenta muito o tempo de correlação das proteínas, portanto as linhas tornaram-se muito alargadas e poucos picos puderam ser analisados (**Figuras 46B e 46C**). Felizmente, dados anisotrópicos de qualidade puderam ser obtidos para CBD12-1.1 tanto na presença quanto na ausência de Ca^{2+} pela adição de Pf1 (**Figuras 46B e 46C**). Nesta condição foi possível calcular

o acoplamento dipolar para 19 pares de spins ^1H - ^{15}N assinalados para o domínio CBD1 e 36 para o domínio CBD2 em CBD12-1.1 apo, e 47 para o domínio CBD1 e 11 para o domínio CBD2 em CBD12-1.1 ligado a Ca^{2+} . Estes dados foram utilizados para realizar toda a análise a seguir.

Figura 46. Sobreposição de espectros de ^1H - ^{15}N HSQC para CBD12-1.1 apo na presença de fagos (Pf1) e PEG (A) e na presença de fagos e gel de acrilamida (B); e para CBD12-1.1 ligado a Ca^{2+} na presença de fagos e gel de poliacrilamida (C).

As correlações entre o acoplamento dipolar observado para cada par de spins $^{15}\text{N}^1\text{H}$ amídico que possuía assinalamento e o respectivo valor teórico calculado por meio das coordenadas da estrutura cristalográfica de CBD12-1.1 ligado a Ca^{2+} (3RB5) ou das coordenadas dos domínios CBD1 (3E9T) e CBD2 (3E9U) isolados, são apresentadas na **Figura 47**.

O ajuste dos acoplamentos dipolares obtidos para CBD12 na presença ou na ausência de Ca^{2+} às coordenadas da estrutura cristalográfica de CBD12 ligado a Ca^{2+} (PDB 3RB5) mostrou que o alinhamento global (estimado a partir do componente axial do tensor de alinhamento, A_a) aumenta de 17,0 Hz para 52,1 Hz após a adição de Ca^{2+} (**Figura 47, Tabela 8**). Um alinhamento global maior indica uma estrutura mais rígida, já que a introdução de flexibilidade ocasiona uma distribuição ampla de orientações de vetores $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ (flexibilidade) ao longo do tempo o que leva a uma diminuição na magnitude dos RDCs medidos (*dynamic averaging*).

O fator de qualidade, “Q”, indica o grau de consistência entre os RDCs experimentais e aqueles calculados a partir de um modelo estrutural, o que por sua vez indica o grau de consistência entre a estrutura da proteína em solução e a estrutura cristalográfica, de modo que quanto menor o valor de Q, maior a semelhança entre as duas estruturas. Valores maiores que 1,0 indicam ausência total de correlação. Os RDCs obtidos para CBD12-1.1 ligado a Ca^{2+} mostram que a proteína em solução é consistente com a estrutura cristalográfica (PDB 3RB5; $Q = 0,49$) (**Figura 47, Tabela 9**). Essa observação sugere que, pelo menos na forma ligada a Ca^{2+} , a conformação média de CBD12-1.1 em solução é similar à conformação observada no cristal. Em contraste, os dados obtidos na ausência de Ca^{2+} não se ajustam

bem à estrutura cristalográfica de CBD12 na forma holo (PDB 3RB5; $Q = 0,78$) (**Figura 47A, Tabela 9**), sugerindo que a estrutura média de CBD12 apo é diferente da estrutura cristalográfica da forma ligada a cálcio.

O ajuste dos RDCs obtidos para CBD12-1.1 tanto na presença quanto na ausência de Ca^{2+} à estrutura cristalográfica do domínio CBD1 isolado nas formas livre ou ligada a Ca^{2+} resulta em fatores de qualidade mais baixos (maior concordância) (**Figura 47B, Tabela 9**), o que é consistente com a maior resolução que estas estruturas apresentam (1,6 Å) relativamente à estrutura cristalográfica de CBD12 (2.35 Å). Esta observação reflete a dependência dos RDCs a pequenas alterações locais na estrutura cristalográfica (Ivano Bertini et al. 2009). No caso de CBD2, fatores de qualidade similares foram obtidos utilizando as estruturas cristalográficas de CBD12 ou CBD2, o que é razoável tendo em vista que a resolução destas estruturas é similar (2.35 Å e 2.50 Å, respectivamente).

A) **B)**

Figura 47. Correlação entre ^1H - ^{15}N RDCs experimentais e calculados para CBD12-1.1 parcialmente alinhado com bacteriófagos (Pf1) na presença ou na ausência de Ca^{2+} . Os valores calculados foram obtidos do ajuste dos RDCs às estruturas cristalográficas de CBD12-1.1 (PDB 3RB5) **(A)**, CBD1 livre (PDB 3E9T, cadeia C) ou na presença de Ca^{2+} (PDB 3E9T, cadeia B) e CBD2-1.1 (PDB 3E9U) **(B)**.

Tabela 8. Componente axial (A_a , Hz) e assimetria (η) do tensor de alinhamento obtidos através do ajuste dos dados de RDCs (Pf1) à estrutura cristalográfica de CBD12-1.1 (PDB 3RB5).

Domínio	Parâmetro	Apo	Holo
CBD12	A_a	-17.01	-52.07
	η	0.34	0.58
CBD1	A_a	-28.28	-56.12
	η	0.28	0.40
CBD2	A_a	-23.65	45.31
	η	0.44	0.49

Tabela 9. Fator de qualidade (Q) obtido para o ajuste dos dados de RDCs de CBD12-1.1 na presença (holo) ou na ausência (apo) de Ca^{2+} com as estruturas cristalográficas de CBD12 holo (3RB5) ou de CBD1 (3E9T) e CBD2 (3E9U) no estado apo. A análise dos dados foi realizada utilizando todos os grupos ^1H - ^{15}N assinalados (HNs totais) ou apenas aqueles localizados em estruturas secundárias (HNs rígidos).

Domínio	Fator-Q	Apo	Holo
CBD12 (3RB5)	HNs totais	0.78	0.49
	HNs rígidos	0.70	0.39
CBD1 (3RB5)	HNs totais	0.63	0.47
	HNs rígidos	0.50	0.44
CBD2 (3RB5)	HNs totais	0.50	0.29
	HNs rígidos	0.12	0.01
CBD1 (3E9T_C) (Apo)	HNs totais	0.36	0.24
	HNs rígidos	0.36	0.25
CBD1 (3E9T_B) (Holo)	HNs totais	0.32	0.28
	HNs rígidos	0.25	0.24
CBD2 (3E9U)	HNs totais	0.49	0.25
	HNs rígidos	0.00	0.01

A fim de calcular a orientação média entre CBD1 e CBD2 na presença e na ausência de Ca^{2+} , dados de RDCs obtidos com Pf1 foram utilizados para orientar os domínios um em relação ao outro, conforme descrito na seção 1.1.7. Este cálculo gerou duas soluções possíveis para cada estado de CBD12, sem sobreposição de átomos. No caso de CBD12 com Ca^{2+} , um dos modelos gerados é muito similar à estrutura cristalográfica (PDB 3RB5) e o outro possui um arranjo praticamente linear dos domínios (**Figura 48A**). Para CBD12 livre, os dois modelos obtidos sem sobreposição de átomos possuem um arranjo aberto, quase linear (**Figura 48B**).

Para discriminar entre as duas soluções possíveis para cada estado de CBD12, realizou-se o mesmo cálculo utilizando os RDCs obtidos com os outros meios de alinhamento (gel de poliacrilamida e PEG). Das quatro soluções obtidas para CBD12 ligado a Ca^{2+} na presença do gel de poliacrilamida, uma delas coincide com um dos modelos obtidos com Pf1, a qual se assemelha à estrutura cristalográfica (**Figura 49**). Considera-se que esta é a solução correta, pois é a solução comum aos dois meios de alinhamento. No caso da proteína livre, dados de RDCs obtidos com PEG geraram quatro modelos, um dos quais é bastante semelhante a uma das conformações estendidas obtida com Pf1, e que é caracterizada por um ângulo de aproximadamente 169° entre CBD1 e CBD2 (**Figura 49**). Estes dados indicam que o ângulo médio entre CBD1 e CBD2 na ausência de Ca^{2+} é significativamente mais aberto do que na presença de Ca^{2+} .

Figura 48. Modelos gerados a partir dos dados de RDCs obtidos para CBD12 na presença **(A)** ou na ausência **(B)** de Ca^{2+} utilizando como meio de alinhamento fagos Pf1. O ângulo entre CBD1 e CBD2 está indicado abaixo de cada modelo.

Figura 49. Sobreposição dos modelos gerados a partir dos dados de RDCs obtidos para CBD12 na ausência (acima) ou na presença (abaixo) de Ca^{2+} , utilizando como meio de alinhamento fagos Pf1 (dourado), gel de poliacrilamida (azul) ou PEG (cor-de-rosa). A estrutura cristalográfica de CBD12 na presença de Ca^{2+} (PDB 3RB5) está representada em cinza. Os ajustes dos RDCs obtidos na presença de Pf1 e PEG (para a proteína livre) ou na presença de Pf1 e gel de poliacrilamida (para a proteína ligada a Ca^{2+}) às soluções obtidas a partir de dados na presença de Pf1 estão representados à esquerda.

4.5) Conclusão

Tanto as medidas das velocidades de relaxação de ^{15}N quanto os dados de acoplamentos dipolares residuais de ^1H - ^{15}N para CBD12-1.1 descritos acima indicam que a ligação de Ca^{2+} em CBD1 diminui consideravelmente a flexibilidade entre os dois CBDs. A análise dos dados de RDCs também mostrou que a orientação média entre CBD1 e CBD2-1.1 é mais fechada na forma ligada a Ca^{2+} , em concordância com a estrutura

cristalográfica (PDB 3RB5). Uma vez que este comportamento, ao menos em termos de dinâmica, é o mesmo observado para CBD12 de *Canis familiaris* (Salinas, Bruschweiler-Li, Johnson, e Bruschweiler 2011), é intrigante que a ligação de Ca^{2+} no domínio CBD1 induza uma resposta oposta pelo trocador de *Drosophila melanogaster*.

O fato de o domínio CBD2 não ligar cálcio, em contraste com os outros trocadores eucarióticos, não é capaz de explicar o comportamento incomum de CALX porque a mutação dos resíduos que formam os sítios de ligação de Ca^{2+} em CBD2 de NCX (*knockout* da função de CBD2) não faz com que este trocador apresente o fenótipo oposto, como acontece em CALX (Besserer et al. 2007). Além disso, possíveis mudanças conformacionais na região transmembranar do CALX em relação ao NCX também não são capazes de explicar a diferença de fenótipos, uma vez que a remoção da alça intracelular por tripsina leva à extinção da regulação iônica e os dois trocadores continuam transportando Na^+ e Ca^{2+} (Donald W. Hilgemann 1990; Chris Dyck et al. 1998). Logo, a resposta para esta questão deve estar em outras regiões regulatórias localizadas na alça intracelular nas proximidades de CBD12.

Capítulo 2) CBD12-1.2

A proposta de estudar a isoforma 1.2 do trocador de *Drosophila melanogaster* (CBD12-1.2-CALX) teve como objetivo avaliar o papel do domínio CBD2 no mecanismo de regulação alostérica dos trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. É notória a importância deste domínio, uma vez que as propriedades regulatórias dos NCXs são aperfeiçoadas por *splicing* alternativo presente em CBD2 gerando diferentes isoformas. Possivelmente, as diferentes propriedades regulatórias destas isoformas ajustam o funcionamento do trocador à demanda específica de cada tipo de célula por Ca^{2+} intracelular (C. Dyck et al. 1999). No caso de CALX, o *splicing* alternativo dá origem a duas isoformas, CALX1.1 e CALX-1.2, as quais diferenciam-se por 5 resíduos de aminoácidos na alça FG de CBD2, localizada próximo à interface com CBD1 (Omelchenko et al. 1998) (**Figura 50**).

Estudos de cristalografia mostraram que o domínio CBD12 é estruturalmente muito parecido nas duas isoformas (**Figura 50**) embora elas exibam respostas diferentes à ligação de Ca^{2+} em CBD1: a isoforma 1.1 é inibida enquanto a isoforma 1.2 é insensível à variação de concentração intracelular de íons cálcio (Omelchenko et al. 1998; Wu et al. 2009)

Figura 50. Sobreposição das estruturas cristalográficas das isoformas 1.1 (em cinza, PDB 3RB5) e 1.2 (em vermelho, PDB 3RB7) de CBD12-CALX. Os íons Ca^{2+} estão representados por esferas verdes, e as regiões que sofrem *splicing* alternativo estão destacadas em azul: DELAA em CBD12-1.1 e STHYP em CBD12-1.2.

4.6) Análise dos experimentos de ^1H - ^{15}N HSQC

Os espectros de ^1H - ^{15}N HSQC adquiridos para CBD12-1.2 na presença e na ausência de Ca^{2+} apresentam picos dispersos (**Figura 51**), indicando que a isoforma 1.2 é bem enovelada assim como a isoforma 1.1. Conforme observado com CBD12-1.1 (Capítulo 1), observou-se mudanças espectrais significativas no espectro de CBD12-1.2 após a adição de Ca^{2+} , mostrando que esta proteína é funcional (possui a capacidade de Ca^{2+}) (**Figura 52**).

As duas isoformas possuem o mesmo número de resíduos (273), porém CBD12-1.2 possui uma prolina a mais (12 prolinas), de modo que esperava-se observar 261 picos correspondentes a pares de spin ^1H - ^{15}N da cadeia principal. Um total de 140 picos foram observados para CBD12-1.2 apo e 196 para a proteína ligada a Ca^{2+} . De forma semelhante ao que foi observado com a isoforma 1.1, o menor número de picos observado para a amostra apo poderia ser indicativo da existência de variabilidade conformacional na escala de tempo de micro a milissegundos, o que leva ao

alargamento de linhas e coalescência de sinais. De fato, o espectro ^1H - ^{15}N HSQC de CBD12-1.2 na presença de íons cálcio possui sinais menos alargados e sobrepostos (**Figura 52**), indicando que, à semelhança da isoforma 1.1, CBD12-1.2 torna-se mais ordenado após a ligação de Ca^{2+} em CBD1.

Figura 51. Espectros de ^1H - ^{15}N HSQC de CBD12-1.1 e CBD12-1.2 na ausência e na presença de CaCl_2 (20,0 mM) a 35°C (coloca a temperatura correta).

Figura 52. ^1H - ^{15}N HSQC de CBD12-1.2 na ausência e na presença de CaCl_2 (20,0 mM) a 35°C .

Comparando o espectro de ^1H - ^{15}N HSQC das duas isoformas, observa-se que a maioria dos picos permanece no mesmo local (exibem mesmas frequências) (**Figura 51**), tanto na presença quanto na ausência de Ca^{2+} , o que sugere efeitos locais devido às características diferentes dos 5 aminoácidos exclusivos de cada isoforma e às diferentes interações que exibem, em detrimento de mudanças conformacionais globais.

Embora CBD12-1.2 apresente espectros ^1H - ^{15}N HSQC com boa dispersão de picos, observou-se que esta proteína, especialmente na forma livre, é menos estável do que a isoforma 1.1 e tende a agregar com o tempo inviabilizando a aquisição de experimentos longos, principalmente espectros de tripla ressonância necessários para o assinalamento da proteína. O índice de agregação (IA, **equação 9**) foi monitorado por espectrofotometria UV-Vis a 340 nm, comprimento de onda no qual proteínas não absorvem radiação eletromagnética, mas que reflete o espalhamento de luz causado pela agregação das moléculas (proteína agregada), e a 280 nm, comprimento de

onda em que resíduos de aminoácidos com cadeias laterais contendo grupos aromáticos (tirosina, triptofano) absorvem luz (proteína monodispersa). Índices de agregação de 0-2 indicam que a proteína está solúvel, 2-5 indicam alguma agregação, enquanto que índices maiores que 5 indicam que a proteína está muito agregada (Schrödel e Marco 2005; Vincentelli et al. 2004). Para CBD12-1.2 apo, este índice atingiu o valor de 7,94 em poucas horas, enquanto que para a forma holo este mesmo índice foi atingido após 2 dias.

$$IA = 100 \times (Abs_{340} / Abs_{280} - Abs_{340}) \quad (9)$$

É intrigante tamanha instabilidade, uma vez que as construções de CBD12 1.1 e 1.2 diferenciam-se apenas pelos 5 resíduos que definem as duas isoformas. As propriedades físico-químicas, como ponto isoelétrico, número de cargas positivas e negativas, hidrofobicidade e índice de instabilidade, calculados a partir da sequência primária pela ferramenta ProtParam do portal ExPASy (*SIB Bioinformatics Resource*), são idênticas para as duas isoformas de CBD12. Além disso, as condições de expressão utilizadas para as duas proteínas foram as mesmas e renderam as mesmas quantidades de proteína purificada.

4.7) Experimentos realizados com CBD12-1.2 na presença de Ca^{2+}

Devido à maior estabilidade de CBD12-1.2 na forma ligada a Ca^{2+} , foram realizados alguns experimentos com objetivo de verificar o estado oligomérico desta proteína e comparar o grau de flexibilidade entre CBD1 e CBD2 das duas isoformas na presença de Ca^{2+} . Estudos de difusão por RMN (DOSY) mostraram que CBD12-1.2, ao menos na presença de Ca^{2+} , apresenta-se monomérica em solução ($D_t = 7,69 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) (**Tabela 7**). Medidas de $R_{1\rho}$ foram realizadas para obter valores aproximados de R_2 de ^{15}N de acordo com a **equação 10**:

$$R_2 \sim \frac{R_{1\rho}}{\sin^2 \theta}, \quad (10)$$

em que $\tan \theta = \frac{\gamma B_1}{2\pi \Delta \nu}$, γ =razão giromagnética, B_1 =campo magnético de *spin-lock* e $\Delta \nu$ =*offset* em Hz. Uma análise qualitativa dos dados de R_2 de ^{15}N mostrou que a média desses valores é próxima ao que foi encontrado para CBD12-1.1 na presença de Ca^{2+} (**Figura 53**), sugerindo que a dinâmica entre os dois CBDs da isoforma 1.2 ligado a Ca^{2+} deve ser restrita, assim como observado para a isoforma 1.1.

Figura 53. Distribuição de R_2 de ^{15}N para CBD12-1.1 livre (apo) e CBD12-1.1 e 1.2 ligados a Ca^{2+} .

4.8) Conclusão

Os dados obtidos para a isoforma 1.2 são preliminares, e uma análise comparativa dos estados apo e holo depende da estabilização desta proteína na ausência de Ca^{2+} . Além disso, para obter análises conclusivas sobre a dinâmica entre os domínios, dados de R_1 precisariam ser obtidos a fim de calcular o tempo de correlação isotrópico médio. Tendo em vista a dificuldade de trabalhar com CBD12-1.2 apo optou-se por focar na isoforma 1.1 de CBD12 para o desenvolvimento desta tese

Uma hipótese para explicar a diferença de comportamento entre CALX-1.1 e CALX1.2 é que o domínio CBD12-1.2 encontraria-se rígido mesmo na ausência de Ca^{2+} . Uma evidência que suporta esta hipótese é a observação de que o trecho STHYP em CBD12-1.2 (DELAA em CBD12-1.1) forma diversas interações intramoleculares ausentes na estrutura da isoforma 1.1 (**Figura 54**). Eventualmente, estas interações poderiam contribuir para estabilizar a orientação entre CBD1 e CBD2-1.2 mesmo na ausência de Ca^{2+} .

A)

B)

Figura 54. Representação em fita da estrutura cristalográfica do domínio CBD12 de CALX 1.1 (A) e 1.2 (B). Os contatos (<5Å) envolvendo os aminoácidos na região de *splicing* alternativo estão representados em preto. Distâncias foram calculadas para os aminoácidos que divergem nas duas isoformas contra todos os outros átomos da proteína. A análise dos contatos foi realizada no programa Chimera (Pettersen et al. 2004) e o critério para definir um contato levou em conta distância entre os átomos menor que 4 Å, interpenetração máxima de 0,4 Å e ignorando contatos entre átomos separados por 4 ligações ou menos e contatos intra-resíduo.

Capítulo 3) Domínios isolados: CBD1 e CBD2

Os domínios CBD1 e CBD2 isolados foram produzidos devido à necessidade de ampliar o número de assinalamentos de CBD12-1.1 apo e com o objetivo de transferir assinalamentos para CBD12-1.1. Este objetivo foi cumprido, conforme discutido previamente no capítulo 1. Devido à boa qualidade dos espectros obtidos para CBD1 ligado a Ca^{2+} , decidimos utilizar esta proteína como modelo para padronizar todos os experimentos de ressonância realizados neste trabalho.

4.8) CBD1

CBD1 é flexível na ausência de Ca^{2+}

CBD1 foi produzido marcado uniformemente com ^{15}N e ^{13}C , sendo que para o assinalamento desta proteína nas formas ligada ou livre de Ca^{2+} , foram adquiridos os mesmos experimentos utilizados para assinalar CBD12, conforme mencionado anteriormente (materiais e métodos). Para a proteína livre de Ca^{2+} , foi observado um alargamento severo dos sinais, sendo possível observar apenas 95 picos de correlação ^1H - ^{15}N de 136 esperados (**Figura 55, Anexo C**). Destes 95 picos presentes no espectro de ^1H - ^{15}N HSQC, 47 foram assinalados, e todos esses assinalamentos puderam ser transferidos para CBD12 porque os picos apresentam-se nas mesmas frequências (^1H , ^{15}N) nos espectros de CBD1 isolado ou ligado covalentemente a CBD2 (**Figura 56**).

Figura 55. Espectros de correlação ^1H - ^{15}N (HSQC) obtidos para CBD1 livre (direita) ou ligado a Ca^{2+} (esquerda) com respectivos assinalamentos. Os resíduos assinalados estão representados em vermelho na estrutura cristalográfica de CBD1 na forma ligada a Ca^{2+} (PDB 3EAD).

Figura 56. Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N (HSQC) obtidos para CBD1 (vermelho) e CBD12 (preto) livres de Ca^{2+} .

É curioso a ausência de tantos sinais no espectro de ^1H - ^{15}N HSQC quando CBD1 está livre de Ca^{2+} . Isto é um indício de que esta proteína encontra-se parcialmente desenovelada ou flexível em uma escala de tempo de μs a ms , o que geraria a coalescência dos sinais. Entretanto, se há correlação entre este fato e o fenótipo observado para CALX, ainda não se sabe.

Na tentativa de melhorar o espectro de CBD1 livre (ampliar o número de sinais observados), foram adquiridos espectros ^1H - ^{15}N HSQC em diferentes pHs (tampão TRIS (pH 7,4) ou MES (pH 6,0)) e temperaturas (303 ou 308K). As condições utilizadas e seus respectivos espectros de ^1H - ^{15}N HSQC são mostrados na **Figura 57**. A análise destes espectros mostrou que, embora a diminuição da temperatura de 308K para 303K não afete significativamente os espectros (**Figuras 57B e 57D**), o número de picos observados depende muito do pH utilizado (**Figuras 57A e 57C**), de modo que experimentos obtidos a pH 6,0 apresentaram os melhores resultados (**Tabela 10**). Comparando os espectros obtidos para amostras em pH 6,0, o experimento adquirido a 308K apresentou alguns sinais a mais, o que é razoável, uma vez que a viscosidade em temperaturas mais elevadas é menor, gerando linhas mais estreitas devido ao tombamento mais rápido das moléculas.

Figura 57. Comparação entre espectros de correlação ^1H - ^{15}N (HSQC) obtidos para CBD1 livre de Ca^{2+} em diferentes condições de pH e temperatura.

Tabela 10. Número de picos observados no espectro de ^1H - ^{15}N HSQC de CBD1 livre em função do pH e da temperatura.

Condição	N° de picos observados
TRIS pH 7,4, 308K	104
MES pH 6,0, 308K	154
TRIS pH 7,4, 303K	126
MES pH 6,0, 303K	132

A dependência da estabilidade de proteínas com o pH é algo bem estabelecido (Creighton 1993), e pode ser explicado da seguinte maneira: a mudança no pH gera uma modificação na carga líquida da proteína e também na distribuição de cargas, ou seja, no estado iônico de cadeias

laterais. Desta forma, contribuições de interações eletrostáticas (pontes salinas) e ligações de hidrogênio são afetadas, podendo aumentar ou diminuir a estabilidade das proteínas. A estrutura de CBD1 apresenta uma grande densidade de cargas negativas no sítio de ligação a Ca^{2+} proveniente de aspartatos e glutamatos o que tornaria esta região instável na ausência de Ca^{2+} (repulsão eletrostática). A diminuição do pH poderia contribuir para neutralização destas cargas estabilizando esta região, motivo pelo qual observou-se maior número de picos em pH 6,0.

Como o objetivo central do estudo de CBD1 era auxiliar no assinalamento de CBD12, os experimentos de tripla ressonância foram adquiridos nas mesmas condições (pH 7,4 e 308K), mesmo não sendo as mais favoráveis. Infelizmente não houve tempo para readquirir os espectros de CBD1 em pH 6,0 para obter mais assinalamentos para esta proteína no estado livre.

Curiosamente, o espectro de ^1H - ^{15}N HSQC adquirido para CBD12 livre em pH 6,0 e 308K (condições nas quais CBD1 livre apresentou mais picos no HSQC) não apresentou melhoras com relação ao espectro obtido anteriormente em pH 7,4 (**Anexo B**). Outra observação inusitada e interessante veio da comparação dos espectros de ^1H - ^{15}N HSQC obtidos para CBD1 de *Drosophila melanogaster* e de *Canis familiaris* na ausência de Ca^{2+} (**Figura 58**). Diferente do que foi observado em *Drosophila*, o CBD1 do NCX apresenta todos os sinais no espectro de ^1H - ^{15}N HSQC mesmo na ausência de Ca^{2+} indicando que o domínio CBD1 do NCX é mais rígido.

Figura 58. Espectros de correlação ^1H - ^{15}N (HSQC) obtidos para CBD1-NCX (canino) e CBD1-CALX (drosophila) livre ou ligado Ca^{2+} nas mesmas condições de pH e temperatura. Os espectros de CBD1 do NCX foram fornecidos pelo Prof. Rafael Brünschweiler (OSU, EUA).

CBD1 torna-se estruturado após a ligação de Ca^{2+}

O espectro de ^1H - ^{15}N HSQC obtido para CBD1 ligado a Ca^{2+} apresentou todas as correlações esperadas (136 resíduos, exceto prolínas, sendo 21 destes provenientes do vetor de expressão) e bem dispersas, de acordo com um domínio bem enovelado. Dos 115 resíduos da proteína (exceto prolínas), 111 foram assinalados (**Figura 55**). A boa sobreposição dos sinais permitiu transferir a maior parte destes assinalamentos para o espectro de CBD12 ligado a Ca^{2+} (47 resíduos) (**Figura 59**), o que sugere que a interação com CBD2 na construção covalente (CBD12) não altera significativamente a conformação de CBD1.

Figura 59. Sobreposição dos espectros de ^1H - ^{15}N HSQC de CBD12-1.1 (preto) e CBD1 (azul), ambos na presença de 20 mM de CaCl_2 , e CBD2-1.1 (vermelho). As amostras continham $\sim 250\mu\text{M}$ de proteína.

O assinalamento completo de CBD1 na forma ligada a Ca^{2+} permitiu realizar uma análise detalhada dos parâmetros de relaxação de ^{15}N ao longo do esqueleto polipeptídico da proteína (**Figura 60**). O perfil das velocidades de relaxação longitudinal e transversal (R_1 e R_2), bem como do efeito nuclear *Overhauser* (NOE), sugere que a estrutura global de CBD1 é rígida na forma ligada a Ca^{2+} . Os dados de R_2 e a razão R_2/R_1 apontam que apenas 2 resíduos, F101 e I119 (representados por esferas vermelhas na **Figura 61**) destoam do perfil médio, o que sugere a existência de movimentos em escala de tempo lenta (micro a milissegundos) do esqueleto polipeptídico. Estes resíduos podem estar susceptíveis a tal dinâmica porque estão localizados em regiões onde há a interrupção de ligações de hidrogênio entre fitas β adjacentes (**Figura 60**). Além disso, o E96 localizado no sítio de ligação de

Ca^{2+} apresenta NOE menor que 0,6, indicando a presença de movimentos rápidos (pico a nanossegundos) nesta região.

Figura 60. Parâmetros de relaxação de ^{15}N obtidos para CBD1 na presença de Ca^{2+} .

Figura 61. Estrutura cristalográfica de CBD1 livre **(A)** e ligado a Ca^{2+} (PDB 3EAD) **(B)**. Os resíduos F101 e I119, que apresentam valores elevados de R_2 , estão representados por esferas vermelhas, o E96 que apresenta NOE heteronuclear baixo está representado por uma esfera azul, e os íons Ca^{2+} por esferas verdes.

4.9) CBD2

Análise do espectro de ^1H - ^{15}N HSQC sugere que CBD2-1.1 é rígido e bem enovelado

O domínio CBD2-1.1 foi produzido, marcado uniformemente com ^{13}C e ^{15}N , e o espectro de correlação ^1H - ^{15}N HSQC obtido apresenta todas as correlações esperadas (163 picos) e picos muito bem dispersos (**Figura 62**), sugerindo que esta construção deve ser rígida e bem enovelada.

Espectros de tripla ressonância foram adquiridos recentemente, porém, não houve tempo para realizar o assinalamento. Mesmo assim, a sobreposição dos espectros de ^1H - ^{15}N HSQC de CBD1, CBD12-1.1 e CBD2-1.1 auxiliou o assinalamento de CBD12-1.1 tanto livre quanto ligado a Ca^{2+} pois permitiu diferenciar os picos que pertencem ao domínio CBD1 e ao domínio CBD2 no espectro de CBD12-1.1 (**Figuras 59 e 63**).

Figura 62. Espectro de ^1H - ^{15}N HSQC do domínio CBD2-1.1 isolado. A amostra continha ~250mM de proteína enriquecida uniformemente com ^{15}N e ^{13}C .

Figura 63. Sobreposição dos espectros de ^1H - ^{15}N HSQC de CBD12-1.1 livre (preto) CBD1 livre (azul) e CBD2-1.1 (vermelho). As amostras continham $\sim 250\mu\text{M}$ de proteína.

A isoforma 1.2 de CBD2 foi clonada, porém a expressão desta proteína não foi otimizada. A produção de CBD2-1.2 marcada com ^{15}N e a aquisição de um espectro de correlação ^1H - ^{15}N HSQC para comparação com o espectro da isoforma 1.1 pode ser interessante para compreender como a alteração dos 5 resíduos que diferem estas duas isoformas poderia afetar a conformação e/ou a dinâmica deste domínio.

4.10) Conclusão

O estudo dos domínios CBD1 e CBD2 isolados proporcionou uma ampliação significativa do número de assinalamentos de CBD12-1.1 tanto na forma livre quanto ligada a Ca^{2+} .

Uma análise qualitativa dos espectros de ^1H - ^{15}N HSQC de CBD1 indicou que este domínio é flexível na ausência de Ca^{2+} , mas torna-se rígido após a adição desses íons. Estas observações foram corroboradas através de medidas de parâmetros de relaxação de ^{15}N de CBD1 ligado a Ca^{2+} e também são consistentes com a ausência de densidade eletrônica observada na região do sítio de ligação de Ca^{2+} na estrutura cristalográfica de CBD1 apo (PDB 3E9T, cadeias C e D) (**Figura 61A**). Aparentemente a flexibilidade intrínseca do domínio CBD1 é uma característica particular do trocador de *Drosophila* (**Figura 58**). Estudos adicionais são necessários para averiguar se a flexibilidade/desestruturação de CBD1-CALX na ausência de Ca^{2+} estaria relacionada com o fenótipo distinto do trocador das duas espécies.

A análise qualitativa dos espectros ^1H - ^{15}N HSQC obtidos para o domínio CBD2 é consistente com um domínio rígido e bem enovelado conforme observado para o domínio CBD2 canino (Breukels e Vuister 2010), mas em contraste com CALX-CBD1 livre. O estudo de CBD2-1.1 e CBD2-1.2 poderá contribuir não só para ampliar os assinalamentos de CBD12, mas também para auxiliar na compreensão de como as duas isoformas de CALX exibem respostas distintas à ligação de Ca^{2+} em CBD1.

5) Conclusões

Embora não tenha sido possível obter o assinalamento completo para CBD12, os dados obtidos foram suficientes para avaliar a dinâmica e a orientação média entre os domínios desta proteína em solução. As análises de R_1 e R_2 de ^{15}N e de RDCs de ^1H - ^{15}N para CBD12-1.1 na presença e na ausência de Ca^{2+} mostrou que, assim como em CBD12 de NCX, a flexibilidade entre os domínios CBD1 e CBD2 diminui após a adição de Ca^{2+} . Os dados de RDCs também indicaram que CBD12-1.1 ligado a Ca^{2+} assume uma conformação na forma de “v” aberto em solução, assim como observado no cristal. Estes dados representam a primeira caracterização detalhada da conformação e da dinâmica dessa proteína em solução, e complementam dados de baixa resolução provenientes de estudos SAXS (Giladi et al. 2013a)

O estudo dos domínios CBD1 e CBD2 isolados permitiu avançar na obtenção de assinalamentos para CBD12. Uma análise qualitativa dos dados obtidos para CBD1 revelou este domínio é flexível ou parcialmente desenovelado na ausência de Ca^{2+} , o que parece ser uma característica particular de CALX e merece ser investigada em mais detalhe. Os espectros obtidos para CBD2 são promissores para a realização de um estudo detalhado de RMN.

Uma análise comparativa da estrutura e da dinâmica das duas isoformas de CBD12 e de CBD2 isolado poderá ajudar na compreensão da diferença de regulação entre CALX-1.1 e CALX-1.2. A isoforma 1.2 de CBD12 mostrou-se instável nas condições testadas e a preparação de amostras mais adequadas para o estudo dessa proteína por RMN em solução dependerá da otimização destas condições.

Modelo de regulação alostérica

Apesar da grande quantidade de modelos já propostos para a regulação alostérica dos trocadores NCX com base em estudos contemplando as mais modernas e diversas técnicas de análise estrutural e de dinâmica, nenhum deles é capaz de explicar como a ligação de Ca^{2+} em CBD12 regula o trocador de maneira diferente em NCX e em CALX. Com este intuito, baseados nos dados disponíveis na literatura, nos dados apresentados nesta tese, e em cálculos de energia livre realizados pelo Prof. Rafael Brüsweiler (OSU, EUA), elaboramos um modelo único de regulação alostérica que acomoda tanto o comportamento dos NCX como o fenótipo atípico do CALX (Abiko et al., em preparação, **Anexo E**).

Um aspecto central deste modelo é a modulação da plasticidade de CBD12 pela ligação de Ca^{2+} em CBD1, a qual permite os CBDs adotarem diferentes ângulos um em relação ao outro na ausência de Ca^{2+} enquanto que uma conformação rígida e alongada é definida após a adição de Ca^{2+} . Outro aspecto essencial é possibilidade de interações entre as regiões carregadas em XIP e Cyto2 (Abiko et al., em preparação, **Anexo E**).

6) Bibliografia

- Annunziato, L., G. Pignataro, e G. F. Di Renzo. 2004. "Pharmacology of Brain Na⁺/Ca²⁺ Exchanger: From Molecular Biology to Therapeutic Perspectives". *Pharmacological Reviews* 56 (4): 633–54. doi:10.1124/pr.56.4.5.
- Bano, Daniele, Kenneth W. Young, Christopher J. Guerin, Ros Lefevre, Nancy J. Rothwell, Luigi Naldini, Rosario Rizzuto, Ernesto Carafoli, e Pierluigi Nicotera. 2005. "Cleavage of the Plasma Membrane Na⁺/Ca²⁺ Exchanger in Excitotoxicity". *Cell* 120 (2): 275–85. doi:10.1016/j.cell.2004.11.049.
- Berridge, M. J., P. Lipp, e M. D. Bootman. 2000. "The Versatility and Universality of Calcium Signalling". *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1 (1): 11–21. doi:10.1038/35036035.
- Bertini, I, e C Luchinat. 1999. "New applications of paramagnetic NMR in chemical biology". *Current Opinion in Chemical Biology* 3 (2): 145–51. doi:10.1016/S1367-5931(99)80026-X.
- Bertini, Ivano, Petri Kursula, Claudio Luchinat, Giacomo Parigi, Juha Vahokoski, Matthias Wilmanns, e Jing Yuan. 2009. "Accurate Solution Structures of Proteins from X-ray Data and a Minimal Set of NMR Data: Calmodulin–Peptide Complexes As Examples". *Journal of the American Chemical Society* 131 (14): 5134–44. doi:10.1021/ja8080764.
- Bertini, Ivano, Claudio Luchinat, Giacomo Parigi, e Roberta Pierattelli. 2008. "Perspectives in Paramagnetic NMR of Metalloproteins". *Dalton Transactions*, n° 29 (julho): 3782–90. doi:10.1039/B719526E.
- Besserer, Gabriel Mercado, Michela Ottolia, Debora A Nicoll, Vincent Chaptal, Duilio Cascio, Kenneth D Philipson, e Jeff Abramson. 2007. "The second Ca²⁺-binding domain of the Na⁺–Ca²⁺ exchanger is essential for regulation: Crystal structures and mutational analysis". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (47): 18467–72. doi:10.1073/pnas.0707417104.
- Boyman, Liron, Helen Mikhasenko, Reuben Hiller, e Daniel Khananshvili. 2009. "Kinetic and Equilibrium Properties of Regulatory Calcium Sensors of NCX1 Protein". *Journal of Biological Chemistry* 284 (10): 6185–93. doi:10.1074/jbc.M809012200.
- Breukels, Vincent, e Geerten W. Vuister. 2010. "Binding of Calcium Is Sensed Structurally and Dynamically throughout the Second Calcium-Binding Domain of the Sodium/calcium Exchanger". *Proteins* 78 (8): 1813–24. doi:10.1002/prot.22695.
- Carafoli, E. 1987. "Intracellular Calcium Homeostasis". *Annual Review of Biochemistry* 56 (1): 395–433. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.002143.
- Carlomagno, Teresa. 2012. "NMR in Natural Products: Understanding Conformation, Configuration and Receptor Interactions". *Natural Product Reports* 29 (5): 536–54. doi:10.1039/C2NP00098A.
- Cavanagh, John. 2007. *Protein NMR spectroscopy*. Academic Press.
- Chaptal, Vincent, Gabriel Mercado Besserer, Michela Ottolia, Debora A. Nicoll, Duilio Cascio, Kenneth D. Philipson, e Jeff Abramson. 2007. "How Does Regulatory Ca²⁺ Regulate the Na⁺-Ca²⁺ Exchanger?". *Channels* 1 (6): 397–99. doi:10.4161/chan.1.6.5640.

- Chaptal, Vincent, Michela Ottolia, Gabriel Mercado-Besserer, Debora A. Nicoll, Kenneth D. Philipson, e Jeff Abramson. 2009. "Structure and Functional Analysis of a Ca^{2+} Sensor Mutant of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger". *Journal of Biological Chemistry* 284 (22): 14688–92. doi:10.1074/jbc.C900037200.
- Claridge, Timothy D. W. 1999. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Elsevier.
- Craner, Matthew J., Jia Newcombe, Joel A. Black, Caroline Hartle, M. Louise Cuzner, e Stephen G. Waxman. 2004. "Molecular Changes in Neurons in Multiple Sclerosis: Altered Axonal Expression of Nav1.2 and Nav1.6 Sodium Channels and $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (21): 8168–73. doi:10.1073/pnas.0402765101.
- Creighton, Thomas E. 1993. *Proteins: Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman.
- Crespo, Lynn M., Christopher J. Grantham, e Mark B. Cannell. 1990. "Kinetics, Stoichiometry and Role of the $\text{Na}-\text{Ca}$ Exchange Mechanism in Isolated Cardiac Myocytes". *Nature* 345 (6276): 618–21. doi:10.1038/345618a0.
- Dixit, Mrinalini, Sunghoon Kim, Gage F. Matthews, Kevin Erreger, Aurelio Galli, Charles E. Cobb, Eric J. Hustedt, e Albert H. Beth. 2013. "Structural Arrangement of the Intracellular Ca^{2+} Binding Domains of the Cardiac $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger (NCX1.1): Effects of Ca^{2+} Binding". *The Journal of Biological Chemistry* 288 (6): 4194–4207. doi:10.1074/jbc.M112.423293.
- Dunn, Jeremy, Chadwick L. Elias, Hoa Dinh Le, Alexander Omelchenko, Larry V. Hryshko, e Jonathan Lytton. 2002. "The Molecular Determinants of Ionic Regulatory Differences between Brain and Kidney $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger (NCX1) Isoforms". *The Journal of Biological Chemistry* 277 (37): 33957–62. doi:10.1074/jbc.M206677200.
- Dyck, Chris, Krista Maxwell, John Buchko, Michael Trac, Alexander Omelchenko, Mark Hnatowich, e Larry V. Hryshko. 1998. "Structure-Function Analysis of CALX1.1, a $\text{Na}^{+}-\text{Ca}^{2+}$ Exchanger from *Drosophila*". *J. Biol. Chem.* 273 (21): 12981–87. doi:10.1074/jbc.273.21.12981.
- Dyck, C., A. Omelchenko, C. L. Elias, B. D. Quednau, K. D. Philipson, M. Hnatowich, e L. V. Hryshko. 1999. "Ionic Regulatory Properties of Brain and Kidney Splice Variants of the NCX1 $\text{Na}^{+}-\text{Ca}^{2+}$ Exchanger". *The Journal of General Physiology* 114 (5): 701–11.
- Fushman, David, Ranjani Varadan, Michael Assfalg, e Olivier Walker. 2004. "Determining domain orientation in macromolecules by using spin-relaxation and residual dipolar coupling measurements". *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 44 (3): 189–214. doi:10.1016/j.pnmrs.2004.02.001.
- Giladi, Moshe, Liron Boyman, Helen Mikhasenko, Reuben Hiller, e Daniel Khananshvili. 2010. "Essential Role of the CBD1-CBD2 Linker in Slow Dissociation of Ca^{2+} from the Regulatory Two-Domain Tandem of NCX1". *The Journal of Biological Chemistry* 285 (36): 28117–25. doi:10.1074/jbc.M110.127001.
- Giladi, Moshe, Reuben Hiller, Joel A. Hirsch, e Daniel Khananshvili. 2013a. "Population Shift Underlies Ca^{2+} -Induced Regulatory Transitions in the Sodium-Calcium Exchanger (NCX)". *Journal of Biological Chemistry* 288 (junho): 23141–49. doi:10.1074/jbc.M113.471698.

- Giladi, Moshe, e Daniel Khananshvi. 2013. "Molecular Determinants of Allosteric Regulation in NCX Proteins". *Advances in Experimental Medicine and Biology* 961: 35–48. doi:10.1007/978-1-4614-4756-6_4.
- Giladi, Moshe, Yehezkel Sasson, Xianyang Fang, Reuben Hiller, Tal Buki, Yun-Xing Wang, Joel A. Hirsch, e Daniel Khananshvi. 2012. "A Common Ca²⁺-Driven Interdomain Module Governs Eukaryotic NCX Regulation". *PLoS ONE* 7 (6): e39985. doi:10.1371/journal.pone.0039985.
- Graham, Bim, Choy Theng Loh, James David Swarbrick, Phuc Ung, James Shin, Hiromasa Yagi, Xinying Jia, et al. 2011. "DOTA-Amide Lanthanide Tag for Reliable Generation of Pseudocontact Shifts in Protein NMR Spectra". *Bioconjugate Chem.* 22 (10): 2118–25. doi:10.1021/bc200353c.
- Hansen, M. R., L. Mueller, e A. Pardi. 1998. "Tunable Alignment of Macromolecules by Filamentous Phage Yields Dipolar Coupling Interactions". *Nature Structural Biology* 5 (12): 1065–74. doi:10.1038/4176.
- Häussinger, Daniel, Jie-rong Huang, e Stephan Grzesiek. 2009. "DOTA-M8: An extremely rigid, high-affinity lanthanide chelating tag for PCS NMR spectroscopy". *Journal of the American Chemical Society* 131 (41): 14761–67. doi:10.1021/ja903233w.
- Heckman, Karin L, e Larry R Pease. 2007. "Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension". *Nature protocols* 2 (4): 924–32. doi:10.1038/nprot.2007.132.
- Hilgemann, Donald W. 1990. "Regulation and deregulation of cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchange in giant excised sarcolemmal membrane patches". *Nature* 344 (6263): 242–45. doi:10.1038/344242a0.
- Hilgemann, D W. 1990. "Regulation and deregulation of cardiac Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchange in giant excised sarcolemmal membrane patches". *Nature* 344 (6263): 242–45. doi:10.1038/344242a0.
- Hilgemann, D. W., S. Matsuoka, G. A. Nagel, e A. Collins. 1992. "Steady-State and Dynamic Properties of Cardiac Sodium-Calcium Exchange. Sodium-Dependent Inactivation". *The Journal of General Physiology* 100 (6): 905–32.
- Hilge, Mark, Jan Aelen, Alice Foarce, Anastassis Perrakis, e Geerten W Vuister. 2009. "Ca²⁺ regulation in the Na⁺/Ca²⁺ exchanger features a dual electrostatic switch mechanism". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (34): 14333–38. doi:10.1073/pnas.0902171106.
- Hilge, Mark, Jan Aelen, e Geerten W. Vuister. 2006a. "Ca²⁺ Regulation in the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Involves Two Markedly Different Ca²⁺ Sensors". *Molecular Cell* 22 (1): 15–25. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.008.
- Hilge, Mark, Jan Aelen, e Geerten W Vuister. 2006b. "Ca²⁺ regulation in the Na⁺/Ca²⁺ exchanger involves two markedly different Ca²⁺ sensors". *Molecular Cell* 22 (1): 15–25. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.008.
- Hryshko, Larry. 2008. "What regulates Na /Ca²⁺ exchange? Focus on "Sodium-dependent inactivation of sodium/calcium exchange in transfected Chinese hamster ovary cells" American journal of physiology. *Cell physiology* 295 (4): C869–71. doi:10.1152/ajpcell.00420.2008.

- Hryshko, L V, S Matsuoka, D A Nicoll, J N Weiss, E M Schwarz, S Benzer, e K D Philipson. 1996. "Anomalous regulation of the *Drosophila* Na(+)-Ca²⁺ exchanger by Ca²⁺". *The Journal of General Physiology* 108 (1): 67–74.
- Iwamoto, Takahiro. 2004. "Forefront of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Studies: Molecular Pharmacology of Na⁺/Ca²⁺ Exchange Inhibitors". *Journal of Pharmacological Sciences* 96 (1): 27–32.
- Iwamoto, T., T. Watano, e M. Shigekawa. 1996. "A Novel Isothiourea Derivative Selectively Inhibits the Reverse Mode of Na⁺/Ca²⁺ Exchange in Cells Expressing NCX1". *The Journal of Biological Chemistry* 271 (37): 22391–97.
- Jia, Xinying, Ansis Maleckis, Thomas Huber, e Gottfried Otting. 2011. "4,4'-dithiobisdipicolinic acid: a small and convenient lanthanide binding tag for protein NMR spectroscopy". *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 17 (24): 6830–36. doi:10.1002/chem.201003573.
- Jia, Xinying, Hiromasa Yagi, Xun-Cheng Su, Mitchell Stanton-Cook, Thomas Huber, e Gottfried Otting. 2011. "Engineering [Ln(DPA)₃] 3- binding sites in proteins: a widely applicable method for tagging proteins with lanthanide ions". *Journal of Biomolecular NMR* 50 (4): 411–20. doi:10.1007/s10858-011-9529-x.
- John, Scott A, Bernard Ribalet, James N Weiss, Kenneth D Philipson, e Michela Ottolia. 2011. "Ca²⁺-dependent structural rearrangements within Na⁺–Ca²⁺ exchanger dimers". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (4): 1699–1704. doi:10.1073/pnas.1016114108.
- Johnson, C. S. 1999. "Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications". *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 34 (3): 203–56.
- Kay, L. E., D. A. Torchia, e A. Bax. 1989. "Backbone Dynamics of Proteins as Studied by ¹⁵N Inverse Detected Heteronuclear NMR Spectroscopy: Application to Staphylococcal Nuclease". *Biochemistry* 28 (23): 8972–79.
- Keizers, Peter H J, Jean F Desreux, Mark Overhand, e Marcellus Ubbink. 2007. "Increased paramagnetic effect of a lanthanide protein probe by two-point attachment". *Journal of the American Chemical Society* 129 (30): 9292–93. doi:10.1021/ja0725201.
- Keizers, Peter H J, e Marcellus Ubbink. 2011. "Paramagnetic tagging for protein structure and dynamics analysis". *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 58 (1-2): 88–96. doi:10.1016/j.pnmrs.2010.08.001.
- Khananshveli, Daniel. 2014. "Sodium-Calcium Exchangers (NCX): Molecular Hallmarks Underlying the Tissue-Specific and Systemic Functions". *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 466 (1): 43–60. doi:10.1007/s00424-013-1405-y.
- Levitt, Malcolm H. 2001. *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. Wiley.
- Liao, Jun, Hua Li, Weizhong Zeng, David B Sauer, Ricardo Belmares, e Youxing Jiang. 2012. "Structural Insight into the Ion-Exchange Mechanism of the Sodium/Calcium Exchanger". *Science* 335 (6069): 686–90. doi:10.1126/science.1215759.
- Li, Qing-Feng, Yin Yang, Ansis Maleckis, Gottfried Otting, e Xun-Cheng Su. 2012. "Thiol-ene reaction: a versatile tool in site-specific labelling of proteins with chemically inert tags for paramagnetic NMR". *Chemical*

- Communications (Cambridge, England)* 48 (21): 2704–6.
doi:10.1039/c2cc17900h.
- Li, Z., D. A. Nicoll, A. Collins, D. W. Hilgemann, A. G. Filoteo, J. T. Penniston, J. N. Weiss, J. M. Tomich, e K. D. Philipson. 1991. "Identification of a Peptide Inhibitor of the Cardiac Sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ Exchanger." *Journal of Biological Chemistry* 266 (2): 1014–20.
- Losonczi, J. A., M. Andrec, M. W. Fischer, e J. H. Prestegard. 1999. "Order Matrix Analysis of Residual Dipolar Couplings Using Singular Value Decomposition". *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif.: 1997)* 138 (2): 334–42. doi:10.1006/jmre.1999.1754.
- Man, Bradley, Xun-Cheng Su, Haobo Liang, Shane Simonsen, Thomas Huber, Barbara A Messerle, e Gottfried Otting. 2010. "3-Mercapto-2,6-pyridinedicarboxylic acid: a small lanthanide-binding tag for protein studies by NMR spectroscopy". *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 16 (12): 3827–32. doi:10.1002/chem.200902904.
- Mori, S., C. Abeygunawardana, M. O. Johnson, e P. C. M. Vanzijl. 1995. "Improved Sensitivity of HSQC Spectra of Exchanging Protons at Short InterScan Delays Using a New Fast HSQC (FHSQC) Detection Scheme That Avoids Water Saturation". *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 108 (1): 94–98. doi:10.1006/jmrb.1995.1109.
- Nicoll, Debora A, Michela Ottolia, Liyan Lu, Yujuan Lu, e Kenneth D Philipson. 1999. "A New Topological Model of the Cardiac Sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ Exchanger". *Journal of Biological Chemistry* 274 (2): 910–17. doi:10.1074/jbc.274.2.910.
- Nicoll, Debora A, Michael R Sawaya, Seunghyug Kwon, Duilio Cascio, Kenneth D Philipson, e Jeff Abramson. 2006a. "The Crystal Structure of the Primary Ca²⁺ Sensor of the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Reveals a Novel Ca²⁺ Binding Motif". *Journal of Biological Chemistry* 281 (31): 21577–81. doi:10.1074/jbc.C600117200.
- Omelchenko, A, C Dyck, M Hnatowich, J Buchko, D A Nicoll, K D Philipson, e L V Hryshko. 1998. "Functional Differences in Ionic Regulation between Alternatively Spliced Isoforms of the Na⁺-Ca²⁺ Exchanger from *Drosophila Melanogaster*". *The Journal of General Physiology* 111 (5): 691–702.
- Ortega, A., D. Amorós, e J. García de la Torre. 2011. "Prediction of Hydrodynamic and Other Solution Properties of Rigid Proteins from Atomic- and Residue-Level Models". *Biophysical Journal* 101 (4): 892–98. doi:10.1016/j.bpj.2011.06.046.
- Ottolia, Michela, Debora A Nicoll, e Kenneth D Philipson. 2009. "Roles of two Ca²⁺-binding domains in regulation of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger". *The Journal of Biological Chemistry* 284 (47): 32735–41. doi:10.1074/jbc.M109.055434.
- Peters, Fabian, Mitcheell Maestre-Martinez, Andrei Leonov, Lidija Kovačič, Stefan Becker, Rolf Boelens, e Christian Griesinger. 2011. "Cys-Ph-TAHA: a lanthanide binding tag for RDC and PCS enhanced protein NMR". *Journal of Biomolecular NMR* 51 (setembro): 329–37. doi:10.1007/s10858-011-9560-y.
- Pettersen, Eric F., Thomas D. Goddard, Conrad C. Huang, Gregory S. Couch, Daniel M. Greenblatt, Elaine C. Meng, e Thomas E. Ferrin. 2004. "UCSF Chimera--a

- Visualization System for Exploratory Research and Analysis". *Journal of Computational Chemistry* 25 (13): 1605–12. doi:10.1002/jcc.20084.
- Philipson, K D, e D A Nicoll. 2000. "Sodium-calcium exchange: a molecular perspective". *Annual Review of Physiology* 62: 111–33. doi:10.1146/annurev.physiol.62.1.111.
- Pintacuda, Guido, Michael John, Xun-Cheng Su, e Gottfried Otting. 2007. "NMR structure determination of protein-ligand complexes by lanthanide labeling". *Accounts of Chemical Research* 40 (3): 206–12. doi:10.1021/ar050087z.
- Rai, Nithin, Marcelo Nöllmann, Bruno Spotorno, Giovanni Tassara, Olwyn Byron, e Mattia Rocco. 2005. "SOMO (SOLUTION MOdeler) Differences between X-Ray- and NMR-Derived Bead Models Suggest a Role for Side Chain Flexibility in Protein Hydrodynamics". *Structure (London, England: 1993)* 13 (5): 723–34. doi:10.1016/j.str.2005.02.012.
- Ramos, C R R, P A E Abreu, A L T O Nascimento, e P L Ho. 2004. "A High-Copy T7 Escherichia Coli Expression Vector for the Production of Recombinant Proteins with a Minimal N-Terminal His-Tagged Fusion Peptide". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]* 37 (8): 1103–9. doi:/S0100-879X2004000800001.
- Reeves, John P, e Madalina Condrescu. 2008. "Ionic regulation of the cardiac sodium-calcium exchanger". *Channels (Austin, Tex.)* 2 (5): 322–28.
- Ren, Xiaoyan, e Kenneth D. Philipson. 2013. "The Topology of the Cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger, NCX1". *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 57 (abril): 68–71. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.01.010.
- Rodriguez-Castañeda, Fernando, Peter Haberz, Andrei Leonov, e Christian Griesinger. 2006. "Paramagnetic Tagging of Diamagnetic Proteins for Solution NMR". *Magnetic Resonance in Chemistry* 44 (S1): S10–16. doi:10.1002/mrc.1811.
- Rückert, Markus, e Gottfried Otting. 2000. "Alignment of Biological Macromolecules in Novel Nonionic Liquid Crystalline Media for NMR Experiments". *Journal of the American Chemical Society* 122 (32): 7793–97. doi:10.1021/ja001068h.
- Rule, Gordon S., e T. Kevin Hitchens. 2006. *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*. Springer.
- Russo, Luigi, Mitcheell Maestre-Martinez, Sebastian Wolff, Stefan Becker, e Christian Griesinger. 2013. "Interdomain Dynamics Explored by Paramagnetic NMR". *Journal of the American Chemical Society* 135 (45): 17111–20. doi:10.1021/ja408143f.
- Salinas, Roberto K, Lei Bruschweiler-Li, Eric Johnson, e Rafael Bruschweiler. 2011. "CA²⁺-binding alters the inter-domain flexibility between the two cytoplasmic calcium-binding domains in the NA⁺/CA²⁺ exchanger". *The Journal of Biological Chemistry* 286 (julho): 32123–31. doi:10.1074/jbc.M111.249268.
- Sambrook, Joseph, e David William Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press.
- Sass, H. J., G. Musco, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, e S. Grzesiek. 2000. "Solution NMR of Proteins within Polyacrylamide Gels: Diffusional Properties and

- Residual Alignment by Mechanical Stress or Embedding of Oriented Purple Membranes". *Journal of Biomolecular NMR* 18 (4): 303–9.
- Schrödel, Andrea, e Ario de Marco. 2005. "Characterization of the Aggregates Formed during Recombinant Protein Expression in Bacteria". *BMC Biochemistry* 6 (1): 10. doi:10.1186/1471-2091-6-10.
- Serrano, Pedro, Michael Geralt, Biswaranjan Mohanty, e Kurt Wüthrich. 2013. "Structural representative of the protein family PF14466 has a new fold and establishes links with the C2 and PLAT domains from the widely distant Pfams PF00168 and PF01477". *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 22 (7): 1000–1007. doi:10.1002/pro.2284.
- Skora, Lukasz, Jürgen Mestan, Dorian Fabbro, Wolfgang Jahnke, e Stephan Grzesiek. 2013. "NMR Reveals the Allosteric Opening and Closing of Abelson Tyrosine Kinase by ATP-Site and Myristoyl Pocket Inhibitors". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (47): E4437–45. doi:10.1073/pnas.1314712110.
- Su, Xun-Cheng, Bradley Man, Sophie Beeren, Haobo Liang, Shane Simonsen, Christophe Schmitz, Thomas Huber, Barbara A Messerle, e Gottfried Otting. 2008. "A dipicolinic acid tag for rigid lanthanide tagging of proteins and paramagnetic NMR spectroscopy". *Journal of the American Chemical Society* 130 (32): 10486–87. doi:10.1021/ja803741f.
- Su, Xun-Cheng, e Gottfried Otting. 2010. "Paramagnetic labelling of proteins and oligonucleotides for NMR". *Journal of Biomolecular NMR* 46 (1): 101–12. doi:10.1007/s10858-009-9331-1.
- Swarbrick, James D, Phuc Ung, Sandeep Chhabra, e Bim Graham. 2011. "An Iminodiacetic Acid Based Lanthanide Binding Tag for Paramagnetic Exchange NMR Spectroscopy". *Angewandte Chemie International Edition* 50 (19): 4403–6. doi:10.1002/anie.201007221.
- Tjandra, N., e A. Bax. 1997. "Direct Measurement of Distances and Angles in Biomolecules by NMR in a Dilute Liquid Crystalline Medium". *Science (New York, N.Y.)* 278 (5340): 1111–14.
- Tjandra, Nico. 2013. "Residual Dipolar Coupling". In *Encyclopedia of Biophysics*, organizado por Gordon C. K. Roberts, 2213–21. Springer Berlin Heidelberg. http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-16712-6_311.
- Tolman, J. R. 2001. "Dipolar Couplings as a Probe of Molecular Dynamics and Structure in Solution". *Current Opinion in Structural Biology* 11 (5): 532–39.
- Vincentelli, Renaud, Stéphane Canaan, Valérie Campanacci, Christel Valencia, Damien Maurin, Frédéric Frassinetti, Loréna Scappucini-Calvo, Yves Bourne, Christian Cambillau, e Christophe Bignon. 2004. "High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies". *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 13 (10): 2782–92. doi:10.1110/ps.04806004.
- Williams, R. J. P. 1970. "Tilden Lecture. The Biochemistry of Sodium, Potassium, Magnesium, and Calcium". *Quarterly Reviews, Chemical Society* 24 (3): 331–65. doi:10.1039/QR9702400331.
- Woods, Mark, Mauro Botta, Stefano Avedano, Jing Wang, e A Dean Sherry. 2005. "Towards the rational design of MRI contrast agents: a practical approach to the synthesis of gadolinium complexes that exhibit optimal water

- exchange". *Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)*, n° 24 (dezembro): 3829–37. doi:10.1039/b510778d.
- Wu, Mousheng, Hoa Dinh Le, Meitian Wang, Vladimir Yurkov, Alexander Omelchenko, Mark Hnatowich, Jay Nix, Larry V Hryshko, e Lei Zheng. 2010. "Crystal Structures of Progressive Ca²⁺ Binding States of the Ca²⁺ Sensor Ca²⁺ Binding Domain 1 (CBD1) from the CALX Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Reveal Incremental Conformational Transitions". *The Journal of Biological Chemistry* 285 (4): 2554–61. doi:10.1074/jbc.M109.059162.
- Wu, Mousheng, Shuilong Tong, Jennifer Gonzalez, Vasanthi Jayaraman, John L. Spudich, e Lei Zheng. 2011. "Structural Basis of the Ca²⁺ Inhibitory Mechanism of *Drosophila* Na⁺/Ca²⁺ Exchanger CALX and Its Modification by Alternative Splicing". *Structure* 19 (10): 1509–17. doi:10.1016/j.str.2011.07.008.
- Wu, Mousheng, Meitian Wang, Jay Nix, Larry V Hryshko, e Lei Zheng. 2009. "Crystal structure of CBD2 from the *Drosophila* Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger: diversity of Ca⁽²⁺⁾ regulation and its alternative splicing modification". *Journal of Molecular Biology* 387 (1): 104–12. doi:10.1016/j.jmb.2009.01.045.
- Wüthrich, Kurt. 2003. "NMR Studies of Structure and Function of Biological Macromolecules (Nobel Lecture)". *Angewandte Chemie International Edition* 42 (29): 3340–63. doi:10.1002/anie.200300595.

Lista de Anexos

- A)** Espectro de ^1H - ^{15}N HSQC de CBD12-1.1 livre.
- B)** Sobreposição de espectros de ^1H - ^{15}N HSQC de CBD12-1.1 livre em pH 6,0 e pH 7,4.
- C)** Espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC obtidos para CBD1 livre ou ligado a Ca^{2+} com respectivos assinalamentos.
- D)** Súmula Curricular
- E)** Manuscrito em preparação

Anexo A) Espectro de ^1H - ^{15}N HSQC de CBD12-1.1 livre. A amostra continha $\sim 250\mu\text{M}$ de proteína enriquecida uniformemente com ^{15}N e ^{13}C e parcialmente com ^2H . O espectro foi obtido à frequência de 800MHz para o núcleo de ^1H .

Anexo B) Sobreposição de espectros de ^1H - ^{15}N HSQC de CBD12-1.1 livre em pH 6,0 (vermelho) e pH 7,4 (preto). Os picos verdes correspondem a sinais de cadeias laterais que rebateram no espectro da amostra em pH 6,0. A amostra utilizada nos dois experimentos continha $\sim 250\mu\text{M}$ de proteína enriquecida uniformemente com ^{15}N e ^{13}C e parcialmente com ^2H . O espectro foi obtido à frequência de 800MHz para o núcleo de ^1H .

Anexo C) Espectros de correlação ^1H - ^{15}N (HSQC) obtidos para CBD1 livre (direita) ou ligado a Ca^{2+} (esquerda) com respectivos assinalamentos.

Anexo D) Súmula curricular

Dados pessoais

Nome: Layara Akemi Abiko

Nascimento : 31/12/1988 - Maringá/PR - Brasil

Formação acadêmica/titulação

2011 - 2015 Doutorado em Química.

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil **Título:** Estudo da dinâmica funcional dos domínios regulatórios do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de *Drosophila melanogaster* por Ressonância Magnética Nuclear em Solução

Orientador: Roberto Kopke Salinas

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

2006 - 2010 Licenciatura em Química. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil

Orientador: Ernani Abicht Basso

Formação complementar

2014 - 2014 Protein dynamics and structure determination. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

2013 - 2013 Structure and dynamics of proteins by NMR. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

2013 - 2013 Understanding NMR Spectroscopy. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP , Campinas, Brasil

2012 - 2012 Introduction into Advanced NMR. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNIRIO, Rio De Janeiro, Brasil

2012 - 2012 Introdução à Instrumentação para RMN. Instituto de Física- USP São Carlos, USP, Brasil

2012 - 2012 Fast Protein NMR. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

2007 - 2007 Introdução à Química Computacional e Química Teórica. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil

Prêmios e títulos

2011 Prêmio de Química concedido pela obtenção da maior média global entre os formandos do curso de química-licenciatura do ano letivo de 2010, Universidade Estadual de Maringá

2010 Painele premiado na Seção Química Estrutural na 33a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Sociedade Brasileira de Química

2010 Prêmio de Química concedido pela obtenção da maior média entre os acadêmicos do 4º ano de Química licenciatura em 2009, Universidade Estadual de Maringá

2009 Prêmio de Química concedido pela obtenção da maior média entre os acadêmicos do 3º ano de Química licenciatura em 2008, Universidade Estadual de Maringá

2008 Prêmio de Química concedido pela obtenção da maior média entre os acadêmicos do 2º ano de Química licenciatura em 2007, Universidade Estadual de Maringá

2007 Prêmio destaque de Química Orgânica, XV SBQ sul

Artigos completos publicados em periódicos

1. BAGATIN, M.C., TOZATTI, C.S.S., **ABIKO, L.A.**, YAMAZAKI, D.A.S., SILVA, P.R.A., PEREGO, L.M., AUDI, E.A., SEIXAS, F.A.V., BASSO, E.A., GAUZE, G.F. Molecular Docking and Panicolytic Effect of 8-PrenylNaringenin in the Elevated T-Maze. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* , v.62, p.1231 - 1237, **2014**.

2. RICHTER, W.E., Pontes, R.M., **Abiko, L.A.**, Gauze, G.F., Basso, E.A. Computation of $^3J_{HH}$ coupling constants with a combination of density functional theory and semiempirical calculations. Application to complex molecules. *Comput. Theor. Chem.* , v.1001, p.7 - 14, **2012**.

3. Basso, E.A., **Abiko, L.A.**, Gauze, G.F., Pontes, R.M. Conformational Analysis of *cis*-2-Halocyclohexanols; Solvent Effects by NMR and Theoretical Calculations. *J. Org. Chem.*, v.76, p.145 - 153, **2010**.

4. Bocca, C.C., Rittner, R., Höehr, N.F., Pinheiro, G.M.S., **Abiko, L.A.**, Basso, E.A. Molecular modeling and biological evaluation of 2-*N,N*-dimethylaminocyclohexyl 1-*N,N*-dimethylcarbamate isomers and their methylsulfate salts as cholinesterases inhibitors. *J. Mol. Struc.*, v.983, p.194 - 199, **2010**.

Anexo E) Manuscrito em preparação