UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

NATHALYA CRISTINA DE MORAES ROSO MESQUITA

"Estudos da correlação estrutura-função da enzima Clorocatecol 1,2-Dioxigenase de *Pseudomonas putida*"

SÃO CARLOS

2012

NATHALYA CRISTINA DE MORAES ROSO MESQUITA

"Estudos da correlação estrutura-função da enzima Clorocatecol 1,2-Dioxigenase de *Pseudomonas putida*"

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Ciências

Área de Concentração: Física Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

SÃO CARLOS

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mesquita, Nathalya Cristina de Moraes Roso
Estudos da correlação estrutura-função da enzima Clorocatecol 1,2-dioxigenase de Pseudomonas putida / Nathalya Cristina de Moraes Roso Mesquita; orientador Antonio José da Costa Filho - versão corrigida -- São Carlos, 2012.
124 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

1. Dioxigenase. 2. Cinética Enzimática. 3. Dicroísmo Circular. 4. Calorimetria. 5. Ressonância Paramagnética Eletrônica. I. da Costa Filho, Antonio José, orient. II. Título.

À minha mãe, Rosane, e minha avó, Onynpha, que me criaram e me deram todo o apoio necessário ao longo de minha vida e que souberam me encaminhar e aconselhar. Ao meu pai, Hermes, que me concedeu o dom da vida e mesmo muitas vezes de longe colaborou para com meus aprendizados. À minha irmã, Lyna e meu cunhado, Willian, pelo ombro amigo durante muitas crises. Ao meu sobrinho, Ayron, por me trazer a luz de um sorriso nos momentos de estresse. Ao grande amor da minha vida, meu namorado Valter Júnior, que esteve ao meu lado, me incentivando em todos os momentos e não me deixando desanimar.

Assim faço-lhes uma singela homenagem de forma a retribuir-lhes o carinho, a compaixão, a paciência, o amor, a esperança, a sabedoria e a confiança que depositaram em mim...

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar esta seção agradecendo primeiramente a Deus por ter me concedido o dom da vida, além de força de vontade e persistência suficiente para encarar uma carreira científica. Agradeço, aqui, a minha mãe e a minha avó, que são as grandes responsáveis pela minha criação e por eu estar aqui hoje, foram elas que abdicaram muito de seu tempo, dinheiro e coisas necessárias para elas e me concederam tudo e mais um pouco do que eu precisava para meus estudos. Foram elas as responsáveis por minha educação tanto pessoal quanto profissional, sem elas eu não sei o que seria de mim. Gostaria de agradecer a toda minha família que convive comigo, meu tio, minha irmã, meu cunhado, meu sobrinho e meu namorado, aqueles que sempre me incentivaram e incentivam nos momentos de angústias, aqueles com as quais eu sei que posso contar a qualquer momento.

Agradeço a todos que passaram pela minha vida durante esses dois anos de trabalho e que de alguma forma contribuíram para a realização do mesmo. Sou muito grata especialmente,

ao meu orientador pelo crédito e confiança ao me receber em seu laboratório, desde a época de iniciação científica, pela paciência em me ensinar, orientando nos caminhos a seguir, pelas horas dedicadas ao meu aprendizado, aos relatórios, discussões de experimentos entre outros e especialmente pela amizade,

ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, pelas conversas e elaboração dos protocolos de delipidação e experimentos relacionados a estes,

ao Dr. Fernando Melo, que me ensinou na minha iniciação científica a trabalhar com a proteína que eu realizei este trabalho, bem como com os equipamentos que possuímos em nosso laboratório,

aos meus colegas de laboratório e amigos, do Grupo de Biofísica Sérgio Mascarenhas, pela convivência, amizade e companheirismo,

às técnicas Andressa, Bel e Patrícia pelo apoio técnico, aprendizado, convivência, paciência e amizade,

ao Jabah, Fábio, Fernando Melo, Militar, Ana Citadini, Luís Felipe, Pamela, Patrícia Kumagai, Paty, Andressa, Assuero, Juliana, Helton, Crusca, Bruno, Sumária, ‘Déboras’, Prof Cláudia, Prof Otaciro, pela colaboração científica durante o desenvolvimento desse projeto, pelos momentos de discussões sobre técnicas e meus resultados, por me ensinarem não apenas metodologias, procedimentos e técnicas de laboratório, mas também proporcionarem estímulo para a busca pelo conhecimento, pelas discussões sociais e comportamentais... Enfim, sou grata por serem pessoas que não só convivem comigo, mas que participam do meu dia-a-dia e me fazem enxergar as coisas que sozinha não consigo ver de dentro das minhas próprias perspectivas,

aos meus pais Rosane e Hermes que me concederam o dom da vida e a oportunidade de estar aqui hoje,

aos meus irmãos, Lyna, Graziela, Gabriel e Luís Gustavo, e ao meu cunhado, pessoas que eu carrego em meu coração sempre e que me concedem aquele abraço em momentos delicados,

ao meu grande amor, Valter Júnior, por tudo que ele é em minha vida, por tudo que ele fez eu me tornar desde que iniciei esta caminhada ao seu lado, por me apoiar sempre em minhas decisões e nunca me deixar desistir ou desviar do meu caminho,

ao Pedro, Rafaela e a Prof Dr. Maria Cristina Nonato por me concederem alguns bons momentos juntos dessa família maravilhosa.

Enfim, agradeço a todos aqueles que me ajudaram e contribuíram para esta caminhada de dois anos. Peço desculpas se esqueci de alguém, mas são muitos nomes e com certeza eu não me lembraria de todos.

Sou grata ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo por me conceder a honra de trabalhar neste renomado instituto,

assim como sou grata ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro fundamental para a realização do projeto.

“Não é o crítico que conta, nem o homem que mostra onde o valente tropeçou ou quem faz a obra poderia ter feito melhor. O mérito pertence ao homem que está dentro da arena; cujo rosto é desfigurado pelo pó, pela transpiração, e pelo sangue; que luta bravamente; que erra e falha vez após vez, porque não existe esforço sem erro ou falta; que tenta realizar a obra; que conhece o grande entusiasmo, a grande devoção, e se entrega a uma causa digna; quem, na pior das hipóteses, mesmo que falhe, terá falhado enquanto dava tudo de si. Muito melhor é ousar grandes coisas, obter triunfos gloriosos embora tingidos de fracasso, do que se enfileirar com aqueles pobres de ânimo que nem desfrutam nem sofrem muito porque vivem no crepúsculo cinzento que desconhece vitória ou derrota”. *(Discurso de Theodore Roosevelt, Presidente dos EUA, 1899)*

RESUMO

MESQUITA, N. C. R. M. **Estudos da correlação estrutura-função da enzima Clorocatecol 1,2-Dioxigenase de *Pseudomonas putida.*** 2012. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

O intenso uso de compostos orgânicos em conjunto com o grande avanço industrial culminou em um enorme acúmulo de poluentes orgânicos no meio ambiente. Dentre estes poluentes têm-se destacado a presença de hidrocarbonetos aromáticos altamente tóxicos e resistentes à degradação física, química, fotolítica e biológica. Desta maneira, uma nova forma de combater a presença deste tipo de composto no meio ambiente têm sido estudada: o uso de microorganismos, naturais ou geneticamente modificados, capazes de transformá-los em substâncias inertes, como CO_2 e água. Tal metodologia é denominada biorremediação. Dentres estes microorganismos destacam-se bactérias dos gêneros *Pseudomonas, Aeromonas, Beijerinckia,* dentre outros, que têm sido estudadas para esta finalidade. A enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase (Pp 1,2-CCD) é uma das proteínas expressas por bactérias do gênero *Pseudomonas putida*, sendo responsável pela clivagem de hidrocarbonetos aromáticos através da incorporação de ambos os átomos de uma molécula de oxigênio à estrutura do anel aromático, sendo a proteína escolhida para desenvolvermos o presente trabalho. Mais especificamente, nos interessa estudar como o mecanismo de ação da referida enzima é controlado por moléculas extrínsecas, como fosfolipídios. Tal interesse pela interação entre a enzima e fosfolipídios surgiu recentemente quando da obtenção da primeira estrutura cristalográfica de uma enzima da família da CCD (dioxigenases intradióis). Nesta estrutura foi observado um sítio de ligação por monômero para fosfolipídios, o que fez com que várias questões relativas à influência desses sobre a atividade da enzima fossem levantadas. Nosso objetivo foi fazer uso das técnicas de Dicroísmo Circular (CD), Calorimetria e Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) para estudar alterações conformacionais da enzima e de sua cinética induzidas por moléculas de fosfolipídio, e assim, obter informações que correlacionem as mudanças estruturais com o mecanismo de atividade enzimática da enzima. Os resultados obtidos através do uso daquelas técnicas em conjunto com protocolos que possibilitam a delipidação da enzima mostraram que a presença do fosfolipídios na estrutura da enzima tem influência sobre a atividade enzimática. Quando retiramos o fosfolipídio/ácido graxo, pudemos visualizar uma pequena mudança na estrutura secundária da enzima, um aumento da entalpia de reação, bem como um aumento na velocidade de reação, enquanto que a afinidade da enzima pelo substrato diminuiu. Pudemos também observar uma maior estabilidade térmica da enzima quando na ausência do fosfolipídio/ácido graxo e não foi observado interação da Pp 1,2-CCD com modelos micelares constituídos por lisofosfolipídios. Um breve estudo realizado sobre o papel da força iônica na atividade e na estabilidade térmica da proteína mostrou que na ausência de NaCl, em pH 8, a enzima se mostrou mais ativa, com uma afinidade pelo substrato maior e neste ambiente com baixa força iônica foi observado uma pequena interação da enzima com modelos micelares carregados negativamente. Assim, pudemos concluir que as moléculas anfipáticas, retiradas com os processos de delipidação, apesar de modificarem muito pouco a estrutura secundária da enzima, ainda assim instauram modificações na sua função de catálise do substrato catecol. Esta informação juntamente com os dados sobre inibição do processo reacional ocasionada pelo produto da reação formam um novo conjunto de dados que pode ser utilizado para se alcançar o objetivo mais geral de se

controlar a atividade biológica da Pp 1,2-CCD.

Palavras-chave: Dioxigenase. Cinética Enzimática. Calorimetria. Dicroísmo Circular. Ressonância Magnética Eletrônica.

ABSTRACT

MESQUITA, N. C. R. M. **Studies of the structure-function correlation of the chlorocatechol 1,2-dioxygenase enzyme from *Pseudomonas putida*.** 2012. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

The intensive use of organic compounds in conjunction with the industrial advances led to a huge accumulation of organic pollutants in the environment. Among these pollutants it has been noticed the presence of aromatic hydrocarbons that are highly toxic and resistant to physical, chemical and biological degradation. Thus, a new way to deal with the presence of this compounds in the environment has been studied: the use of microorganisms, natural or genetically modified, that can turn them into inert substances such as CO_2 and water. This methodology is called bioremediation. Among those microorganisms, bacteria from the gender *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, among others, have been studied for this purpose. The enzyme chlorocatechol 1,2-dioxygenase (Pp 1,2-CCD) is one of the proteins expressed by *Pseudomonas putida* bacteria, being responsible for the cleavage of aromatic hydrocarbons through the incorporation of both atoms of a molecule of oxygen into the aromatic ring structure, being the protein chosen for investigation in this work. More specifically, we are interested in studying how the mechanism of action of this enzyme is controlled by extrinsic molecules such as phospholipids. The interest in the interaction between the enzyme and phospholipids arose recently when the first crystal structure of an enzyme of the intradiol dioxygenase family was reported. In this structure it was observed a binding site for a phospholipid per monomer, which raised many issues concerning its influence on the activity of the enzyme. Our goal was to use the techniques of Circular Dichroism (CD), calorimetry and Electron Magnetic Resonance (EMR) to study enzyme conformational changes and kinetics alterations induced by phospholipid molecules, thus gathering information on the structure-function correlation. The results obtained through those experimental techniques in conjunction with the use of protocols for protein delipidation showed that the presence of phospholipids/fatty acids in the structure of the enzyme play a role in enzyme activity. Upon removal of the phospholipid/fatty acids, we observed small changes in the secondary structure of the enzyme, an increase of the enthalpy of reactions as well as an increase in the reaction rate, whereas the affinity of the enzyme for the substrate decreased..We also observed a higher thermal stability of the Pp 1,2-CCD in the absence of the phospholipids/fatty acids, but no interaction was observed between the Pp 1,2-CCD and lysophospholipid micelles. A brief study of the function of ionic strength on the activity and thermal stability of the protein showed that in the absence of NaCl, at pH 8, the enzyme is more active, showing a greater affinity for the substrate and a low interaction was observed between Pp 1,2-CCD and negatively charged micelles. This information along with the data on the inhibition capacity of the reaction product are a new set of data that can be used to achieve the more general goal of controlling Pp 1,2-CCD biological activity.

Keyword: Dioxygenase. Enzyme kinetics. Calorimetry. Circular Dichroism. Electron Magnetic Ressonance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Funil de degradação bacteriana de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Adaptada de BONALUMI.[7] _____ 30

Figura 2 - Representação dos três modos de fissão do anel benzênico de uma molécula de catecol: (a) clivagem intradiol, (b) clivagem extradiol proximal e (c) clivagem extradiol distal. R representa os radicais que podem ligar-se à molécula, como por exemplo, o íon cloro. _____ 31

Figura 3 - Representação de estrutura secundária para a Pp 1,2-CCD. As esferas azuis representam os íons de Fe presentes na estrutura. Figura retirada de BONALUMI. [7] _____ 32

Figura 4 - Superfície da enzima Pp 1,2-CCD mostrando a ocupação do ácido graxo no túnel hidrofóbico. Retirada de BONALUMI. [7] _____ 33

Figura 5 - (a) Luz linearmente polarizada pode ser vista como a superposição de luz circularmente polarizada opostas com amplitudes e fases iguais. (b) As diferenças de absorção e de velocidade de propagação de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita levam ao dicroísmo circular (CD) e à rotação óptica, respectivamente.Figura adaptada de CANTOR & SCHIMMEL. [22] _____ 53

Figura 6 - Esquema do equipamento de CD para a detecção da diferença de absorção. Figura retirada da referência 23. _____ 55

Figura 7 - Ilustração mostrando os tipos de espectros na faixa de UV-distante relacionados aos tipos de estrutura protéica. Linha sólida, α-hélice; linha tracejada longa, folha β antiparalela; linha pontilhada, volta-β tipo I; linha tracejada-cruz, extensão de 3 α-hélice ou hélice poli (Pro) II; linha tracejada curto, estrutura aleatória. Figura adaptada de Kelly et al.[24] _____ 56

Figura 8 - Endotérmica caracterizando um evento térmico em um biopolímero hipotético. A entalpia calorimétrica é a área sob a curva que mostra a dependência com a temperatura da capacidade calorífica da amostra à pressão constante. O ΔC_p do processo é definido na temperatura de melting (T_m) ou temperatura de transição de fase, onde a capacidade calorífica apresenta um máximo. Figura retirada de referência 31. _____ 58

Figura 9 - Esquema representativo de um Calorímetro de Titulação Isotérmica (ITC): (a) Cela de referência e de amostra; (b) Durante o experimento quando se inicia a injeção, ocorre uma variação de temperatura da cela de amostra. A diferença de temperatura entre as celas (ΔT) é compensada pelo equipamento, gerando, assim, o termograma. Figura retirada da referência 35._____ 61

Figura 10 - Curva típica de cinética enzimática no ITC: potência térmica versus tempo. A cada injeção a linha de base se estabiliza num nível inferior (em destaque no círculo) e a quantidade de calor gerado é proporcional à velocidade da reação. Figura retirada da referência 37. _____ 63

Figura 11 - Gráfico demonstrando os dados de cinética obtidos pelo calorímetro (variação de calor em relação ao tempo) e convertidos em velocidade de reação. Figura retirada da referência 35. 63

Figura 12 - Simulação de um experimento de ITC de injeção única. Esta simulação tem como parâmetros: k_{cat} = 80s^{-1}, K_M = 0,075 M, ΔH_{ap} = -50 kCal/mol e $[E]_t$= 4,5 mM. Figura retirada da referência 40. 65

Figura 14 - Espectros de RPE do marcador 5-SASL incorporado em micelas de LPC na ausência e na presença de StII1-30, StII11-30, StI1-31 e StI12-31, em pH7. Figura retirada da referência 44. 68

Figura 15 - Análise de purificação da enzima Pp 1,2-CCD por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS Page 15%: (1) padrão GE de massas moleculares; (2) pellet após sonicação e centrifugação, (3) extrato bruto – parte solúvel –antes de passar pela resina de purificação por afinidade, (4) extrato bruto – parte solúvel - após passar pela resina de afinidade, (5) eluição imediata com tampão de clivagem e DTT e (6) eluição após descanso de 16 horas concentrada em concentradores Millipore de 10 kDa. 71

Figura 16 - Espectro de dicroísmo circular na região do UV distante da Pp 1,2-CCD em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8. 72

Figura 18 - Espectros de CD referentes ao desenovelamento térmico da enzima Pp 1,2-CCD num intervalo de 10°C a 90°C (283,15 K a 363,15 K). 74

Figura 19 - Termograma de DSC para o desenovelamento da enzima Pp 1,2-CCD, em 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl. 75

Figura 20 - Cinética da enzima Pp 1,2-CCD com seu substrato catecol realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl em pH 8, através da titulação de 13 µL de uma solução de proteína a 19 µM, em soluções de catecol num intervalo de concentração de 1 a 50 µM em cubetas de quartzo de 1 mL. A curva sólida representa o ajuste dos dados experimentais com a Equação 13. 76

Figura 21 - Determinação da entalpia aparente da reação de conversão de catecol em ácido cis,cis-mucônico pela enzima Pp 1,2-CCD, em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl em pH 8, através de injeção única de 7,5 µL de substrato (572 µM) em 100 nM de proteína inserida na cela (azul) e do calor de diluição do catecol no mesmo tampão (verde). 78

Figura 23 - (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético por ITC da enzima Pp 1,2-CCD. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten, sendo a cinética realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl em pH8, através de injeções múltiplas (20 injeções) de 1,25 µL de um substrato (572 µM) em 100 pM de proteína inserida na cela. 81

Figura 24 - Conversão completa do catecol em ácido cis,cis-mucônico, onde temos: (A) o calor produzido por três injeções de 7,5 µL de uma solução a 572 µM de catecol na cela de amostra contendo 100 nm de enzima e (B) a área integrada sob cada pico. Os valores encontrados são o calor de conversão total do catecol em produto, ou seja, ΔH_{ap}. 83

Figura 25 - Resultados da expressão, purificação e delipidação visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS - Page 15%: (1) padrão GE de massas moleculares; (2) pellet após sonicação e centrifigação; (3) extrato bruto – parte solúvel - antes de passar pela resina de afinidade, (4) extrato bruto – parte solúvel – após passar pela resina de afinidade; (5) eluição imediata com tampão de clivagem e DTT e (6) eluição após descanso de 16 horas concentrada em concentradores Millipore de 10 kDa, sem delipidar; (7) Proteína delipidada com CALBIOSORB, (8) Proteína delipidada com POLIDOCANOL e (9) Proteína delipidada com POLIDOCANOL e CALBIOSORB. 85

Figura 26 - Espectros de dicroísmo circular da Pp 1,2-CCD em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8 obtida ao final dos protocolos de delipidação utilizados no presente trabalho. 86

Figura 27 - Termograma de DSC para o desenovelamento da enzima Pp 1,2-CCD em 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8, após os protocolos de delipidação descritos no texto. 88

Figura 28 - Cinética da enzima Pp 1,2-CCD com seu substrato catecol, realizada em tampão 20mM Tris HCl, 50mM NaCl em pH 8, através titulação de 13 µL de uma proteína a 19 µM em soluções de catecol num intervalo de concentração de 1 a 50µM em cubetas de quatzo de 1 mL (sem o ajuste teórico para não prejudicar a clareza da imagem). 90

Figura 29: Espectros de dicroísmo circular da Pp 1,2-CCD antes e após delipidação com resina hidrofóbica. (A) DSC da Pp 1,2-CCD em 20mM Tris HCl, 50mM NaCl, em pH 8. (B) DSC da Pp 1,2-CCD em 20 mM Tris HCl, 0 mM NaCl, em pH 8. 93

Figura 30 - Termograma de DSC para o desenovelamento da enzima Pp 1,2-CCD antes e após delipidação com resina hidrofóbica. (A) DSC da Pp 1,2-CCD em 20 mM Tris HCl, 50mM NaCl, em pH 8. (B) DSC da Pp 1,2-CCD em 20 mM Tris HCl, 0 mM NaCl, em pH 8. 94

Figura 31 - (A) Cinética da enzima Pp 1,2-CCD com seu substrato catecol, realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl em pH 8, através titulação de 13 µL de uma proteína à 19 µM, em soluções de catecol num range de concentração de 1µM à 50 µM em cubetas de quatzo de 1mL. (B) Mesmo procedimento cinético realizado em tampão 20 mM Tris HCl, 0 mM NaCl em pH 8. 96

Figura 32 - (A) Entalpia da Pp 1,2-CCD em 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8. (B) Entalpia da Pp 1,2-CCD em 20 mM Tris HCl, 0 mM NaCl, pH 8. 98

Figura 33 - (A) Dados experimentais da velocidade de reação ajustados à equação de Michaelis-Menten, sendo a cinética realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mMNaCl em pH8, através de injeção múltipla (20 injeções) de 1,25 µL de substrato a 572µM em 100 pM de proteína – delipidada e sem delipidar - inserida na cela. (B) Dados experimentais da velocidade de reação ajustados à equação de Michaelis-Menten, sendo a cinética realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 0mM NaCl em pH8, através de injeção múltipla (20 injeções) de 1,25 µL de substrato a 572 µM em 100 pM de proteína – delipidada e sem delipidar inserida na cela. _____ 100

Figura 34 - Conversão completa do catecol em ácido cis,cis-mucônico realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8. (A) Calor gerado pelas três injeções de 7,5 µL de uma solução 572 µM de catecol dentro da cela de amostra contendo 100 nM de Pp 1,2-CCD. (B) Área integrada sob cada pico. Os valores encontrados são o calor total de conversão do catecol em substrato, ou seja, ΔH_{ap}. _____ 103

Figura 35 - Conversão completa do catecol em ácido cis,cis-mucônico realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 0 mM NaCl, pH8. (A) Calor gerado pelas três injeções de 7,5 µL de uma solução 572 µM de catecol dentro da cela de amostra contendo 100 nM de Pp 1,2-CCD. (B) Área integrada sob cada pico. Os valores encontrados são o calor total de conversão do catecol em substrato, ou seja, ΔH_{ap}. _____ 105

Figura 36 - Espectros de RPE das sondas 5-SASL e 16-SASL em modelos micelares na ausência (linha preta), na presença (linha azul) da enzima Pp 1,2-CCD e na presença da enzima Pp 1,2-CCD delipidada por CALBIOSORB (linha rosa). Ensaio realizado com 25 µM de CCD em uma razão proteína:lipídio de 1:100, em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8. _____ 107

Figura 37 - Espectros de RPE das sondas 5-SASL e 16-SASL em modelos micelares na ausência (linha preta), na presença (linha azul) da enzima Pp 1,2-CCD e na presença da enzima Pp 1,2-CCD delipidada por CALBIOSORB (linha rosa). Ensaio realizado com 25 µM de CCD em uma razão proteína:lipídio de 1:100, em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8. _____ 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros termodinâmicos do desenovelamento da Pp 1,2-CCD obtidos a partir de experimento de DSC. 76

Tabela 2: Dados cinéticos obtidos através do ajuste da curva de cinética enzimática da Figura 20 por uma hipérbole representativa de uma curva de Michaelis-Menten, no programa ORIGIN 8. 77

Tabela 3 - Dados cinéticos obtidos através do ajuste da curva de cinética enzimática da Figura 23 por uma hipérbole representativa de uma cinética de Michaelis-Menten. 81

Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos obtidos para o desenovelamento da Pp 1,2-CCD quando submetida aos protocolos de delipidação. 89

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos da enzima Pp 1,2-CCD antes e após os protocolos de delipidação, obtidos ajustando-se as curvas da Figura 28 a uma hipérbole. 91

Tabela 6 - Parâmetros termodinâmicos do desenovelamento da Pp 1,2-CCD quando submetida a protocolo de delipidação na presença e na ausência de sal. 95

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da enzima Pp 1,2-CCD antes e após o protocolo de delipidação, na presença e na ausência de sal. Os valores de ΔH_{ap} foram obtidos integrando-se as curvas da Figura 32. 99

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos da enzima Pp 1,2-CCD antes e após o protocolo de delipidação, na presença e na ausência de sal. Os valores de $v_{máx}$ e K_M foram obtidos através de ensaio enzimático realizado em um calorímetro, citado anteriormente, e ajustando-se as curvas da Figura 33 a uma hipérbole. 101

LISTA DE ABREVIAÇÕES

$[E]_t$	Concentração total de enzima
5-PCSL	1- Palmitoil-2(5-doxil esteroil)Fosfatidilcolina
5-SASL	Ácido 5-doxil esteárico
16-SASL	Ácido 16-doxil esteárico
ΔC_p	Variação da capacidade calorífica
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs
ΔH_{ap}	Variação da entalpia aparente
ΔH_{cal}	Variação da entalpia calorimétrica total
ΔH_{VH}	Variação da entalpia de van’t Hoff
ΔS_{Tm}	Variação de entropia associada a entalpia calorimétrica total
$\Delta T_{1/2}$	Variação da largura a meia altura da curva de transição
AO	Absorção Óptica
CCD	Clorocatecol 1,2 dioxigenase
CD	Dicroísmo Circular
$CHCl_3$	Clorofórmio
CO_2	Dióxido de carbono
CTD	Catecol 1,2 dioxigenase
DHODH	Enzima diidroorotato desidrogenase
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTD	Ditianodiol
DTT	Ditiotreitol
HAPs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

IPTG	Isopropil
ITC	Calorimetria Titulação Isotérmica
k_{cat}	Constante catalítica
K_M	Constante de Michaelis
LB	Luria Brough
LPC	1-Palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina
LPG	1-Palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)]
NaCl	Cloreto de Sódio
OR	Fenômeno de rotação óptica
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
Pp 1,2-CCD	Clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida*
PSI	Pressão por polegada quadrada
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS
T_m	Temperatura de Melting
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta visível
$v_{máx}$	Velocidade máxima
v_0	Velocidade inicial da catálise enzimática

SUMÁRIO

Capítulo 1 ..... **27**

1 Introdução 29

1.1 Dioxigenases 31

Capítulo 2 ..... **35**

2 Objetivos 37

Capítulo 3 ..... **39**

3 Materiais e Métodos 41

3.1 Materiais 41

3.2 Preparação de Amostras 41

3.2.1 Expressão e purificação da Pp 1,2-CCD 42

3.2.2 Preparação das Micelas 43

3.2.3 Protocolos de delipidação da Pp 1,2-CCD 43

3.3 Medidas de RPE 46

3.3.1 Medidas de interação com micelas de lisolipídios 46

3.4 Medidas de CD 47

3.5 Medidas de Absorção Óptica 47

3.6 Medidas de ITC 48

3.6.1 Ensaios de entalpia 49

3.6.2 Ensaios de cinética enzimática 49

3.6.3 Ensaios de cinética enzimática da conversão do catecol em ácido cis,cis-mucônico para visualização de inibição por produto 50

3.6.4 Ensaio de cinética enzimática da conversão do catecol em ácido cis,cis-mucônico com a proteína delipidada 50

3.6.5 Análise dos Dados 51

3.7 Medidas de DSC 51

3.8 Considerações teóricas 52

3.8.1 Dicroísmo Circular (CD) 52

3.8.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) 57

3.8.3 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) e Cinética Enzimática 60

3.8.4 Ressonância Paramagnética eletrônica (RPE) 66

Capítulo 4 69

4 Resultados e Discussões 71

4.1 Estudo estrutural e funcional da Pp 1,2-CCD 71

4.2 Estudo estrutural e funcional da Pp 1,2-CCD quando submetida a processos de delipidação 85

4.3 Estudo estrutural e funcional da Pp 1,2-CCD quando submetida a diferentes forças iônicas e processos de delipidação 93

4.4 Estudos da interação da Pp 1,2-CCD com modelos micelares 108

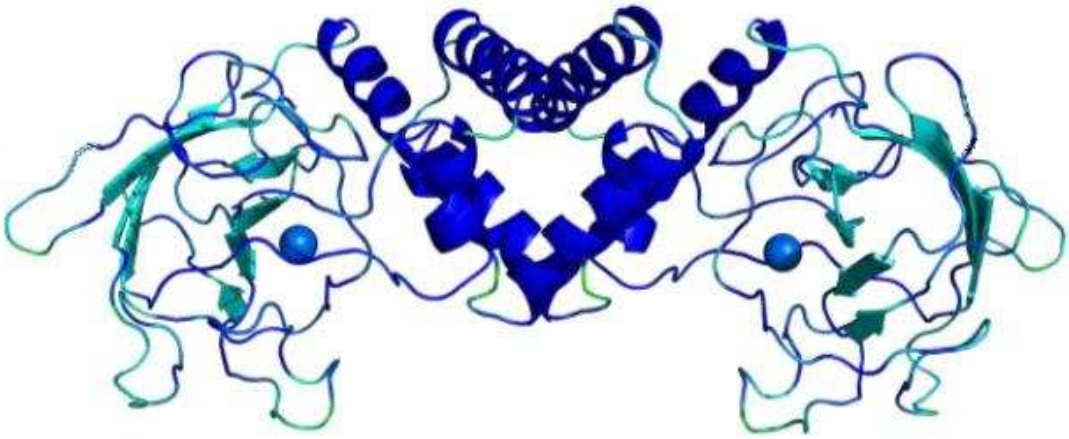
Capítulo 5 113

5 Conclusões 115

Referências 117

Capítulo 1

Introdução



1 INTRODUÇÃO

O uso intensivo de compostos orgânicos, juntamente com o grande avanço industrial consequente da alta demanda tecnológica ocasionada pelo extenso crescimento populacional, culminaram em um enorme acúmulo de poluentes orgânicos no meio ambiente. Uma classe desses poluentes devido a suas estruturas químicas cíclicas ou aromáticas possuem alta estabilidade, toxicidade e resistência à oxidação química, fotolítica e à degradação biológica, permanecendo, desta forma, no ambiente. [1]

Poluentes aromáticos devido a sua lipossolubilidade em membranas celulares são facilmente absorvidos pela pele, por via oral ou inalação[2], depositando-se subsequentemente em tecidos adiposos [3] e causando, assim, a desregulação de sistemas do organismo, sendo apontados, ainda, como substâncias carcinogênicas. Dentre tais poluentes, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são considerados, na atualidade, os mais agressivos, por gerarem compostos epóxidos através de seu metabolismo, que podem levar a ocorrência de carcinomas e mutações [4], sendo encontrados no meio ambiente em decorrência de atividades naturais antropogênicas como: queima de combustíveis fósseis, incineração de resíduos sólidos urbanos, processos industriais na produção de corantes, dentre outras.

Quando no meio ambiente, os HAPs podem sofrer alguns processos físico-químicos como: volatilização, foto-oxidação, oxidação química, adsorção nas partículas do solo, lixiviação e degradação microbiana. Desta forma, os riscos gerados pela presença de tais compostos podem ser contornados utilizando-se algumas metodologias conservadoras como: remoção, alteração e isolamento do poluente ou escavação do solo contaminado e sua incineração ou, ainda, confinamento. No entanto, estes métodos apresentam alto custo e apenas transformam os compostos de uma fase físico-química a outra, evidenciando a necessidade de se encontrar uma técnica mais eficiente de descontaminação.

Uma metodologia biotecnológica eficaz para a eliminação dos HAPs é o uso de microorganismos, naturais ou geneticamente modificados, capazes de transformá-los em substâncias inertes, como CO_2 e água [5]. Esse procedimento é denominado de bioremediação e há anos é utilizado em diferentes países, apresentando maior eficiência na remoção de contaminantes do que as técnicas físicas e químicas[2]. Sua eficiência depende de fatores

ambientais como o tipo de microorganismo utilizado, bem como a natureza estrutural e química do composto a ser degradado de modo que tanto bactérias como fungos e algas possuem habilidades que envolvem a quebra sistemática desses compostos orgânicos em metabólitos menos complexos.

Bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, dentre outros são as mais extensivamente estudadas e utilizadas na aplicação do processo de biorremediação [6]. No caso dessas bactérias, o principal mecanismo utilizado no metabolismo dos HAPs inicia-se na oxidação do anel benzênico através da ação de enzimas dioxigenases levando à formação de compostos cis-diidrióis, como podemos visualizar na Figura 1.

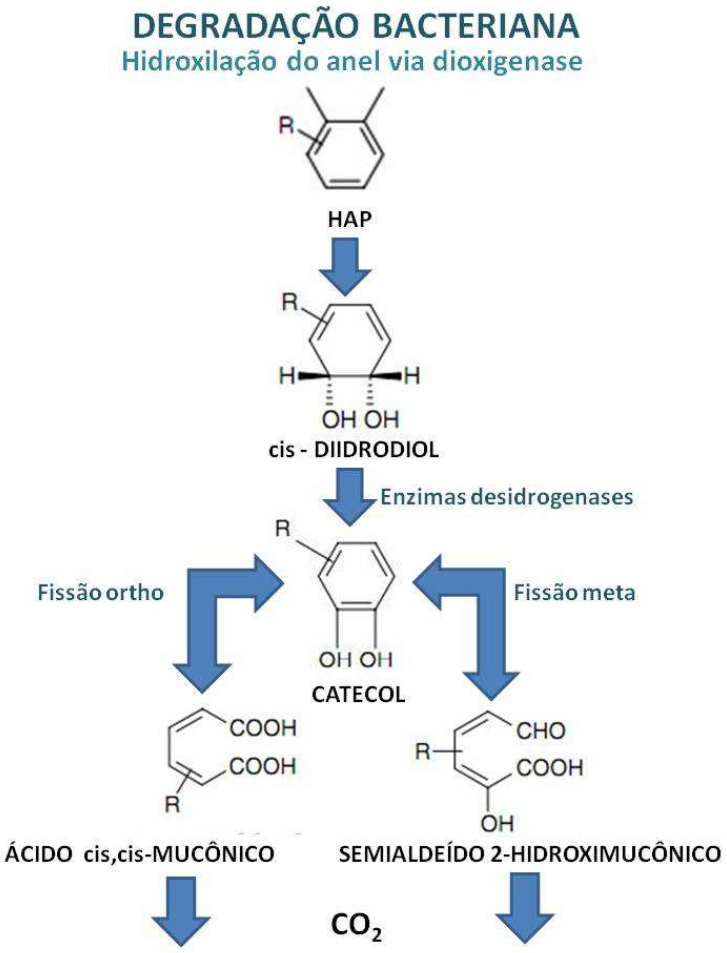


Figura 1 - Funil de degradação bacteriana de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Adaptada de BONALUMI.[7]

1.1 Dioxigenases

Dioxigenases são algumas das enzimas que fazem parte da diversidade metabólica da bactéria do gênero *Pseudomonas putida.* Estas enzimas bacterianas são portadoras de um grupo não heme de ferro e responsáveis pelo metabolismo de diversos compostos intermediários produzidos pela decomposição de compostos aromáticos, os quais são continuamente liberados no meio ambiente por inúmeros processos descritos anteriormente [8-9]. Seu papel no funil metabólico de compostos aromáticos leva a um grande interesse pelo estudo dessa família de enzimas, bem como seus mecanismos de ação.

Através da inserção dos dois átomos de uma molécula de oxigênio no substrato ao qual são expostas, as dioxigenases clivam, então, o anel aromático do substrato [10-11]. Tal anel pode ser clivado em três pontos distintos da molécula de substrato, nomeando-se, assim, o tipo de reação que a enzima catalisa e também dividindo as dioxigenases em intradiol e extradiol, como podemos ver na Figura 2. Em particular, a enzima estudada no presente trabalho se encaixa na família das dioxigenases intradiol. [12]

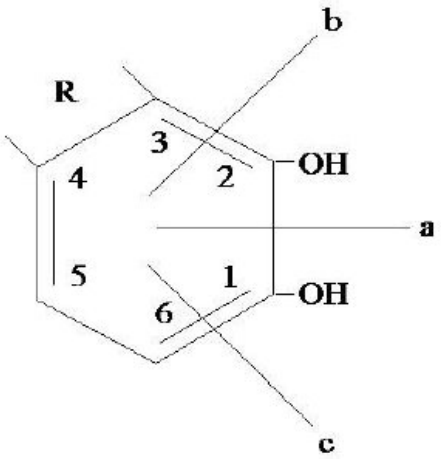


Figura 2 - Representação dos três modos de fissão do anel benzênico de uma molécula de catecol: (a) clivagem intradiol, (b) clivagem extradiol proximal e (c) clivagem extradiol distal. R representa os radicais que podem ligar-se à molécula, como por exemplo, o íon cloro.

Apenas recentemente foram reportados os primeiros estudos envolvendo a determinação das estruturas tridimensionais de alguns membros da família das catecol 1,2-dioxigenases, quais sejam: 1,2-CTD de *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 (Ac 1,2-CTD) [13,] 1,2-CTD de *Pseudomonas arvilla* [14] e 1,2-CCD de *Rhodococcus opacus* [15-16] e da própria enzima estudada no presente trabalho (Pp 1,2-CCD) [17]. Os membros desta família de dioxigenases são homodímeros, possuindo três domínios, dentre os quais dois são domínios catalíticos e um domínio de ligação, como podemos ver na Figura 3.

Figura 3 - Representação de estrutura secundária para a Pp 1,2-CCD. As esferas azuis representam os íons de Fe presentes na estrutura. Figura retirada de BONALUMI. [7]

Os domínios catalíticos são localizados na extremidade de cada constituinte da estrutura proteica, onde há um íon de Fe^{3+} coordenado por dois resíduos de tirosina, dois resíduos de histidina e um grupo hidroxil, gerando uma geometria esférica de coordenação para o sítio ativo das estruturas das duas primeiras enzimas citadas anteriormente [13-16]. Já no caso da Pp 1,2-CCD, o mesmo se sítio se apresenta coordenado por dois resíduos de tirosina, dois resíduos de histidina e uma molécula de hidroxila do ligante DTD (ditianodiol), os quais geram uma geometria bipiramidal trigonal de coordenação [17]. A diferença geométrica e de tamanho dos sítios catalíticos entre as estruturas citadas acima e outras já conhecidas, pode estar relacionada à diferença de especificidade pelo substrato que clivam, tendo a Pp 1,2-CCD um espectro mais amplo de substratos sobre os quais atua do que outras enzimas da família. Estes domínios catalíticos mostram-se estruturalmente e cataliticamente equivalentes, uma vez que nenhum mecanismo alostérico foi observado até o momento [1,18].

O domínio de ligação é um domínio helicoidal localizado no centro das estruturas protéicas, onde, de maneira quase surpreendente, tem sido encontradas, em todas as estruturas determinadas até hoje, moléculas de fosfolipídios situados na interface das duas subunidades [13-17]. No caso da Pp 1,2-CCD, nosso grupo mostrou em trabalhos anteriores que existe o sítio de ligação para fosfolipídio [19]. Além disso, a sua estrutura tridimensional foi recém resolvida pelo grupo da Prof(a). Dr(a). Maria Cristina Nonato (FCFRP/USP) [dados ainda não publicados] e nela vemos que há uma densidade eletrônica não contínua de ocupação de tal sítio, o que levou nossos colaboradores a sugerir que a ocupação ocorresse por um ácido graxo e não por um fosfolipídio [7,17]. O interessante de tal ocupação é que as moléculas se ligam no túnel atravessando toda a molécula de uma face a outra da estrutura que lembra o formato de um bumerangue (Figura 4).

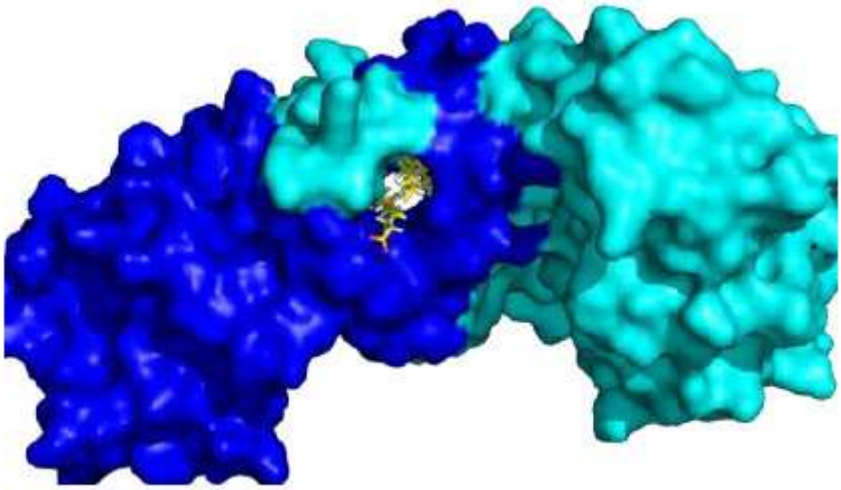


Figura 4 - Superfície da enzima Pp 1,2-CCD mostrando a ocupação do ácido graxo no túnel hidrofóbico. Retirada de BONALUMI. 7

Ainda que a interação da Pp 1,2-CCD com fosfolipídios/ácidos graxos tenha sido comprovada através de ensaios de ressonância paramagnética eletrônica e que CITADINI et al [19] tenham sugerido que a presença dessas moléculas possa modular a atividade enzimática da proteína [19], o tipo de ligante existente neste sítio de ligação e a sua função na funcionalidade da enzima ainda não foram totalmente compreendidos. É neste último aspecto que o presente trabalho pretende contribuir, já que se a função da enzima como agente capaz de degradar estruturas aromáticas tem relevância tecnológica, o aspecto básico de que moléculas como fosfolipídios possam atuar como moduladores dessa atividade assume papel

fundamental se o que se deseja é evoluir na compreensão e controle da capacidade catalítica da enzima.

Sendo assim, o trabalho que se segue apresenta um estudo investigativo do papel das moléculas de fosfolipídio/ácido graxo que se encontram no túnel hidrofóbico da Pp 1,2-CCD. Foram realizados ensaios que revelassem características relativas à atividade catalítica da enzima em questão, bem como a sua possível interação com modelos micelares antes e depois de procedimentos de delipidação. Para tanto, utilizamos um conjunto de técnicas espectroscópicas como Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), Absorção Óptica (AO) e Dicroísmo Circular (CD), além das técnicas de Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) e de Titulação Isotérmica (ITC).

Capítulo 2

Objetivos

2 OBJETIVOS

O presente projeto tem por finalidade gerar resultados que possam ajudar a compreender aspectos básicos acerca da estrutura e da atividade enzimática da Pp 1,2-CCD, principalmente no que diz respeito à atuação de moléculas de fosfolipídios no mecanismo catalítico da enzima, estabelecendo, assim, uma correlação entre mudanças conformacionais e atividade catalítica.

Primeiramente objetivamos:

- ✓ Obter uma expressão heteróloga e purificação da enzima Pp 1,2-CCD;
- ✓ Estabelecer protocolos de delipidação da proteína;
- ✓ Em seguida, com a finalidade de se investigar aspectos quanto a função da moléculas anfipática na estrutura, cátalise enzimática, bem como interação da PP 1,2-CCd com modelos micelares, faremos uso de uma abordagem experimental utilizando o seguinte conjunto de técnicas: Dicroísmo Circular (CD), Absorção Óptica, Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) a fim de realizarmos as seguintes etapas:

- ✓ Realizar ensaios estabilidade térmica utilizando a proteína antes e depois de sua delipidação;
- ✓ Realizar ensaios de cinética enzimática utilizando a proteína antes e depois de sua delipidação;
- ✓ Realizar ensaios de interação com ligantes utilizando a proteína antes e depois da delipidação;
- ✓ Acompanhar todos os ensaios com espectros de CD para estudo de mudanças estruturais;
- ✓ Estabelecer uma correlação entre mudanças estruturais e função.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os lisofosfolipídios zwiteriônico 1-Palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (LPC) e aniônico 1-Palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)] (LPG), assim como os marcadores de spin Ácido n-doxil esteárico (n=5,16) foram adquiridos comercialmente da empresa Avanti Polar Lipids, Inc.(Alabaster, AL). O substrato utilizado nas cinéticas, catecol (1,2-benzenediol pyrocatecol), foi obtido da empresa Sigma Chem. Co. A resina CALBIOSORB e o detergente não-iônico POLIDOCANOL foram cedidos pelo Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, do Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

3.2 Preparação de Amostras

Nesta seção descrevemos a preparação de amostras empregadas nas etapas do desenvolvimento do projeto, abrangendo a obtenção da proteína e os protocolos de delipidação e preparação de micelas.

3.2.1 Expressão e purificação da Pp 1,2-CCD

A enzima Pp 1,2-CCD foi expressa e purificada de acordo com o protocolo de ARAÚJO et al [20], onde um pré-inóculo foi preparado a partir de uma alíquota de estoque de bactérias *Escherichia coli* (*Roseta*), mantidas em glicerol, e previamente transformadas com o plasmídeo pTYBCLCA em meio LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina. O pré-inóculo foi, então, colocado sob agitação de 250 rpm em temperatura constante de 37°C durante 16 h. Após esse período, este foi utilizado para inocular 1 L de meio LB acrescido de 0,35 g/L de sulfato ferroso heptahidratado - $FeSO_4.7H_2O$ e 100 µg/mL de ampicilina. As células foram mantidas durante 2h sob agitação de 250 rpm a 37°C, tempo suficiente para que se atinja uma densidade óptica em 600 nm ($D.O._{600nm}$) de 0,6. A seguir, a expressão da enzima foi induzida pela adição de agente indutor IPTG 0,5 mM overnight a 20°C e 250 rpm.

A cultura foi dividida em duas partes e centrifugada a 4500 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. As células foram, então, ressuspendidas em tampão 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8 e 0,5 mM de agente inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), divididas em 6 partes e armazenadas a 8°C.

As células armazenadas foram descongeladas e lisadas por sonicação através de uma sequência de 15 pulsos de 30 segundos com 60 segundos de intervalo entre eles. Após tal processo, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 30 minutos e 4°C a fim de se separar a parte solúvel dos restos celulares. A parte solúvel foi, então, aplicada em coluna cromatográfica previamente empacotada de quitina (Biolabs) e equilibrada com 130 mL do mesmo tampão utilizado para ressuspensão das células, e deixada por 30 minutos com tal sobrenadante com a finalidade de aumentar a interação da proteína com a resina.

Dando continuidade, a coluna foi lavada com 200 mL de tampão de ressuspensão e, posteriormente, com 20 mL de tampão 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8 (tampão de clivagem), com a adição de 30 mM de DTT e 20 µM de PMSF. A coluna foi, então, mantida por aproximadamente 16 horas a 8°C.

Após tal período a coluna foi lavada com tampão de clivagem e a proteína eluída com 80 mL de tampão de clivagem a fim de se retirar toda a proteína presente na coluna. O

resultado do protocolo descrito acima foi a obtenção da enzima Pp 1,2-CCD em quantidade e grau de pureza suficiente para as medidas realizadas ao longo deste trabalho. Tal procedimento foi acompanhado através de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% das várias frações de proteínas obtidas nas etapas descritas acima.

3.2.2 Preparação das Micelas

Soluções estoque de marcadores de spin em clorofórmio ($CHCl_3$) foram colocadas em tubos de vidro. A massa total de lisofosfolipídio utilizada neste experimento foi de 0,5 mg e a concentração de marcador de spin foi mantida em 0,5 mol % dos lisofosfolipídios presnetes na amostra. As amostras foram evaporadas em fluxo de N_2, para secagem do clorofórmio, deixando-o completamente seco na forma de um filme fino nas paredes do tubo de vidro e para garantir a completa eliminação de resíduos de clorofórmio da amostra, esta foi submetida à ultracentrifugação sob vácuo (Savant speedvac plus-Thermo Quest). A seguir, o filme seco foi hidratado com as soluções contendo lisolipídios em tampão de clivagem e/ou com volume específico de proteína. O filme foi, então, raspado da parede do tubo e agitado em vórtex. Em seguida, a micela hidratada foi mantida em geladeira *overnight* para hidratação completa e interação com a enzima. Após a hidratação as amostras foram transferidas para capilares de 50 µL e, posteriormente, submetidas a medidas de RPE.

3.2.3 Protocolos de delipidação da Pp 1,2-CCD

Com o objetivo de realizar a remoção de moléculas de fosfolipídios/ácidos graxos presentes na estrutura da Pp 1,2-CCD após sua expressão e purificação, foram testados quatro protocolos de delipidação (resina de interação hidrofóbica CALBIOSORB, detergente não-

iônico POLIDOCANOL, detergente não-iônico seguido de resina de interação hidrofóbica CALBIOSORB e solvente orgânico METANOL:CLOROFÓRMIO (1:1)) para determinarmos o método mais eficaz de se atingir tal objetivo. Os protocolos seguem descritos abaixo.

3.2.3.1 Protocolo de delipidação com resina de interação hidrofóbica CALBIOSORB.

A proteína purificada segundo protocolo descrito na secção 3.2.1 foi concentrada em concentrador Amicon Ultra – 10000 Da (Millipore), obtendo-se uma solução com concentração final de 1 mg/mL.

Separadamente, a resina CALBIOSORB estocada em H_2O mili-Q, em geladeira, foi desgaseificada por 20 minutos através de bomba de vácuo e, posteriormente, filtrada em papel de filtro. Após a filtração, a resina foi pesada em balança de precisão em três porções de 100 mg, que foram estocadas em três microtubos tipo eppendorf de volume de 2 mL. Adicionou-se a solução de proteína a um desses microtubos contendo a resina, mantido, então, em gelo sob agitação constante por 30 minutos. Após os 30 minutos, a solução heterogênea foi centrifugada por 2 minutos à 14.000 rpm com a finalidade de separar a solução protéica da resina. O sobrenadante desta centrifugação foi retirado e acrescido a outro microtubo contendo a resina. Este foi mantido em gelo e sob agitação constante por 60 minutos. Esta etapa foi repetida mais uma vez. Ao final do procedimento, a solução heterogênea foi centrifugada por 5 minutos a 14.000 rpm a fim de se separar toda a resina da solução e obter-se a solução com proteína delipidada para os ensaios posteriores.

3.2.3.2 Protocolo de delipidação com detergente não-iônico POLIDOCANOL

Novamente começamos com uma solução de proteína purificada segundo protocolo descrito na secção 3.2.1 e com concentração de 1mg/mL. Separadamente, foi feita uma solução estoque de POLIDOCANOL 1% em tampão 20 mM Tris, 50 mM NaCl, em pH 8, de onde se retiram 6 µL para se acrescentar a solução de proteína anterior, obtendo-se uma solução de proteína com 0,006% de POLIDOCANOL. Esta solução foi mantida em gelo sob agitação por 60 minutos, obtendo-se, então a proteína delipidada para os ensaios posteriores.

3.2.3.3 Protocolo de delipidação com detergente não-iônico POLIDOCANOL e resina de interação hidrofóbica CALBIOSORB.

Partindo-se de uma solução de proteína a 1 mg/mL, preparamos, separadamente, uma solução estoque de POLIDOCANOL 1% em tampão 20 mM Tris, 50 mM NaCl, em pH 8, de onde se retirou 6 µL para se acrescentar a solução de proteína anterior, obtendo-se uma solução de proteína com 0,006% de POLIDOCANOL. Esta solução foi mantida em gelo sob agitação por 60 minutos. Simultaneamente, a resina CALBIOSORB foi preparada como descrito acima (v. seção 3.2.3.1), obtendo-se frações de resina contidas em três microtubos tipo eppendorf de volume de 2 mL. Adicionou-se a solução de proteína com 0,006% de POLIDOCANOL a um destes microtubos contendo a resina, que foi mantido em gelo e sob agitação constante por 30 minutos. Após este período, a solução heterogênea foi centrifugada por 2 minutos à 14.000 rpm com a finalidade de separar a solução protéica da resina. O sobrenadante desta centrifugação foi retirado e acrescido a outro microtubo contendo a resina. Este foi mantido em gelo e sob agitação constante por 60 minutos. Esta etapa foi repetida mais uma vez. Ao final do procedimento a solução heterogênea foi centrifugada por 5 minutos a 14.000 rpm a fim de se separar toda a resina da solução e obter-se a solução com proteína delipidada para os ensaios posteriores.

3.2.3.4 Protocolo de delipidação com solvente orgânico METANOL:CLOROFÓRMIO (1:1)

Em um tubo de vidro foi preparada uma solução contendo 1 mL de clorofórmio 100% e 1 mL de metanol 100% à qual foi acrescido o volume de 1 mL de solução protéica. A solução foi submetida a 10 minutos de centrifugação e após tal centrifugação pode-se ver a separação de duas fases por um filme fino branco, onde estava localizada a proteína em questão. As duas fases foram retiradas dos frascos cuidadosamente para não ocorrer a mistura de ambas novamente e uma tentativa de ressuspensão do filme em tampão 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8 foi realizada. No entanto, não ocorreu a ressuspensão do filme, o que caracteriza desnaturação irreversível da proteína. Este filme foi submetido à sonicação por 5 minutos e posterior centrifugação por 2 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi retirado e submetido aos ensaios posteriores.

3.3 Medidas de RPE

3.3.1 Medidas de interação com micelas de lisolipídios.

As amostras preparadas segundo o protocolo geral para micelas descrito acima foram medidas no espectrômetro de RPE Varian E109, que opera em banda X e usando uma cavidade retangular Varian E-248. Os parâmetros de operação do equipamento comuns a todas as amostras foram: frequência de modulação, 100 KHz; tempo de varredura, 2 min; constante de tempo, 0,0064s; varredura do campo magnético, 100 G; potência de microondas, 10 mW, e amplitude de modulação do campo, 1 G. Utilizou-se 0,5 mg de lisofosfolipídio, ressuspendido em tampão, ou em solução com concentração final de 25 μM de proteína, gerando uma solução que foi transferida para capilares, que foram colocados em tubos de

quartzo posicionados no centro da cavidade de ressonância. No caso da Pp ,2-CCD, as medidas apresentadas ocorrem realizadas a temperatura ambiente (25°C).

3.4 Medidas de CD

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos no espectropolarímetro Jasco J-720, em um intervalo de comprimento de onda de 195 a 240 nm, sendo os espectros gerados por uma média entre 8 leituras consecutivas. As medidas foram realizadas com Pp 1,2-CCD pura, Pp 1,2-CCD delipidada e Pp 1,2-CCD na presença de micelas. Para as mesmas foram utilizados 1,0 µM de proteína em tampão de clivagem e em cubetas de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Os dados obtidos encontram-se em unidades de mdeg, e para melhor analisá-los e realizar a desconvolução dos mesmos através do programa CDPro, realizou-se a conversão desta unidade para elipticidade molar.

3.5 Medidas de Absorção Óptica

Foram utilizados para determinação da atividade enzimática nas diversas situações de interesse um espectrofotômetro Hitachi U-2001 e cubetas de quartzo de 1 mL e 0,5 cm de caminho óptico. A solução contendo proteínas foi adicionada em quantidade adequada do substrato catecol, de forma a se obter uma concentração final de proteína de 0,5 µM em solução, e a degradação deste foi monitorada pela absorbância do ácido cis,cis-mucônico (produto da degradação do catecol pela Pp 1,2-CCD) em 260 nm durante um intervalo de 60 segundos.

3.6 Medidas de ITC

A qualidade de um experimento calorimétrico depende de inúmeros cuidados que devem ser adotados durante cada procedimento experimental, os quais são descritos nesta secção.

Anteriormente a cada medida, todas as soluções utilizadas dentro da cela e na seringa foram desgaseificadas durante um período de 10 a 20 minutos, através de bomba de vácuo – ThermoVac - contida no equipamento calorimétrico VP-ITC fabricado pela MicroCal Inc. (Northampton, MA). Concomitantemente a tal procedimento, as soluções foram termostatizadas em uma temperatura pouco abaixo da temperatura em que for realizado o experimento (entre 0,5° e 2°C) com a finalidade de evitar grandes períodos de estabilização do calorímetro.

A cela de referência foi preenchida com água destilada desgaseificada, utilizou-se uma seringa tipo 'livre de gás' fornecida pelo fabricante, enquanto que a cela de amostra foi limpa com aproximadamente 30 mL de solução tampão que foi utilizada em todo o experimento, tomando-se o cuidado de se remover completamente todo o líquido da cela antes do início de cada ensaio calorimétrico. Esta última foi, então, preenchida com enzima utilizando-se a seringa de injeção. Deve-se evitar a formação de bolhas durante o preenchimento da seringa, a fim de se evitar ruídos nas medidas experimentais. A seringa de injeção, de 300 µL, foi preenchida lentamente para que se retire todo o ar. Em seguida purgou-se duas vezes a solução da seringa para assegurar a ausência de bolhas na mesma. A superfície da seringa foi, então, lavada e seca com papel antes de se introduzi-la na cela, para evitar contaminação da cela de amostra.

Após o início de cada experimento foi necessário um tempo de estabilização da temperatura (de 5 a 10 minutos). Após este tempo, há um tempo adicional para estabilização da linha de base e subsequente início das injeções (10 a 20 minutos). O fluxo de calor, então, foi registrado pelo aparelho em função do tempo. A velocidade de agitação e a temperatura foram mantidas constantes em todos os experimentos, sendo seus valores de 307 rpm e 25°C, respectivamente.

3.6.1 Ensaios de entalpia

A entalpia aparente da conversão do catecol em ácido cis,cis-mucônico foi determinada preenchendo-se a cela de amostra com 100 nm de Pp 1,2-CCD em tampão 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8, enquanto a seringa foi preenchida por uma solução de 572 µM de catecol no mesmo tampão a fim de se minimizar o calor de diluição. ***O substrato foi titulado na cela de amostra pela injeção de 7,5 µL da solução da seringa de forma que a concentração final de catecol na cela fosse de 3,5 µM, sendo o ácido cis, cis-mucônico o limitante da reação; seu completo consumo foi observado quando a linha de base retornou a zero.*** O calor de diluição do substrato foi determinado nas mesmas condições, mas com a cela preenchida apenas com tampão 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8.

3.6.2 Ensaios de cinética enzimática

Num primeiro ensaio (Ensaio 1), as curvas de cinética enzimática foram obtidas preenchendo-se a seringa com 286 µM de catecol em tampão 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8 e a cela com 100 pM de Pp 1,2-CCD no mesmo tampão. Realizou-se 50 injeções de 2,5 µL, com intervalo de 120 s. Um segundo ensaio (Ensaio 2) foi estabelecido a fim de ser garantir que as condições de pseudo-primeira ordem com relação ao catecol fossem obtidas. Neste ensaio, preencheu-se a seringa com 572 µM de catecol em tampão 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8 e a cela com 100 pM de Pp 1,2-CCD no mesmo tampão. Foram realizadas de 20 a 25 injeções de 1,5 µL, com intervalo de 120 s.

3.6.3 Ensaios de cinética enzimática da conversão do catecol em ácido cis,cis-mucônico para visualização de inibição por produto

Com o intuito de verificarmos a ocorrência de inibição por produto da própria reação, foi realizado um ensaio preenchendo-se a seringa com 572 μM de catecol em tampão 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8 e a cela com 100 nM de Pp 1,2-CCD no mesmo tampão. Foram realizadas 3 injeções de 7,5 μL, com intervalo de 4000 s.

3.6.4 Ensaio de cinética enzimática da conversão do catecol em ácido cis,cis-mucônico com a proteína delipidada

A fim de se verificar a função do fosfolipídio/ácido-graxo encontrado por BONALUMI [7] na estrutura cristalográfica estabelecida para a enzima estudada foram realizados quatro ensaios de delipidação, dos quais três foram escolhidos devido ao rendimento da delipidação e a quantidade de proteína remanescente do processo.

Como os três protocolos de delipidação mostraram-se equivalentes quanto à cinética enzimática vista por absorção óptica, escolhemos trabalhar apenas com o protocolo de delipidação com CALBIOSORB, por ele não utilizar detergente e poder produzir dados sem demais interferências no ITC. Com a proteína resultante deste protocolo foram realizados experimentos de cinética enzimática para verificação do perfil cinético da enzima após este procedimento. Para tanto, foi realizado o mesmo protocolo do Ensaio 2, estabelecido anteriormente.

3.6.5 Análise dos Dados

A análise dos dados obtidos através do monitoramento do fluxo de calor foi realizada através do programa Origin-ITC 7.0 [21].

Para determinar os valores de entalpia aparente molar (ΔH_{ap}) integram-se as curvas correspondentes às reações e as suas respectivas diluições. Logo após subtraíram-se os calores de diluição das curvas de reação.

Os parâmetros de $v_{máx}$, k_{cat} e K_M da reação de conversão do catecol a ácido cis, cis-mucônico foram calculados no programa Origin-ITC no modo 'ensaio enzimático' e os dados experimentais ajustados graficamente pelo método de ajuste não–linear dos mínimos quadrados à equação de Michaelis-Menten.

3.7 Medidas de DSC

Os experimentos de DSC foram realizados em um equipamento VP-DSC fabricado pela MicroCal (Northampton, MA). As amostras dissolvidas em tampão desejado (20mM Tris, 50mM NaCl, pH8 ou 20mM Tris, 0mM NaCl, pH8) foram desgaseificadas por um período de 10 a 20 minutos e aplicadas no calorímetro (500 μL). Foi realizada, então, uma varredura no intervalo de 30 a 70°C, com taxa de aquecimento de 60°C/h e com pressão aplicada em ambas as celas de 22 PSI (libra por polegada quadrada). A quantidade de proteína utilizada em todos os experimentos foi de 10 μM. A aquisição da linha de base instrumental foi feita no mesmo intervalo de temperaturas preenchendo-se ambas as celas de amostra e de referência do calorímetro com tampão desejado. Os termogramas adquiridos foram, então, normalizados pela concentração antes de analisados.

3.8 Considerações teóricas

3.8.1 Dicroísmo Circular (CD)

A espectroscopia de dicroísmo circular é uma técnica que permite, dentre outras coisas, determinar e monitorar mudanças estruturais de biomoléculas. Proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos são macromoléculas biológicas de muitas unidades opticamente ativas que exibem sinal de CD. Tais moléculas opticamente ativas interagem com luz polarizada e provocam alterações na mesma. O dicroísmo circular está associado com a alteração na polarização da luz oriunda da diferença de absorção de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita após esta passar através da amostra.

3.8.1.1 O fenômeno de Dicroísmo Circular (CD)

Uma superposição de raios de luz circularmente polarizados à esquerda e à direita, com campos elétricos de mesma amplitude e fase, pode ser considerada como uma luz linearmente polarizada, pois a combinação das projeções desses campos numa direção perpendicular à direção de propagação leva a uma reta como mostra a Figura 5a. Cromóforos assimétricos ou cromóforos simétricos em ambientes assimétricos interagem de forma diferente com a luz polarizada circularmente à direita e à esquerda resultando em dois fenômenos distintos.

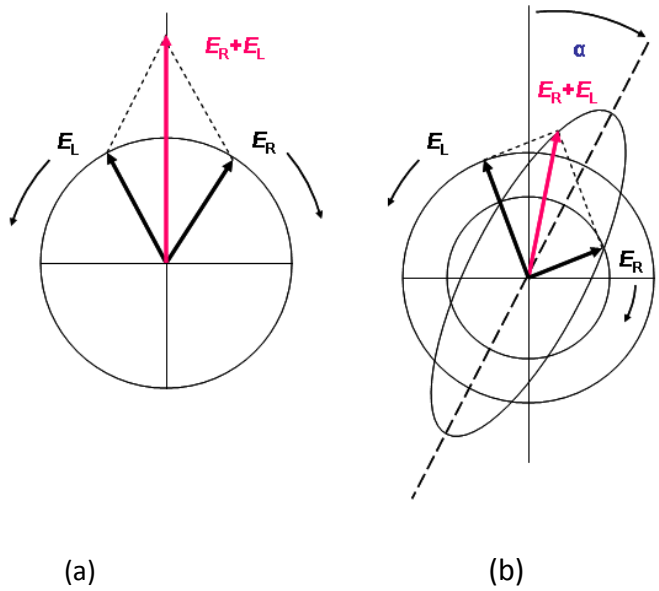


Figura 5 - (a) Luz linearmente polarizada pode ser vista como a superposição de luz circularmente polarizada opostas com amplitudes e fases iguais. (b) As diferenças de absorção e de velocidade de propagação de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita levam ao dicroísmo circular (CD) e à rotação óptica, respectivamente.Figura adaptada de CANTOR & SCHIMMEL. [22]

No primeiro fenômeno, raios de luz circularmente polarizados viajam através de uma amostra com velocidades diferentes devido a diferentes índices de refração, ocasionando uma diferença de fase entre os raios de luz proporcional à diferença entre os índices de refração. Tal fenômeno é conhecido como birrefringência [22] e está relacionado ao fenômeno de rotação óptica (OR) através de:

$$\Phi(\lambda) = \frac{180 \cdot l.(n_L - n_R)}{\lambda}.[graus] \qquad \textbf{(1)}$$

onde $\Phi(\lambda)$ é a rotação óptica, l é o caminho óptico, n_L é o índice de refração do meio para a luz polarizada à esquerda, n_R é o índice de refração do meio para a luz polarizada à direita e λ é o comprimento de onda. Após a amostra, a luz linearmente polarizada tem sua direção de polarização rodada por um ângulo Φ.

No segundo fenômeno, luz linearmente polarizada passa através de uma amostra opticamente ativa com uma diferença de absorbância para as componentes polarizadas à esquerda e à direita. A absorção maior de uma das componentes do que a da outra resulta em uma luz elipticamente polarizada, porém sem alteração da direção de propagação. Esta elipticidade induzida [22] é definida como o arco tangente da razão entre o eixo menor e maior da elipse formada e que está relacionado com o fenômeno de dicroísmo circular através de:

$$\theta(\lambda) = \frac{2{,}303}{4} \cdot (A_L - A_R).\frac{180}{4\pi}.[graus] \quad \textbf{(2)}$$

onde θ(λ) é a elipticidade da luz e $(A_L - A_R)$ é a diferença de absorção da amostra medida.

Para realizarmos uma comparação da atividade óptica entre diferentes moléculas ou com valores medidos em diferentes experimentos faz-se necessário transformar os dados obtidos para elipticidade em valores com unidades normalizadas. A unidade mais conhecida em trabalhos com proteínas e peptídeos é a elipticidade molar e rotação óptica molar ou elipticidade e rotação óptica por resíduo, que podem ser encontradas da seguinte maneira [22]:

$$[\Phi(\lambda)] = \frac{100 \cdot \Phi}{C \cdot l} \quad \textbf{(3)}$$

$$[\theta(\lambda)] = \frac{100 \cdot \theta}{C \cdot l} \quad \textbf{(4)}$$

onde C é a concentração em mol/L e l é caminho óptico.

3.8.1.2. O Espectropolarímetro e os espectros de CD

Como mencionado, o aparelho de CD mede a diferença de absorção da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda, após a luz incidente passar por uma amostra. O esquema que segue (Figura 6) mostra uma montagem simplificada do equipamento de CD utilizado para realizar as medidas de diferença de absorção:

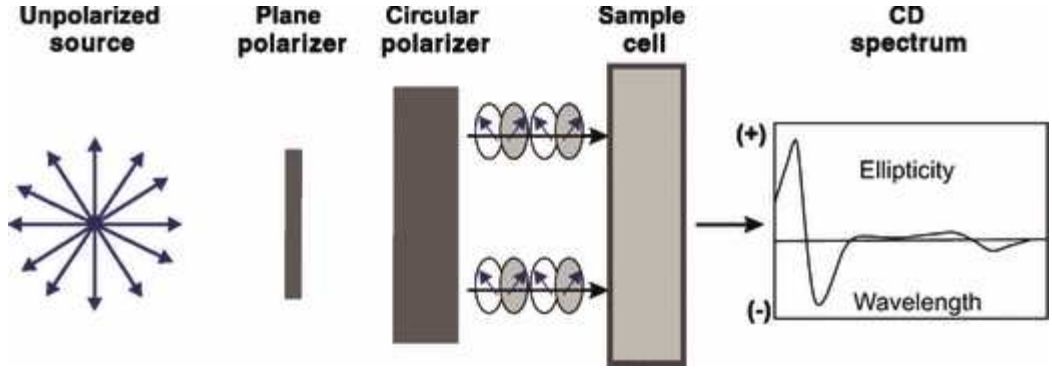


Figura 6 - Esquema do equipamento de CD para a detecção da diferença de absorção. Figura retirada da referência 23.

Os dados adquiridos em CD permitem encontrar a elipticidade induzida pela amostra em função do comprimento de onda da luz incidente. Através de medidas na região espectral do UV distante (190-250 nm) podemos determinar o conteúdo de estrutura secundária de uma proteína. Neste caso, os cromóforos são as próprias ligações peptídicas que constituem a proteína e o sinal gerado varia com a localização e o ambiente em que estas se encontram [23].

Os sinais de baixa intensidade de atividade óptica correspondem à transição n → π* do cromóforo, que é observada na região de 210-220 nm e envolve os elétrons não-ligados do oxigênio da carbonila. Já os sinais de CD de mais alta intensidade são vistos como uma banda centrada em 190 nm ocasionada pela transição π → π*, envolvendo os elétrons-π da carbonila. Os espectros típicos de estruturas α-hélice, folha β e randômica podem ser visualizados na Figura 7.

Cada tipo de estrutura protéica possui características típicas em um espectro de CD [24]:

- <u>Estrutura aleatória:</u> é caracterizada por um pico positivo associado à transição n → π* em 212 nm, e um pico negativo associado à transição π → π*em 195 nm;
- <u>Estrutura folha β:</u> é caracterizada por um pico negativo associado à transição π → π* em 218 nm, e um pico positivo associado à transição n → π*em 196 nm;
- <u>Estrutura α-hélice:</u> é caracterizada por um pico paralelo e negativo associado à transição π → π* em 208 nm, um pico paralelo e negativo associado à transição

n → π* em 222 nm, e um pico perpendicular e positivo associado à transição π → π* em 192 nm;

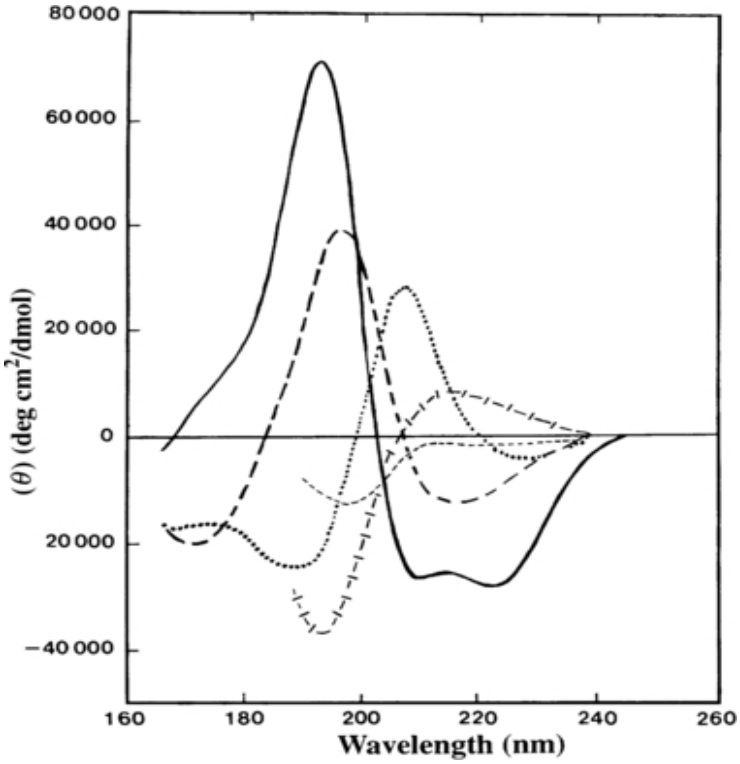


Figura 7 - Ilustração mostrando os tipos de espectros na faixa de UV-distante relacionados aos tipos de estrutura protéica. Linha sólida, α-hélice; linha tracejada longa, folha β antiparalela; linha pontilhada, volta-β tipo I; linha tracejada-cruz, extensão de 3 α-hélice ou hélice poli (Pro) II; linha tracejada curto, estrutura aleatória. Figura adaptada de Kelly et al.[24]

Podemos monitorar o desenovelamento de uma proteína através do monitoramento da mudança de intensidade em um comprimento de onda específico no espectro de CD à medida que variamos um parâmetro externo como a temperatura. Graficando-se o valor de θ em função da temperatura podemos obter a curva de desenovelamento da proteína e inferir a sua temperatura de melting (T_m).

3.8.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica que têm sido extensivamente usada com o intuito de se estudar as variações de parâmetros termodinâmicos de biopolímeros quando são submetidos à variação de temperatura controlada [25], ajudando no estudo de estabilidade e enovelamento protéicos [26] e de outras moléculas, bem como na caracterização de sistemas de micelas, membranas, lipídios e ácidos nucléicos [27-28].

No equipamento de DSC existem duas celas (uma tida como referência e a outra para amostra) que são aquecidas e/ou resfriadas a uma taxa constante de temperatura (dT/dt). O equipamento mede a diferença de temperatura entre as essas celas.[28-29] No nosso caso, uma solução de proteína em tampão 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8 é usada na cela de amostra e apenas tampão na cela de referência .

Durante o ensaio de DSC e na ausência de qualquer evento termodinâmico, as temperaturas de ambas as celas mudam linearmente com o tempo a uma taxa (dT/dt), levando a uma diferença de temperatura entre ambas praticamente nula, o que gera, então, uma linha de base horizontal e reta. No entanto, quando o ensaio se aproxima de uma transição de fase em que ocorre troca de calor na cela de amostra, uma diferença de temperatura detectável entre as celas é estabelecida. O equipamento tenta restabelecer a equidade de temperaturas entre as celas de referência e de amostra fornecendo mais (ou menos) calor à cela de referência [30] e, assim, gera uma deflexão positiva ou negativa da linha de base original, dependendo se o evento decorre de uma transição endotérmica ou exotérmica, respectivamente. Após a transição, a linha de base tende a se restabelecer ou, ainda, uma nova linha de base se estabelece no caso de mudança de capacidade térmica da amostra [31], o que se mostra corriqueiro em transições decorrentes do desenovelamento protéico, onde os calores específicos do estado nativo e desenovelado são distintos - isto pode decorrer da mudança de hidratação das cadeias laterais que não se encontram expostas quando no estado nativo, mas se expõe quando submetidas à desnaturação. O resultado experimental obtido é um gráfico da diferença do fluxo de calor (dQ/dt) em função da temperatura, sendo a que intensidade do sinal e a forma do termograma obtido, é diretamente proporcional à taxa de aquecimento ou resfriamento da amostra (dT/dt).

Sendo os experimentos de DSC realizados a pressão constante, temos termodinamicamente que a quantidade de calor fornecida a um sistema é igual à variação da entalpia do mesmo sistema, logo:

$$C_p = \frac{dQ}{dT} = \frac{\frac{dQ}{dt}}{\frac{dT}{dt}} = \frac{dH}{dT} \qquad \textbf{(5)}$$

Através desta expressão nota-se que o termograma gerado pelo calorímetro fornece, também, a dependência com a temperatura da capacidade calorífica da amostra.

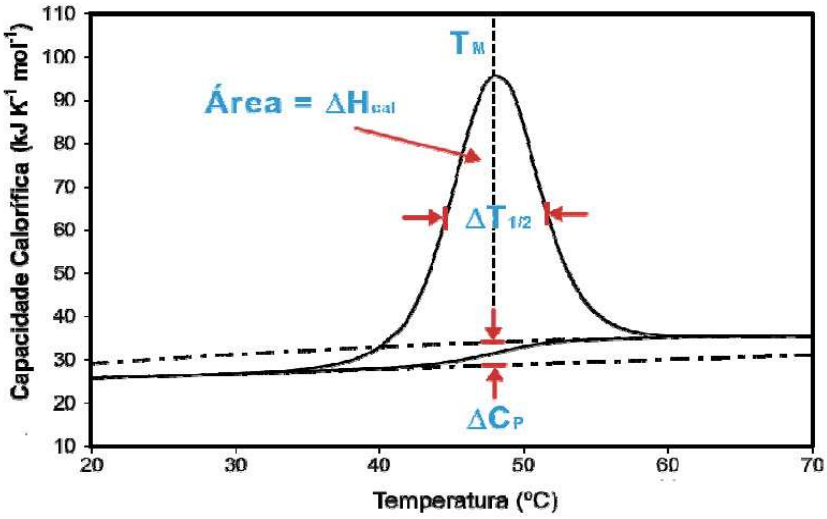


Figura 8 - Endotérmica caracterizando um evento térmico em um biopolímero hipotético. A entalpia calorimétrica é a área sob a curva que mostra a dependência com a temperatura da capacidade calorífica da amostra à pressão constante. O ΔC_p do processo é definido na temperatura de melting (T_m) ou temperatura de transição de fase, onde a capacidade calorífica apresenta um máximo. Figura retirada de referência 31.

Como observado na Figura 8 através de um único experimento de DSC podemos obter alguns parâmetros termodinâmicos importantes para a caracterização molecular biológica tais como:

- a capacidade calorífica obtida diretamente do termograma;
- a entalpia calorimétrica total de um evento termicamente induzido na amostra através da área sob a curva obtida e da equação abaixo;

$$\Delta H_{cal} = \int C_p(T)dT \quad \textbf{(6)}$$

- a temperatura da transição de fase, ou temperatura de melting (T_m), onde a capacidade calorífica atinge o máximo e, no caso de desenovelamento de proteínas, é um indicativo da estabilidade do sistema;

- em transições de primeira ordem, a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) na temperatura de transição é nula, logo têm-se como calcular a mudança de entropia (ΔS_{Tm}) associada com a mesma através de:

$$\Delta S_{(Tm)} = \frac{\Delta H_{cal}}{T_m} \quad \textbf{(7)}$$

- a largura a meia altura da curva de transição ($\Delta T_{1/2}$), que está relacionada com a cooperatividade no processo termotrópico – quanto menor o $\Delta T_{1/2}$ maior a cooperatividade [31];

$$n = \frac{\Delta H_{VH}}{\Delta H_{cal}} \alpha \frac{1}{\Delta T_{1/2}} \quad \textbf{(8)}$$

onde ΔH_{VH} é a entalpia de van't Hoff.

Assim, a técnica calorimétrica de DSC é uma ferramenta muito útil no estudo de transição de fase termotrópica, permitindo o entendimento de mudança entrópica e entálpicas quando biopolímeros são submetidos a procedimentos termicamente induzidos e os efeitos causados por um agente externo quando os mesmos interagem com estes.

3.8.3 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) e Cinética Enzimática

O foco no estudo bioquímico de enzimas, para o entendimento de seu comportamento, é a determinação de sua atividade e função. Para tanto, a caracterização termodinâmica através de calorimetria de titulação isotérmica têm-se mostrado uma ferramenta poderosa e eficiente, tendo como principais aplicações: o estudo de interações covalentes entre cadeias poliméricas; equilíbrios de dissociação de aminoácidos em diferentes estados de protonação; estudos termodinâmicos de detergentes e a formação de micela; interações entre moléculas e ligantes e estudos cinéticos enzimáticos. [32-34]

O método de ITC consiste na adição do titulante, através de uma micropipeta automática, sobre o titulado que se encontra na cela de amostra (Figura 9). Em experimentos típicos de cinética enzimática, a enzima é colocada na cela de amostra e titulada com o substrato. A grande maioria dos calorímetros mede efeitos diferenciais do calor entre a cela de referência (preenchida usualmente com água) e a cela de amostra e trabalham baseados no sistema de compensação de calor. [34] Monitora-se constantemente a diferença de temperatura entre as duas celas e uma energia constante (pré-definida pelo usuário) é aplicada na cela de referência, a qual ativa o circuito de retorno para aplicar uma quantidade de energia variável sobre a cela de amostra a fim de manter uma diferença de temperatura, entre as duas celas, próxima de zero (Figura 9).

Decorrente da reação há uma alteração de temperatura na cela de amostra, o que leva a uma diferença de temperatura entre as duas celas. Tal diferença é detectada pelo calorímetro e a energia aplicada na cela de amostra é ajustada. O sinal observado pelo experimento calorimétrico é a energia fornecida à cela de amostra. [34]

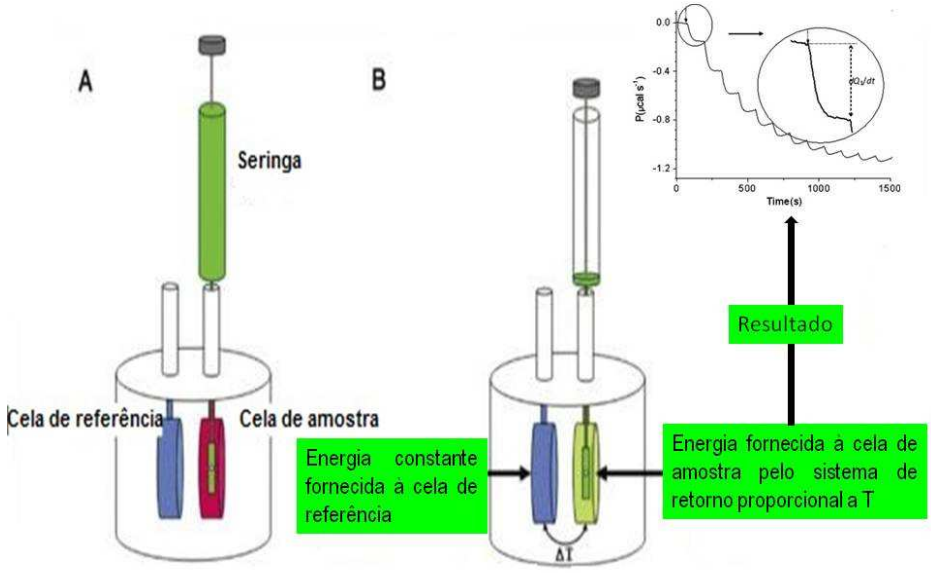


Figura 9 - Esquema representativo de um Calorímetro de Titulação Isotérmica (ITC): (a) Cela de referência e de amostra; (b) Durante o experimento quando se inicia a injeção, ocorre uma variação de temperatura da cela de amostra. A diferença de temperatura entre as celas (ΔT) é compensada pelo equipamento, gerando, assim, o termograma. Figura retirada da referência 35.

Pode-se acompanhar, através do ITC, a velocidade de reação de catálises enzimáticas. Todd e Gomes [34] citam em seu trabalho que a quantidade de energia ou potência térmica (E) produzida pela reação é proporcional ao calor (Q) trocado pelo sistema, seja este exotérmico ou endotérmico.

$$E = \frac{dQ}{dt} \qquad \textbf{(9)}$$

Reações químicas são termodinamicamente favoráveis (ou espontâneas) desde que ocorra uma diminuição da energia livre de Gibbs, que é a soma dos termos relacionados à entropia e a entalpia (ΔG = ΔH - TΔS). [34] O termo entálpico é observado como calor (em condições de pressão constante), e tal quantidade de calor está associada na conversão de moles de substrato em produto por:

$$Q = n\Delta H_{ap} = [P]_{total} V \Delta H_{ap} \qquad \textbf{(10)}$$

sendo, ΔH_{ap} é a entalpia molar aparente, n o número de moléculas , V o volume da solução na cela de amostra e $[P]_{total}$ a concentração molar de produto. Assim, temos a taxa de produto gerado pela reação proporcional à potência térmica:

$$E = \frac{dQ}{dt} = \left(\frac{d[P]}{dt}\right) V\Delta H_{ap} \qquad \textbf{(11)}$$

Trabalhando na Equação 11, onde d[P]/dt é igual a velocidade de formação do produto ou consumo do substrato, temos:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{\left(\frac{dQ}{dt}\right)}{V\Delta H_{ap}} \qquad \textbf{(12)}$$

Experimentos de ITC com sistemas enzimáticos devem ser realizados sob condições de pseudo-primeira ordem com relação a seu substrato, ou seja, a velocidade da reação que ocorre é diretamente proporcional a concentração de substrato que é injetada na cela [36]. Para se determinar a velocidade da Equação 12, necessita-se, então determinar o valor de dQ/dt, ou seja, o fluxo de calor da reação. Tal medida é obtida através de um experimento de múltiplas injeções, no nosso caso, como a diferença da linha de base original e a nova linha de base apresentada pelo sistema após cada injeção de substrato (Figura 10). Após cada injeção de substrato, a linha de base se estabiliza em uma potência menor que a observada antes de cada injeção; isso ocorre devido à geração de calor pela reação enzimática, ocorrendo conseqüentemente a compensação de tal energia pelo instrumento a fim de manter o equilíbrio térmico entre as celas do equipamento. Portanto, após cada injeção a linha de base se estabiliza num nível inferior. [37]

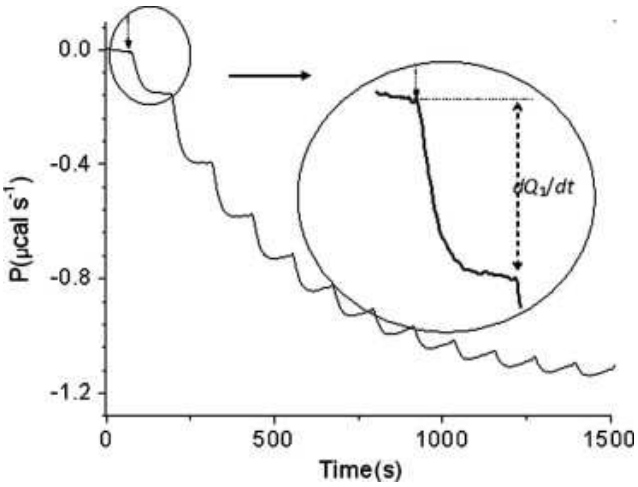


Figura 10 - Curva típica de cinética enzimática no ITC: potência térmica versus tempo. A cada injeção a linha de base se estabiliza num nível inferior (em destaque no círculo) e a quantidade de calor gerado é proporcional à velocidade da reação. Figura retirada da referência 37.

Assim, após inserir os dados no programa VP-ITC, medir os vários valores de dQ_n/dt, proporcionais à velocidade da reação[35] , determinarmos o tipo de rotina para execução(injeção única) e inserirmos a entalpia aparente de reação (determinada através de um experimento de múltiplas injeções), conseguimos, então, transformar os dados adquiridos em dados de cinética enzimática como mostrado na Figura 11, ou seja, obtemos um gráfico de velocidade de reação em função da concentração de substrato.

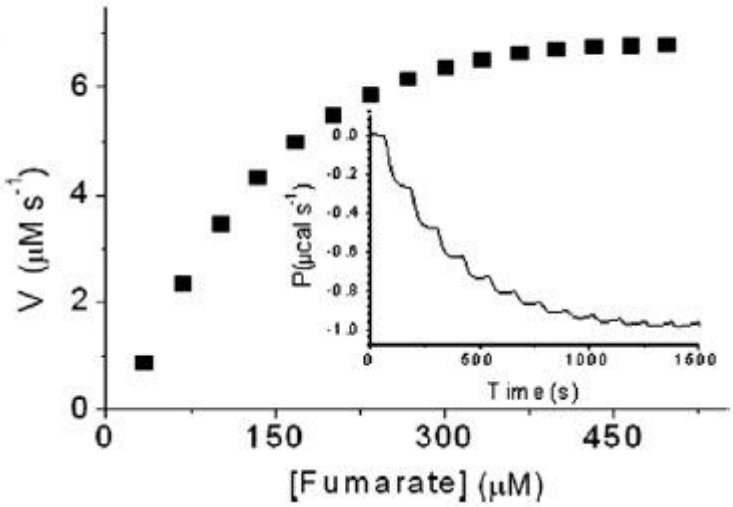


Figura 11 - Gráfico demonstrando os dados de cinética obtidos pelo calorímetro (variação de calor em relação ao tempo) e convertidos em velocidade de reação. Figura retirada da referência 35.

Após este procedimento, pode-se realizar o ajuste desta curva de cinética enzimática a um modelo adequado, sendo o mais comumente utilizado aquele determinado pela equação de Michaelis-Menten. Quando ajustamos as curvas de cinética enzimática realizada através de múltiplas injeções com a equação de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \qquad \textbf{(13)}$$

onde os parâmetros da cinética enzimática são K_M - que é a concentração para a qual a velocidade da reação enzimática é metade de $V_{máx}$ e $V_{máx}$ - a máxima velocidade da reação. [32-34, 38-39]. Já o k_{cat} - número de moléculas de substrato convertidas a produto numa determinada unidade de tempo por uma única molécula de enzima saturada pelo substrato, outra constante que caracteriza a cinética enzimática, pode ser obtida através de:

$$k_{cat} = \frac{V_{máx}}{[E_{total}]} \qquad \textbf{(14)}$$

Os parâmetros cinéticos podem ser também obtidos através de um experimento de injeção única [39] (Figura 12), onde substrato é adicionado na cela de amostra, iniciando a reação exotérmica. A linha de base do sistema decresce até um nível que corresponde à velocidade máxima de reação, ponto onde a enzima se encontra saturada por ter 1.000 vezes mais substrato na cela do que sua concentração, com a finalidade de se assegurar a condição de estado estacionário. Tal reação termina quando a linha de base volta ao seu estágio inicial.

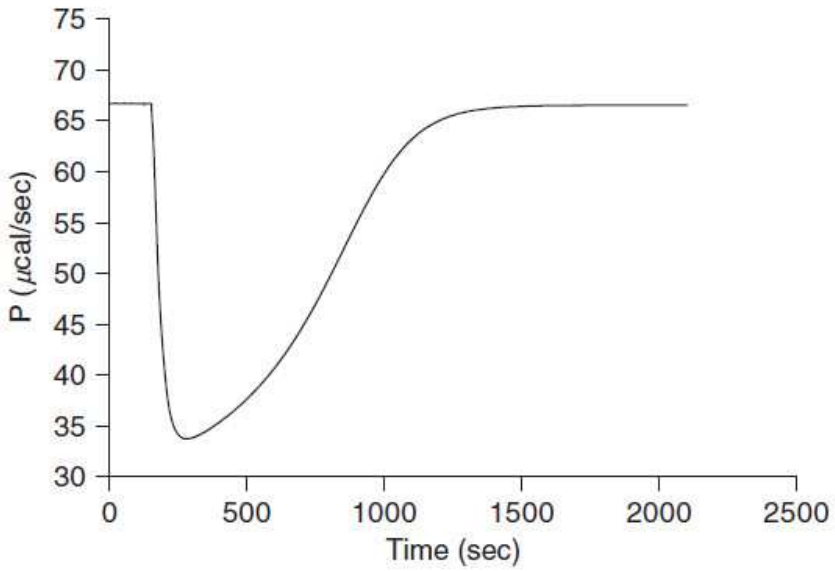


Figura 12 - Simulação de um experimento de ITC de injeção única. Esta simulação tem como parâmetros: k_{cat} = 80s-1, K_M = 0,075 M, ΔH_{ap} = -50 kCal/mol e $[E]_t$= 4,5 mM. Figura retirada da referência 40.

Analogamente ao método de múltiplas injeções, os dados obtidos devem ser transformados em dados de cinética enzimática, onde podemos ajustar a curva com a Equação 13 e obter os parâmetros de cinética enzimática já citados anteriormente. Para tanto, coloca-se os dados no programa VP-ITC do calorímetro, determinamos o tipo de rotina para execução – neste caso injeção única e apenas com substrato; e inserimos a entalpia aparente de reação (determinada através de um experimento de injeção única). Desta forma, transformamos os dados adquiridos em dados de cinética enzimática, ou seja, obtemos um gráfico de velocidade de reação em função da concentração de substrato. No próprio programa ajusta-se a curva de cinética obtida com a Equação 13 e chega-se aos parâmetros cinéticos da reação. [40- 41]

A vantagem do uso do método de múltiplas injeções em relação ao de injeção única é a baixa quantidade de produto formado durante o experimento. Desta maneira, se a enzima estudada sofre algum tipo de inibição pelo produto da reação, que é o nosso caso, quando se realiza o método de múltiplas injeções o mesmo não causa influências significativas na reação enzimática.

3.8.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A espectroscopia de RPE, assim como todas as utilizadas no presente trabalho, monitora, a absorção de energia de um campo de radiação quando uma molécula muda seu estado de energia. [42-43] Porém, no caso desta técnica espectroscópica, há a necessidade de se ter uma sonda paramagnética, possuidora de elétrons desemparelhados cujos momentos magnéticos possam interagir com o campo magnético aplicado pelo equipamento. [43]

No presente trabalho, lidamos com sistemas biológicos que em sua maioria são diamagnéticos, ou seja, possuidores de momento magnético total nulo, assim, não produzindo sinal de RPE. Para podermos estudá-los, então, inserimos em tais sistemas uma sonda paramagnética extrínseca como marcadores ou sondas de spin [31]. Neste trabalho, utilizamos como marcador de spin um radical nitróxido sensível à mudanças de fatores do ambiente que o cerca como: polaridade, viscosidade, acidez, estrutura e ordem do meio, além de depender de possíveis restrições de movimento [31].

Como o interesse do nosso trabalho é investigar a interação da proteína com modelos micelares, utilizamos, então, o radical nitróxido ligado a lisofosfolipídios e seus derivados (Figura 13A), objetivando monitorar a estrutura e a dinâmica do ambiente lipídico ao redor do marcador. (Figura 13B).

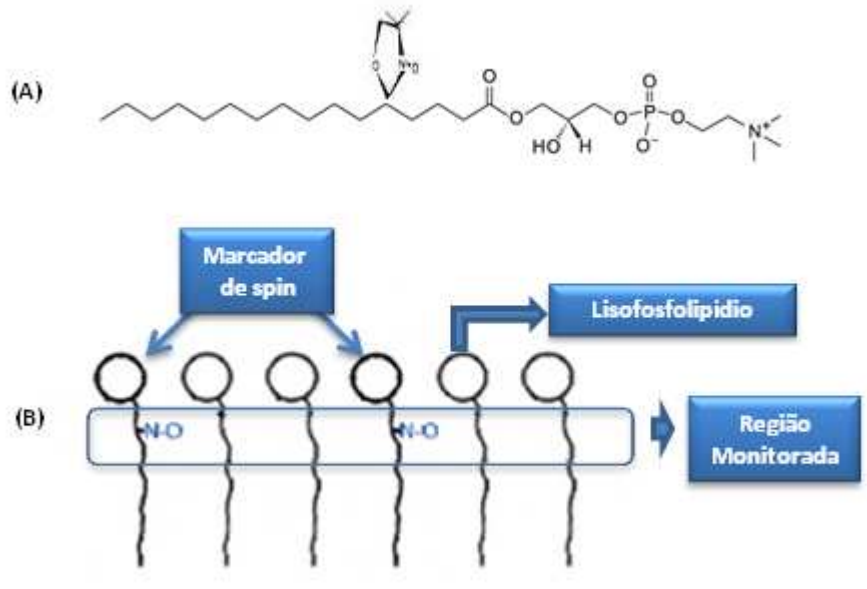


Figura 13 - (A) Estrutura do marcador de spin 5-SASL. O grupamento nitróxido se localiza no carbono 5 da cadeia lisolipídica, monitorando, assim, a região próxima a cabeça polar.(B) Ilustração dos marcadores de spin 5-SASL intercalados com lisofosfolipídios em micelas. A linha azul indica a região monitorada pela sonda de spin.

O radical nitróxido inserido nas micelas é nosso repórter para as mudanças que podem ocorrer neste ambiente. Todos os experimentos de interação da Pp 1,2-CCD com micelas são comparados a experimentos controles em que estão presentes apenas micelas com o marcador de spin. Na Figura 14 é mostrado um exemplo: quando se insere um agente externo às micelas, estas se rearranjam, gerando uma mudança conformacional do ambiente circunvizinho. As sondas inseridas nas micelas sentem a mudança e respondem à excitação pela radiação de maneira distinta das sondas que se encontram em uma amostra sem o agente externo. Assim, temos perfis de espectros de RPE distintos e essas modificações nos mostram as sondas em um ambiente mais livre (quando da obtenção de um sinal em que os três picos possuem intensidades próximas e pequenas larguras de linha) ou em um ambiente mais rígido (quando da obtenção de um sinal em que os três picos possuem intensidades distintas e larguras de linhas maiores).

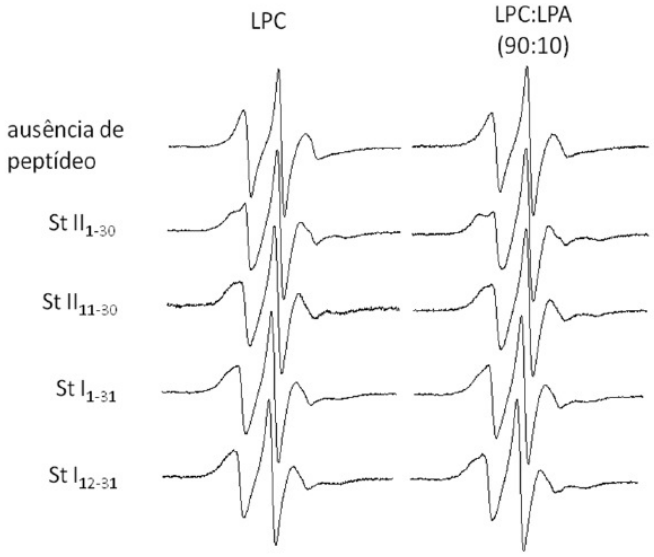


Figura 14 - Espectros de RPE do marcador 5-SASL incorporado em micelas de LPC na ausência e na presença de StII1-30, StII11-30, StI1-31 e StI12-31, em pH7. Figura retirada da referência 44.

Logo, mudanças no perfil dos espectros de RPE relatam mudanças na conformação das micelas e consequentemente interação do agente externo inserido nas amostras micelares.[44]

Capítulo 4

Resultados e Discussões

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Estudo estrutural e funcional da Pp 1,2-CCD

Com a finalidade de conhecermos melhor o sistema com o qual trabalhamos realizamos uma breve caracterização estrutural e funcional da enzima Pp 1,2-CCD. Assim, após cada processo de expressão e purificação descrito na secção 3.2.1 foi verificado o grau de pureza da enzima com a qual trabalhamos através de um gel de eletroforese SDS-PAGE 15% que pode ser visualizado na Figura 15. Através deste mostramos que a enzima em questão é solúvel e possui em torno de 30 kDa quando na sua forma monomérica, como previsto por ARAÚJO et al. [20]

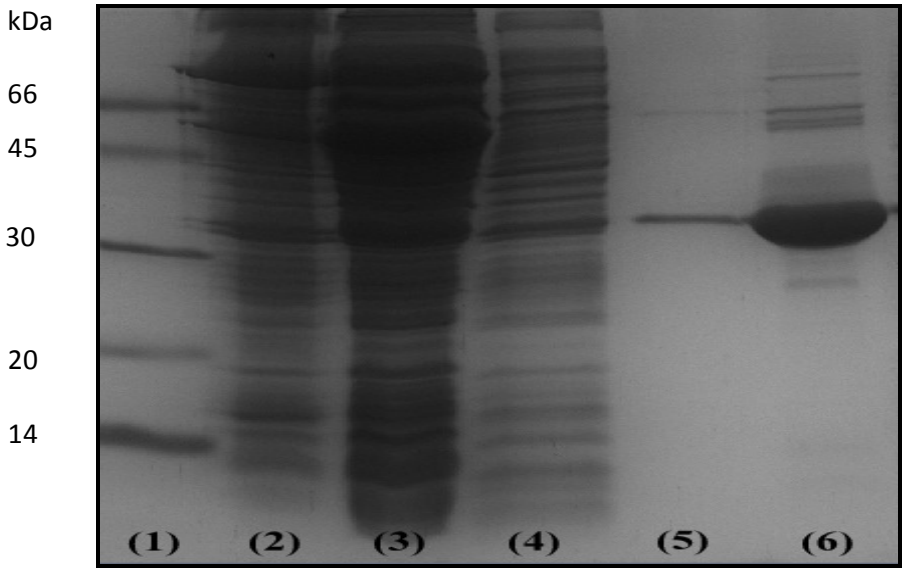


Figura 15 - Análise de purificação da enzima Pp 1,2-CCD por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS Page 15%: (1) padrão GE de massas moleculares; (2) pellet após sonicação e centrifugação, (3) extrato bruto – parte solúvel –antes de passar pela resina de purificação por afinidade, (4) extrato bruto – parte solúvel - após passar pela resina de afinidade, (5) eluição imediata com tampão de clivagem e DTT e (6) eluição após descanso de 16 horas concentrada em concentradores Millipore de 10 kDa.

Como podemos visualizar no gel de eletroforese acima, a proteína é eluída juntamente com alguns contaminantes, os quais possuem uma porção muito pequena quando comparada à

quantidade de proteína Pp 1,2-CCD. Inúmeras tentativas de separar tais contaminantes da enzima foram realizadas por BONALUMI [7], no entanto, apenas uma delas se mostrou efetiva para esse fim: a utilização de detergente Triton X-100. O inconveniente do uso deste componente é o fato deste ser eluído juntamente com a proteína, logo, como interessa-nos realizar experimentos com a enzima em sua forma apo (sem ligantes), descartamos tal adição ao protocolo de purificação e continuamos a trabalhar com Pp 1,2-CCD com grau de pureza mostrado pelo gel acima.

Continuando a nossa caracterização, utilizamos de medida de Dicroísmo Circular (CD) para analisarmos o conteúdo de estrutura secundária da proteína. Os dados de intensidade de atividade óptica em miligraus foram transformados para elipticidade molar como descrito na referência 45. O espectro de CD da enzima Pp 1,2-CCD na região do UV distante está mostrado na Figura 16 e apresenta dois mínimos em torno de 208 e 220 nm característicos de estruturas em hélice α. No entanto, a não definição pronunciada desses mínimos, assim como a aparente equivalência nas intensidades da banda em torno de 208 nm e daquela em torno de cerca de 195 nm indica que deva haver uma mistura de estruturas secundárias em hélice α e folhas β.

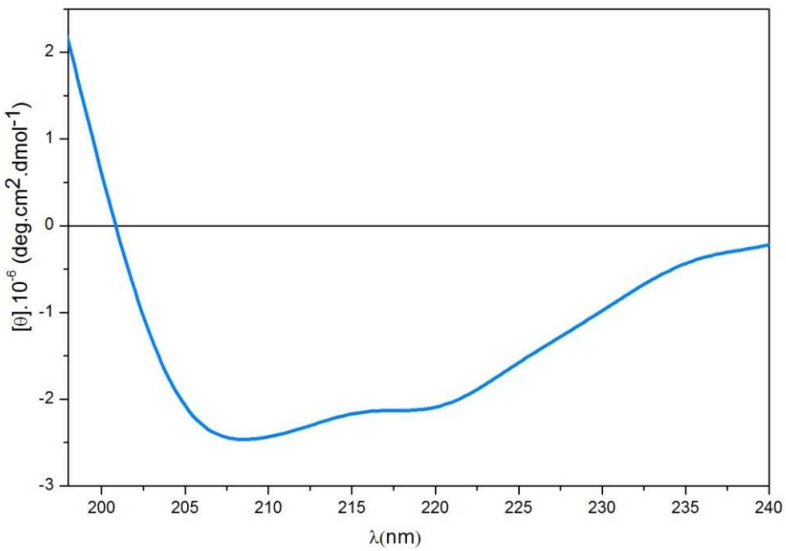


Figura 16 - Espectro de dicroísmo circular na região do UV distante da Pp 1,2-CCD em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8.

Tendo informações acerca da quantidade, pureza e enovelamento da enzima Pp 1,2-CCD expressa e purificada, procuramos, então, analisar a sua atividade enzimática. O ensaio de atividade enzimática foi realizado como descrito na seção 3.5 utilizando como substrato moléculas de catecol e medindo-se a formação do produto da reação que absorve luz em 260 nm. A atividade específica da enzima, calculada a partir de resultados análogos aos da Figura 17, apresentou valores em torno de 1,1 U/mg, compatíveis com aqueles relatados previamente na literatura. [1]

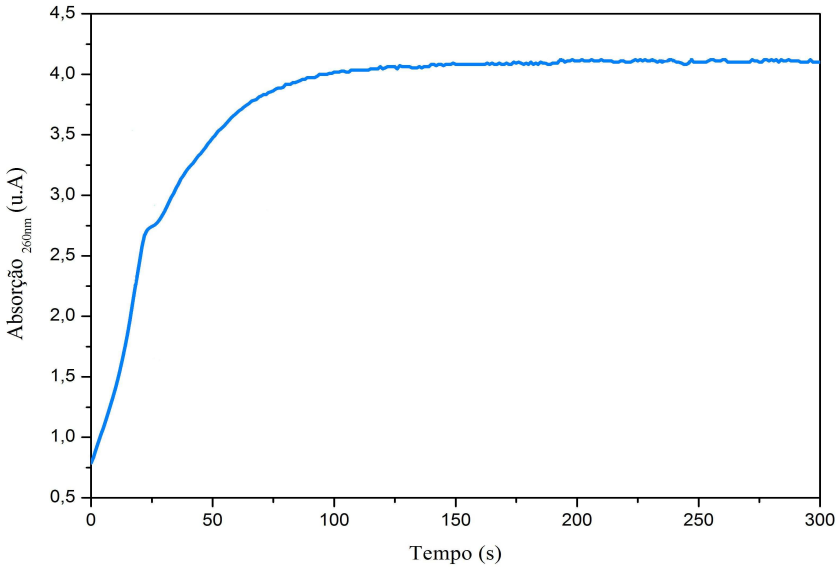


Figura 17 - Ensaio de atividade enzimática como descrito na secção 3.5 para verificação da atividade da Pp 1,2-CCD através do aumento da absorção de luz em 260 nm devido à formação do produto da reação.

Dando sequência a nossos estudos estruturais, realizamos ensaios de desnaturação térmica da enzima no equipamento de CD. O resultado de um desses ensaios está mostrado na Figura 18. Podemos observar que na faixa de temperatura de 10°C a 90°C (283,15 K a 363,15 K) não ocorre um completo desenovelamento dos elementos de estrutura secundária da proteína, o que aponta para um alto grau de estabilidade estrutural nas condições do experimento, mas provavelmente com perda da atividade catalítica.

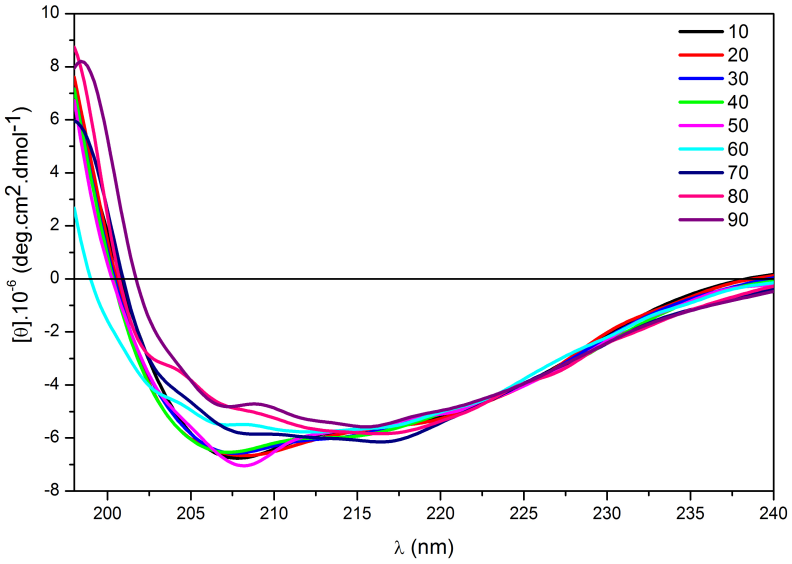


Figura 18 - Espectros de CD referentes ao desenovelamento térmico da enzima Pp 1,2-CCD num intervalo de 10°C a 90°C (283,15 K a 363,15 K).

Um segundo método muito útil para se estudar o desenovelamento térmico de uma proteína é a calorimetria exploratória diferencial. O equipamento de DSC, descrito anteriormente na seção 3.8.3, mede dados relacionados às trocas de calor que ocorrem durante o processo de desenovelamento estrutural de uma proteína em função da temperatura. Através da medida da resposta da diferença de calor entre a cela de referência (preenchida com tampão) e a cela de amostra (preenchida com proteína) [30], o equipamento nos gera um termograma que, após a subtração da linha de base (ensaio nas mesmas condições, contendo tampão nas duas celas do calorímetro) e normalização pela concentração de enzima na cela de amostra, nos propicia as constantes desejadas: T_m, ΔT_m, ΔH e $\Delta S_{(Tm)}$. [46] Estas constantes nos caracterizam termodinamicamente o desenovelamento térmico da enzima estudada.

Analogamente a MELO [47], realizamos a desnaturação térmica da Pp 1,2-CCD, porém numa escala de temperatura de 30 a 70°C (303,15 K a 343,15 K), uma vez que os resultados do artigo mencionado mostram uma transição próxima de 54°C (327,2 K). Realizando o procedimento mencionado na seção 3.7, o processo de desenovelamento térmico da Pp 1,2-CCD mostrou apenas um pico de transição em (52,9±0,3)°C (Figura 19). Além disso, foi realizado o experimento da volta do desenovelamento nas mesmas condições dos anteriores e não foi obtido um termograma de enovelamento térmico, logo indicando que este processo é irreversível[31]. Através do tratamento de uma triplicata de termogramas como aquele

apresentado na Figura 19, obtivemos as constantes citadas anteriormente e cujos valores estão apresentados na Tabela 1. Desses valores, podemos inferir que: levando-se em conta que "o grau de cooperatividade da desnaturação é inversamente proporcional à largura à meia altura na curva de desnaturação de uma molécula" [48] e que processos físico-químicos muito cooperativos completam-se em uma faixa estreita de temperatura,[46] o processo de desnaturação térmica da proteína possui um grau de cooperatividade alto com o valor de $\Delta T_{1/2}$ de 5,4 K, assim como os resultados obtidos por SANTOS[46]. Além disso, esta proteína aparenta possuir uma boa estabilidade térmica, ou seja, é necessário muita energia térmica para sua desnaturação, o que pode ser visualizado através do termo entálpico (ΔH_{cal}) mostrado na Tabela 2. Outra constante que pode ser retirada deste tipo de termograma é a variação da entropia calorimétrica determinada no T_m ($\Delta S_{(Tm)}$), importante parâmetro termodinâmico, uma vez que seu valor relaciona-se com compensações entálpico-entrópicas e com diminuição de efeito hidrofóbico com aumento da temperatura. Para calcular o $\Delta S_{(Tm)}$ utilizamos a Equação 7. [49]

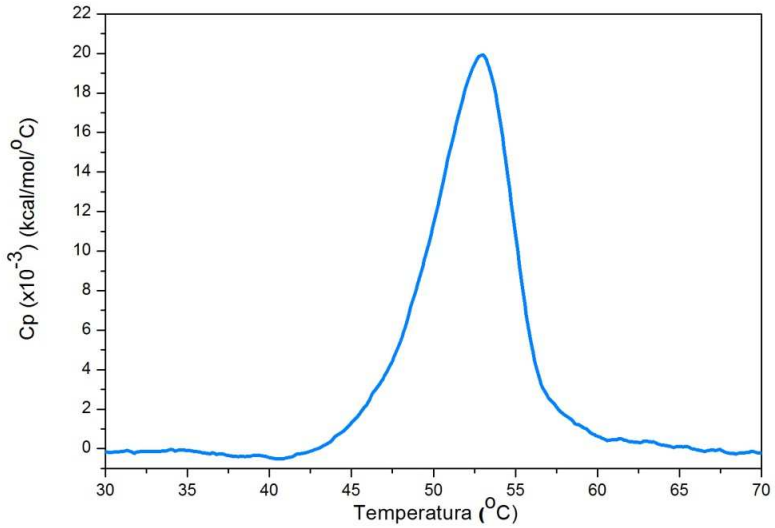


Figura 19 - Termograma de DSC para o desenovelamento da enzima Pp 1,2-CCD, em 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl.

Tabela 1 - Parâmetros termodinâmicos do desenovelamento da Pp 1,2-CCD obtidos a partir de experimento de DSC.

Amostra	T_m (K)	$\Delta T_{1/2}$ (K)	ΔH_{cal} (kcal/mol)	$\Delta S_{(Tm)}$ (kcal.mol^{-}1°K)
Sem delipidar	(326,2±0,2)	(5,4± 0,2)	(123,1± 0,2)	(0,377±0,001)

De posse das informações sobre estrutura secundária e estabilidade térmica, passamos, então, ao estudo da atividade enzimática da Pp 1,2-CCD. Com o intuito de se obter o máximo de resultados confiáveis, foram utilizadas duas técnicas para o presente estudo cinético – espectrofotometria e Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC). Primeiramente, foram realizados dois ensaios em espectrofotômetro como descrito na secção 3.5, utilizando amostras com grau de pureza próximos (Figura 15), com a finalidade de se obter uma duplicata dos mesmos. Os resultado estão mostrado na Figura 20 e na Tabela 2, onde podemos verificar que a enzima estudada possui uma afinidade com seu substrato, expressa pelo valor de K_m, de (4,74±0,02) µM e uma velocidade máxima de cerca de (0,024±0,001) µM.s^{-1}, além de um k_{cat} de (48±3) µs^{-1} para transformação do catecol a ácido cis,cis-mucônico.

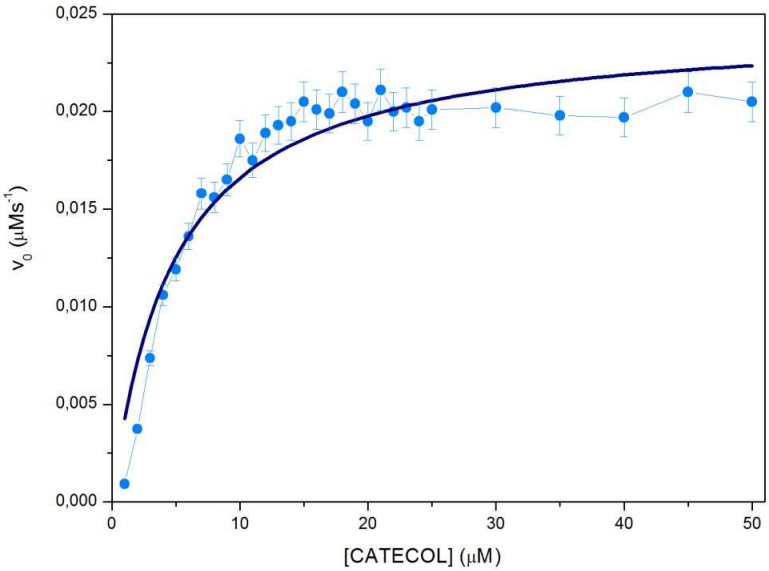


Figura 20 - Cinética da enzima Pp 1,2-CCD com seu substrato catecol realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl em pH 8, através da titulação de 13 µL de uma solução de proteína a 19 µM, em soluções de catecol num intervalo de concentração de 1 a 50 µM em cubetas de quartzo de 1 mL. A curva sólida representa o ajuste dos dados experimentais com a Equação 13.

Os dados de cinética obtidos em espectrofotômetro foram ao encontro dos dados obtidos por BRODERICK & O'HALLORAN, em seu estudo de produção e caracterização funcional da enzima clorocatecol dioxygenase. [1] Através da presente curva, mostrada na Figura 20, gerada pelo tratamento dos dados obtidos pelo espectrofotômetro, chegamos à conclusão de que a enzima realiza sua função catalítica com grande eficiência na faixa de concentração de substrato estudada e que parece seguir uma cinética tradicional de Michaelis-Menten.

Tabela 2 - Dados cinéticos obtidos através do ajuste da curva de cinética enzimática da Figura 20 por uma hipérbole representativa de uma curva de Michaelis-Menten, no programa ORIGIN 8.

Amostra	Sem delipidar
$v_{máx}$ (μM.s $^{-1}$)	(0,024± 0,001)
K_M (μM)	(4,74± 0,02)
k_{cat} (μs^{-1})	(48± 3)

Continuando o estudo de atividade enzimática e tentando investigar mais a fundo o mecanismo cinético de catálise da Pp 1,2-CCD, passamos, então, a realizar os experimentos no calorímetro de titulação isotérmica (ITC). Primeiramente, realizamos uma duplicata de ensaios de injeção única do substrato utilizado para o estudo, o catecol, no tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8, e outra duplicata de ensaios de injeção única do substrato catecol em uma solução contendo 100 nM da enzima estudada, como descrito na seção 3.6.1. Os dados obtidos seguem na Figura 21. Através da integração das curvas obtidas para a reação enzimática e subtraindo das mesmas o calor de diluição do substrato utilizado, obtivemos a entalpia de reação da enzima Pp 1,2-CCD, que foi de –(90±4) kcal/mol.

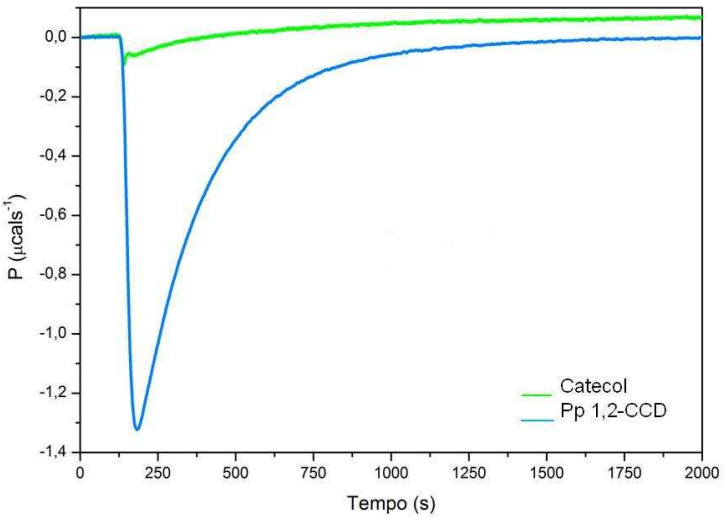


Figura 21 - Determinação da entalpia aparente da reação de conversão de catecol em ácido cis,cis-mucônico pela enzima Pp 1,2-CCD, em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl em pH 8, através de injeção única de 7,5 µL de substrato (572 µM) em 100 nM de proteína inserida na cela (azul) e do calor de diluição do catecol no mesmo tampão (verde).

Após determinarmos a entalpia da reação necessária para realizar o tratamento dos dados de cinética enzimática no programa que acompanha o calorímetro de titulação exotérmica (ITC), partimos então para a realização dos ensaios de cinética enzimática pelo método de múltiplas injeções. Primeiramente, foi realizado um ensaio, descrito na seção 3.6.2, para verificação da existência de possíveis inibições da reação. Neste ensaio, mostrado na Figura 22B, podemos visualizar que a partir da injeção de número 23 ocorre uma queda na velocidade de reação enzimática, o que é um indício de inibição. Ao contrário do que foi observado na medida da cinética utilizando uma técnica espectrofotométrica, os dados experimentais obtidos por ITC claramente não seguem uma cinética tradicional de Michaelis-Menten. Este é um resultado não reportado anteriormente para a enzima Pp 1,2-CCD frente ao substrato catecol. BRODERICK & O'HALLORAN [1] reportaram dados espectrofotométricos para a cinética da Pp 1,2-CCD frente a diversos substratos, mas não detectaram qualquer mecanismos inibitório para o catecol especificamente. Isto mostra que o uso de diferentes métodos experimentais é interessante, pois pode prover informações que caracterizam de forma mais detalhada o mecanismo catalítico de interesse.

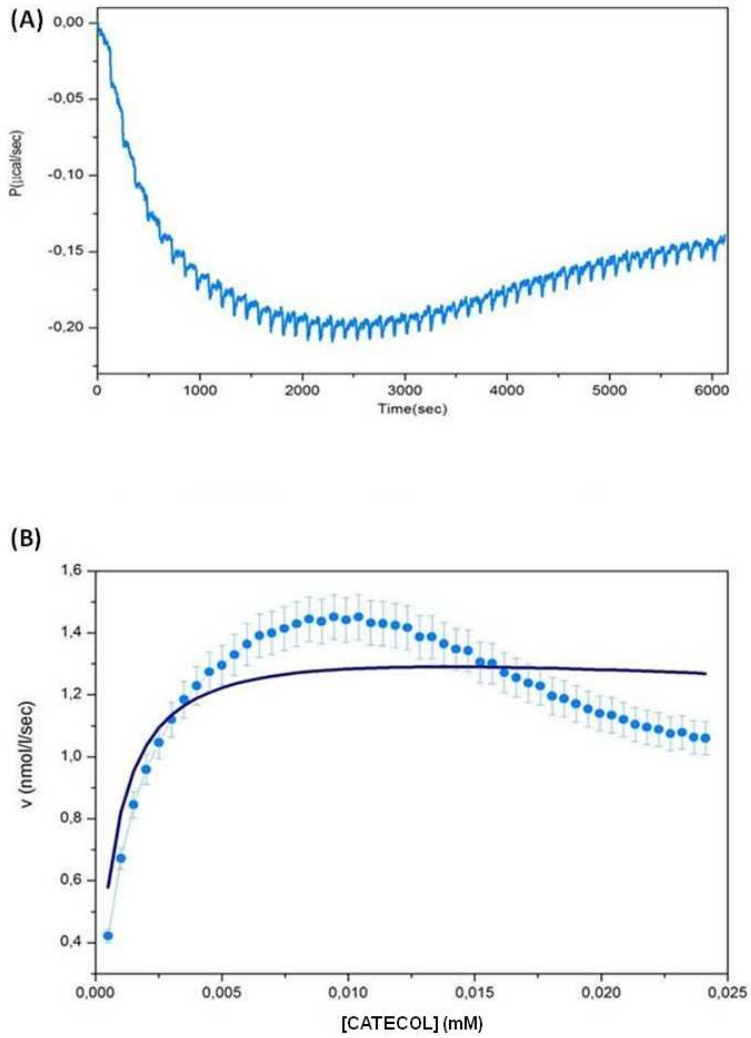


Figura 22 - (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima Pp 1,2-CCD. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten (curva sólida), sendo a cinética realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl em pH 8, através de injeções múltiplas (48 injeções) de 1,25 µL de substrato (572 µM) em 100 pM de proteína inserida na cela.

Como mencionado anteriormente, no ensaio cinético através do uso de espectrofotômetro, nenhuma diminuição na velocidade inicial da reação enzimática foi observada, ou seja, nenhuma inibição relacionada ao aumento de concentração de substrato na cubeta de amostra foi detectada numa faixa de concentração de substrato de 0,5 a 50 µM, o que pode indicar que a inibição vista no resultado de ITC estaria relacionada a outro mecanismo inibitório, provavelmente pelo produto da reação, assim como reportado anteriormente na literatura.[34,37,50-51] Embora tenhamos dados que nos levem a concluir que a inibição aparentemente se deva ao produto da reação, a inibição pelo substrato não pode ser totalmente descartada. O mecanismo de inibição por alguns substratos da reação que a Pp 1,2-

CCD catalisa, já foi observado por BRODERICK & O'HALLORAN, quando estes são apresentados em altas concentrações.[1] Neste trabalho, os autores ajustaram os dados cinéticos da Pp 1,2-CCD frente aos substratos 3-clorocatecol, 4-clorocatecol, 4- bromocatecol, 4-fluorocatecol, 3-metoxicatecol, 4- metilcatecol e 3-metilcatecol com uma expressão derivada a partir de um mecanismo cinético que prevê a inibição pelo substrato. No caso da Pp 1,2-CCD, uma explicação para um mecanismo desse tipo estaria na maior "promiscuidade" frente a substrato apresentada por enzimas da família das clorocatecóis dioxigenases. Para membros desta família, o sítio ativo maior (necessário para que se acomode o íon cloro do substrato natural clorocatecol) acaba sendo capaz de acomodar também outros substrato derivados do catecol. Nestes casos, pode ocorrer que a ligação do substrato derivado de catecol ou o próprio catecol se liguem de forma incorreta ao sítio, inviabilizando sua clivagem e acabando por inibir a enzima pela ocupação ineficiente do seu sítio ativo. Para dirimirmos qualquer dúvida em relação a isso, seria necessário realizarmos experimentos cinéticos por ITC utilizando o substrato clorocatecol, para o qual não esperaríamos detectar redução na velocidade de reação semelhante àquela mostrada na Figura 22B. Isto foi tentado, mas por diversos problemas de solubilidade da molécula de clorocatecol, resultados confiáveis não foram obtidos.

Após verificarmos a possível existência de inibição no ensaio cinético, realizamos, então, um novo ensaio como descrito na seção 3.6.2, mas desta vez com apenas 20 injeções de maneira a não se atingir a região de redução da velocidade de reação. Com isso, podemos calcular os parâmetros cinéticos quando ajustamos a curva de cinética enzimática, mostrada na Figura 23, à equação de Michaelis-Menten (Equação 13). Através deste ajuste, utilizando uma triplicata de dados, pudemos obter os parâmetros de cinética enzimática deste ensaio, os quais seguem na Tabela 3 e que se ajustam à uma curva hiperbólica do tipo Michaelis-Menten, porém possui valores um pouco distintos dos obtidos por espectrofotometria, o que atribuímos , aqui, à concentração de enzima necessária para a realização de cada ensaio, o que pode levar à uma mudança no perfil cinético da enzima.

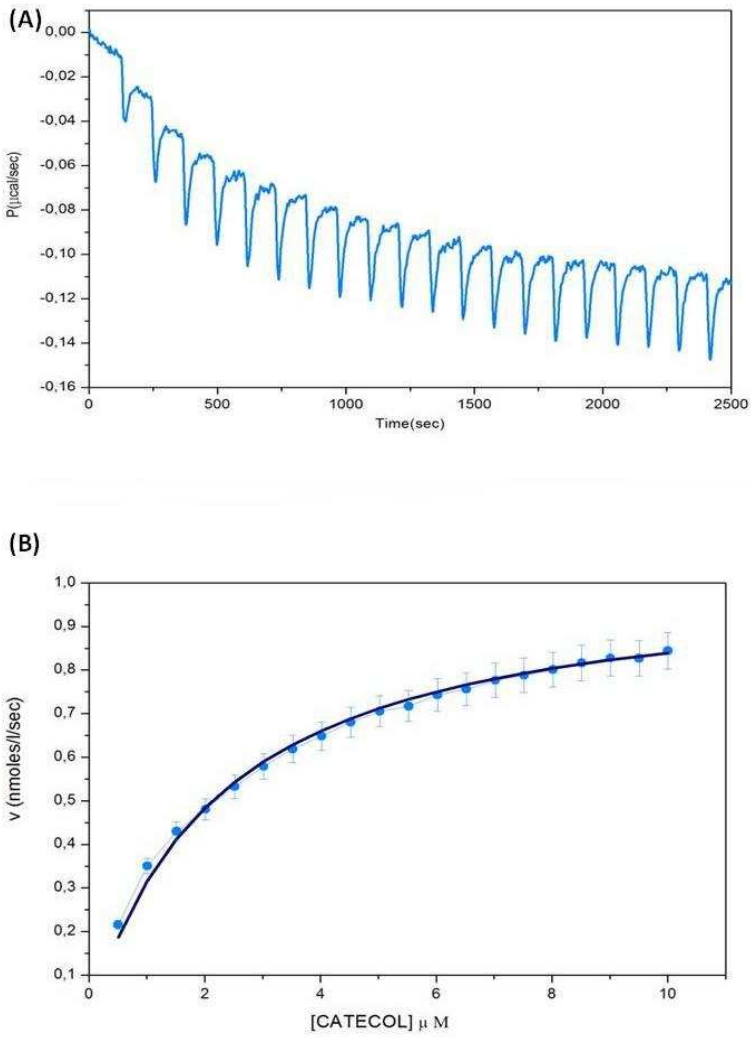


Figura 23 - (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético por ITC da enzima Pp 1,2-CCD. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten, sendo a cinética realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl em pH8, através de injeções múltiplas (20 injeções) de 1,25 µL de um substrato (572 µM) em 100 pM de proteína inserida na cela.

Tabela 3 - Dados cinéticos obtidos através do ajuste da curva de cinética enzimática da Figura 23 por uma hipérbole representativa de uma cinética de Michaelis-Menten.

Amostra	Sem delipidar
$v_{máx}$ (µM.s^{-1})	(0,0010± 0,0001)
K_M (µM)	(2,4± 0,3)
k_{cat} (µs^{-1})	(10,1± 0,2)

Dando continuidade ao estudo do mecanismo funcional da Pp 1,2-CCD, tentamos investigar de alguma forma se a inibição que a enzima sofre, encontrada através de ensaio em calorímetro pelo nosso trabalho e também mostrado a ocorrência por MELO [47], estaria realmente ligado à inibição por produto como levantamos a possibilidade anteriormente. Para tanto, além de compararmos a cinética realizada em espectrofotômetro, onde visualizamos a não interferência da concentração de substrato na velocidade inicial da reação, com aquela realizada em calorímetro, fizemos uso de um experimento complementar citado por TODD & GOMES [34] para verificar se a formação de produto dentro da cela de amostra do calorímetro interfere na reação enzimática. Em tal experimento, realizamos três injeções de 3 μM de substrato como descrito na seção 3.6.3 e o resultado está apresentado na Figura 24. A idéia aqui é acompanhar a completa conversão de uma quantidade de substrato que estará em concentração muito maior do que a de enzima na cela. Ao final deste primeiro passo, haverá produto da reação em excesso presente na cela. Assim, após uma segunda injeção, observamos se ocorre ou não alguma mudança na cinética reacional, o que indicará se o produto influencia ou não a reação.

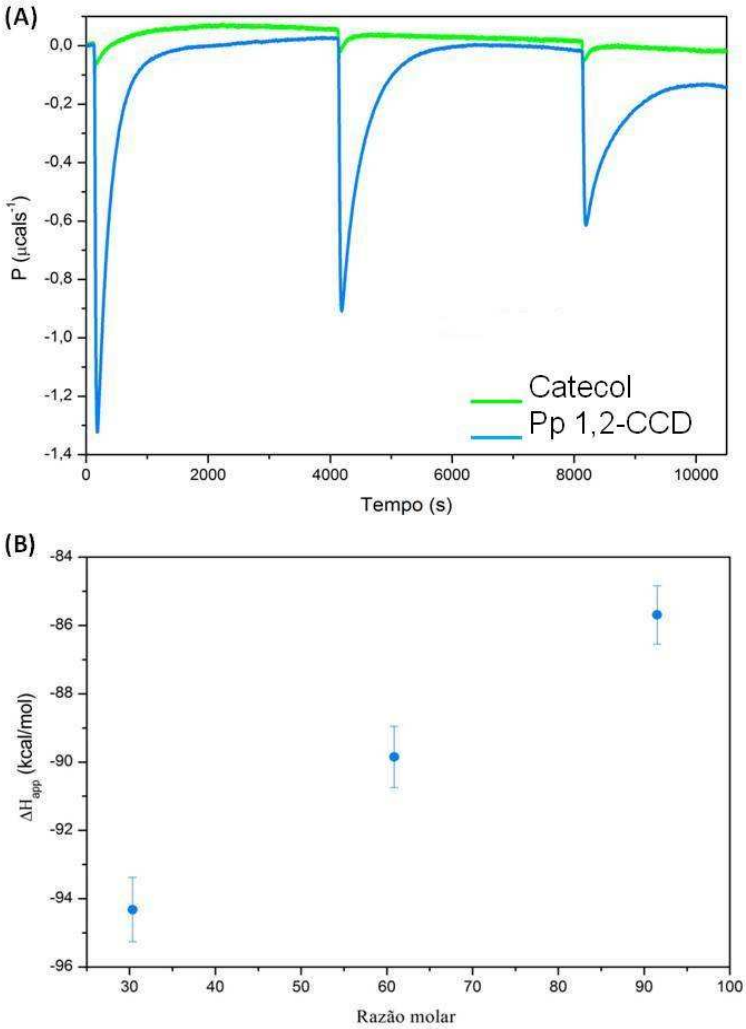


Figura 24 - Conversão completa do catecol em ácido cis,cis-mucônico, onde temos: (A) o calor produzido por três injeções de 7,5 µL de uma solução a 572 µM de catecol na cela de amostra contendo 100 nm de enzima e (B) a área integrada sob cada pico. Os valores encontrados são o calor de conversão total do catecol em produto, ou seja, ΔH_{ap}.

Através do experimento mostrado na Figura 24, podemos visualizar duas alterações significativas: um aumento do tempo necessário para que a reação retorne à linha de base, indicando-nos a completa degradação do catecol e uma diminuição gradativa, após a segunda e terceira injeções, da entalpia aparente da reação, assim como ocorrera no estudo realizado por MELO [47]. Este tipo de comportamento é relatado na literatura e enfatizado por TODD & GOMES [34] como comportamento descrito por enzimas que possuem a atividade modulada pelo produto de sua reação, ou seja, o produto da reação enzimática inibe a atividade da enzima quando gerado em quantidades relevantes.

Com base nos resultados expostos acima, podemos inferir que a hipótese mais provável é a de que a inibição da reação enzimática ocorra através do produto da reação. No entanto, a inibição pelo substrato catecol não pode ser totalmente descartada por motivos apresentados anteriormente. A detecção da existência de mecanismos naturais de inibição da enzima e sua caracterização são relevantes quando se almeja o uso tecnológico da Pp 1,2-CCD. Nossos dados reportam tal caracterização e sua extensão a outros substratos pode abrir novas possibilidades para mecanismos de controle da atividade biológica da enzima.

4.2 Estudo estrutural e funcional da Pp 1,2-CCD quando submetida a processos de delipidação

Dando continuidade ao nosso trabalho, estudamos a influência de processos de delipidação da proteína clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida* na sua atividade catalítica e estabilidade conformacional.

Em um trabalho recente realizado por BONALUMI [7] – dados ainda não publicados – determinou-se a estrutura cristalográfica da enzima com que estamos trabalhando e indicou a presença de um sítio hidrofóbico nesta estrutura, também encontrado na estrutura de enzimas da mesma família da Pp 1,2-CCD. [13-17] Neste sítio foi detectada uma densidade eletrônica compatível com a estrutura de um ácido graxo e não à de um fosfolipídio como relatado na literatura [13-16]. Além disso, trabalhos realizados anteriormente em nosso grupo de pesquisa mostraram que a possível delipidação da proteína, acarretaria uma perda da atividade específica, bem como levaria a uma menor afinidade da enzima pelo seu substrato [19].

Para a realização de nosso estudo, a enzima foi, então, purificada segundo protocolo de ARAÚJO *et al* [20] e delipidada como descrito nas seções 3.2.3.1 a 3.2.3.4. O resultado da execução deste protocolo pode ser visualizado no gel de eletroforese SDS-PAGE 15% abaixo (Figura 25). Através deste gel, podemos verificar que ao utilizarmos a resina CALBIOSORB, que é uma resina de interação hidrofóbica, algumas impurezas são retiradas da solução

contendo a proteína, tornando-a mais pura e, possivelmente, delipidada, o que podemos visualizar na coluna 7 da Figura 25. O processo em que utilizamos POLIDOCANOL e a mesma resina também se mostrou eficiente na retirada de tais impurezas da amostra de proteína, o que podemos visualizar na coluna 9 da Figura 25. O processo com solvente orgânico não consta no gel, pois este protocolo tornou-se inviável para realização, como explicaremos adiante.

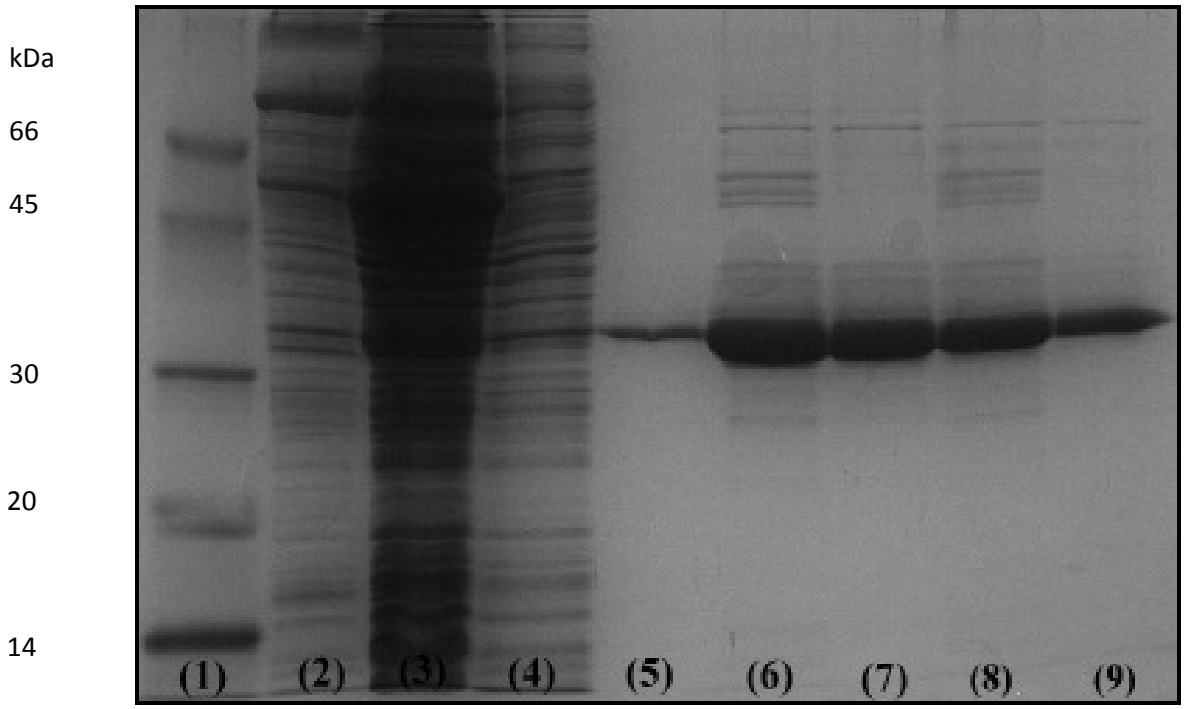


Figura 25 - Resultados da expressão, purificação e delipidação visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS - Page 15%: (1) padrão GE de massas moleculares; (2) pellet após sonicação e centrifigação; (3) extrato bruto – parte solúvel - antes de passar pela resina de afinidade, (4) extrato bruto – parte solúvel – após passar pela resina de afinidade; (5) eluição imediata com tampão de clivagem e DTT e (6) eluição após descanso de 16 horas concentrada em concentradores Millipore de 10 kDa, sem delipidar; (7) Proteína delipidada com CALBIOSORB, (8) Proteína delipidada com POLIDOCANOL e (9) Proteína delipidada com POLIDOCANOL e CALBIOSORB.

Para investigarmos a influência da delipidação da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase foi realizado um estudo com quatro protocolos de delipidação: por resina CALBIOSORB, com detergente não-iônico (POLIDOCANOL), com detergente não-iônico e resina, e com solvente orgânico (METANOL:CLOROFÓRMIO – 1:1), descritos na seção de materiais e métodos. Tais protocolos de delipidação foram ajustados para a proteína estudada e foram sugeridos pelo Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, que nos ajudou a estudar os melhores protocolos para a enzima em questão. A resina CALBIOSORB foi escolhida por ser uma resina

hidrofóbica e insolúvel mencionada na literatura para utilização com a finalidade de eliminar contaminantes orgânicos não ligados, assim como sais e íons pesados e remover detergentes de meio aquoso. [52] Já o detergente POLIDOCANOL foi escolhido por ser um detergente não iônico e pelo fato de um estudo anterior ter mostrado que detergentes iônicos interferem na estrutura protéica assim como na atividade enzimática da proteína[49]. Já os solventes orgânicos foram escolhidos por ser o protocolo mais utilizado para delipidação de substâncias.[53]

Várias preparações de expressão e purificação da enzima foram feitas a fim de testarmos os protocolos de delipidação mencionados. Um dos controles realizados ao final do processo de delipidação foram experimentos de CD da proteína para verificarmos a influência do protocolo em si sobre o grau de enovelamento protéico. Os espectros de CD da enzima antes da delipidação e após cada um dos protocolos para remoção de fosfolipídios estão mostrados na Figura 26. Dentre tais protocolos de delipidação, o protocolo com solvente orgânico mostrou-se não aplicável, uma vez que causa desnaturação irreversível de grande parcela da amostra, ou seja, há perda de mais de 80% da quantidade de amostra da proteína, além de ocasionar a maior modificação na estrutura da proteína, como podemos visualizar na Figura 26.

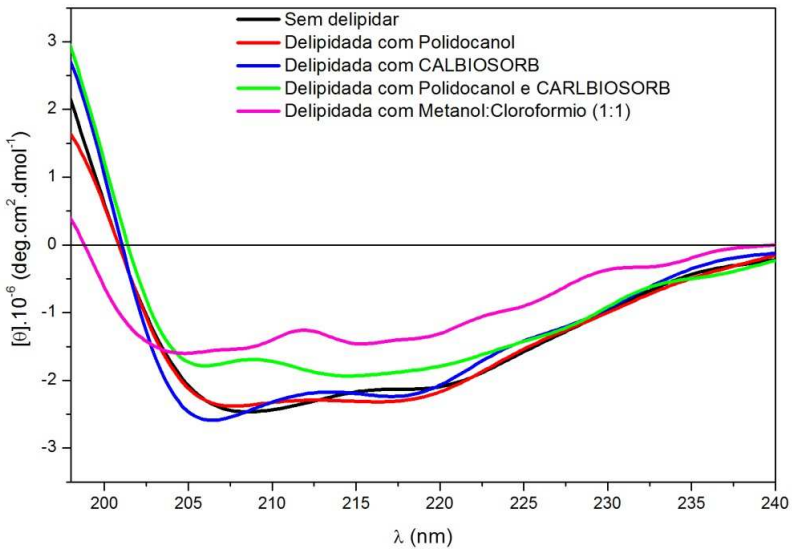


Figura 26 - Espectros de dicroísmo circular da Pp 1,2-CCD em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8 obtida ao final dos protocolos de delipidação utilizados no presente trabalho.

Através dos espectros de CD podemos visualizar que os processos de delipidação que utilizam POLIDOCANOL e CALBIOSORB apresentam uma mudança equivalente da estrutura secundária da proteína, levando esta a mostrar uma estrutura com menos α-hélice e randômica e um aumento de folha-β e voltas; já os processos que utilizam a combinação de POLIDOCANOL e CALBIOSORB e solventes orgânicos, ocasionam uma maior modificação na estrutura secundária da Pp 1,2-CCD, o que pode estar relacionado com o fato de estes serm protocolos mais agressivos a proteína.

Como mencionado anteriormente, o protocolo de delipidação que leva solvente orgânico tornou-se inviável para utilização, logo, prosseguimos com os outros três protocolos de delipidação e com a finalidade de verificar a estabilidade térmica da Pp 1,2-CCD quando submetida aos três protocolos descritos em 3.2.3. [29] Para tanto, fizemos uso da técnica de DSC e os resultados são apresentados a seguir.

Os termogramas de DSC podem ser visualizados na Figura 27 e alguns parâmetros termodinâmicos estão mostrados na Tabela 4. Em todos os casos, a proteína apresenta uma única transição, porém com variações tanto na temperatura de melting quanto no grau de cooperatividade. O valor de T_m não se altera ou é apenas ligeiramente diminuído após os protocolos que utilizam POLIDOCANOL e POLIDOCANOL conjuntamente com CALBIOSORB, ao passo que é aumentado, com variação fora do erro da medida, quando usamos apenas a resina CALBIOSORB.

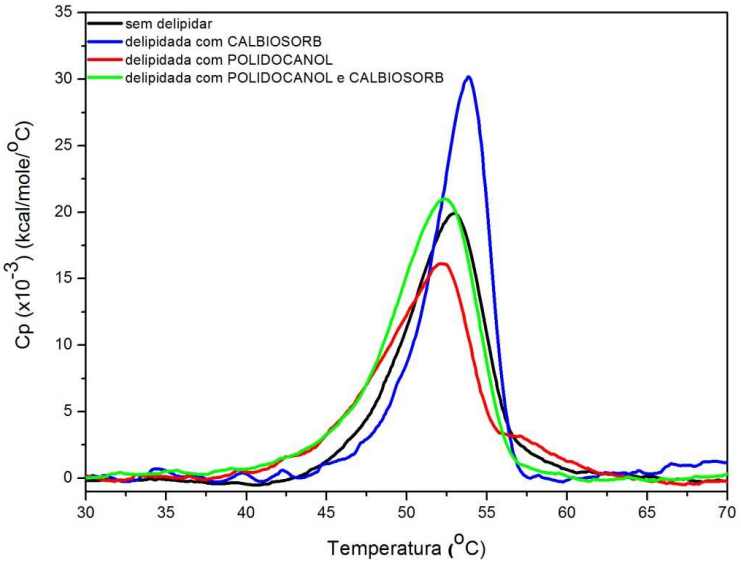


Figura 27 - Termograma de DSC para o desenovelamento da enzima Pp 1,2-CCD em 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8, após os protocolos de delipidação descritos no texto.

A cooperatividade apresentada pela proteína quando submetida aos processos de delipidação pode ser monitorada quando da obtenção da largura a meia altura da curva de transição ($\Delta T_{1/2}$), como descrito na seção 3.8.2 [31]. Através desta grandeza, podemos observar que quando submetida aos processos de delipidação que utilizam POLIDOCANOL, a proteína mostrou-se com um grau de cooperatividade menor (maior valor de $\Delta T_{1/2}$) do que aquele apresentado pela enzima sem delipidação, enquanto que quando se utilizou o processo de delipidação apenas com a resina CALBIOSORB, a proteína mostrou um grau de cooperação maior quando comparada com as citadas anteriormente, o que pode estar relacionado ao fato das quebras na cadeia polipeptídica e a flexibilidade das mesmas quando da realização dos protocolos de delipidação que usam POLIDOCANOL.

Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos obtidos para o desenovelamento da Pp 1,2-CCD quando submetida aos protocolos de delipidação.

Amostra	Sem delipidar	Delipidada com CALBIOSORB	Delipidada com POLIDOCANOL	Delipidada com POLIDOCANOL e CALBIOSORB
T_m (K)	(326,2±0,2)	(327,1±0,3)	(325,4 ±0,2)	(325,7±0,5)
$\Delta T_{1/2}$ (K)	(5,4±0,2)	(3,9±0,2)	(6,3±0,1)	(5,9±0,1)
ΔH_{cal} (kcal/mol)	(123,1±0,2)	(150,7±0,1)	(124±1)	(149,1±0,6)
$\Delta S_{(Tm)}$ (kcal.mol^{-}1K)	(0,377±0,001)	(0,461±0,002)	(0,381±0,002)	(0,458±0,001)

A estabilidade conformacional da proteína quando submetida à variação de temperatura também pode ser monitorada através da variação da entalpia calorimétrica do desenovelamento térmico (ΔH_{cal}) [31]. Através deste parâmetro termodinâmico mostrado na Tabela 4, observamos uma proteína com o comportamento de desenovelamento térmico muito parecido com o da Pp 1,2-CCD sem delipidação quando utilizamos apenas o detergente aniônico POLIDOCANOL, enquanto que em ambos os processos em que usamos a resina CALBIOSORB (com e sem a utilização concomitante do detergente aniônico POLIDOCANOL), obtivemos um comportamento que difere dos citados anteriormente. As delipidações envolvendo a resina CALBIOSORB parecem levar a uma proteína com transições térmicas parecidas no que diz respeito à sua variação de entalpia.

A variação da entropia calorimétrica determinada na temperatura de melting (T_m) é um importante parâmetro termodinâmico, pois estes valores relacionam-se com compensações entálpico-entrópicas e com diminuição de efeito hidrofóbico com aumento da temperatura. Para calcular o $\Delta S_{(Tm)}$ utilizamos a Equação 7 e os dados seguem na Tabela 4. A partir da análise deste parâmetro, podemos visualizar valores muito próximos de $\Delta S_{(Tm)}$ para as Pp 1,2-CCD antes e depois dos processos de delipidação, porém com pequenas variações. Assim, podemos concluir que a delipidação que utiliza CALBIOSORB, aumenta a entalpia e a entropia da transição da Pp 1,2-CCD do estado enovelado para o estado desenovelado; logo,

ao se realizar a retirada da molécula anfipática da proteína, a mesma se apresenta mais estável do que quando na presença deste.

Uma vez determinadas as alterações na estruturação global da enzima após os processos de delipidação, passamos, então, ao estudo da sua atividade enzimática quando submetida aos mesmos protocolos, tentando determinar, assim, o efeito da delipidação tanto do ponto de vista estrutural quanto funcional. Para tanto foram utilizadas as mesmas amostras com grau de pureza mostrados na Figura 25 e realizamos os ensaios cinéticos, em espectrofotômetro como descrito na secção 3.5. Os resultados seguem na Figura 28.

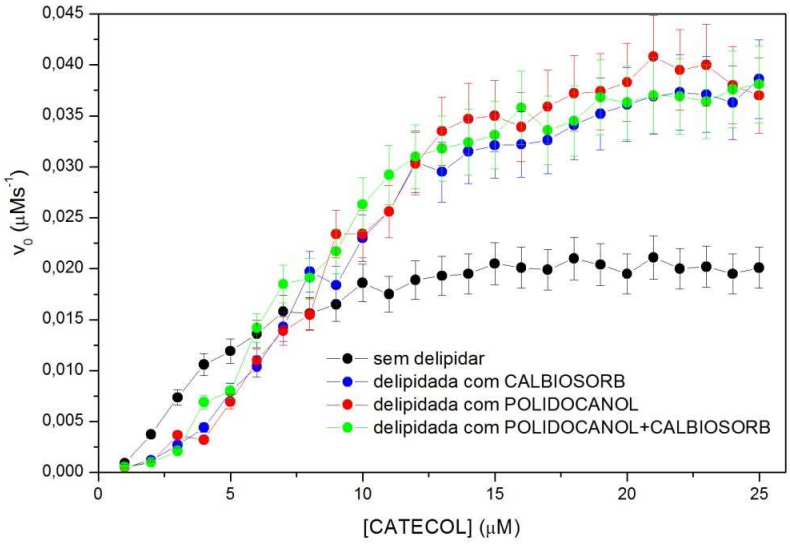


Figura 28 - Cinética da enzima Pp 1,2-CCD com seu substrato catecol, realizada em tampão 20mM Tris HCl, 50mM NaCl em pH 8, através titulação de 13 µL de uma proteína a 19 µM em soluções de catecol num intervalo de concentração de 1 a 50µM em cubetas de quatzo de 1 mL (sem o ajuste teórico para não prejudicar a clareza da imagem).

Uma análise qualitativa da Figura 28 permite observar que as moléculas anfipáticas realmente exercem um papel inibitório sobre a enzima, ocasionando menor velocidade inicial máxima de reação para a enzima antes da delipidação. Outro fato interessante que é visto na Figura 28 está na forma das curvas de cinética para os casos antes e depois de retiradas as moléculas anfipáticas. No caso da enzima antes da delipidação, a curva cinética tem a forma de uma hipérbole como seria esperado de uma cinética que segue o modelo tradicional de

Michaelis-Menten (Equação 13). Após a delipidação, a forma da curva cinética parece alterada principalmente para a região de baixas concentrações de substrato, ganhando aí um aspecto curvado que torna o comportamento geral de v_0 mais parecido com o de uma sigmóide do que uma hipérbole. Curvas cinéticas do tipo sigmoidal (*sigmoid-like*) sugerem um mecanismo cinético alostérico em que a presença de moléculas anfipáticas tornaria mais fácil/difícil a ligação da molécula de substrato. [36] Nossos dados de cinética confirmados através de duplicata geram um dado fundamental para controle da atividade biológica da enzima. Por agora, realizamos os ajustes das curvas cinéticas acima com uma equação do tipo Michaelis-Menten e os parâmetros daí obtidos estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos da enzima Pp 1,2-CCD antes e após os protocolos de delipidação, obtidos ajustando-se as curvas da Figura 28 a uma hipérbole.

Amostra	Sem delipidar	Delipidada com CALBIOSORB	Delipidada com POLIDOCANOL	Delipidada com POLIDOCANOL e CALBIOSORB
$v_{máx}$ ($\mu M.s^{-1}$)	(0,024±0,002)	(0,057±0,01)	(0,065±0,003)	(0,056±0,002)
K_M (μM)	(4,74±0,01)	(7,49±0,02)	(8,57±0,05)	(6,53±0,2)
k_{cat} (μs^{-1})	(48±2)	(114±8)	(130±7)	(112±5)

Realizamos até aqui, um estudo do que cada processo de delipidação utilizado até agora pode causar na proteína estudada e, de maneira geral, pudemos notar que os protocolos de delipidação diminuem a afinidade da proteína pelo substrato, assim como, produzem uma variação no T_m da proteína quando realizamos o processo de delipidação apenas com CALBIOSORB. No entanto, todos os protocolos utilizados aumentam a velocidade máxima da reação enzimática, bem como modificam o regime da cinética enzimática, o qual aparenta não mais se apresentar como uma reação enzimática de Michaelis-Menten. Estes dados nos sugerem, juntamente como os outros apresentados acima, que fosfolipídio/ácido graxo pode ser responsável por gerar uma regulação alostérica da reação enzimática catalisada pela Pp 1,2-CCD, ou seja, a ligação da molécula anfipática no bolsão hidrofóbico da proteína, deve levar a uma mudança conformacional que afeta a afinidade enzima-substrato e também a

atividade enzimática. Estes dados vem ao encontro com as previsões CITADINI et al, que relatam o fosfolipídio/ácido graxo como um regulador da atividade enzimática [19] e também com o que relata ESMANN [54] , onde os lipídios associados são essenciais para manter estrutura nativa da enzima.

4.3 Estudo estrutural e funcional da Pp 1,2-CCD quando submetida a diferentes forças iônicas e processos de delipidação

A função enzimática e a estrutura das proteínas podem ser afetadas por interferência de alguns fatores externos tais como: temperatura, pH, agentes químicos, força iônica, entre outros. [55-58] Logo, com o intuito de se investigar a estabilidade térmica, a estrutura secundária e a função enzimática da proteína quando expostas a alguns fatores externos, além de estudarmos a influência da delipidação da enzima nestas características, nos colocamos a estudar, a influência da força iônica do meio para que a Pp 1,2-CCD exerça sua função catalítica, bem como, vir a interagir com modelos micelares (que será tratado na seção 4.4).

Realizamos o presente estudo utilizando apenas a proteína sem delipidar e delipidada com CALBIOSORB, uma vez que o estudo da delipidação da proteína apresentado na seção anterior mostrou que cineticamente os três protocolos de delipidação são equivalentes e, também, pelo fato de não querermos interferências externas – no caso de detergente – ao realizarmos mais adiante os estudos de interação com micelas.

Iniciamos, então, nossos estudos quanto à influência da força iônica na função e estrutura da proteína através de análise de dicroísmo circular mostrados na Figura 29.

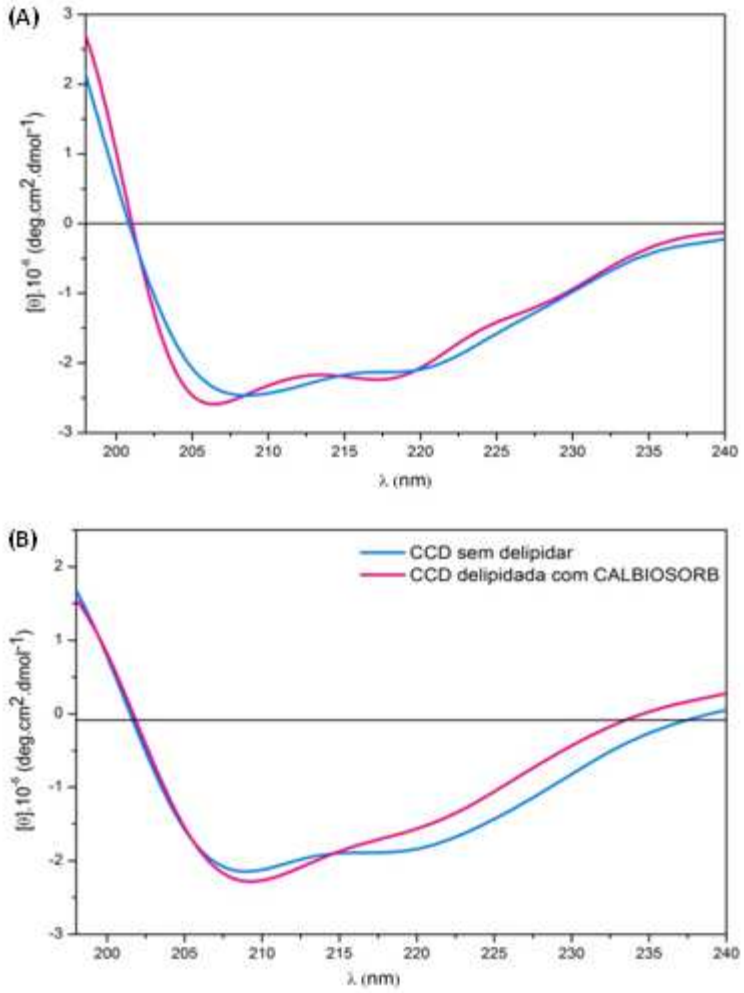


Figura 29 - Espectros de dicroísmo circular da Pp 1,2-CCD antes e após delipidação com resina hidrofóbica. (A) DSC da Pp 1,2-CCD em 20mM Tris HCl, 50mM NaCl, em pH 8. (B) DSC da Pp 1,2-CCD em 20 mM Tris HCl, 0 mM NaCl, em pH 8.

Através da Figura 29 podemos visualizar que a enzima quando em uma solução sem sal, ou seja, sem força iônica do meio - a não ser a que pode ser minimamente realizada pelo Tris HCl, que é utilizado para manter o pH da solução - se mostra com uma estrutura ligeiramente distinta da proteína sem delipidar em ambiente iônico contendo 50 mM de NaCl, em pH 8. Desta maneira, podemos inferir que a força iônica do meio faz-se necessária para ajudar a estabilização das ligações responsáveis pela geração destas estruturas secundárias e a flexibilidade das mesmas. [59]

Realizada esta análise de estrutura secundária da proteína, seguimos para o estudo da sua estabilidade térmica. Os termogramas obtidos seguem na Figura 30. Tivemos uma

duplicata de experimentos, com muito ruído devido a um problema na rede elétrica do laboratório que diagnosticamos, porém os dados não foram descartados uma vez que a duplicata mostrou-se muito eficiente. Realizando a integral destes termogramas pudemos obter os dados que seguem na Tabela 6.

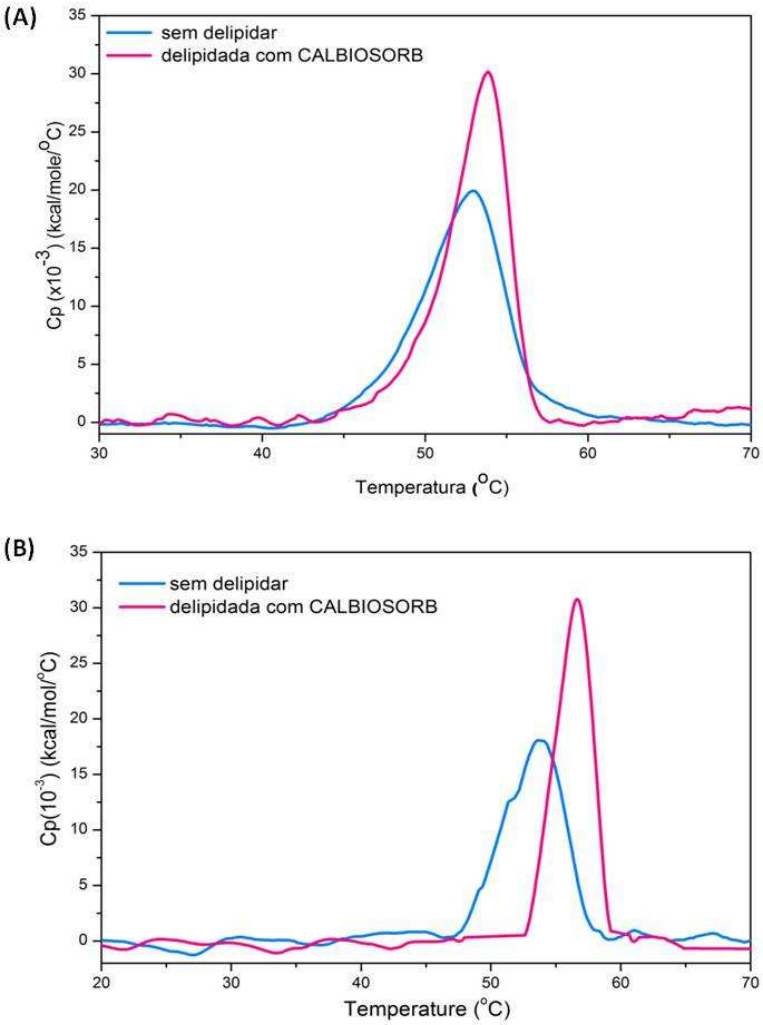


Figura 30 - Termograma de DSC para o desenovelamento da enzima Pp 1,2-CCD antes e após delipidação com resina hidrofóbica. (A) DSC da Pp 1,2-CCD em 20 mM Tris HCl, 50mM NaCl, em pH 8. (B) DSC da Pp 1,2-CCD em 20 mM Tris HCl, 0 mM NaCl, em pH 8.

Tabela 6 - Parâmetros termodinâmicos do desenovelamento da Pp 1,2-CCD quando submetida a protocolo de delipidação na presença e na ausência de sal.

Amostra	Sem delipidar (0mM NaCl)	Sem delipidar (50mM NaCl)	Delipidada com CALBIOSORB (0mM NaCl)	Delipidada com CALBIOSORB (50mM NaCl)
T_m (K)	(326,9±0,2)	(326,2±0,2)	(329,9±0,5)	(327,1±0,3)
$\Delta T_{1/2}$ (K)	(5,6±0,1)	(5,4±0,2)	(3,45±0,1)	(3,9±0,2)
ΔH_{cal} (kcal/mol)	(109,2±1,3)	(123,1±0,2)	(93,5±0,6)	(150,7±0,1)
$\Delta S_{(Tm)}$ (kcal.mol^{-1} ^{o}K)	(0,334±0,002)	(0,377±0,001)	(0,283±0,001)	(0,461±0,002)

Através destes dados fica nítido que a proteína quando sofre delipidação por resina hidrofóbica mostra-se mais estável do que quando se encontra na presença do lipídio se analisarmos apenas o parâmetro da temperatura de melting (T_m) e os dados de CD. Assim, notamos que apesar de a enzima se mostrar estruturalmente diferente nestes meios contendo forças iônicas distintas, esta se mostra mais estável termicamente, segundo estes dados. Já quando analisamos a entalpia necessária para que ocorra do desenovelamento térmico ΔH_{cal}, a estabilidade conformacional da proteína a Pp 1,2-CCD mostrou-se maior na presença de sal do que quando na ausência do mesmo, o que faz sentido e vem ao encontro dos dados de CD e a hipótese gerada ao analisar os mesmos, ou seja: que o sal é responsável por ajudar na estabilidade das ligações que formam as estruturas secundárias presentes na enzima.[59-60]

Quanto ao grau de cooperatividade da enzima, que pode ser analisado através do valor de $\Delta T_{1/2}$, a enzima mostrou-se com o mesmo grau de cooperatividade nos dois meios, quando submetida à delipidação ou não. E a entropia de desenovelamento térmico está muito próxima, apresentando pequenas variações, em ambos os ambientes iônicos e estados sem delipidar e delipidada, ou seja, o desenovelamento térmico da Pp 1,2-CCD aparenta ser entalpicamente dirigido.

Após caracterizar a estabilidade da Pp 1,2-CCD nestes ambientes iônicos, realizamos, então um estudo da sua atividade cinética. Iniciamos, como anteriormente, realizando ensaios

de atividade enzimática em um espectrofotômetro. As curvas obtidas destes ensaios são mostradas na Figura 31. Podemos citar que ambos os ensaios foram realizados na mesma faixa de concentração de substrato com a finalidade de se comparar o comportamento da enzima nestes dois ambientes e quando da sua delipidação. Os dados de cinética obtidos em espectrofotômetro foram ajustados por uma hipérbole representativa da equação de Michaelis-Menten (Equação 13) e os parâmetros obtidos seguem na Tabela 7.

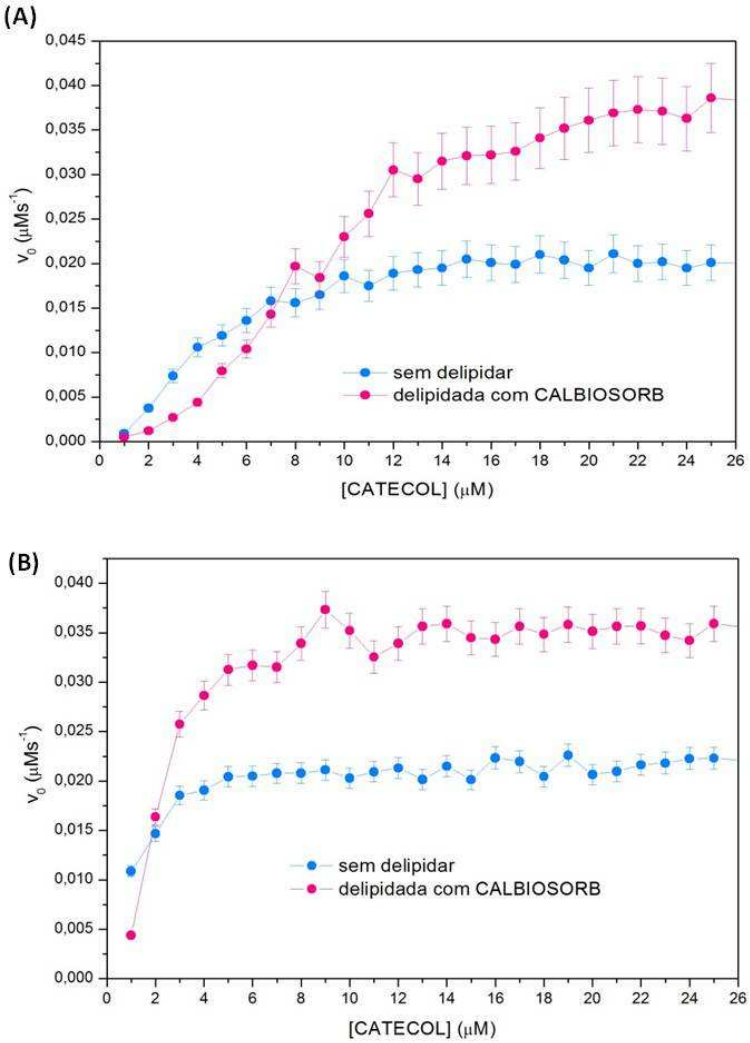


Figura 31 - (A) Cinética da enzima Pp 1,2-CCD com seu substrato catecol, realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl em pH 8, através titulação de 13 µL de uma proteína à 19 µM, em soluções de catecol num range de concentração de 1µM à 50 µM em cubetas de quatzo de 1mL. (B) Mesmo procedimento cinético realizado em tampão 20 mM Tris HCl, 0 mM NaCl em pH 8.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos da enzima Pp 1,2-CCD antes e após o protocolo de delipidação, na presença e na ausência de sal, foram obtidos através de ensaio enzimático realizado em espectrofotômetro e ajustando-se as curvas da Figura 31 a uma hipérbole.

Amostra	Sem delipidar (0mM NaCl)	Delipidada com CALBIOSORB (0mM NaCl)	Sem delipidar (50mM NaCl)	Delipidada com CALBIOSORB (50mM NaCl)
$v_{máx}$ ($\mu M.s^{-1}$)	(0,023±0,04)	(0,039±0,01)	(0,024±0,002)	(0,057±0,01)
K_M (μM)	(0,89±0,08)	(1,81±0,02)	(4,74±0,01)	(7,49±0,02)
k_{cat} (μs^{-1})	(46±3)	(78±4)	(48±2)	(114±8)

Os parâmetros da tabela acima mostram que a proteína possui uma mudança grande de afinidade pelo substrato quando não existe sal em sua solução, diminuindo o parâmetro que seria uma medida da constante de afinidade pelo substrato, K_M, em torno de duas vezes tanto para a proteína sem delipidar quanto para a delipidada e aumentando a velocidade máxima de reação para quase o dobro. Isto pode se relacionar ao fato de neste ambiente a proteína se encontrar com uma força iônica menor agindo sobre os aminoácidos que a constituem, ou seja, a retirada de sal pode mexer com a carga dos aminoácidos que coordenam o sítio ativo, ocasionando, assim um afinidade do substrato pela enzima, como podemos observar na Figura 31 e pelos dados da Tabela 7. [56-58]

O valor do parâmetro k_{cat} também foi aumentado quando a proteína é submetida ao processo de delipidação, tanto na solução que contém NaCl, quanto para a que não o contém, porém o valor de k_{cat} para a enzima que se encontra na presença de sal mostrou-se maior que na ausência do mesmo. Como k_{cat} representa o número de moléculas de substrato convertidas a produto numa determinada unidade de tempo por uma única molécula de enzima saturada pelo substrato, temos que a enzima na presença de sal é mais eficiente na formação de produto, ou seja, na dissociação da mesma com o produto do que a enzima na ausência de sal. Tal fato pode estar relacionado à inibição da enzima pelo produto. Para investigarmos tal hipótese, estudamos a inibição da enzima pelo produto primeiramente realizando ensaios de calorimetria da proteína nas condições acima e como descrito anteriormente.

A Figura 32 mostra os ensaios realizados para determinação das entalpias de reação da Pp 1,2-CCD sem delipidar e delipidada, como descrito na seção 3.6.1, nos dois ambientes iônicos estudados. Através da integração da área destas curvas e da subtração da mesma do calor de diluição do substrato utilizado (catecol), obtivemos as entalpias que seguem na Tabela 8, cujos valores variam apenas discretamente (dentro da margem de erro) para baixo quando a enzima é delipidada nas duas condições de concentração de sal.

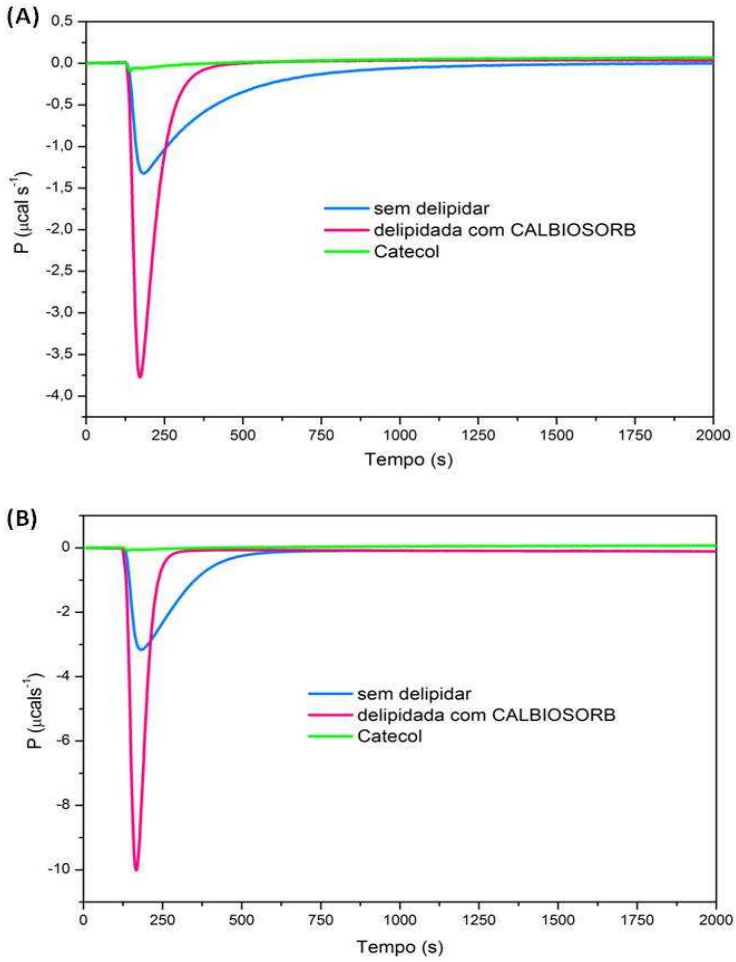


Figura 32 - (A) Entalpia da Pp 1,2-CCD em 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8. (B) Entalpia da Pp 1,2-CCD em 20 mM Tris HCl, 0 mM NaCl, pH 8.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da enzima Pp 1,2-CCD antes e após o protocolo de delipidação, na presença e na ausência de sal. Os valores de ΔH_{ap} foram obtidos integrando-se as curvas da Figura 32.

Amostra	Sem delipidar (0mM NaCl)	Sem delipidar (50mM NaCl)	Delipidada com CALBIOSORB (0mM NaCl)	Delipidada com CALBIOSORB (50mM NaCl)
ΔH_{ap} (kcal/mol)	-(130± 3)	-(90±4)	-(129±7)	-(83±2)

Para testarmos a hipótese de que o perfil cinético da enzima poderia variar com a força iônica do meio e com a delipidação, mostrando uma reação mais lenta e a afinidade da enzima pelo substrato diminuindo quando a força iônica do meio diminui como mostrado na literatura [56-58], realizamos um estudo de atividade cinética da enzima por ITC – lembrando que o estudo da mesma por espectrofotômetro já havia sido realizado e mostrou exatamente a hipótese relatada acima. As cinéticas enzimáticas foram realizadas de acordo com o procedimento descrito na secção 3.6.2 e 3.6.4 e os resultados obtidos através de triplicada seguem mostrados na Figura 33.

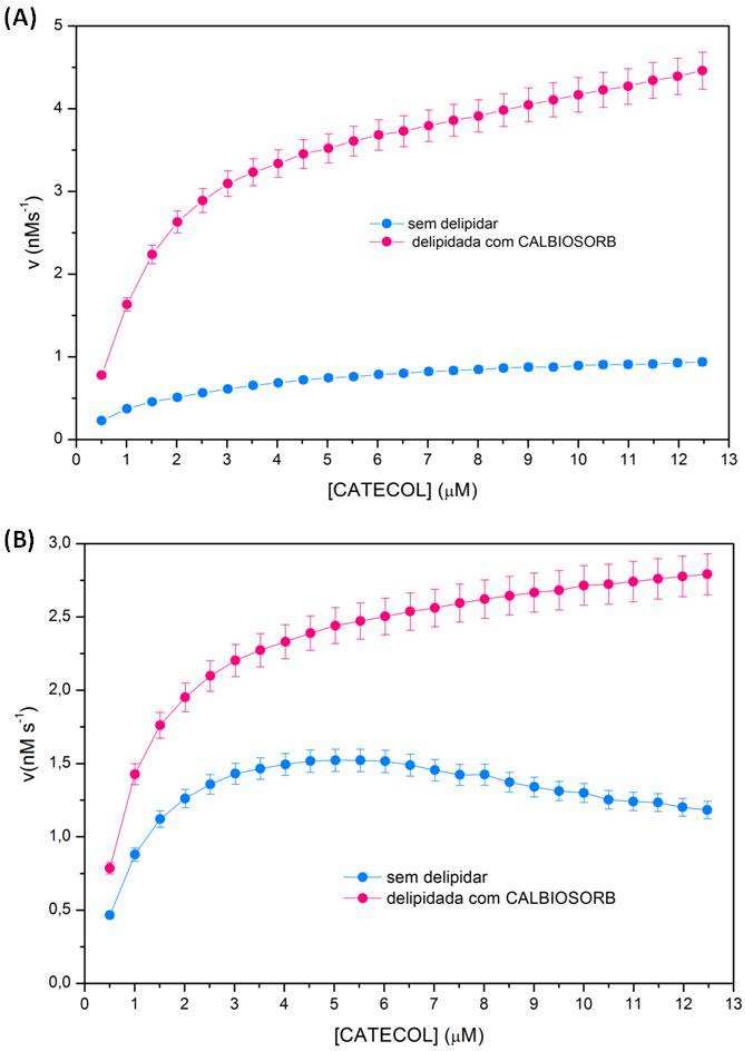


Figura 33 - (A) Dados experimentais da velocidade de reação ajustados à equação de Michaelis-Menten, sendo a cinética realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mMNaCl em pH8, através de injeção múltipla (20 injeções) de 1,25 µL de substrato a 572µM em 100 pM de proteína – delipidada e sem delipidar - inserida na cela. (B) Dados experimentais da velocidade de reação ajustados à equação de Michaelis-Menten, sendo a cinética realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 0mM NaCl em pH8, através de injeção múltipla (20 injeções) de 1,25 µL de substrato a 572 µM em 100 pM de proteína – delipidada e sem delipidar inserida na cela.

A Figura 33 nos mostra que quando na presença de sal (50 mM NaCl) a enzima aparenta ter um comportamento clássico de Michaelis-Menten tanto da proteína sem delipidar quanto da delipidada, o que difere dos dados obtidos quando a cinética é feita no espectrofotômetro. A diferença existente entre estes dados pode estar relacionada às diferentes concentrações de enzima utilizadas em ambos os experimentos (0,5 µM para o espectrofotômetro e 100 pM para o ITC), uma vez que a concentração enzimática utilizada pode influenciar na atividade da enzima, como relata LEHNINGER e LOYA.[23, 59, 61, 62] Já a

cinética em meio sem a presença de sal, observamos uma mudança interessante no tipo de cinética executada pela Pp 1,2-CCD que passa de um comportamento hiperbólico com sinais de inibição (diminuição da velocidade máxima de reação após determinada concentração de substrato) para a enzima antes da delipidação para um padrão simplesmente hiperbólico usual com leve aumento da velocidade dentro da margem de erro. Para melhor caracterizar as cinéticas acima, realizamos um ajuste das curvas por uma hipérbole representativa de Michaelis-Menten, o que forneceu os parâmetros típicos em cada caso e cujos valores estão apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos da enzima Pp 1,2-CCD antes e após o protocolo de delipidação, na presença e na ausência de sal. Os valores de $v_{máx}$ e K_M foram obtidos através de ensaio enzimático realizado em um calorímetro, citado anteriormente, e ajustando-se as curvas da Figura 33 a uma hipérbole.

Amostra	Sem delipidar (0mM NaCl)	Delipidada com CALBIOSORB (0mM NaCl)	Sem delipidar (50mM NaCl)	Delipidada com CALBIOSORB (50mM NaCl)
$v_{máx}$ ($nM.s^{-1}$)	(1,5±0,8)	(2,8±0,5)	(1,01±0,01)	(4,4±0,4)
K_M (μM)	(1,4±0,7)	(1,2±0,1)	(2,4±0,3)	(2,9±0,4)
k_{cat} (μs^{-1})	(26±5)	(28±5)	(10±2)	(45±7)

Realizado este estudo da cinética enzimática na presença de meios com forças iônicas distintas e após protocolo de delipidação da Pp 1,2-CCD, partimos para o estudo da inibição da enzima que aparece em alguns ensaios de cinética enzimática. Como pudemos ver através dos ensaios realizados por ITC, a enzima aparenta ser inibida por alguma substância que aumenta sua concentração dentro da cela de reação. Duas hipóteses foram levantadas: a substância inibitória da atividade enzimática poderia ser tanto o substrato da reação, como relatado por MELO [47], quanto o produto de reação. Passamos, então a analisar todos os dados conjuntamente e desta forma concluímos que: apesar de os ensaios de cinéticas enzimáticas por ITC mostrarem uma queda (inibição) da velocidade de reação em relação ao aumento da concentração de substrato, os mesmos quando realizados em espectrofotômetro não mostraram tal queda de velocidade de reação, sendo que no espectrofotômetro conseguimos

captar a velocidade logo no início da reação enzimática e montar um gráfico da velocidade inicial da reação em função da concentração do substrato. Desta maneira, podemos inferir que nesta faixa de concentração de substrato, a inibição apresentada na cinética enzimática por técnica calorimétrica não estaria associada ao substrato da reação. Assim, passamos a estudar a segunda hipótese que geramos, ou seja, o produto da reação seria, então, o responsável por tal inibição enzimática.

Após determinarmos que a Pp 1,2-CCD é inibida e que a possibilidade mais provável é a de que tal inibição se dê pelo produto da reação, decidimos investigar se tal inibição realmente ocorre. Este tipo de evento pode ser investigado através de um experimento simples de calorimetria utilizando-se três injeções contendo a mesma quantidade de substrato. O substrato em excesso foi, então, injetado na cela de amostra, e a variação de calor produzida pela degradação do mesmo foi monitorada até o final da reação, ou seja, até o retorno da potência térmica instrumental para a linha de base inicial, o que nos indica que o substrato injetado na cela de amostra foi totalmente convertido em produto de reação. Após esta etapa a cela de amostra foi deixada em repouso por cerca de 4000 s com a finalidade de se estabilizar o equipamento e uma nova injeção foi realizada. Nesta fase, o produto da reação já se encontrava na cela de reação, desta forma, caso não houvesse inibição pelo produto de reação, o sinal deveria ser idêntico ao medido após a primeira injeção de substrato, [34, 61, 62] caso ocorresse a inibição seria visualizado um sinal na segunda e na terceira injeção menor que o sinal gerado pela primeira injeção.

A Figura 34 mostra o ensaio descrito anteriormente realizado em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8. Podemos visualizar que os calores gerados pela conversão completa do catecol em ácido cis,cis-mucônico são diferentes na primeira, segunda e terceira injeção. Tal diferença fica mais evidente quando integramos as áreas abaixo das curvas e obtemos, então, a entalpia aparente para cada injeção. No caso da Figura 34, foram obtidos os seguintes dados para a proteína sem delipidação: ΔH_{ap1} = -(94±3), para a primeira injeção; ΔH_{ap2} = -(90±1), para a segunda injeção e ΔH_{ap3} = -(85±2), para a terceira injeção. Já a proteína delipidada, tivemos: ΔH_{ap1} = -(83±1) para a primeira injeção; ΔH_{ap2} = -(80±2), para a segunda injeção e ΔH_{ap3} = -(73±3). Estes dados levam-nos a inferir que o produto de reação presente na cela de amostra interfere na reação enzimática, diminuindo a entalpia aparente de reação, e alterando a taxa de retorno da potência térmica à linha de base, tornando a reação mais lenta. Ainda na Figura 34 podemos ver que a delipidação leva a uma cinética enzimática com menor

variação aparente de entalpia (Figura 34B) e com maior velocidade de reação indicada pela volta mais rápida à linha de base instrumental (Figura 34A – curva rosa).

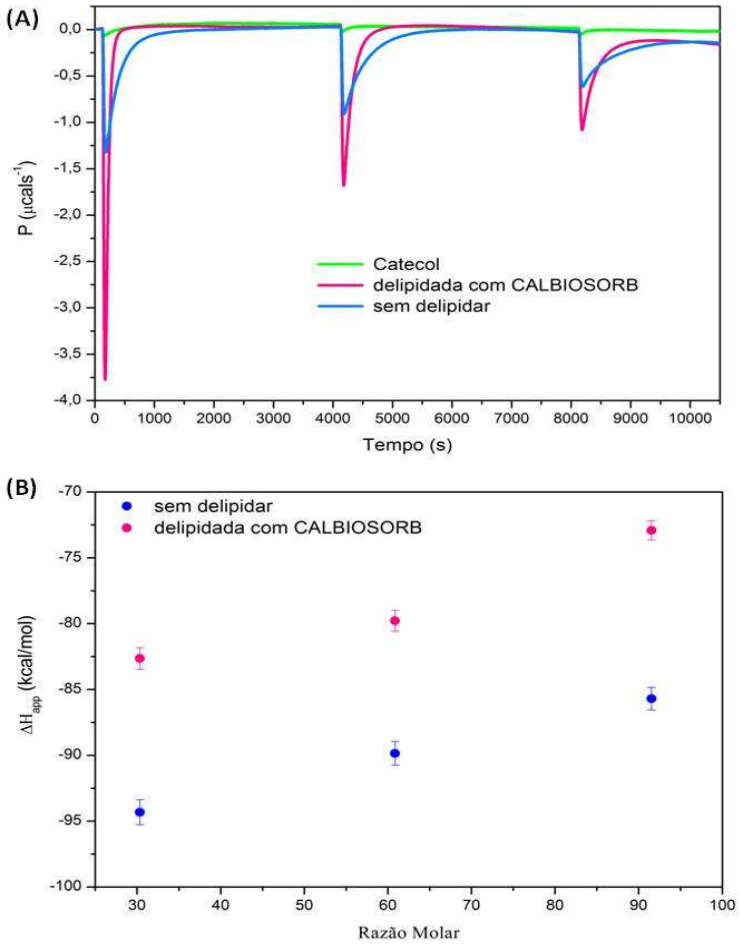


Figura 34 - Conversão completa do catecol em ácido cis,cis-mucônico realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8. (A) Calor gerado pelas três injeções de 7,5 µL de uma solução 572 µM de catecol dentro da cela de amostra contendo 100 nM de Pp 1,2-CCD. (B) Área integrada sob cada pico. Os valores encontrados são o calor total de conversão do catecol em substrato, ou seja, ΔH_{ap}.

Como realizamos um estudo quanto à interferência da força iônica do meio na reação enzimática, realizamos, também, a influência da mesma na inibição da enzima pelo produto. É notório, ao compararmos os dados das Tabelas 8 e 9 que o aumento da força iônica do meio diminuía a entalpia aparente da reação, bem como altera os parâmetros cinéticos da atividade catalítica da enzima, tornando sua afinidade pelo substrato menor, assim como sua velocidade

máxima da reação maiores. Quando comparamos, porém, a inibição da enzima pelo produto de reação, visualizamos que apesar de a enzima mostrar uma diferença na entalpia de reação quando comparamos os meios iônicos distintos, a Pp 1,2-CCD mostrou o mesmo comportamento inibitório, ou seja, com o aumento da concentração de produto na cela de reação, ocorre uma diminuição na entalpia de reação, o que caracteriza inibição da enzima pelo produto. Tal descrição é baseada nos dados obtidos a partir da integral da curvas termométricas da Figura 35, onde obtivemos para a proteína sem delipidação: ΔH_{ap1} = -(128±3), para a primeira injeção; ΔH_{ap2} = -(123±3), para a segunda injeção e ΔH_{ap3} = -(107±2), para a terceira injeção. Já a proteína delipidada, tivemos: ΔH_{ap1} = -(142±2) para a primeira injeção; ΔH_{ap2} = -(135±2), para a segunda injeção e ΔH_{ap3} = -(133±3). Desta forma podemos observar que há uma inversão de tendências o que pode estar relacionado à força iônica do meio, apesar de novamente após a delipidação, a reação acontece com taxa de consumo do substrato maior do que observado para a enzima contendo moléculas anfipáticas, a entalpia necessária para que a mesma aconteça mostrou-se maior do que quando na presença do lipídio, invertendo a situação que tínhamos anteriormente na presença de sal.

Portanto, nossa hipótese de que o produto da reação enzimática seja o responsável pela inibição da atividade da enzima mostra-se consistente, porém seria de extrema importância realizar as cinéticas enzimáticas na presença deste produto para mostrar o comportamento da cinética enzimática na presença deste.

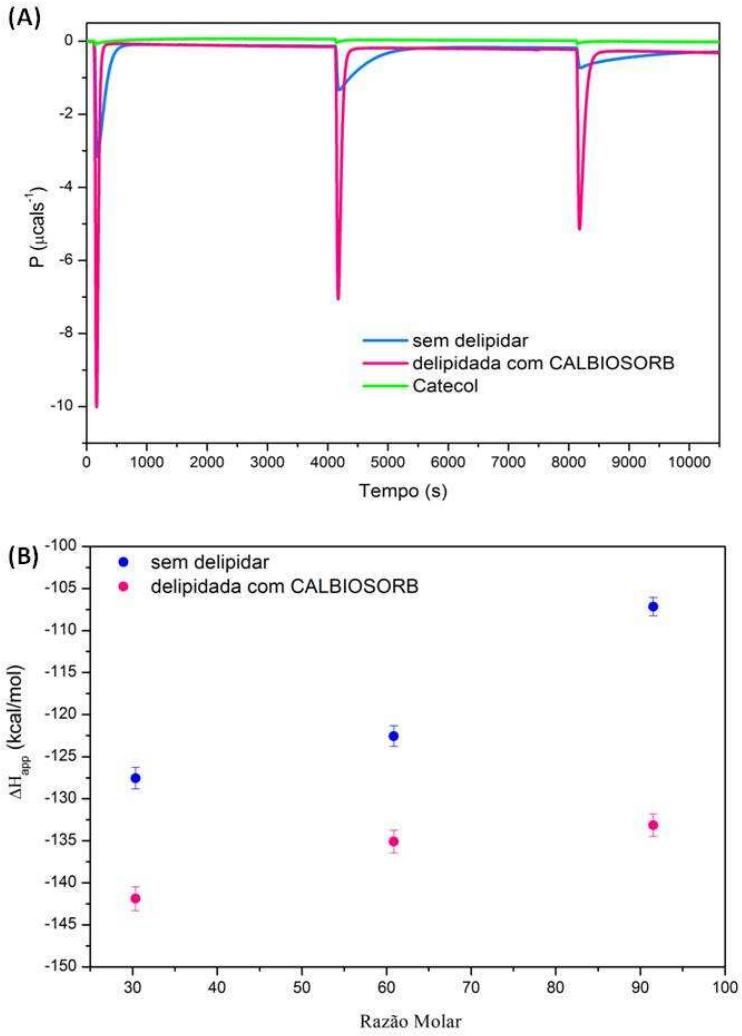


Figura 35 - Conversão completa do catecol em ácido cis,cis-mucônico realizada em tampão 20 mM Tris HCl, 0 mM NaCl, pH8. (A) Calor gerado pelas três injeções de 7,5 µL de uma solução 572 µM de catecol dentro da cela de amostra contendo 100 nM de Pp 1,2-CCD. (B) Área integrada sob cada pico. Os valores encontrados são o calor total de conversão do catecol em substrato, ou seja, ΔH_{ap}.

4.4 Estudos da interação da Pp 1,2-CCD com modelos micelares

É de nosso conhecimento que a Pp 1,2-CCD possui um sítio hidrofóbico no qual encontra-se uma molécula com densidade eletrônica compatível a um fosfolipídios/ácido graxo ainda desconhecido. Realizamos ao decorrer de nosso trabalho uma caracterização da enzima quando na presença e na ausência desta molécula, como resultado de alguns protocolos de delipidação distintos, e em meios de força iônica diferentes. Desta forma, pudemos observar que tanto a força iônica do meio quanto a delipidação da Pp 1,2-CCD geram modificações na estrutura, na desnaturação e na atividade da enzima, ao passo que a coordenação do sítio ativo aparenta não ser alterada.

Agora interessa-nos estudar a provável interação da proteína Pp 1,2-CCD com modelos micelares. Esta hipótese fora levantada pela inesperada presença de moléculas anfipáticas na interface do dímero que constitui a estrutura da Pp 1,2-CCD.[19] Ou seja, se há uma molécula com tais características na estrutura da enzima, interessa-nos saber o seu papel sobre a catálise enzimática (abordado nas seções anteriores), mas também suscita a indagação acerca de um provável mecanismo regulatório que envolvesse a interação com membranas biológicas. Sendo assim, escolhemos o sistema mimético de membranas mais simples com o qual se pode trabalhar, qual seja micelas de lisofosfolipídios.

Iniciamos nosso estudo realizando as medidas de RPE em banda-X, a temperatura ambiente (~ 25°C), em capilar de vidro inserido em um tubo de quartzo, sistema que é colocado e centralizado na cavidade de amostra. A amostra inicialmente foi preparada em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8 e na proporção 1:100 de proteína:lipídio, ou seja, para cada 1 molécula de proteína, temos 100 moléculas de lipídios disponíveis para que ocorra a interação. As soluções de amostra foram preparadas como descritas na seção 3.2.2 e estas foram, então, submetidas às medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), cujos resultados seguem mostrados na Figura 36.

A Figura 36 mostra um perfil de espectros de ressonância para micelas contendo moléculas do ácido esteárico marcadas com o radical nitróxido.[30] Os espectros apresentam três linhas representativas das transições dos elétrons desemparelhados quando em contato

com um campo externo e com um campo de radiação que exerce uma perturbação no sistema. Podemos, ainda, notar que o marcador de spin encontra-se incorporado às micelas de lisolipídios, uma vez que não temos espectros de marcador livre em nenhum dos casos (caracterizados por linhas muito estreitas e de intensidades próximas).

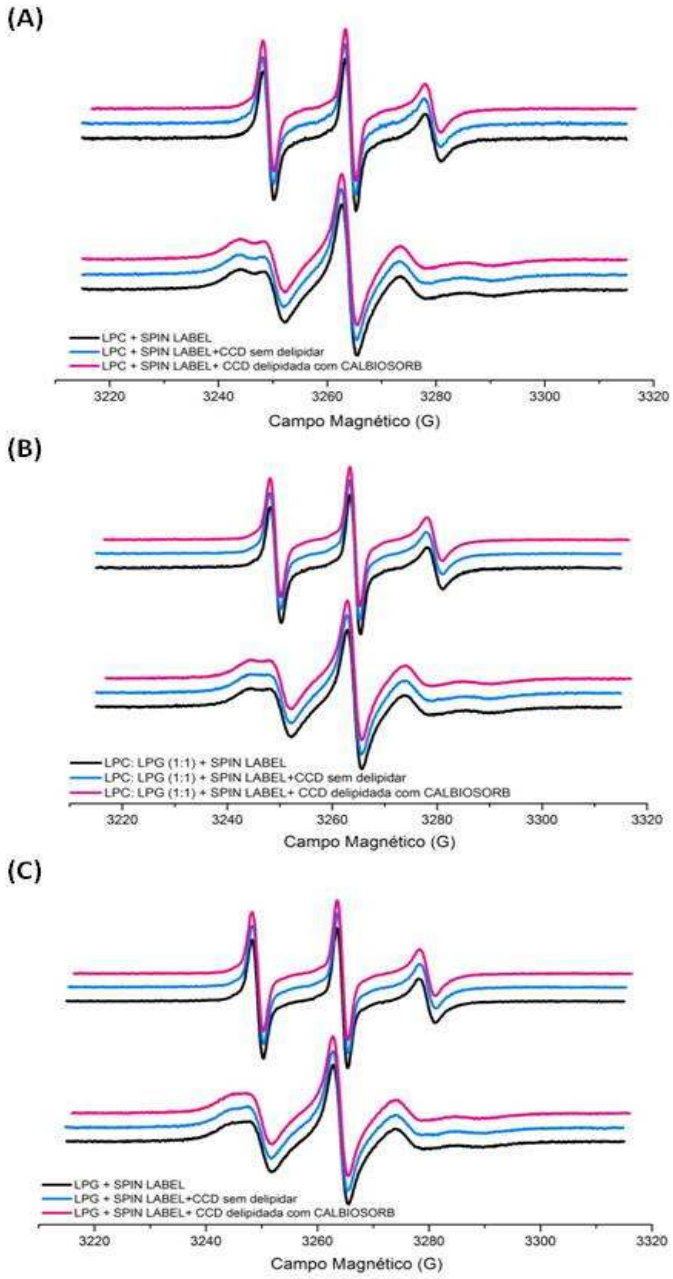


Figura 36 - Espectros de RPE das sondas 5-SASL e 16-SASL em modelos micelares na ausência (linha preta), na presença (linha azul) da enzima Pp 1,2-CCD e na presença da enzima Pp 1,2-CCD delipidada por CALBIOSORB (linha rosa). Ensaio realizado com 25 μM de CCD em uma razão proteína:lipídio de 1:100, em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8.

Os espectros mostrados na Figura 36, tanto (A), quanto (B) e (C) mostraram os perfis descritos acima e como não foram visualizado modificações no perfil de nenhum dos espectros, podemos inferir que nenhuma interação ocorreu entra a Pp 1,2-CCD e os modelos micelares utilizados nas condições descritas acima.

Continuando nossos estudos, realizamos outro ensaio de interação com os modelos micelares, porém, em força iônica distinta do primeiro. Retiramos, aqui, o sal da amostra e procuramos por alterações espectrais que indicassem uma possível interação. A Figura 37 nos mostra os espectros obtidos através dos quais podemos visualizar uma pequena interação da enzima quando neste ambiente e quando a proteína se encontra delipidada. Esta interação se mostra como uma pequena modificação no perfil do espectro que pode ser visualizado nas pates (B) e (C) daquela figura. Além disso, podemos inferir que a interação da enzima com os modelos micelares está relacionada a interações eletrostáticas, uma vez que a força iônica do meio modifica esta interação. [31,57-58]

Os espectros apresentados sugerem que há uma interação entre a Pp 1,2-CCD e modelos micelares de lisofosfolipídios. No trabalho de MELO e colaboradores [63], não foram observadas alterações em espectros de marcadores de spin inseridos em lipossomos de constituições fosfolipídicas diversas. Tomados conjuntamente esses dados sugerem que a interação entre a Pp 1,2-CCD e vesículas lipídicas, caso ocorra, necessita da presença de vesículas carregadas e com maior fluidez e/ou menor ordenamento das cadeias carbônicas dos lipídios (dou pelo menos de domínios em lipossomos com tais características). Se uma possível interação é realmente funcional para a Pp 1,2-CCD é uma questão ainda em aberto e que se valerá bastante de estudos em continuidade aqueles já iniciados em nosso grupo.

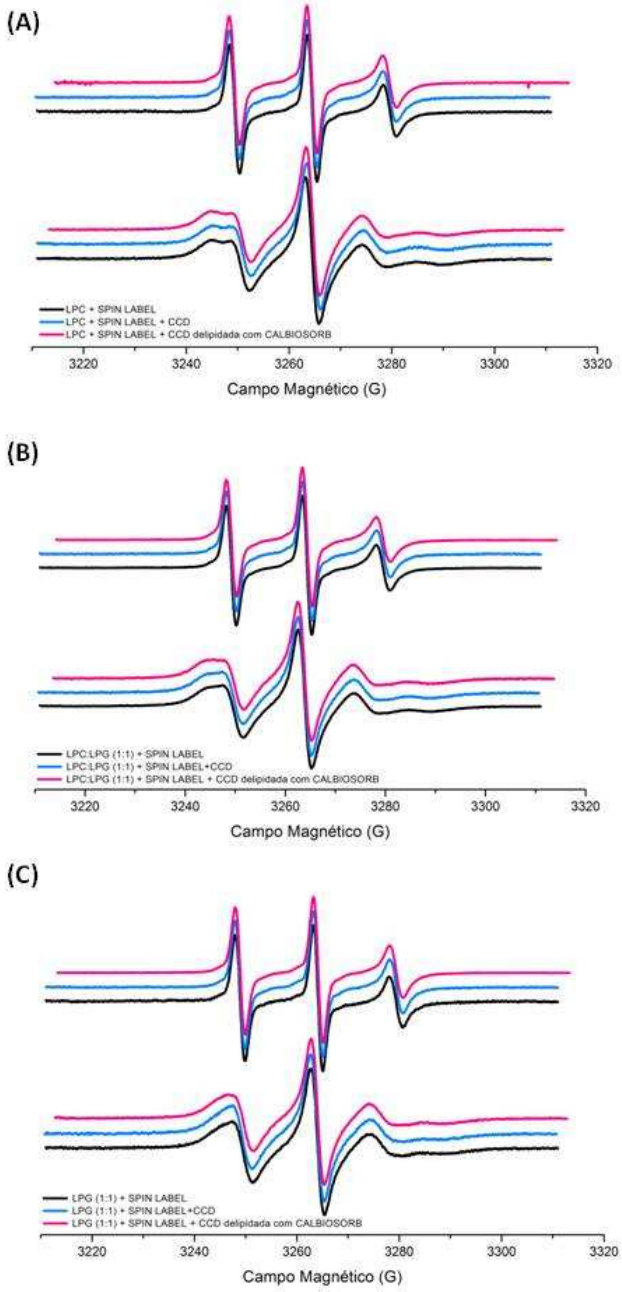


Figura 37 - Espectros de RPE das sondas 5-SASL e 16-SASL em modelos micelares na ausência (linha preta), na presença (linha azul) da enzima Pp 1,2-CCD e na presença da enzima Pp 1,2-CCD delipidada por CALBIOSORB (linha rosa). Ensaio realizado com 25 µM de CCD em uma razão proteína:lipídio de 1:100, em tampão 20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH 8.

Capítulo 5

Conclusões

5 CONCLUSÕES

O trabalho aqui apresentado teve como foco o estudo da influência de moléculas de fosfolipídio/ácido graxo na estabilidade e funcionalidade da enzima Pp 1,2-CCD. Nossa contribuição para tanto se baseia na determinação dos parâmetros de cinética enzimática, bem como parâmetros termodinâmicos da estabilidade da enzima em questão, utilizando um conjunto de técnicas físico-químicas aqui descritas e que tem se mostrado de muita importância.

Através de uma caracterização pudemos verificar que a enzima com a qual trabalhamos mostrou-se ativa, com atividade específica próxima da citada por referências literárias[1]. A Pp 1,2-CCD mostrou não ter grandes perdas de estrutura secundária com relação à variação de temperatura, como foi visto por dados gerados por CD. Além disso, foi utilizada a técnica de DSC para fazermos uma caracterização da estabilidade térmica da proteína, a qual mostrou-se análoga àquela realizada por MELO [47]. A enzima apresentou apenas um estado de transição em torno de (326,2±0,2) K, um alto grau de cooperatividade $\Delta T_{1/2}$ de (5,4±0,2) K quando comparado aos resultados obtidos por SANTOS [46] e uma contribuição entálpica para que seu desenovelamento ocorra muito pequena (0,377±0,001) ($kcal.mol^{-1}{}^{o}K$). A atividade enzimática da Pp 1,2-CCD apresentou-se com o mesmo perfil cinético visualizado por MELO e BRODERICK & O'HALLORAN [1, 47], bem como uma aparente inibição foi observada para esta através dos experimentos de ITC, a qual atribuímos aqui, ao produto. Porém, a inibição pelo substrato ainda não foi descartada uma vez que mais estudos serão necessários para dirimirmos esta dúvida. A detecção da existência de mecanismos naturais de inibição da enzima e sua caracterização são relevantes quando se almeja o uso tecnológico da Pp 1,2-CCD, assim, nossos dados reportam tal caracterização e sua extensão a outros substratos pode abrir novas possibilidades para mecanismos de controle da atividade biológica da enzima.

Após essa caracterização da Pp 1,2-CCD, voltamo-nos a estudar a influência da molécula hidrofóbica encontrada no sítio de ligação da Pp 1,2-CCD. Nosso estudo levou-nos a supor que a função enzimática da Pp 1,2-CCD é controlada alostericamente pela presença de tal molécula, aumentando a afinidade pelo substrato, bem como sua velocidade inicial máxima de reação quando da retirada desta molécula hidrofóbica. Outras características da enzima foram modificadas quando na ausência desta molécula, dentre elas pudemos constatar

uma estabilidade térmica mais alta do que quando na presença deste (retirado com resina hidrofóbica), assim como a cooperatividade entre os aminoácidos da proteína. A entalpia e a entropia da transição da Pp 1,2-CCD do estado enovelado para o estado desenovelado, também aumentam; logo, ao se realizar a retirada do fosfolipídio da proteína, a mesma se apresenta mais estável do que quando na presença deste. Nossos dados sugerem, então, que fosfolipídio/ácido graxo pode ser responsável por uma regulação alostérica da reação enzimática catalisada pela Pp 1,2-CCD, ou seja, a ligação do fosfolipídio no bolsão hidrofóbico da proteína, deve levar a uma mudança conformacional que afeta a afinidade enzima-substrato e também a atividade enzimática, o que vem ao encontro das previsões de CITADINI et al, que relatam o fosfolipídio/ácido graxo como um regulador da atividade enzimática [19] e também com o que relata ESMANN [54] , onde os lipídios associados são essenciais para manter estrutura nativa da enzima.

Outra característica importante a ser estudada dentro de nosso trabalho era a interferência do meio na função enzimática. Realizamos um breve estudo da influência da força iônica na atividade catalítica e estabilidade térmica da enzima, através do qual pudemos inferir que a presença de força iônica modifica minimamente a estrutura secundária da enzima, bem como a estabilidade térmica da proteína. Ao compararmos os dados de estabilidade térmica da proteína antes e após delipidação nos meios iônicos distintos e utilizarmos parâmetro da temperatura de melting (T_m) e os dados de CD, fica nítido que a enzima apresenta-se mais estável na ausência da molécula hidrofóbica. Enquanto que se analisamos a entalpia necessária para que ocorra do desenovelamento térmico ΔH_{cal}, a estabilidade conformacional da proteína a Pp 1,2-CCD mostrou-se maior na presença de sal do que quando na ausência do mesmo, o que veio ao encontro dos dados de CD e a hipótese que geramos ao analisar os mesmos, ou seja: que o sal é responsável por ajudar na estabilidade das ligações que formam as estruturas secundárias presentes na enzima. [59-60]

Como perspectivas que se colocam para trabalhos futuros, podemos citar: novos experimentos poderiam ser realizados em relação à inibição da enzima utilizando substratos que preenchessem completamente seu bolsão catalítico, como o clorocatecol, na tentativa de dirimir as dúvidas quanto a influência do substrato na atividade enzimática; um estudo mais sistemático da influência da força iônica na estrutura e função da Pp 1,2-CCD; busca por condições que maximizem a interação da Pp 1,2-CCD com modelos de membrana, além de realizar medidas de atividade da enzima na presença desses modelos de membrana.

Referências

1 BRODERICK, J. B.; O'HALLORAN, T. V; Overproduction, purification and characterization of chlorocatecol dioxygenase, a non-heme iron dioxygenase with broad substrate tolerance. **Biochemistry**, v. 30, n. 29, p. 7349-7358, 1991.

2 JACQUES, R. J. S. et al. Characterization of a polyclclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. **Bioremediation Journal**, v.11, n.1, p. 1-11, 2007.

3 ZHANG, P.; SONG, J.; YURAN, H. Persist organic pollutant residues in the sedments and mollusks from the Bohai sea Coastal areas, north China: an overview. **Environmental International**, v. 35, n. 3, p. 632-646, 2009.

4 SAMANTA, S. K.; SINGH, O. V.; RAKESH, K. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 423-248, 2002.

5 MILLER, R. V.; POINDEXTER, J. S. **Strategies and mechanisms for field research in environmental bioremediation:** a call for a national environmental bioremediation field research program. Washington: American Academy of Microbiology, 1994.

6 CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, v. 3, n. 2-3, p. 351-368, 1992.

7 BONALUMI, J. K. R. **Estudos cristalográficos da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase de Pseudomonas putida.** 2010. 122p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

8 ORNSTON, L. N.; STANIER, R. Y. Conversion of cathecol and protocathecuate to betaketoadipate by pseudomonas putida. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 241, n. 16, p. 3776-3786, 1966.

9 SCHLÖMANN, M. Evolution of chlorocatechol catabolic pathways. **Biodegradation**, v. 5, n. 3-4, p.301-321, 1994.

10 BUGG, T. D. H. Oxygenases: mechanisms and structural motifs for O-2 activation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p.550-555, 2001.

11 BUGG, T. D. H.; RAMASWAMY, S. Non-heme iron-dependent dioxygenases: unraveling catalytic mechanisms for complex enzymatic oxidations. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 2, p. 134-140, 2008.

12 NOZAKI, M.; KOTANI, S.; ONO, K.; SENOH, S. Metapyrocatechase.3.substrate specificity and mode of ring fission. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 220, n. 2, p. 213-223, 1970.

13 VETTING, M. W.; ORLENDORF, D. H. The 1.8 angstron crystal structure of catechol 1, 2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker. **Structure**, v. 8, n. 4, p. 429-440, 2000.

14 EARHART, C. A.; VETTING, M. W.; GOSU, R.; MICHAUD-SORET, I.; QUE, L.; OHLENDORF, D. H. Structure of catechol 1,2-dioxygenase from pseudomonas arvilla. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 1, p. 198-205, 2005.

15 FERRARONI, M.; KOLOMYTSEVA, M. P.; SOLYANIKOVA, I. P.; SCOZZAFAVA, A.; GOLOVLEVA, L. A; BRIGANTI, F. Crystal structure of 3-chlorocatechol 1,2-dioxygenase key enzyme of a new modified ortho-pathway from the gram-positive rhodococcus opacus 1CP grown on 2-chlorophenol**. Journal of Molecular Biology**, v. 360, n. 4, p. 788-799, 2006.

16 FERRARONI, M.; SOLYANIKOVA, I. P.; KOLOMYTSEVA, M. P.; SCOZZAFAVA, A.; GOLOVLEVA, L.; BRIGANTI, F. Crystal structure of 4-chlorocatechol 1,2-dioxygenase from the chlorophenol-utilizing gram-positive Rhodococcus opacus 1CP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 26, p. 27646-27655, 2004.

17 RUSTIGUEL, J. K. R.; PINHEIRO, M. P.; ARAUJO, A. P. U.; NONATO, M. C. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant chlorocatechol 1,2-dioxygenase from Pseudomonas putida. **Acta Crystallographica F**, v. F67, n.4, p. 507-509, 2011.

18 NAKAZAWA, T.; NAKAZAWA, A. Pyrocatechase (Pseudomonas). In: TABOR, H.; TABOR, C. W. (Ed.). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1970. v. 17A, p. 518-522.

19 CITADINI, A. P. S.; PINTO, A. P. A.; ARAUJO, A. P. U.; NASCIMENTO, O. R.; COSTA, A. J. EPR studies of chlorocatechol 1,2-dioxygenase: evidences of iron reduction during catalysis and of the binding of amphipatic molecules. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 5, p. 3502-3508, 2005.

20 ARAUJO, A. P. U.; OLIVA, G.; HENRIQUE-SILVA, F.; GARRAT, R. C.; CACERES, O.; BELTRAMINI, L. M., Influence of the histidine tail on the structure and activity of recombinant chlorocatechol 1,2-dioxygenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, n. 2, p. 480-484, 2000.

21 ISOTHERMAL Titration Calorimeter (ITC). data analysis in oringin®**:** tutorial guide, version 7.0. Northampton: Microcal, 2004. 121p.

22 CANTOR, R. C.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical Chemistry –** part iii: the behavior of biological macromolecules. New York: W. H. Freeman and Company, 1980. 849p.

23 RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques:biomolecular and nanostructural analyses – a review. **Chemistry and Biology Drug Design**, v. 74, n. 2, p. 101-120, 2009.

24 KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1751, p. 119–139, 2005.

25 BURGOS, I.; DASSIE, S. A.; FIDELIO, G. D. Thermodynamic model for the analysis of calorimetric data of oligomeric proteins. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 45, p. 14325-14333, 2008.

26 MINETTI, C. A.; REMEDA, D. P. Energetics of membrane protein folding and stability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 452, n. 1, p. 32-53, 2006.

27 ATKINS, P. W; DE PAULA, J. **Physical chemistry for the life sciences**. Oxford: Oxford University Press, 2006. 699p.

28 LADBURY, J. E.; CHOWDHRY, B. Z., **Biocalorimetry:** applications of calorimetry in the biological sciences. Chichester: John Wiley, 1998. 345p.

29 HARDING, S. E; CHOWDHRY, B. Z. **Protein-ligand interactions:** a practical approach. Oxford: Oxford University Press, 2001.

30 SKOOG, D. A.; HOLLER F. J.; NIEMAN T. **Principles of instrumental analysis.** 5th ed Philadelphia: Saunders College Pub, 1988. p. 805–808.

31 BASSO, L. G. B. **Interações de fármacos anti-malária com modelos de membrana**, 2009. 150 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração - Física Básica) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

32 ABADOU, A.; LADBURY, J. E. Survey of the year 2004: literature on applications of isothermal titration calorimetry. **Journal of Molecular Recognition**, v. 19, n. 1, p. 79-89, 2006.

33 ABADOU, A.; LADBURY, J. E. Survey of the year 2005: literature on applications of isothermal titration calorimetry. **Journal of Molecular Recognition**, v. 20, n. 1, p. 4-14, 2007.

34 TODD, M. J.; GOMEZ, J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? **Analytical Biochemistry**, v. 296, n. 2, p. 179-187, 2001.

35 CHELESKI, J. **Planejamento de inibidores da enzima diidroorotato desidrogenase de trypanosoma cruzi por biocalorimetria**. 2011. 157p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

36 MARANGONI, A. G. **Enzyme kinetics:** a modern approach. New Jersey: John Wiley&Sons, Inc, 2003. 228p.

37 CHELESKI, J.; WIGGERS, H. J.; CITADINI, A. P.; DA COSTA FILO, A. J.; NONATO, M. C.; MONTANARI, C. A. Kinetic mechanism and catalysis of Trypanosoma crusi dihydroorotate dehydrogenase enzyme evaluated by isothermal titration calorimetry. **Analytical Biochemistry**, v. 399, n. 1, p. 13-22, 2010.

38 LADBURY, J. E. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. **Chemistry & Biology**, v. 3, n. 10, p. 791-801, 1996.

39 HAQ, I. **Calorimetry in the fast lane:** the use of itc for obtaining enzyme kinetic constants. Studio City: Microcal, 2002. 23p. (LLC Leading the World in Ultrasensitive Microcalorimetry)

40 FREYER, M. W.; LEWIS, E. A. Isothermal Titration Calorimetry: experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. In: FALCONER, R. J. et al. Survey of the year 2008: applications of isothermal titration calorimetry. **Journal of Molecular Recognition**. Arizona: Elsevier Inc. 2010. p.79-113.

41 BIANCONI, M. L. Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reactions reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 18709-18713, 2003.

42 BASU, P. “Use of EPR spectroscopy in elucidating electronic structures of paramagnetic transition metal complexes”. **Journal of Chemical Education**, v. 78, n. 5, p. 666, 2001.

43 ATHERTON, N. M. **Principles of electron spin resonance**. New York: Ellis Horwood Limited, 1993.

44 PAULINO, J. **Estudos conformacionais de peptpídeos correspondentes à região do N-terminal das toxinas protéicas esticolisinas I e II**. 2010. 158p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

45 SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. **Methods in Enzymology**, v. 383, p. 318-35, 2004.

46 SANTOS, A. M. C. **Purificação e caracterização bioquímica do tripsinogênio, ααα- e ψψψ-tripsina bovina e análise termodinâmica em meio ácido por calorimetria diferencial de varredura**. 2009. 198p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Imunologia , Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

47 MELO, F. A.; Araújo, A. P. U. ; COSTA-FILHO, A. J. Role of cis cis muconic acid in the catalysis of Pseudomonas putida chlorocatechol 1,2-dioxygenase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 2, p. 233-237, 2010.

48 RELKIN, P. Differential scanning calorimetry: a useful tool for studying protein denaturation. **Thermochimica Acta**, v. 246, n. 2, p. 371-386, 1994.

49 CALLEN, H. B. **Thermodynamics and an introduction to thermostatics**. New York: John Wiley & Sons, 1985. 493p.

50 WIGGERS, H. J. **Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanossoma cruzi* por biocalorimetria**, 2007. 102p Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

51 STÖDEMAN, M.; SCHARZ, F. P. Importance of product inhibition in the kinetics of the acylase hydrolysis reaction by differential stopped flow microcalorimetry. **Analytical Biochemistry**, v. 308, n. 2, p. 285-293, 2002.

52 **CALBIOCHEM detergentes:** a guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry. Disponível em: <www.calbiochem.com.> Acesso em: 30 de Nov. 2011.

53 VELKOV, T.; LIM, M. L. R.; CAPUANO, B.; PRANKERD, R. A protocol for the combined sub-fractionation and delipidation of lipid binding proteins using hydrofobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 867, n. 2, p. 238-246, 2008.

54 ESMANN, M. The distribution of $C_{12}E_8$ – solubilized oligomers of the (Na^+ + K^+)-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.787, n. 1, p.81-89, 1984.

55 NORBY, J. G.; ESMANN, M. The effect of ionic strength and specific anions on substrate binding and hydrolytic activities of Na,K-ATPase. **Journal of General Physiology**, v. 109, n. 5, p. 555-570, 1997.

56 NISHINA, K.; JENKS, S.; SUPATTAPONE, S. Ionic strength and transition metals control PrP^{Sc} protease resistance and conversion-inducing activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 40788-40794, 2004.

57 WADE, R. C.; GABDOULLINE, R. R.; LÜDEMANN, S. K.; LOUNNAS, V. Electrostatic steering and ionic tethering in enzyme-ligand binding: Insights form simulations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 5942-5949, 2008. Disponível em: < http://www.pnas.org/content/95/11/5942.full >. Acesso em: 25 de Nov. 2011.

58 MADDOCK, K. R.; HUFF-LONERGAN, E.; ROWE, L. J.; LONERGAN, S. M. Effect of pH and ionic strength on μ- and m-calpain inhibition by calpastatin. **Journal of Animal Science**, v.83, n. 6, p. 1370-1376, 2005.

59 LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.; Principles of biochemistry. 2nd ed., New York:Worth Publishers, 1993. 1013 p.

60 YAMAZAKI, K.; IWURA, T.; ISHIKAWA, R.; OZAKI, Y. Effects of ionic strength on the thermal unfolding process of granulocyte-colony stimulating factor. **Journal of Biochemistry**, v. 139, n. 1, p. 41-49, 2006.

61 LOYA , S.; RUDI, A.; KASHMAN, Y.; HIZI, A. Mode of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by polyacetylenetriol, a novel inhibitor of RNA- and DNA-directed DNA polymerases. **Journal of Biochemistry**, v. 362, pt. 3, p.685-692, 2002.

62 CAI, L. F.; CAO, A. N.; LAI, L. H. An isothermal titration calorimetric method to determine the kinetics parameters of enzyme catalytic reaction by employing the product inhibition as probe. **Analytical Biochemistry**, v. 299, n. 1, p. 19-23, 2001

63 MELO, F. A. **Interações moleculares no mecanismo de ação de clorocatecol 1,2-dioxigenase e da tirosina quinase**. 2010. 175p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.