

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E INFORMÁTICA

FERNANDO ALVES DE MELO

Interações moleculares no mecanismo de ação
de clorocatecol 1,2-dioxigenase e da tirosina
quinase FGFR2

São Carlos

2010

FERNANDO ALVES DE MELO

Interações moleculares no mecanismo de ação
de clorocatecol 1,2-dioxigenase e da tirosina
quinase FGFR2

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
do Instituto de Física de São Carlos da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho

São Carlos

2010

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 IFSC/USP

Melo, Fernando Alves de.

Interações moleculares no mecanismo de ação de clorocatecol 1,2-dioxigenase e da tirosina quinase FGFR2./Fernando Alves de Melo; orientador Antonio José da Costa Filho - São Carlos, 2010.
175 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Física - Área de concentração: Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Tirosina quinase. 2. Clorocatecol 1,2-dioxigenase. 3. Cinética. 4. Calorimetria. 5. Ressonância magnética eletrônica. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando Alves de Melo

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada.

Aprovado em: 26/04/2010

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Eneida de Paula

Instituição: UNICAMP

Assinatura



Profa. Dra. Rosângela Itri

Instituição: IF/USP

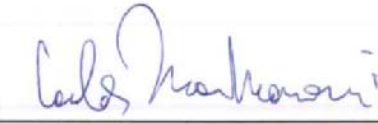
Assinatura



Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

Instituição: IQSC/USP

Assinatura



Prof. Dr. Marcos Vicente de Albuquerque Salles Navarro

Instituição: IFSC/USP

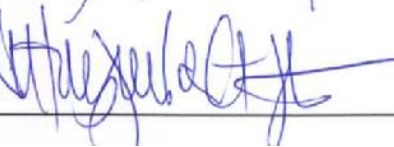
Assinatura



Prof. Dr. Antônio José da Costa Filho

Instituição: IFSC/USP

Assinatura



À minha esposa Roberta

&

À minha filha Maria Luíza

Agradecimentos

A minha família, Roberta e Maria Luiza, pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão e apoio incondicionais nas horas de dificuldade.

A minha mãe, Luiza, que tanto se sacrificou para que eu tivesse uma educação de qualidade.

A minha irmã, Lindinalva, que junto com a minha mãe teve um papel fundamental para que eu pudesse ir tão longe com meus estudos.

Aos meus irmãos, Dorival e Jose Carlos, pelo companheirismo e por sempre estarem dispostos a me ajudar prontamente nas dificuldades.

Ao professor Antonio José da Costa Filho pela orientação, por me ajudar para que eu pudesse fazer parte do meu doutorado fora do país, pela confiança depositada em minha pessoa e pelas discussões a respeito de meu trabalho que contribuíram para o meu crescimento profissional.

To the professor John Edward Ladbury that has accepted me to work in his lab, for helping me with the bureaucracy out of my country and for all fruitful discussion about my project with his thoughts and tricks that helped me to get good results in too short period of time.

À Thatyane Nobre pela ajuda e discussões importantes para finalização desta tese, no que diz respeito às monocamadas de Langmuir.

A minha querida amiga Célia, que me apoiou e sempre e teve uma palavra amiga e de conforto para problemas que passamos durante o período de doutorado.

Aos meus amigos queridos, Julio e Sheila, que me ajudaram muito numa época de extrema dificuldade.

Ao José Fernando de Lima, pela amizade e pelas conversas a respeito de qualquer coisa, incluindo é claro Física.

Aos amigos do grupo de Biofísica, Ana Isabel, Ana Paula, Assuero, Daniel (Baiano) Débora Fernanda, Fernanda, Joci, Jose Luiz, Julio Damálio, Lia, Ernani (Ceará), Luis Fernando (Argentino), Luis Guilherme (Militar), Nathalya, Natália e Nayara pelo companheirismo e pelos bons momentos compartilhados. Também pelo incentivo, apoio e discussões a respeito das dificuldades encontradas nos trabalhos realizados em laboratório.

To the friends I have met at UCL and Birkbeck College, Thomas, Kin, Roger, Sunita, Dipali, Anderson, Zamal, Ellie, Rogini, Masooma, Geraldine, Xiaolin, Marília, Hélène, Jean Paul, Tina, Mark, Rumisa and Clair for all discussions about the project, for making my life easier out of my homeland, for all picnics in the Russell Square and all Pub drinking and Rock'n'Roll nights in the Queen's Land.

Aos professores do grupo de Biofísica, Leila, Ana Paula, Otaciro.

Aos técnicos, Possato, Beto, Andressa e Bel, por toda ajuda que me deram e paciência que tiveram em me ensinar no geral como funciona o laboratório.

À CAPES, CNPq, PRONEX e FAPESP, pelo apoio financeiro para realizar este trabalho.

“Loucura? Sonho? Tudo é loucura ou sonho no começo. Nada do que o homem fez no mundo teve início de outra maneira, mas tantos sonhos se realizaram que não temos o direito de duvidar de nenhum”

Monteiro Lobato

Resumo

MELO, F.A. **Interações moleculares no mecanismo de ação de clorocatecol 1,2-dioxigenase e da tirosina quinase FGFR2.** 2010.175p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Neste trabalho foi utilizado um esquema multi-técnicas para estudar as interações moleculares no mecanismo de ação de clorocatecol 1,2-dioxigenase e da tirosina quinase FGFR2. Na primeira parte desta tese, descrevemos uma série de experimentos envolvendo a interação da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase (1,2-CCD) com seus ligantes naturais e também com miméticos de membranas biológicas (micelas de surfactantes, monacamadas lipídicas e lipossomos). Utilizamos a técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para mostrar que tanto o substrato, quanto o produto da reação inibem a cinética enzimática mediada por 1,2-CCD. Resultados obtidos com as técnicas de calorimetria de varredura diferencial (DSC) e ressonância paramagnética eletrônica (RPE) confirmaram que a inibição se dá devido à ligação direta do produto da reação no sítio catalítico da enzima. Sendo assim, nossos dados indicam que o produto da reação exerce um papel relevante na catálise mediada por 1,2-CCD, devendo ser levado em consideração para estudos futuros que versem sobre a regulação da atividade desta enzima. Em outra vertente, investigamos a capacidade de 1,2-CCD de se ligar a modelos de membranas. Para isso, utilizamos as técnicas de RPE, DSC e de monacamadas de Langmuir no monitoramento das alterações nos miméticos de membranas (micelas dos surfactantes SDS e CTABr, monocamadas de DPPC e lipossomos de DPPC e DMPC) quando da adição de 1,2-CCD. Este conjunto de dados aponta claramente para a existência da referida interação, o que pode representar, junto com a inibição por produto, outro mecanismo de regulação do metabolismo desta enzima dentro da célula. Na segunda parte de nosso estudo, utilizamos a técnica de ITC para acessar as cinéticas de autofosforilação de FGFR2 quinase e de fosforilação, catalisada por FGFR2 quinase, da isoforma p52 da proteína Shc. A fosforilação reversível da cadeia lateral de aminoácidos é um princípio de regulação da atividade de enzimas e

sinalização de proteínas largamente utilizado pelas células. Para tornarem-se ativas, proteínas tirosina quinase (PTK) autofosforilam-se hidrolisando moléculas de ATP em ADP em uma reação sequencial e precisamente ordenada. Uma vez ativas, interagem com proteínas adaptadoras, como Shc, que são fosforiladas pelo intermédio de PTK. Assim que é fosforilada, Shc torna-se apta a interagir com outras proteínas importantes no processo de sinalização celular para formar os complexos de sinalização primários (ESC). Nossos resultados mostram que o processo de autofosforilação da FGFR2 é governado por uma cinética cooperativa e com a ordem de fosforilação dos resíduos de tirosina provavelmente idêntica àquela previamente determinada para FGFR1. Já para a fosforilação de Shc, a cinética tende a mudar com a temperatura, sendo que a 10 °C ocorre segundo um mecanismo de Michaelis-Menten, enquanto que a 15°C podemos identificar uma indefinição de comportamento deste sistema, uma vez que os dados podem ser ajustado pelos modelos de Michaelis-Menten e Hill. Já para 20 °C, vemos uma mudança no perfil catalítico, mostrando um certo grau de cooperatividade. Estes resultados, além de estabelecerem características da cinética de fosforilação de FGFR2 e Shc ainda não reportadas, também validam o método calorimétrico utilizado para determinar os parâmetros cinéticos associados àquele processo.

Palavras-chave: Tirosina quinase, clorocatecol 1,2-dioxigenase, cinética, calorimetria, ressonância magnética eletrônica

Abstract

MELO, F.A. **Interações moleculares no mecanismo de ação de clorocatecol 1,2-dioxigenase e da tirosina quinase FGFR2.** 2010.175p. Thesis (Ph.D.) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

In this thesis we have used a multi-technique approach to study the molecular interactions relevant in the reaction mechanism of two enzymes: chlorocatechol 1,2 dioxxygenase (1,2-CCD) and tyrosine kinase FGFR2. In the first part, we have described a series of experiments involving the interaction of 1,2-CCD with its natural ligands and also with models of biological membranes (micelles, lipid monolayer, and liposomes). Isothermal titration calorimetry (ITC) has shown that both substrate and product of the reactions inhibit 1,2-CCD kinetics. The results from differential scanning calorimetry (DSC) and electron paramagnetic resonance (EPR) have confirmed that inhibition is due to the direct binding of product to the enzyme catalytic site. Thus, our data has indicated that the product of reaction plays a relevant role in the 1,2-CCD catalysis, and should be taken into account in studies related to activity regulation of this class of enzymes. In other study, we have investigated the 1,2-CCD capability of binding to model membranes. For that, EPR, DSC and Langmuir monolayer have been used to monitor changes in the mimetic systems (SDS and CTABr micelles, DPPC monolayer and DMPC liposomes) upon addition of 1,2-CCD to the system. Taken together our data points to existence of the such interaction, which means that this behaviour, along with the product inhibition, could be another mechanism for regulating this enzyme metabolism inside the cell. In the second part of our work, we have used ITC to assess the kinetics of phosphorylation of both FGFR2 kinase and the p52 isoform of Shc. The reversible phosphorilation of tyrosine residues is a widely used mechanism for regulating enzyme activity and protein signalling into the cell. To become active, Tyrosine kinase (PTK) phosphorylates itself by hydrolysing ATP into ADP molecules in a sequential and precisely ordered reaction. When active, PTK interacts with protein partners, like Shc, thus phosphorylating them. After its phosphorylation, Shc interacts with other

important proteins in signalling events in order to form the so-called early signalling complexes (ESC). Our results have shown that the FGFR2 kinetics of autophosphorylation happened in a cooperative manner and probably following a phosphorylation order of the Tyr residues similar to that previously reported for FGFR1 kinase. As for the Shc phosphorylation mediated by FGFR2 kinase, it changes with temperature from a regular Michaelis-Menten kinetics at 10 °C to an unclear behaviour, adjustable to both Michaelis-Menten and to Hill model, at 15 °C. At 20 °C, we can see that the kinetics shows some degree of cooperativity. These results provide the kinetic parameters for the FGFR2 autophosphorylation as well as p52Shc phosphorylation that have not been reported before, and also validate the calorimetric methods as a very useful tool to perform kinetics studies related to kinase signalling processes.

keywords: Tyrosina kinase, chlorocatechol 1,2-dioxygenase, kinetics, calorimetry, electron magnetic resonance

Lista de Figuras

- FIGURA 1 -** Esquema das reações catalisadas por enzimas da família das dioxigenases intradióis. Adaptada da referência (46)..... **47**
- FIGURA 2 -** Representação da molécula de catecol mostrando as três maneiras que a fissão do anel benzênico pode ocorrer: (a) clivagem intradiol, (b) clivagem extradiol proximal e (c) clivagem extradiol distal. R representa os radicais que podem ligar-se à molécula, tal qual o íon cloro..... **48**
- FIGURA 3 -** Estrutura dimérica (αFe^{3+})₂ da Rho Clorocatecol 1,2-Dioxigenase. Na figura podem ser vistos os domínios catalíticos e de dimerização (ligação), bem como a entrada de acesso do substrato para o sítio ativo. Figura adaptada da referência (30)..... **49**
- FIGURA 4 -** Coordenação de resíduos do sítio catalítico de Rho 1,2-catalítico contém um núcleo de Fe^{3+} ligado a quatro resíduos: Tyr-134, Tyr-169, His-194 e His-196. Esta coordenação His_2Tyr_2 é típica para todas as dioxigenases intradióis. Figura adaptada da referência (30)..... **49**
- FIGURA 5 -** Análise da 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 – após passar pela resina de purificação por afinidade; (4) lavagem com tampão de suspensão; (5) primeira eluição com tampão de clivagem e DTT – imediata; (6) segunda eluição com tampão de clivagem – após 12 horas de descanso; (7) proteína concentrada em tampão de clivagem..... **52**
- FIGURA 6 -** Coordenação de resíduos do sítio catalítico de Rho 1,2-CCD. O sítio catalítico contém um núcleo de Fe^{3+} ligado a quatro resíduos: Tyr-134, Tyr-169, His-194 e His-196. Esta coordenação His_2Tyr_2 é típica para todas as dioxigenases intradióis. Figura adaptada da referência (30)..... **53**
- FIGURA 7 -** “Layout” do experimento de titulação de água contra

água para obtenção de linha de base. Neste experimento podemos verificar a notória sensibilidade no registro do calor de diluição da água em água a cada titulação. Podemos ver ainda que este calor de diluição é exotérmico, pois a cada titulação (setas) vemos uma deflexão negativa na potência térmica instrumental..... 55

FIGURA 8 - Efeitos da concentração de substrato sobre a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima. Esta curva foi gerada pela equação de Michaelis-Menten implementada no programa MicroCal Origin 7.0. Os parâmetros foram escolhidos como segue: $K_M = 4,3 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 0,084 \text{ s}^{-1}$ e a concentração de enzima foi mantida fixa em 100 nM. Na concentração de substrato indicado pela linha azul, metade das moléculas de enzima está complexada ao substrato e a taxa da reação é exatamente metade da velocidade máxima V_{max} 56

FIGURA 9 - Reação catalisada pela enzima urease a 37°C. Em (A), a potência (ou fluxo de calor) em função do tempo foi medida em condições estacionárias, onde a cela do calorímetro foi preenchida com uma solução contendo enzima (urease) e substrato (uréia) foi injetado como indicado pelas setas. A concentração de enzima utilizada foi 50 pM, enquanto que a concentração de substrato dentro da cela foi de 88 μM . Uma segunda injeção foi feita 10 minutos depois, onde foram adicionados mais 88 μM de uréia dentro da cela, mostrando a variação da potencia térmica dQ/dt com o aumento da concentração de substrato. Em (B), a completa conversão de substrato em produto para se obter o valor de ΔH da reação. Neste experimento, uma quantidade de 513 μM de uréia foi consumida por 4 nM de urease gerando um $\Delta H = - 10,4 \pm 0,1 \text{ Kcal/mol}$. O experimento também indica que não há inibição durante a formação do produto. Figura adaptada da referência (17)..... 59

FIGURA 10 - Potência térmica instrumental para a taxa de reação da hidrólise do PNPP por PP1- γ . Figura adaptada da referência (60)..... 61

FIGURA 11 - Hidrólise do BAEE (Na-Benzoyl-Arginine Ethyl Ester) catalisada pela tripsina. Em (A) uma solução de 9,6 nM

de tripsina foi equilibrada a 25°C dentro da cela de amostra. Após o equilíbrio térmico, BAEE foi injetado (seta) para uma concentração final de substrato dentro da cela de 171 μM. A potência térmica instrumental foi monitorada até a completa conversão do substrato em produto. A curva grossa mostra a catálise da BAEE pela tripsina na presença de benzamidina, enquanto que a curva fina mostra a catálise da BAEE pela tripsina sozinha. Em (B) vemos a taxa de reação em função da concentração de BAEE. Os parâmetros cinéticos encontrados neste experimento foram $\Delta H = -11,45$ Kcal/mol; $K_M = 4$ μM; $k_{cat} = 16$ s⁻¹. K_i devido à benzamidina nestas condições foi de 16 μM. Figura adaptada da referência (17)..... 63

FIGURA 12 - Diagrama para um típico DSC usado para o estudo térmico de soluções diluídas de biomoléculas. Figura adaptada da referência (63)..... 67

FIGURA 13 - Imagem da tela do computador durante um experimento de DSC onde as celas foram preenchidas com solução tampão. Na figura acima podemos ver como é feita a aquisição de dados durante um experimento de DSC. A diferença de potência entre as celas no eixo Y (DP em mcal/min) é registrada em função da temperatura..... 68

FIGURA 14 - Termograma obtido de uma solução da proteína ubiquitina na concentração de 5 g dm⁻³. A taxa de aquecimento foi de 60oC h⁻¹. No diagrama é possível verificar as definições de T_m e ΔC_p . Figura adaptada da referência (62)..... 69

FIGURA 15 - Protocolo típico para experimentos de DSC. Figura adaptada da referência (62)..... 70

FIGURA 16 - Diagrama esquemático de um experimento de PPC. A figura representa o tempo t em que a cela permanece em determinada temperatura T, a variação de pressão aplicada sobre a cela durante este tempo t e, ainda, o sinal obtido durante este processo. Figura adaptada da referência (6)..... 72

FIGURA 17 - Experimento de PPC de água versus água realizada a 10°C..... 74

- FIGURA 18 -** Estimava da concentração micelar crítica do surfactante SDS por ITC à 25 °C. (A) Dados não tratados da potência térmica em função do tempo durante múltiplas injeções. Alíquotas de 10 µL de uma solução de SDS (50 mM) foram injetadas dentro da cela de amostra contendo tampão (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0). (B) Calor observado de cada injeção em função da concentração de SDS dentro da cela de amostra do calorímetro. (C) Primeira derivada da isoterma obtida no gráfico B. O mínimo neste gráfico é tomado como sendo o valor da CMC para SDS nas condições acima citadas..... **78**
- FIGURA 19 -** Estimava da concentração micelar crítica do surfactante CTABr por ITC à 25 °C. (A) Dados não tratados da potência térmica em função do tempo durante múltiplas injeções. Alíquotas de 10 µL de uma solução de CTABr (2 mM) foram injetadas dentro da cela de amostra contendo tampão (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0). (B) Calor observado de cada injeção em função da concentração de CTABr dentro da cela de amostra do calorímetro. (C) Primeira derivada da isoterma obtida no gráfico B. O mínimo neste gráfico é tomado como sendo o valor da CMC para CTABr nas condições acima citadas..... **79**
- FIGURA 20 -** Determinação do valor da entalpia aparente (ΔH_{ap}) da catálise do catecol em ácido cis-cis-mucônico realizada a 25 °C..... **83**
- FIGURA 21 -** Experimento de cinética enzimática por calorimetria a 25 °C. A figura acima mostra que a atividade catalítica (refletida pela potência térmica) atinge um máximo por volta de 600 segundos seguido de um decréscimo a partir daquele ponto em diante..... **84**

- FIGURA 22** - Curva cinética da catálise do catecol em ácido cis-cis-mucônico realizada a 25 °C. A velocidade de reação foi calculada através da equação 6 usando-se os dados da Figura 21. Podemos ver claramente na figura acima que a atividade catalítica de Pp 1,2-CCD sofre um decréscimo quando a concentração de substrato dentro da cela atinge cerca de 25 μM. A figura acima mostra ainda o ajuste dos pontos utilizando a equação 3 de Michaelis-Menten (____) e também o ajuste dos pontos utilizando a equação 19 (____), onde levamos em consideração um termo de inibição..... **85**
- FIGURA 23** - Experimento de cinética enzimática por calorimetria a 25°C. O experimento acima foi otimizado de modo que a duração do experimento fosse cerca de 600 segundos..... **86**
- FIGURA 24** - Curva cinética da catálise do catecol em ácido cis-cis-mucônico realizado a 25 °C. Neste segundo experimento, a concentração de substrato dentro da cela foi menor que 25 μM, ou seja, a concentração limite onde o decréscimo da atividade catalítica tornou-se aparente..... **86**
- FIGURA 25** - Gráfico de duplos recíprocos mostrando o inverso da velocidade de reação em função do inverso da concentração de substrato. Os pontos referem-se aos dados cinéticos da Figura 24. O ajuste dos pontos por uma parábola ($y = 72893,53049 + 71,51379 x + 0,43516 x^2$) é um indicativo forte de que a inibição esteja ocorrendo desde o começo da reação enzimática..... **87**
- FIGURA 26** - Conversão completa de catecol em ácido cis-cis-mucônico. O painel superior mostra o calor produzido por três injeções de 3 μL de uma solução de 50 mM de catecol dentro da cela de amostra contendo 600 nM de enzima. O painel inferior mostra a área integrada sob cada pico. Os valores encontrados são o calor total de conversão do catecol em substrato, ou seja, ΔH_{ap} **90**

- FIGURA 27** - Desenovelamento da Pp 1,2-CCD na presença de ácido cis-cis-mucônico. Vemos que a temperatura de transição T_m do desenovelamento de Pp.1,2-CCD desloca-se para temperaturas menores quando a razão entre proteína/ácido diminui. A figura mostra ainda que quando a razão proteína/ácido é igual a 10, a variação de temperatura vale $\Delta T_m = 2,4$ oC..... **91**
- FIGURA 28** - Regressão linear para determinação da constante de ligação do ácido cis-cis-mucônico à Pp 1,2-CCD (Equação 21). O comportamento linear mostra que as aproximações feitas são válidas..... **92**
- FIGURA 29** - Espectro de RPE do íon Fe^{3+} localizado no sítio ativo da Pp 1,2-CCD. Vemos que o sinal de RPE diminui conforme aumentamos a concentração de ácido cis-cis-mucônico na amostra..... **93**
- FIGURA 30** - Espectros de RPE dos marcadores: (A) CAT-16, (B) 5-SASL, (C) 12-SASL e (D) 16-SASL incorporados em micelas de SDS na ausência e presença de 0,125 mM de Pp 1,2-CCD em tampão Tris-HCl (20mM Tris, 50mM NaCl, pH 8,0). A concentração final de SDS foi 5 mM, contendo 0,5 mol% de cada marcador de spin..... **96**
- FIGURA 31** - Espectros de RPE dos marcadores: (A) CAT-16, (B) 5-SASL, (C) 12-SASL e (D) 16-SASL incorporados em micelas de CTABr na ausência e presença de 0,025 mM de Pp. 1,2-CCD em tampão Tris-HCl (20mM Tris, 50mM NaCl, pH 8,0). A concentração final de CTABr foi 1 mM, contendo 0,5 mol% de cada marcador de spin..... **97**
- FIGURA 32** - Anisotropia do espectro de RPE do marcador de spin sob várias condições: (A) limite rígido – rotação em torno do eixo z somente, (B) aumento na amplitude de movimento devido à inclinação e oscilação das cadeias lipídicas na bicamada, e (C) movimento isotrópico rápido. Figura adaptada de (82)..... **99**
- FIGURA 33** - Variação da mobilidade do meio ambiente ao redor dos marcadores de spin na região polar e ao longo da cadeia acil do ácido esteárico em micelas de SDS..... **102**

FIGURA 34 -	Variação da mobilidade do meio ambiente ao redor dos marcadores de spin na região polar e ao longo da cadeia acil do ácido esteárico em micelas de CTABr.....	102
FIGURA 35 -	Representação esquemática de uma cuba de Langmuir utilizada para as medidas da isoterma de pressão superficial. Figura adaptada da referência (27).....	104
FIGURA 36 -	Representação esquemática de uma isoterma de pressão superficial (π -A).....	104
FIGURA 37 -	Cinética de adsorção de Pp1,2-CCD em monocamadas de DPPC (A) na interface sem lipídios e (B) a diferentes níveis de empacotamento de lipídios.....	106
FIGURA 38 -	Adsorção de Pp12-CCD em monocamadas de DPPC. Foi usada a aproximação de Magett-Dana para analisar o processo de adsorção desta proteína à interface de lipídios.....	109
FIGURA 39 -	Isoterma π -A de monocamada de DPPC em solução tampão e na presença de Pp 1,2-CCD.....	112
FIGURA 40 -	Transição de fase de Pp 1,2-CCD determinada por DSC. A velocidade de aquecimento foi configurada em 60°C/h e a quantidade de proteína dentro da cela de amostra foi de 25 mM.....	114
FIGURA 41 -	Transições de fase de vesículas lipídicas de DMPC. O evento 1 refere-se à chamada pré-transição surgida da conversão da fase gel tilted ($L_{\beta'}$) para a fase gel ripple ($P_{\beta'}$) e o evento 2, denominado de transição principal, surge da conversão da fase $P_{\beta'}$ para a fase líquido-cristalino (L_{α}). Figura adaptada da referência (97).....	114
FIGURA 42 -	Transição de fase de vesículas multilamelares de DMPC na ausência (—) e na presença (—) de Pp 1,2-CCD determinada por DSC. A velocidade de aquecimento foi configurada para ser 60°C/h e a razão molar lipídio/proteína usada foi de 31.....	115

- FIGURA 43** - Coeficiente de dilatação térmica em função da temperatura da transição de fase de vesículas multilamelares de DMPC na ausência (●●●●) e na presença (●●●●) de Pp 1,2-CCD determinada por PPC. A razão molar lipídio/proteína usada foi de 31..... **117**
- FIGURA 44** - Espectro de RPE do marcador 5-PC (fosfatidil colina) em vesículas multilamelares de DPPC na ausência (___) e presença (___) de Pp1,2-CCD. A razão molar lipídio/proteína foi de 40, contendo 0,5 mol% de cada marcador de spin..... **119**
- FIGURA 45** - Espectro de RPE do marcador 5-PC (fosfatidil colina) em vesículas multilamelares de DMPC na ausência (___) e presença (___) de Pp1,2-CCD. A razão molar lipídio/proteína foi de 40, contendo 0,5 mol% de cada marcador de spin..... **119**
- FIGURA 46** - Regulação da expressão gênica pela insulina. A via de sinalização pela qual a insulina regula a expressão de genes específicos envolve uma cascata de proteínas quinases cada uma ativando a seguinte. O receptor da insulina é uma Tirosina quinase específica, as outras quinases (todas mostradas em azul) fosforilam resíduos de Ser e Thr. MEK é uma quinase de dupla especificidade, que fosforila tanto um resíduo de Thr quanto um de Tyr em MAPK. MAPK é às vezes chamada de ERK (“extracellular regulated kinase”). Figura adaptada da referência (55)..... **124**
- FIGURA 47** - Diagrama esquemático da região N-terminal do domínio SH2 de SH-PTP2 complexada com um peptídeo derivado da Tyr895 de IRS-1. Figura adaptada da referência (104). **127**
- FIGURA 48** - Domínio SH3 do complexo protéico Grb2/Sem-5 complexado com peptídeo de motivo PxxP. Figura adaptada da referência (104)..... **128**
- FIGURA 49** - Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% das etapas de purificação de p52SHC. (1) marcadores; (2) pellet; (3) coluna Thalon; (4) coluna de troca iônica Q-Sefarose; (5,6) coluna de gel filtração SuperDex 75..... **132**

FIGURA 50 - Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% das etapas de purificação de FGFR2 Quinase:(1) marcadores; (2) coluna Thalon; (3) coluna de troca iônica Q-Sefarose; (4-14) coluna de gel filtração SuperDex 75.....	134
FIGURA 51 - Velocidade inicial versus concentração de substrato típico para uma enzima cooperativa. Figura adaptada da referência (56).....	135
FIGURA 52 - Representação esquemática da interação sequencial do substrato com uma enzima cooperativa de quatro sítios. A ligação de um dos substratos altera a afinidade do outro sítio ativo da enzima pelo substrato (56).....	135
FIGURA 53 - Simulação de um experimento hipotético para enzimas cooperativas onde o parâmetro que está sendo variado é o índice n . Note que para $n=1$, a equação de Hill transforma-se na equação de Michaelis-Menten. Figura adaptada da referência (56).....	136
FIGURA 54 - Simulação de um experimento hipotético para enzimas cooperativas onde o parâmetro que está sendo variado é o índice k' e o índice n foi fixado em $n=2$. Figura adaptada da referência (56).....	136
FIGURA 55 - Experimento da cinética de autofosforilação de FGFR2 quinase realizado por ITC a 15°C. A isoterma acima é composta por dois processos. O primeiro é endotérmico e está relacionado ao calor de diluição do ATP após injeção dentro da cela seguida por um processo exotérmico referente ao processo de autofosforilação da FGFR2 quinase.....	141
FIGURA 56 - Cinética de auto-fosforilação de FGFR2 quinase realizada a 15 oC. Podemos ver nesta figura um comportamento cinético que se assemelha aos processos cinéticos apresentados por enzimas cooperativas.....	142
FIGURA 57 - Alinhamento das seqüências primárias de FGFR2 e FGFR1 quinases mostrando que no domínio quinase todos os resíduos de tirosinas são conservados, além de mostrar o alto grau de indentidade deste domínio em ambas as proteínas. O sitio ativo das proteínas estão localizados nas posições 653 e 654.....	143

- FIGURA 58** - Ensaio de Western Blot mostrando que FGFR2 quinase foi fosforilada após o experimento de cinética. (1) a fração de quinase que foi tratada com CIP antes do experimento cinético, (2) fração de quinase antes do tratamento com CIP. As bandas (4) e (6) representam alíquotas em duplicata de quinase logo após a realização do experimento de autofosforilação, enquanto que as bandas (3) e (5) são os seus respectivos controles..... **145**
- FIGURA 59** - Interação entre FGFR2 quinase e p52Shc por ITC. No painel acima é mostrado a variação de potência gerada após cada injeção de Shc em quinase. No painel abaixo é mostrado o calor gerado após cada injeção. Os dados acima foram ajustados segundo o modelo de um sítio de ligação..... **147**
- FIGURA 60** - Cinética de fosforilação de p52Shc mediada por FGFR2 quinase realizada na temperatura de 10 oC. No painel superior vemos a variação da potência térmica instrumental após injeção de 10 µL de ATP à 25 mM dentro da cela de amostra contendo 0,1 µM FGFR2 quinase e 10µM p52Shc. No painel inferior vemos a curva cinética calculada da isoterma acima juntamente com melhor ajuste usando-se o modelo de Michaelis-Menten para este caso..... **149**
- FIGURA 61** - Cinética de fosforilação de p52Shc mediada por FGFR2 quinase realizada na temperatura de 15 oC. No painel superior vemos a variação da potência térmica instrumental após injeção de 10 µL de ATP à 25 mM dentro da cela de amostra contendo 0,1 µM FGFR2 quinase e 10µM p52Shc. No painel inferior vemos a curva cinética calculada da isoterma acima juntamente com melhor ajuste usando-se o modelo de Michaelis-Menten (___) sobreposto ao modelo de Hill (___)..... **150**
- FIGURA 62** - Cinética de fosforilação de p52Shc mediada por FGFR2 quinase realizada na temperatura de 20 oC. Podemos notar que não é possível ajustar os dados segundo o modelo de Michaelis-Menten (___). No entanto, podemos ver um bom ajuste dos dados pelo modelo de Hill (___)..... **151**

FIGURA 63 - Variação de ΔH em função da temperatura durante a fosforilação de 10 μ M de Shc.....	152
FIGURA 64 - Western blot referente à cinética de fosforização de p52Shc mediada por FGFR2 quinase.....	154

Lista de Tabelas

Tabela 1-	Parâmetros de mobilidade e polaridade do meio ambiente ao redor dos marcadores de spin localizados na região polar e ao longo da cadeia acil do ácido esteárico em micelas de SDS e CTABr.....	100
Tabela 2-	Constantes de velocidade para adsorção de Pp1,2-CCD em monocamadas de DPPC.....	110
Tabela 3-	Valores de elasticidade dilatacional superficial (E) de monocamada de DPPC na presença e ausência de Pp1,2-CCD em função da pressão superficial.....	113
Tabela 4-	Dados termodinâmicos obtidos da transição de fase das vesículas de DMPC_M multilamelar e vesículas de DMPC_U unilamelar na ausência e presença de Pp1,2-CCD.....	116

Lista de Abreviações e Siglas

[E]	Concentração de enzima
[S]	Concentração de substrato
ΔC_p	Variação da capacidade térmica molar a pressão constante
ΔT_m	Variação da temperatura de transição
12-SASL	12-doxil ácido esteárico
16-PC	1-palmitoil-2-(16-doxil esteaoril) fosfatidilcolina
16-SASL	16- doxil ácido esteárico
5-PC	1-palmitoil-2-(5-doxil esteaoril) fosfatidilcolina
5-SASL	5-doxil ácido esteárico
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CAT-16	4-(N,N-dimetil-N-hexadecil) amônio-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil iodido
CH1	“Collagen Homology 1”
CTABr	Hexadecil trimetil brometo de amônio
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fostatidilcolina
DMPG	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fostatidilcolina
DSC	Calorimetria de Varredura Diferencial
DTT	Ditiotreitol
ES	Complexo enzima-substrato
ESC	Complexos de sinalização primários (<i>early signalling complexes</i>)
FGFR2	<i>Fibroblast Grow Factor Receptor</i>

h_{+1}/h_0	Razão entre as amplitudes das linhas de campo baixo e central
HCl	Ácido Clorídrico
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
k_{cat}	Constante catalítica
K_i	Constante de Inibição
K_M	Constante de Michaelis
LB	Luria Brough
LUV	Vesículas unilamelares grandes (<i>Large unilamellar vesicles</i>)
L_α	Fase lamelar líquido-cristalino
$L_{\beta'}$	Fase gel lamelar <i>tilted</i>
MLV	Vesícula Multilamelar (<i>multilamellar vesicles</i>)
NaCl	Cloreto de Sódio
NBL	coluna cromatográfica de quitina
Pp1,2-CCD	Clorocatecol 1,2-dioxigenase de <i>Pseudomonas putida</i>
PPC	Calorimetria de Perturbação de Pressão
PTB	Domínio de ligação a fosfotirosina (<i>Phosphotyrosine Binding Domain</i>)
$P_{\beta'}$	Fase gel lamelar <i>ripple</i>
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS
SH2	Homologia 2 a Src (<i>Src Homology 2</i>)
Shc	Homologia a Src do tipo colágeno (<i>Src homology collagen-like</i>)
T_m	Temperatura de transição (<i>melting temperature</i>)

Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
u. a.	Unidade arbitrária
UV	Ultra violeta
v_0	Velocidade inicial da catalise enzimática

Sumário

Introdução Geral.....	39
A enzima Clorocatecol 1,2-dioxigenase de <i>Pseudomonas putida</i>	45
1.1 Introdução.....	47
1.2 Materiais e métodos	51
1.2.1 Expressão e purificação de Pp 1,2-CCD	51
1.2.2 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	52
1.2.3 Cinética enzimática por ITC.....	55
1.2.3.1 Considerações práticas	59
1.2.3.2 O Método das Múltiplas Injeções.....	60
1.2.3.3 Método da Injeção Única	62
1.2.3.4 Condições experimentais do ensaio enzimático por ITC.....	64
1.2.3.5 Determinação da entalpia aparente da reação enzimática (ΔH_{ap}).....	64
1.2.3.6 Ensaio de inibição por produto	65
1.2.4 Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC).....	66
1.2.4.1 Condições do experimento de DSC da interação entre Pp 1,2-CCD e ácido cis-cis-mucônico.....	71
1.2.5 Calorimetria de perturbação por pressão (PPC).....	71
1.2.5.1 Condições do experimento de PPC da interação de Pp 1,2-CCD com modelos de membranas	75
1.2.6 Experimento por RPE do íon Fe^{3+}	76
1.2.7 Preparo de micelas para experimentos de RPE	77
1.2.8 Preparo de Lipossomos para experimentos de RPE, DSC e PPC	80
1.2.9 Experimento de RPE com micelas e lipossomos	81
1.2.10 Experimentos de monocamadas de Langmuir	81
1.2.11 Elasticidade dilatacional superficial	82
1.3 Resultados e discussão.....	83
1.3.1 Interação da Pp 1,2-CCD com seus ligantes naturais	83
1.3.2 Interação de Pp.1,2-CCD com micelas, monocamadas e lipossomos	95
A Tirosina Quinase FGFR2	121
2.1 Introdução.....	123
2.2 Materiais e Métodos	131

2.2.1	Expressão e purificação de p52Shc	131
2.2.2	Expressão e purificação de FGFR2 Quinase	132
2.2.3	Cinética Enzimática e equação de Hill.....	134
2.2.4	Calorimetria por Titulação Isotérmica (ITC)	137
2.2.5	Análise da fosforilação por Western blotting.....	138
2.3	Resultados e discussão	140
	Conclusões Gerais e Perspectivas.....	157
	REFERÊNCIAS.....	163

Introdução Geral

Um dos principais objetivos da bio-físico-química contemporânea é conseguir entender as bases moleculares dos fenômenos de especificidade e reconhecimento entre proteínas e ligantes. Proteínas podem reconhecer e ligar-se de forma reversível a pequenas moléculas alvo de baixo peso molecular, outras macromoléculas e a estruturas supramoleculares. Sendo assim, a caracterização destas interações consiste em investigar a inter-correlação entre função, estrutura, cinética e energia do sistema sob condições físico-químicas bem definidas (1).

Interações entre proteína-proteína, proteína-ligante e proteína-lipídio são apenas alguns exemplos de sistemas biológicos onde uma grande variedade de métodos experimentais é usada para a determinação direta e indireta de quantidades dinâmicas e termodinâmicas que governam o processo de interação destas biomoléculas (2-9). Uma vez que praticamente todas as reações químicas envolvem mudanças na entalpia, as técnicas calorimétricas são de aplicabilidade universal na determinação dos parâmetros termodinâmicos de uma reação com grande precisão. As principais técnicas calorimétricas disponíveis hoje são calorimetria de titulação isotérmica (ITC), calorimetria de varredura diferencial (DSC) e calorimetria de perturbação por pressão (PPC), sendo que, com estas técnicas, é possível atualmente se medir diretamente as variações de entalpia devido às interações de quase todos os processos biológicos (1, 9, 10) e dentro de certos limites, dependendo do arranjo experimental, esses métodos podem, ainda, ser usados para se obter a constante de equilíbrio da reação de ligação K_B , a estequiometria de ligação de n moléculas (10, 11), parâmetros relacionados à compressibilidade e expansão de macromoléculas durante uma transição (6, 9-12) e parâmetros cinéticos tradicionais K_M e k_{cat} , importantes para catálise enzimática (2, 13-18). Com a calorimetria também é possível se traçar o perfil termodinâmico de uma reação de ligação de uma proteína ao seu ligante, incluindo a variação da energia livre ΔG^0 e entropia ΔS^0 (1).

Dentre os problemas biológicos acima citados podemos destacar o uso de ITC para o estudo de reações catalisadas por enzimas. O uso desta técnica aumentou bastante nos últimos anos e isso foi possível devido aos avanços no desenvolvimento dos instrumentos hoje disponíveis. Estudos pioneiros envolvendo o uso de técnicas calorimétricas em tais reações foram realizados pelo grupo do Prof. Julian Sturtevant (Yale University), cujas contribuições nesta área datam do começo dos anos 50. Alguns anos depois, Sturtevant publicou uma série de investigações calorimétricas de reações orgânicas, mostrando que calorimetria é uma técnica poderosa para monitorar cinética de reações (13).

Outras técnicas que podemos destacar no estudo de sistemas de interesse biológico são Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e a técnica das monocamadas de Langmuir. Estas duas técnicas foram usadas neste trabalho para monitorar a interação de uma proteína com modelos de membranas.

A aplicabilidade de RPE é bastante diversa (19-21), mas aqui destacamos sua utilização como uma ferramenta altamente sensível no monitoramento de espécies paramagnéticas presentes durante a interação proteína com modelos de membrana e proteína com ligante. Uma vez que a ocorrência de espécies paramagnéticas naturais em sistemas biológicos é baixa, um recurso muito utilizado para contornar este problema é incorporar um marcador de spin no sistema biológico de interesse. Na maioria das vezes este marcador de spin é uma molécula orgânica que possui um radical livre em sua estrutura e para ser eficiente é importante que possua as seguintes características: 1) o radical precisa ser estável o suficiente frente às diversas condições de pH, temperatura e a concentração de sal normalmente encontradas em sistemas biológicos; 2) o marcador precisa possuir propriedades físicas únicas e distintas do sistema biológico de interesse e 3) o marcador de spin, uma vez incorporado, não deve interferir ou interferir muito pouco na estrutura do sistema de interesse, seja uma proteína ou um modelo de membrana. O marcador de spin mais comumente usado é radical nitróxido (N-O) que liga-se covalentemente a uma molécula repórter, como um fosfolípido no caso de estudos envolvendo membranas biológicas ou um resíduo de cisteína no caso de estudos estruturais de proteínas (19, 20). Uma vez incorporados, os marcadores de spin serão capazes de dar informações importantes do ambiente físico-químico em que estas moléculas se encontram, como, polaridade do meio, viscosidade, estrutura e ordenamento do meio e também restrição ao seu movimento (19, 20, 22-24).

As monocamadas de Langmuir são originalmente uma técnica útil para estudos da interação em arranjos bidimensionais de moléculas anfipáticas, no entanto esta pode ser usada com grande versatilidade como modelo de membrana no estudo das interações de lipídios com moléculas e macromoléculas diversas. Por se tratar de uma meia membrana propriamente dita, esta se mostra muito útil quando os processos de interação ocorrem na superfície do modelo de membrana (não sendo quando os processos de interação atingem níveis transmembrana). Utilizando composições de lipídios diversos, é possível por meio desta técnica, variar de uma maneira controlada a densidade de fosfolípídios contidos em uma área bem definida, e a dinâmica das interações entre estas moléculas é monitorada via medidas de pressão superficial (25-27). Uma vez que a pressão superficial está relacionada com a variação do empacotamento dos lipídios que formam a monocamada, a presença de ligantes ao sistema deve mudar sensivelmente este parâmetro devido à adsorção destes ligantes na monocamada.

Problemas em Biofísica Molecular requerem muito comumente uma abordagem que integre diversas técnicas experimentais e/ou teóricas a fim de se obter a maior quantidade de informação possível de um sistema complexo como uma macromolécula biológica e seus ligantes. Sendo assim, o presente trabalho de tese está dividido em duas partes que

encontram coesão quando vistas sob a luz do entendimento de processos reacionais catalisados por enzimas e cuja investigação envolveu a supracitada abordagem multitécnicas. Este trabalho também foi o primeiro de nosso grupo onde se fez uso mais intensivo das técnicas calorimétricas e, por isso, é dada especial atenção a sua descrição em um dos capítulos subseqüentes.

Na primeira parte, utilizamos ITC como técnica padrão para estudar a reação enzimática catalisada por clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida* (Pp 1,2-CCD) frente ao substrato catecol. Os resultados obtidos mostraram que a atividade catalítica de Pp 1,2-CCD foi influenciada pela quantidade de produto formado, o que nos levou a investigar o papel que o produto desta reação, ácido cis-cis-mucônico, exerce no processo catalítico. Para isso, utilizamos DSC para medir a estabilidade térmica de Pp 1,2-CCD na presença do produto da reação e RPE para investigar a interação do produto com o sítio catalítico de Pp 1,2-CCD. Com a resolução da estrutura de alguns membros da família das dioxigenases (28-32), descobriu-se que estas proteínas possuíam uma densidade eletrônica na região de interface dos monômeros que era compatível com a densidade eletrônica de um fosfolípido, levantando então a hipótese de que proteínas desta família seriam capazes de interagir com membranas. Sendo assim, utilizamos as técnicas de DSC, RPE e monocamadas de Langmuir para testar essa hipótese em Pp 1,2-CCD, que atualmente não possui estrutura resolvida.

A segunda parte de estudos adicionada a este trabalho se refere ao período de doutorado sanduíche realizado na Universidade de Londres (UCL-*University College London*), onde estudamos a especificidade da sinalização mediada por uma tirosina quinase. Sabe-se que a fosforilação reversível da cadeia lateral de aminoácidos de Tyr é um princípio de regulação da atividade de enzimas e de sinalização de proteínas largamente utilizado pelas células (33) e por meio desta função, proteínas quinases, como FGFR2 quinase, exercem um papel fundamental na regulação do metabolismo celular, expressão gênica, crescimento, divisão e diferenciação celular. As FGFs tornam-se ativas pela autofosforilação dos resíduos de Tyr localizados em seu sítio ativo e este processo leva à subseqüente autofosforilação de outros resíduos de Tyr localizados fora de seu sítio ativo. Este último passo é responsável pelo recrutamento de proteínas importantes para sinalização celular, como Shc (34, 35). Shc é, por sua vez, uma proteína adaptadora importante para a formação dos chamados complexos de sinalização primários (*early signalling complexes-ESC*) (36). Esta proteína é formada por um domínio de ligação para fosfotirosinas (PTB-*Phosphotyrosine Binding Domain*) em sua região N-terminal, um domínio com homologia ao colágeno 1 (CH1-Collagen Homology) na região central da proteína com 3 sítios de fosforilação (Tyr) e um domínio SH2 (Src Homology 2) na região C-terminal (2). Sabemos que Shc interage com quinase via domínio PTB e que seu domínio SH2

permanece inativo para interação com outras proteínas até que o domínio CH1 seja fosforilado (36). Por isso, acreditamos que a caracterização deste sistema no que diz respeito à interação e à cinética de fosforilação de tanto de FGFR2 quanto de p52Shc torna-se importante para o entendimento dos mecanismos de ação destas proteínas, haja vista que, a sinalização anormal mediada por este sistema está relacionada a múltiplas displasias humanas e alguns tipos de câncer (34, 35). Sendo assim, utilizamos neste trabalho ITC para acessar com sucesso a cinética de autofosforilação da FGFR2 quinase e a cinética de fosforilação da proteína p52Shc humana mediada por FGFR2 quinase (36-39).

A enzima Clorocatecol 1,2-dioxigenase
de *Pseudomonas putida*

1.1 Introdução

Pseudomonas putida é uma bactéria gram-negativa, capaz de crescer em uma grande variedade de substratos orgânicos. Esta bactéria vive no solo ou na água e exerce um papel importante em processos tais como: decomposição, biodegradação e nos ciclos do carbono e nitrogênio. Este organismo apresenta uma considerável diversidade metabólica, pois se utiliza de uma grande variedade de fontes de carbono, incluindo moléculas que poucos outros organismos são capazes de degradar. Devido à sua capacidade altamente especializada, esta bactéria tornou-se relevante em processos de bioremediação (40).

Dentre as enzimas responsáveis pela diversidade metabólica de *P. putida*, a enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase (Pp 1,2-CCD) catalisa a clivagem de compostos aromáticos que são o resultado de diferentes vias de degradação daquilo que se convencionou chamar de funil metabólico (41, 42). A reação catalisada por Pp 1,2-CCD envolve a ativação de uma molécula de oxigênio seguida pela incorporação dos átomos desta molécula ao substrato (43, 44), que pode ser tanto o catecol quanto um de seus vários derivados (Figura 1). No caso de Pp 1,2-CCD e outras enzimas que pertencem à família das dioxigenases intradióis (Figura 2), os compostos aromáticos são clivados entre os dois grupos hidroxil encontrados na estrutura do catecol (45).

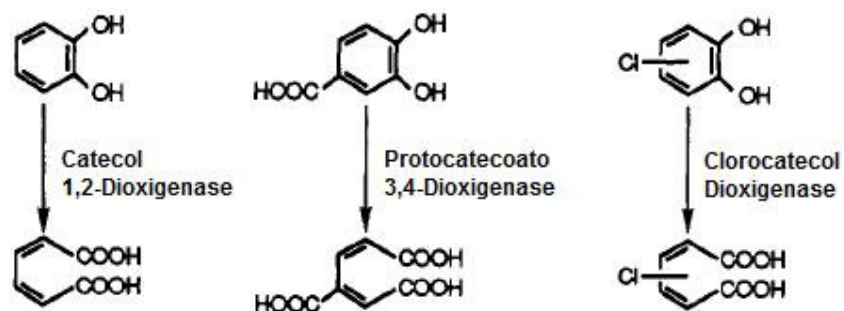


Figura 1 – Esquema das reações catalisadas por enzimas da família das dioxigenases intradióis. Adaptada da referência (46).

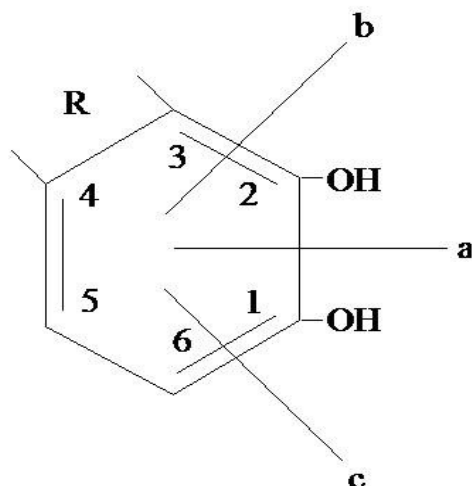


Figura 2 – Representação da molécula de catecol mostrando as três maneiras que a fissão do anel benzênico pode ocorrer: (a) clivagem intradiol, (b) clivagem extradiol proximal e (c) clivagem extradiol distal. R representa os radicais que podem ligar-se à molécula, tal qual o íon cloro.

As estruturas tridimensionais de alguns membros da família das catecol 1,2-dioxygenase (1,2-CTD) foram determinadas recentemente: 1,2-CTD de *Acinetobacter calcoaceticus* (Ac 1,2-CTD) (47) e 1,2-CCD de *Rhodococcus opacus* 1CP (Rho 1,2-CCD) (29, 30). Os membros desta família são homodímeros que possuem um íon Fe^{3+} em seus sítios ativos (Figura 3), sendo que a coordenação esférica do íon ferro é formada por dois resíduos de tirosina, dois resíduos de histidina e um grupo hidroxil (Figura 4). Uma diferença notável em respeito à especificidade ao substrato foi observada quando as atividades de 1,2-CCD e 1,2-CTD foram comparadas. A primeira enzima é capaz de catalisar um intervalo muito maior de substratos do que a última (46), o que nos leva a crer que exista uma diferença estrutural fundamental entre os bolsões que formam os sítios catalíticos de 1,2-CCD e 1,2-CTD. Podemos, então, supor que o sítio de ligação ao substrato em 1,2-CCD provavelmente apresenta uma distribuição histórica e eletrônica que permite a acomodação do átomo de Cl presente na estrutura do substrato clorocatecol (48), de modo que, um sítio de ligação ao substrato de tamanho maior, deve ser o responsável pela capacidade de 1,2-CCD em catalisar outros derivados do catecol, como o metilcatecol (46, 48).

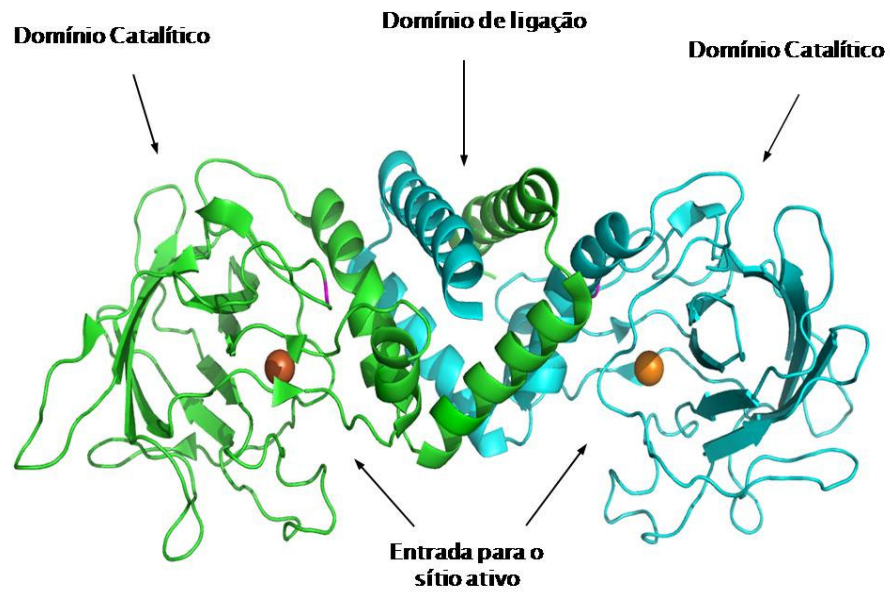


Figura 3 – Estrutura dimérica (αFe^{3+})₂ da Rho Clorocatecol 1,2-Dioxigenase. Na figura podem ser vistos os domínios catalíticos e de dimerização (ligação), bem como a entrada de acesso do substrato para o sítio ativo. Figura adaptada da referência (30).

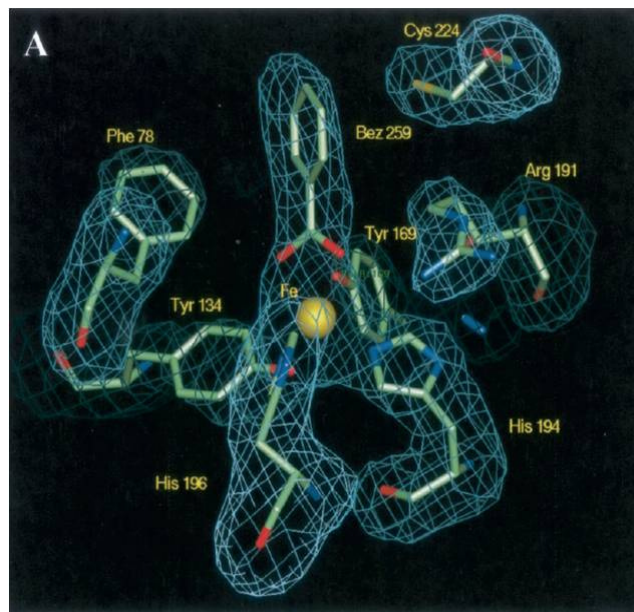


Figura 4 – Coordenação de resíduos do sítio catalítico de Rho 1,2-CCD. O sítio catalítico contém um núcleo de Fe^{3+} ligado a quatro resíduos: Tyr-134, Tyr-169, His-194 e His-196. Esta coordenação His_2Tyr_2 é típica para todas as dioxigenases intradióis. Figura adaptada da referência (30).

Além do interesse pelos mecanismos de ação básicos apresentados por essas enzimas, os altos níveis de lixo industrial, ricos em compostos aromáticos, que são jogados no meio ambiente continuamente, tornam 1,2-CCD e 1,2-CTD enzimas bastante atrativas em estratégias de engenharia de proteínas, que tem como objetivo produzir enzimas mais eficientes para aplicações em processos de biotecnologia (49, 50). Neste caso, Schlosrich e colaboradores relataram a existência de vários mutantes de uma dioxigenase extradiol que apresentaram atividade intradiol (50). Em outro estudo (49), Caglio e colaboradores publicaram com sucesso que, por meio de mutações específicas, as propriedades catalíticas de 1,2-CTD de *A. radioresistens* S13 foram ajustadas de forma a produzir não apenas enzimas com alta atividade catalítica e boa estabilidade, mas também enzimas cuja especificidade foi alterada de forma que a proteína passasse a catalizar também substratos clorados.

Outra característica marcante que surgiu com a determinação das primeiras estruturas da clorocatecol e catecol dioxigenases foi a presença de moléculas anfipáticas em um bolsão localizado perto da interface entre os monômeros que formam o dímero (28-32). Desta maneira, uma questão imediata que surge deste resultado é se as dioxigenases intradióis possuem a capacidade de se ligar a membranas biológicas. Em um trabalho anterior de nosso grupo, mostramos que a clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida* (Pp 1,2-CCD), objeto de estudo desta tese e cuja estrutura tridimensional ainda não é conhecida, também tem a capacidade de se ligar a monômeros do ácido esteárico e de fosfolípidios e que a presença destes diminui a atividade enzimática da proteína (28).

No presente trabalho, damos continuidade aos estudos de nosso grupo com a enzima Pp 1,2-CCD desta feita abordando duas questões ainda não entendidas: 1) o papel das moléculas que interagem com a enzima durante o ciclo de catálise enzimática (substrato e produto) e 2) a possível interação da Pp 1,2-CCD não somente com os monômeros de fosfolípidios, mas também com miméticos de membranas de interesse biológico. Para isso, nos valem de uma abordagem conjunta na qual utilizamos as técnicas de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC), Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC), Calorimetria de Perturbação por Pressão, (PPC) e a técnica de monocamadas de Langmuir.

1.2 Materiais e métodos

Nesta seção, apresentamos uma introdução sobre os conceitos fundamentais das técnicas em biofísica molecular empregadas no desenvolvimento de nosso trabalho de tese, com especial ênfase às técnicas de calorimetria já que se trata do primeiro trabalho de nosso grupo onde foi feito uso mais intensivo dessas metodologias.

1.2.1 Expressão e purificação de Pp 1,2-CCD

A proteína Pp 1,2-CCD de *Pseudomonas putida* foi expressa em *Escherichia coli* BL21(DE3) como descrito em (51). As células de *E. coli* contendo o plasmídeo pTYBCLCA foram usadas para preparar uma cultura de células (pré-inóculo) em meio LB (Luria Brough) contendo 100 µg/mL do antibiótico ampicilina. A quantidade de 10 mL do pré-inóculo foi diluída em 500 mL de meio LB, no qual foi adicionado previamente 0,25 g/L de FeSO₄·7H₂O mais 100 µg/mL de ampicilina. Estas células foram deixadas para crescer em incubadora sob agitação de 250 rpm na temperatura de 37°C. As células cresceram até que se atingisse densidade óptica em 600nm de 0,6. Nesta etapa, a expressão de Pp 1,2-CCD foi induzida pela adição de 0,3 mM IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) ao meio de cultura, seguida, de uma espera de 5 horas na temperatura de 22°C. Após este período, as células foram imediatamente colhidas por centrifugação a 4.000 x g na temperatura de 4 °C por 10 minutos. O “pellet” formado durante a centrifugação foi ressuscitado em 30 mL de tampão Tris-HCl (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM PMSF, pH 8.0), e lisado logo em seguida por sonicação. Os restos celulares provenientes do processo de sonicação foram separados do sobrenadante por centrifugação a 20.000 x g na temperatura de 4°C por 30 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi injetado em coluna de quitina (NBL) previamente equilibrada com o mesmo tampão utilizado para ressuscitar as células. A coluna de quitina foi então lavada com um volume do tampão anterior equivalente a 10 volumes da coluna e, subseqüentemente, com 2 volumes de tampão de clivagem (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 30 mM DTT, pH

8.0). Finalmente, a proteína eluída foi exaustivamente dialisada contra tampão de clivagem para remover DDT. A concentração da proteína recombinante foi determinada por absorção na região do UV (280 nm) usando o coeficiente de extinção molar teórico baseado na composição de aminoácidos da proteína em questão (52). A pureza foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% (53) (Figura 5). Catecol, substrato para a reação de desoxigenação, e ácido cis-cis-mucônico foram adquiridos de Sigma-Aldrich.

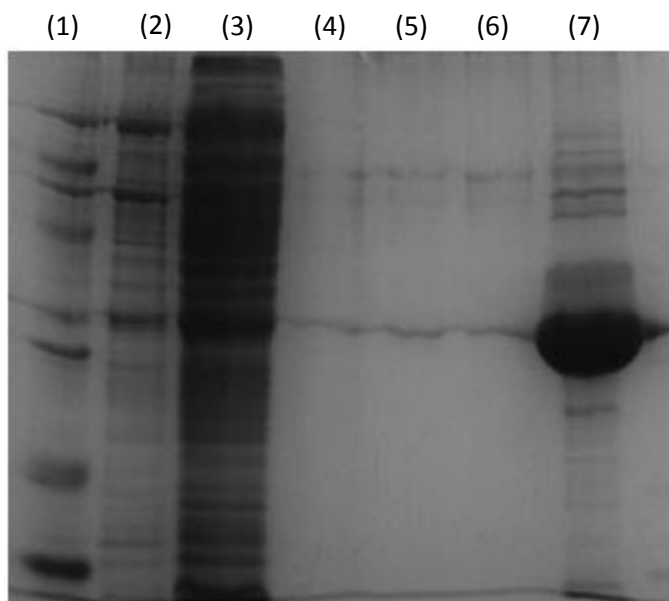


Figura 5 – Análise da purificação da enzima Pp 1,2-CCD por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page 15%: (1) padrão GE de massas moleculares; (2) pellet após sonicação e centrifugação; (3) extrato bruto - parte solúvel – após passar pela resina de purificação por afinidade; (4) lavagem com tampão de suspensão; (5) primeira eluição com tampão de clivagem e DTT – imediata; (6) segunda eluição com tampão de clivagem – após 12 horas de descanso; (7) proteína concentrada em tampão de clivagem.

1.2.2 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Até a década de 1970 todas as análises biocalorimétricas eram feitas majoritariamente em laboratórios equipados com calorímetros de construção própria. Foi apenas na década de 1980 que calorímetros, incluindo os calorímetros diferenciais de varredura (DSC) e o ITC, se tornaram comercialmente disponíveis. O termo “micro-calorímetro isotérmico” é comumente designado para calorímetros que trabalham na escala de micro-watts e o experimento é conduzido sob condições

essencialmente isotérmicas. Do ponto de vista do calor medido, podemos dividir os calorímetros em três principais grupos: adiabáticos, por condução de calor e por potência compensada (1). Aqui será tratado este último tipo de calorímetro.

Basicamente um equipamento de ITC consiste em duas celas idênticas (Figura 6) feitas de um material condutor de calor bastante eficiente (geralmente *Hasteloy*). Estas celas são envolvidas em uma câmara adiabática cujo resfriamento é feito usualmente por um banho de água circulante. Um circuito termo-sensível detecta as diferenças de temperatura entre as duas celas e a câmara. Aquecedores localizados em ambas as celas e também na câmara adiabática são ativados quando necessário para que todos os componentes envolvidos no experimento estejam na mesma temperatura.

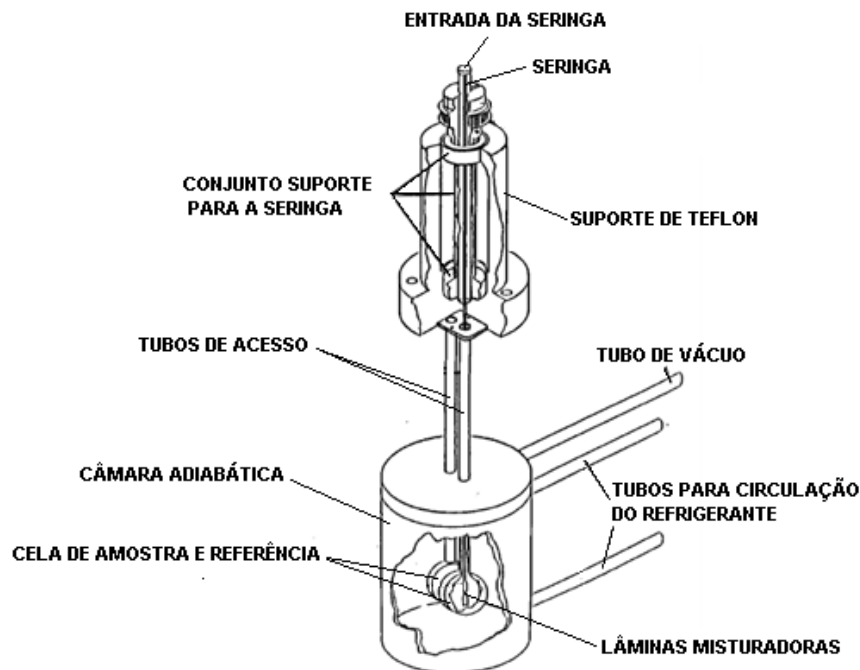


Figura 6 – Desenho da cela de amostra e referência, câmara adiabática e o conjunto injetor/misturador. Para se realizar um experimento abaixo da temperatura ambiente um líquido refrigerante (água) passa por canais nas paredes da câmara adiabática e uma bomba externa produz vácuo dentro da câmara para prevenir condensação. Figura adaptada da referência (10).

Durante um experimento de ITC, a cela de referência é preenchida com água ou solução tampão enquanto que a cela de amostra é preenchida com a solução de tampão contendo a macromolécula de interesse. Uma quantidade conhecida de potência térmica ($< 1 \text{ mW}$) é dissipada no aquecedor acoplado à cela de referência.

Este aquecimento na cela de referência ativa o outro aquecedor localizado na cela de amostra, que a aquece de modo que a diferença de temperatura ΔT entre as celas seja igual a zero. A solução tampão contendo o ligante é titulada dentro da cela de amostra por uma seringa de vidro de alta precisão. Esta seringa possui uma agulha de material inoxidável com pequenas pás em sua extremidade. A titulação é automatizada por um motor de passo controlado por computador que também faz a seringa girar a uma frequência constante enquanto ocorre a titulação da solução de ligante. Este procedimento ocorre a fim de se misturar rapidamente os reagentes. Durante a titulação, a reação entre os componentes vai liberar ou absorver calor, dependendo se a reação é exotérmica ou endotérmica, respectivamente. Para uma reação exotérmica, a temperatura na cela de amostra aumenta e a resposta do aquecedor acoplado nesta cela diminui a taxa de potência térmica fornecida de modo a manter o experimento em condições isotérmicas. Deste modo, a taxa de potência térmica, que é constantemente monitorada em função do tempo, sofre uma deflexão negativa indicando a quantidade de calor que o aquecedor deixou de fornecer para a cela de amostra. Por outro lado, se a reação entre os componentes é endotérmica, a temperatura dentro da cela de amostra diminui. O aquecedor então fornece calor para a cela de modo a compensar o calor absorvido durante a reação. Assim, a taxa de potência térmica observada sofre uma deflexão positiva indicando a quantidade de calor em função do tempo que foi fornecida para a cela de amostra a fim de manter as condições isotérmicas do experimento (1, 9-11). Para ilustrar, a Figura 7 a seguir mostra o “layout” de um experimento onde está sendo titulada água dentro da cela de amostra contendo água. Este procedimento é feito geralmente para se certificar que a cela de amostra está limpa.

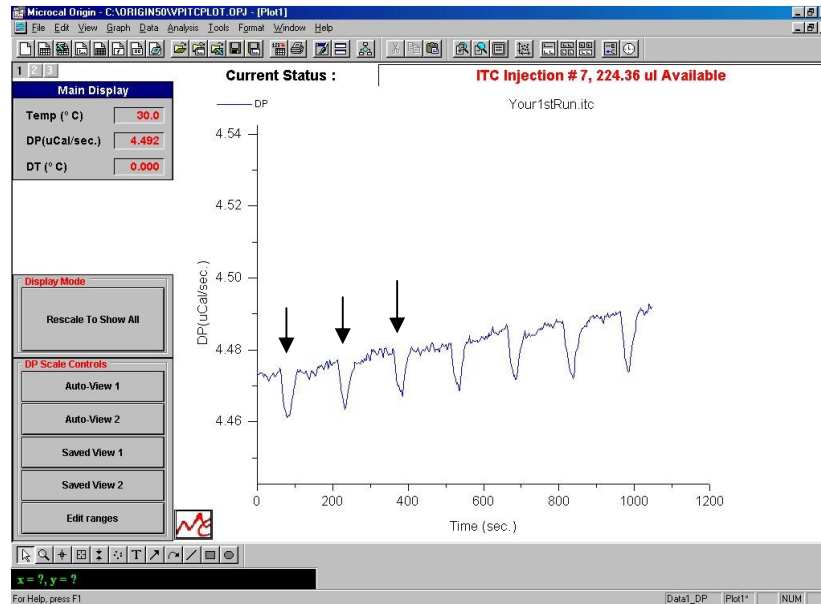


Figura 7 – “Layout” do experimento de titulação de água contra água para obtenção de linha de base. Neste experimento podemos verificar a notória sensibilidade no registro do calor de diluição da água em água a cada titulação. Podemos ver ainda que este calor de diluição é exotérmico, pois a cada titulação (setas) vemos uma deflexão negativa na potência térmica instrumental.

1.2.3 Cinética enzimática por ITC

Para se entender qualquer processo bioquímico é necessário se estudar as reações enzimáticas que caracterizam um sistema individualmente. A principal abordagem para se entender os mecanismos de uma reação catalisada por enzima é determinar a velocidade da reação e como ela varia em resposta às mudanças dos parâmetros experimentais (46, 54-57). A concentração de substrato $[S]$ é um importante fator de influência na taxa de uma reação catalisada por uma enzima. No entanto, é difícil se estudar os efeitos da concentração de substrato devido ao fato que sua concentração varia com o tempo no curso de uma reação em que este é convertido para produto. Para contornar este problema, uma abordagem simples é utilizada para medir a taxa inicial ou velocidade inicial, denominada por v_0 , onde a concentração de substrato, $[S]$, é muito maior que a concentração de enzima, $[E]$ (55, 57). Em um experimento típico, são utilizadas $[E]$ da ordem de nanomolar, enquanto $[S]$ deve ser 3-4 ordens de grandeza maior. Assim, o começo da reação pode ser monitorado de modo que nestas condições um percentual pequeno de $[S]$

(cerca de 5%) é consumido (2, 13-18, 46, 54, 56-59). O efeito da variação da concentração de substrato sobre v_0 , quando a concentração de enzima é constante, pode ser visto na Figura 8.

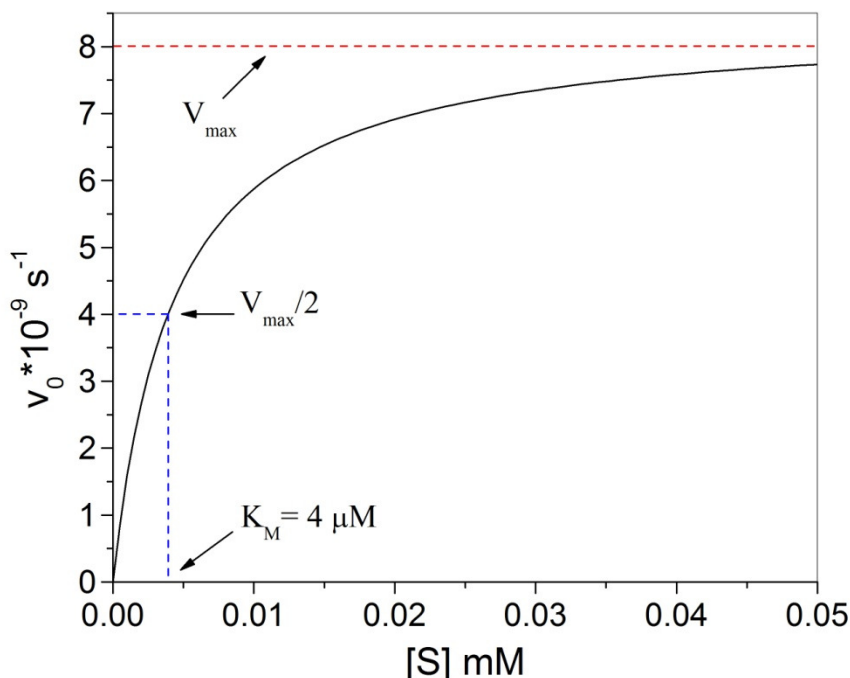


Figura 8 – Efeitos da concentração de substrato sobre a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima. Esta curva foi gerada pela equação de Michaelis-Menten implementada no programa MicroCal Origin 7.0. Os parâmetros foram escolhidos como segue: $K_M = 4,3 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 0,084 \text{ s}^{-1}$ e a concentração de enzima foi mantida fixa em 100 nM. Na concentração de substrato indicado pela linha azul, metade das moléculas de enzima está complexada ao substrato e a taxa da reação é exatamente metade da velocidade máxima v_{\max} .

Em concentrações relativamente baixas de substrato, a velocidade inicial da reação (v_0) aumenta quase que linearmente com o acréscimo de $[S]$. Em concentrações mais altas de $[S]$ esta velocidade aumenta cada vez menos até atingir uma região de “plateau” onde a velocidade inicial da reação é máxima (v_{\max}).

A chave para se entender este comportamento cinético está estritamente relacionada com a formação do complexo enzima-substrato (ES) da reação. O modelo cinético mostrado na Figura 8 levou grandes cientistas, como *Henri* e *Wurtz*, a proporem em 1903 que a combinação de uma enzima com seu substrato para formar o complexo ES é uma etapa necessária para catálise enzimática. Mais tarde em 1913, esta idéia foi expandida, por Leonor Michaelis e Maud Menten, em uma teoria geral para cinética de enzimas. Menten postulou que uma enzima

primeiramente se combina de forma reversível ao seu substrato para formar o complexo ES em um passo de reversibilidade relativamente rápido (Eq.1).



O complexo ES então se rompe em uma reação mais lenta para produzir enzimas livres e o produto P da reação (Eq.2).



Por ser mais lenta, a segunda reação limita a velocidade da reação como um todo, fazendo com que esta velocidade seja proporcional à concentração das espécies que reagem no segundo passo, ou seja, ES (54-57).

Em um dado instante de uma catálise enzimática, a enzima pode ser encontrada em duas formas, livre (ou forma não-combinada [E]) e na forma combinada ES. Com o aumento da concentração de substrato existem mais moléculas disponíveis para formar o complexo ES, pois o equilíbrio da equação 1 é favorável para a formação deste complexo. A velocidade inicial máxima (Figura 8) da reação é observada quando todas as moléculas de enzima estão virtualmente ligadas a moléculas de substrato (55, 57). Esta curva que relaciona a dependência das velocidades iniciais v_0 com a variação de [S] tem a mesma forma geral para a maioria das catálises enzimáticas e se aproxima de uma hipérbole retangular. Este comportamento pode ser expresso algebricamente pela equação de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} = \frac{k_{cat} \cdot [E_{total}] \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

A caracterização apropriada de uma enzima que segue o mecanismo de Michaelis-Menten consiste em se determinar a constante de Michaelis, K_M , e a taxa de conversão enzimática k_{cat} . A razão k_{cat}/K_M é uma medida da eficiência catalítica de uma enzima. Estes parâmetros são frequentemente determinados por um conjunto de experimentos que envolvem medidas ópticas ou eletroquímicas. Devido ao fato que a maioria dos substratos e/ou produtos não possuem propriedades úteis a estes métodos, os estudos enzimáticos são feitos muitas vezes utilizando substratos modificados ou ensaios enzimáticos acoplados. No entanto, o uso de tais estratégias pode acarretar em erros significativos na determinação dos parâmetros cinéticos k_{cat} e K_M (13). Virtualmente todas as reações químicas, incluindo aquelas catalisadas por enzimas, ocorrem com a liberação ou absorção de calor fazendo, deste modo, a

técnica calorimétrica de ITC muito útil para seu monitoramento (2, 13, 14, 16, 17, 59).

A taxa de uma reação enzimática é obtida através da mudança da potência térmica instrumental fornecida à cela de amostra decorrente do calor gerado ou absorvido após a adição de substrato ou enzima por uma seringa agitadora. Uma deflexão negativa na potência térmica instrumental será vista no caso da reação liberar calor (reação exotérmica) e uma deflexão positiva será vista na potência térmica instrumental no caso da reação absorver calor (reação endotérmica). Uma reação química termodinamicamente favorável é guiada pelo decréscimo de sua energia livre ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) em que a entalpia é o calor trocado à pressão constante entre os componentes do sistema. Deste modo, a taxa de calor gerado devido à conversão de substrato em produto deve ser uma medida direta da velocidade da reação enzimática (13, 14, 17, 18).

A quantidade de calor total (a menos do calor proveniente dos efeitos de diluição) gerado para transformar n moles de substrato em produto é dada por:

$$Q_T = n \cdot \Delta H = [P]_{total} \cdot V_0 \cdot \Delta H \quad (4)$$

onde V_0 refere-se ao volume inicial de solução na cela de amostra, $[P]$ é a concentração molar de produto gerado ao final da reação, ou seja, quando todo o substrato for convertido em produto e ΔH refere-se à entalpia molar da reação. Desta maneira, o calor gerado por uma enzima fornece imediatamente a taxa de reação enzimática:

$$Potência = \frac{dQ}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \cdot V_0 \cdot \Delta H \quad (5)$$

Se rearranjarmos a equação acima, temos que,

$$Velocidade = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V_0 \cdot \Delta H} \cdot \frac{dQ}{dt} \quad (6)$$

A equação 6 nos diz que para determinarmos a velocidade de uma catálise enzimática devemos determinar não somente a variação de calor com o tempo (dQ/dt), mas também a entalpia da reação ΔH . Esta grandeza é determinada dividindo-se o calor total (Q_{total}) gerado em uma reação catalisada pela enzima, quando o substrato é totalmente convertido em produto, pela concentração molar de substrato envolvido na reação. O calor total pode ser obtido integrando-se a área sob a curva (termograma):

$$\Delta H = \frac{1}{[S]_{total} \cdot V_0} \cdot \int_{t=0}^{t=\infty} \frac{dQ(t)}{dt} dt \quad (7)$$

Se for necessário, a concentração [S] pode ser calculada em qualquer instante usando-se a seguinte equação,

$$[S]_t = [S]_0 - \frac{1}{V_0 \cdot \Delta H} \cdot \int_0^t \frac{dQ(t)}{dt} dt \quad (8)$$

onde [S]₀ é a concentração de substrato inicial (3,14,16-19,60). Para ilustrar, a Figura 9 mostra a isoterma obtida na hidrólise de uréia catalisada pela enzima uréase de *H. pylori* (17).

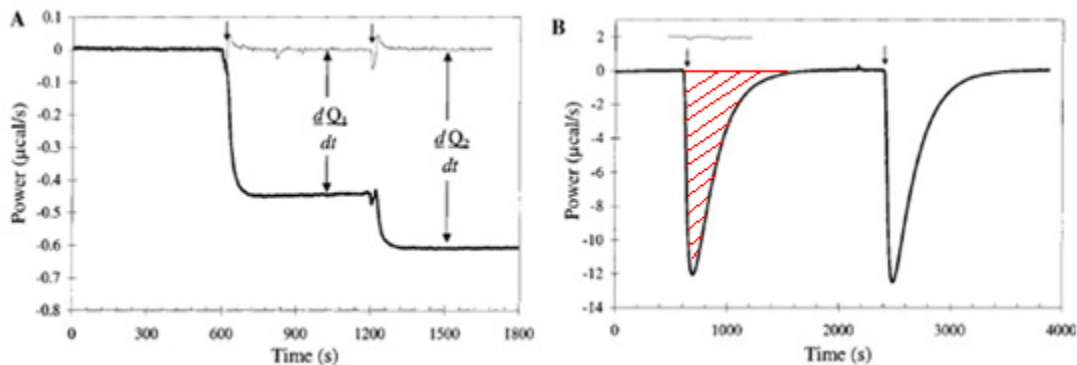


Figura 9 - Reação catalisada pela enzima urease a 37°C. Em (A), a potência (ou fluxo de calor) em função do tempo foi medida em condições estacionárias, onde a cela do calorímetro foi preenchida com uma solução contendo enzima (urease) e substrato (uréia) foi injetado como indicado pelas setas. A concentração de enzima utilizada foi 50 pM, enquanto que a concentração de substrato dentro da cela foi de 88 µM. Uma segunda injeção foi feita 10 minutos depois, onde foram adicionados mais 88 µM de uréia dentro da cela, mostrando a variação da potencia térmica dQ/dt com o aumento da concentração de substrato. Em (B), a completa conversão de substrato em produto para se obter o valor de ΔH da reação. Neste experimento, uma quantidade de 513 µM de uréia foi consumida por 4 nM de urease gerando um $\Delta H = -10,4 \pm 0,1$ Kcal/mol. O experimento também indica que não há inibição durante a formação do produto. Figura adaptada da referência (17).

1.2.3.1 Considerações práticas

A primeira coisa a levarmos em consideração quando pretendemos fazer um experimento de ITC é que todos os reagentes estejam em uma mesma solução tampão. Este procedimento é feito para evitar calores excessivos de diluição entre soluções tampão diferentes. Para isso, a enzima deve ser dialisada contra uma

solução tampão propriamente escolhida e usamos o mesmo tampão para preparar a solução contendo o substrato. Em alguns casos, também é possível dialisarmos o substrato contra o tampão escolhido. Outro procedimento importante para qualquer experimento de ITC é degasificar as soluções que vão preencher tanto a cela de amostra quanto a seringa tituladora. Este procedimento é necessário para evitar que o equipamento registre o calor de formação de bolhas. Para se realizar um experimento de ensaio enzimático por ITC é necessário quantificar precisamente as concentrações molares de enzima e substrato. Isto é feito na maioria das vezes por meios espectroscópicos, onde os reagentes possuem cromóforos e coeficientes de extinção molares experimentalmente determinados ou calculados. Também é necessário determinarmos a entalpia molar da conversão completa de substrato para produto, por isso é vantajoso sabermos a concentração molar dos reagentes com precisão. É de grande ajuda se existe alguma indicação do valor aproximado de K_M , pois desta maneira podemos usar este valor aproximado na obtenção de uma curva completa de Michaelis-Menten, ou seja, alguns pontos em concentrações abaixo e acima de K_M . Atualmente existem dois métodos disponíveis para se realizar um ensaio cinético: Método das Múltiplas Injeções e Método da Injeção Única. Estes métodos são tratados a seguir.

1.2.3.2 O Método das Múltiplas Injeções

Este método é usado para se estudar cinéticas lentas, em que os valores de K_M são maiores do que 10 μM ou para cinéticas que ao longo da reação exibam inibição por formação de produto. Neste experimento é possível utilizar proteínas em concentrações na faixa de picomolar (pM) até concentrações na ordem de nanomolar (nM) e concentrações de substratos na faixa de micromolar (μM) a milimolar (mM). As velocidades de reação enzimática são determinadas medindo-se a mudança na potência térmica instrumental fornecida para a cela de amostra após a adição de substrato. Após cada titulação é possível ver picos de calor antes de a potência térmica instrumental ficar constante. Estes picos estão relacionados ao calor de diluição dos componentes envolvidos no experimento (Figura 10). A potência térmica instrumental rapidamente diminui aproximando-se de um novo

patamar de estado estacionário. A intenção neste experimento é que ele ocorra de modo que, após cada injeção de solução contendo substrato, a condição de estado estacionário, $[E] \ll [S]$, seja mantida e que não mais que 5% do total de substrato sejam consumidos na catálise. Tipicamente 10-30 injeções com intervalos de tempo de 1-5 minutos entre cada injeção são suficientes para se obter pares de (velocidade da reação enzimática, $[S]$), e então se construir uma curva catalítica. Cabe lembrar que para se obter estes pares de dados devemos antes determinar a entalpia molar de conversão total de substrato em produto (Figura 9B); a cada titulação de substrato dentro da cela é possível calcular a concentração molar envolvida na catálise e a taxa de variação constante de calor (dQ/dt) é determinada diretamente do termograma (Figura 10). Deste modo, a velocidade da reação para uma determinada concentração de substrato é obtida a partir da equação 6. Os parâmetros cinéticos podem, então, ser obtidos ajustando-se os dados através da equação de Michaelis-Menten ou pelo método dos duplos recíprocos (55, 57). Na Figura 10 é possível se ver um ensaio feito para obtenção das taxas catalíticas da hidrólise do substrato *p*-nitrofenil fosfato (PNPP) pela fosfatase 1 (PP1- γ) (60).

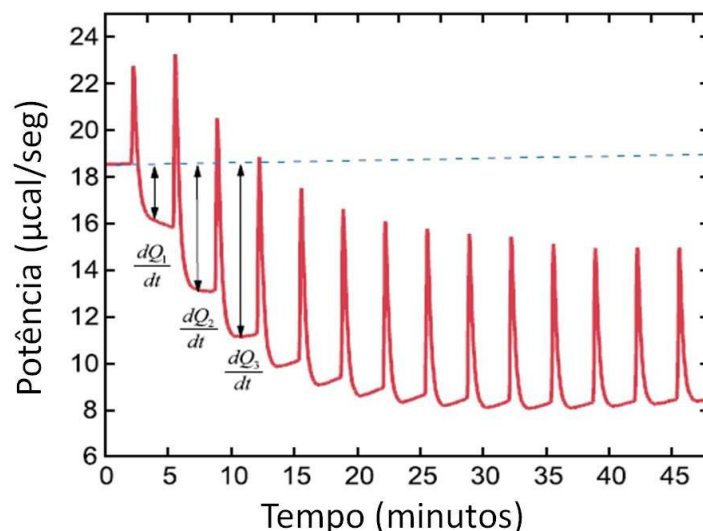


Figura 10 – Potência térmica instrumental para a taxa de reação da hidrólise do PNPP por PP1- γ . Figura adaptada da referência (60).

1.2.3.3 Método da Injeção Única

Este método requer uma quantidade maior de enzima (1-30 nM), mas é um método mais direto para a obtenção dos parâmetros cinéticos do que o método das múltiplas injeções. É indicado para reações rápidas (K_M menor que 10 μM), onde uma única injeção de substrato (10-30 μL à 10-100 μM , dependendo da reação) em concentrações maiores que K_M é titulada dentro da cela de amostra. A potência térmica instrumental é continuamente monitorada conforme o substrato é convertido em produto (Figura 9B e Figura 11A). O monitoramento continua até o substrato ser totalmente consumido e a potência térmica instrumental voltar para a linha de base inicial (17). A taxa da reação é graficada em função da concentração de substrato restante, produzindo uma curva catalítica contínua. Os valores de k_{cat} e K_M são, então, determinados pelo método dos duplos recíprocos (55, 57) ou ajustando-se os dados de acordo com a equação de Michaelis-Menten (Eq. 3). Na obtenção da curva catalítica são utilizadas as equações 7 e 8 para calcular ΔH e $[S]$ em qualquer instante, respectivamente. A taxa de potência instrumental (dQ/dt) é obtida diretamente do termograma no intervalo de integração em que foi calculado ΔH e $[S]$, o que leva à velocidade de reação (equação 6 e Figura 11B).

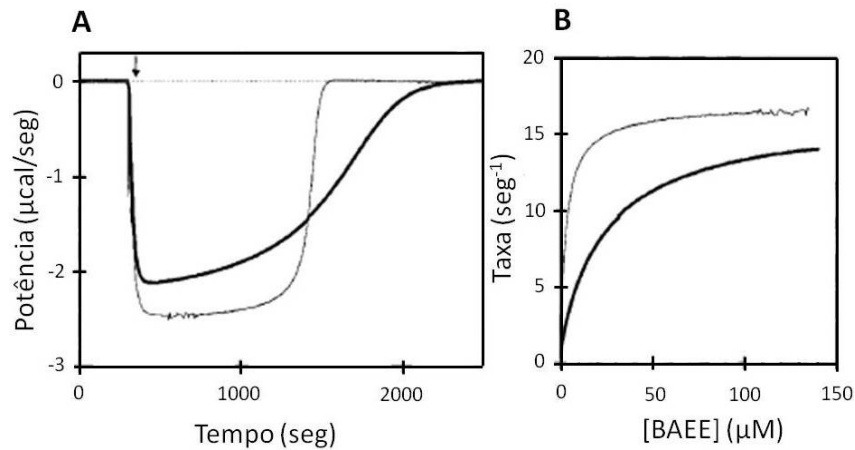


Figura 11 – Hidrólise do BAEE (Na-Benzoyl-Arginine Ethyl Ester) catalisada pela tripsina. Em (A) uma solução de 9,6 nM de tripsina foi equilibrada a 25°C dentro da cela de amostra. Após o equilíbrio térmico, BAEE foi injetado (seta) para uma concentração final de substrato dentro da cela de 171 μM . A potência térmica instrumental foi monitorada até a completa conversão do substrato em produto. A curva grossa mostra a catálise da BAEE pela tripsina na presença de benzamidina, enquanto que a curva fina mostra a catálise da BAEE pela tripsina sozinha. Em (B) vemos a taxa de reação em função da concentração de BAEE. Os parâmetros cinéticos encontrados neste experimento foram $\Delta H = -11,45$ Kcal/mol; $K_M = 4$ μM ; $k_{cat} = 16$ s^{-1} . K_i devido à benzamidina nestas condições foi de 16 μM . Figura adaptada da referência (17).

Os efeitos da inibição por formação de produto também podem ser facilmente monitorados pelo método da injeção única. Em uma segunda injeção de substrato, se a resposta de calor for à mesma obtida na primeira injeção, o produto não está inibindo a reação enzimática. Por outro lado, se a inibição por formação de produto ocorre ou se um inibidor competitivo é adicionado na reação, os efeitos causados pela inibição podem ser quantificados por várias injeções subseqüentes de substrato ou da mistura de substrato-inibidor (17, 60).

1.2.3.4 Condições experimentais do ensaio enzimático por ITC

Os ensaios calorimétricos foram realizados em um instrumento VP-ITC fabricado pela MicroCal Inc. (Northampton, MA) equipado com software para controle e aquisição de dados VP Viewer. Os experimentos foram realizados a 25 °C e a cela de amostra foi preenchida com uma quantidade pré-determinada de enzima, enquanto a seringa foi preenchida com substrato. A cela de referência foi preenchida com água pura. Durante o experimento, a aquisição da potência térmica instrumental foi feita a cada intervalo de um segundo, a velocidade de agitação da seringa foi de 300 rpm e a sensibilidade do equipamento foi configurada para ser “alta”. O método usado para os ensaios enzimáticos foi o das múltiplas injeções e a quantidade de reagentes utilizados foi 10 nM de enzima e 1 mM de substrato ambos em tampão Tri-HCl (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0). Um segundo experimento na mesma temperatura foi realizado de maneira que a concentração final de substrato na cela fosse menor que 25 µM. Neste caso, as quantidades de reagentes utilizadas foram de 200 nM de enzima e 1 mM de substrato no mesmo tampão descrito acima. O número, volume e tempo entre cada injeção foi ajustado de forma a otimizar os dados em cada experimento. O calor de diluição do substrato, obtido quando substrato foi injetado na cela de amostra sem enzima, foi usado para corrigir os dados. A análise dos dados, bem como a determinação dos parâmetros cinéticos foi feita segundo descrito acima.

1.2.3.5 Determinação da entalpia aparente da reação enzimática (ΔH_{ap})

A variação de entalpia molar aparente da reação enzimática (ΔH_{ap}) quando Pp 1,2-CCD catalisa catecol em ácido cis-cis-mucônico foi determinada por ITC como se segue: a cela de amostra do calorímetro, cujo volume é de 1,43 mL, foi preenchida com uma solução de 3 µM de enzima em tampão Tris-HCl (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0), enquanto que a seringa do calorímetro foi preenchida com 1 mM catecol. Após um período de equilíbrio térmico do calorímetro, a reação

enzimática começou pela injeção de 10 μL da solução de catecol dentro da cela de amostra contendo enzima. A catálise completa do catecol em ácido cis-cis-mucônico e conseqüente fim da reação enzimática foi indicada pelo retorno da potência térmica instrumental para a linha de base. A velocidade de agitação da seringa foi 300 rpm, enquanto que a taxa de injeção de substrato na cela foi 0,5 $\mu\text{L s}^{-1}$. A potência térmica instrumental ($\mu\text{cal s}^{-1}$) foi registrada a cada 2 segundos durante o experimento. O calor gerado pela diluição do substrato foi determinado em um experimento separado sob as mesmas condições experimentais, exceto pelo fato de que a cela de amostra do calorímetro foi preenchida apenas com solução tampão. A entalpia (ΔH_{ap}) foi determinada, primeiramente, subtraindo-se o calor de diluição do calor total envolvido na reação enzimática e, em seguida, dividindo-se o valor da entalpia resultante, obtida pela integração da área sob a curva do fluxo de calor, pelo número de moles de substrato que foram injetados dentro da cela de amostra.

1.2.3.6 Ensaio de inibição por produto

A cela de amostra do calorímetro foi preenchida com uma solução 600 nM de Pp 1,2-CCD enquanto que a seringa foi preenchida com uma solução 50 mM de catecol. Ambas as soluções foram preparadas em tampão Tris-HCl (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0). O experimento foi realizado a 30 °C e a reação enzimática foi seguida medindo-se a mudança na potência térmica instrumental após a injeção de 3 μL de substrato dentro da cela de amostra. A reação aconteceu até que a completa conversão do catecol em ácido cis-cis-mucônico fosse alcançada, fato evidenciado pela volta da potência térmica instrumental para a linha de base. Após isso, uma segunda e uma terceira injeções de substrato foram realizadas. A integração numérica de cada pico foi feita de maneira a se obter o calor total da conversão do catecol em produto. Os dados foram corrigidos para o calor de diluição do substrato.

1.2.4 Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)

DSC é uma técnica muito utilizada para se medir o calor absorvido ou transferido de uma amostra a pressão constante durante uma mudança física ou química. O termo “Diferencial” refere-se ao fato de que o comportamento de uma amostra de interesse é comparado a uma amostra de referência que durante o experimento não sofre mudanças físicas ou químicas significativas. O termo “Varredura” refere-se ao fato de que tanto a amostra de interesse quanto a amostra de referência são submetidas a uma variação sistemática da temperatura em um intervalo pré-determinado.

Muitas moléculas importantes de baixo peso molecular não podem ser examinadas por DSC ao menos que estas moléculas formem agregados moleculares estabilizados por cooperação intermolecular. Estruturas altamente cooperativas como os biopolímeros (lipossomos, ácidos nucleicos, proteínas) são estabilizadas pela cooperação de vários fatores de pequena magnitude (ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e efeito hidrofóbico) e sofrem, frequentemente, transição de fase como resultado de mudanças conformacionais, fusão, hidratação ou desidratação, agregação, desagregação ou uma combinação destes (61). Estes são os tipos de moléculas para as quais a análise por DSC fornece parâmetros termodinâmicos macroscópicos e às vezes microscópicos (quando esta técnica é usada juntamente com técnicas de espectroscopia). Através da técnica de DSC é possível se determinar grandezas termodinâmicas absolutas durante uma transição termicamente induzida. DSC é frequentemente utilizada para se estudar o desenovelamento e reenovelamento de proteínas, estabilidade térmica de proteínas na presença de ligantes (como fármacos), transições lipídicas, interações de proteínas com fosfolipídios, interação entre proteínas, detecção de domínios de membrana, entre outros estudos (61, 62).

Basicamente, um equipamento de DSC para o estudo de biomoléculas consiste em dois pequenos compartimentos (celas) idênticos que são aquecidos eletricamente por aquecedores a uma taxa constante (Figura 12). Uma das celas é preenchida com solução que contém a amostra a ser estudada (proteína, lipossoma, etc.) e a outra cela é preenchida geralmente com o tampão usado para solubilizar a amostra de interesse. As celas são mantidas sob pressão atmosférica ou em alguns

casos sob pressão de gás inerte, para inibir a formação de bolhas durante o aquecimento. Durante o experimento, potência é fornecida pelo aquecedor principal para aumentar a temperatura das celas a uma taxa estacionária, enquanto que diferenças de temperatura entre as celas de referência e de amostra (ΔT_1), e entre as celas e a câmara adiabática (ΔT_2) são monitoradas (Figura 12). Através de circuitos de resposta, um aquecedor/resfriador localizado na câmara adiabática permite a esta atingir a mesma temperatura das celas e aquecedores de resposta localizados nas celas compensem qualquer diferença de temperatura entre as estas durante a varredura. Um computador controla a potência térmica dissipada nas celas e câmara adiabática e faz a aquisição de dados (62, 63).

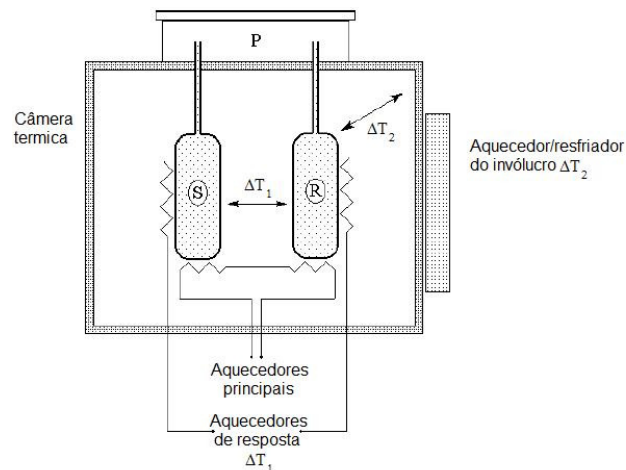


Figura 12 – Diagrama para um típico DSC usado para o estudo térmico de soluções diluídas de biomoléculas. Figura adaptada da referência (63).

Geralmente durante um experimento de DSC, os dados de saída mostram potência em função da temperatura (Figura 13).

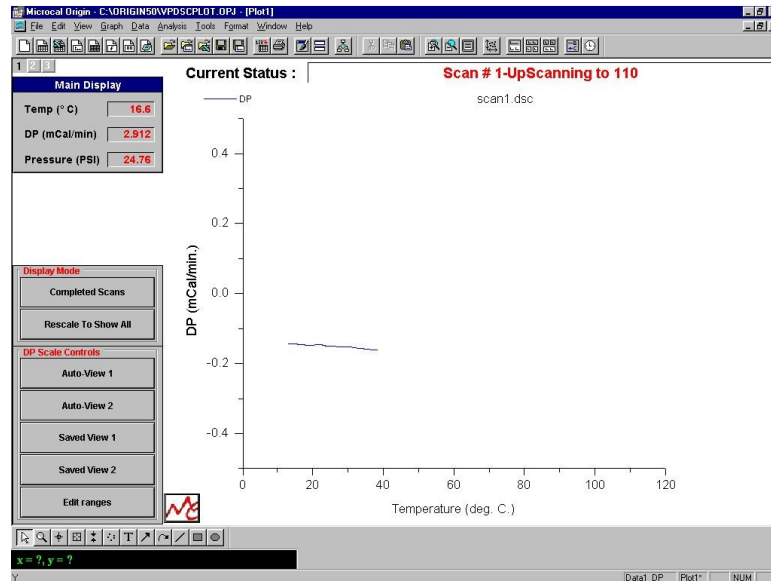


Figura 13 – Imagem da tela do computador durante um experimento de DSC onde as celas foram preenchidas com solução tampão. Na figura acima podemos ver como é feita a aquisição de dados durante um experimento de DSC. A diferença de potência entre as celas no eixo Y (DP em mcal/min) é registrada em função da temperatura.

Os dados medidos de potência são convertidos para excesso de capacidade térmica molar C_p através da equação:

$$\frac{dQ_p}{dt} \frac{1}{\sigma M} = C_p \quad (9)$$

onde Q_p é o calor absorvido pela amostra à pressão constante; t é o tempo; σ é a taxa de aquecimento, dT/dt ; T é a temperatura; M é o número de moles de amostra usado no experimento. O tempo é convertido para temperatura usando-se a fórmula $t \times \sigma$ (62).

Durante a varredura (aumento ou decréscimo da temperatura), em um intervalo que não contém nenhuma transição de fase, as temperaturas de ambas as celas variam linearmente com o tempo na mesma taxa de aquecimento $\sigma = dT/dt$, e a diferença de temperatura entre as celas permanece zero. Isso se reflete de maneira ideal em uma linha de base reta e horizontal (Figura 13). Por outro lado, se ocorre alguma mudança física ou química no sistema, a temperatura da cela de amostra muda de maneira significativa com relação à temperatura da cela de referência. Assim, para manter a mesma temperatura em ambas as celas, o excesso de energia deve ser compensado (em forma de fluxo de calor para as celas) pelos aquecedores durante este processo. Por exemplo, em um processo endotérmico a temperatura da cela que contém a amostra diminui (neste caso o processo remove energia do meio

para que a transição ocorra, o que leva a um decréscimo da temperatura na cela de amostra) em relação à temperatura da cela de referência. Como resultado, os aquecedores devem fornecer mais energia (calor) para a amostra em relação à referência para manter as temperaturas das celas iguais. Neste caso, esta diferença de energia fornecida pelos aquecedores para ambas às celas reflete-se em uma deflexão positiva da linha de base original. No caso contrário, onde o processo se mostra exotérmico (a transição libera calor para o meio promovendo o aumento da temperatura da cela de amostra), os aquecedores devem então fornecer menos energia para a cela de amostra do que para a cela de referência para que ambas as celas permaneçam na mesma temperatura. Neste caso então, a diferença de energia fornecida pelos aquecedores para as celas vai resultar em uma deflexão negativa da linha de base original (9, 62). A transição térmica pode ser vista durante um experimento através de um gráfico da diferença do fluxo de calor (dQ/dt) entre as celas de amostra e de referência em função da temperatura, gerado pelo sistema de aquisição de dados do equipamento cuja intensidade do sinal é diretamente proporcional à taxa de aquecimento ou resfriamento (dT/dt) da amostra. A Figura 14 mostra um caso de transição de fase de proteína clássica, onde a proteína em questão é a ubiquitina (62).

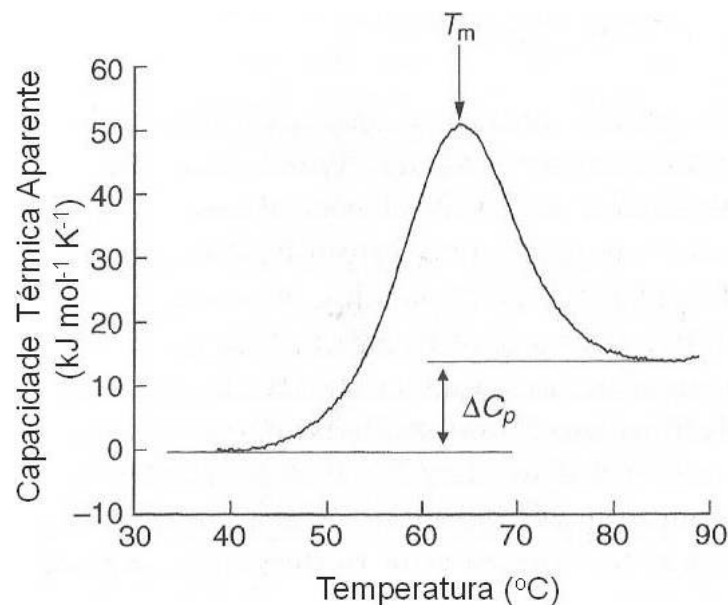


Figura 14 – Termograma obtido de uma solução da proteína ubiquitina na concentração de 5 g dm^{-3} . A taxa de aquecimento foi de $60^{\circ}\text{C h}^{-1}$. No diagrama é possível verificar as definições de T_m e ΔC_p . Figura adaptada da referência (62).

A limpeza das celas durante um experimento é fundamental. Para isso, preencha as celas com SDS ou HNO_3 concentrado e aqueça-as até a temperatura de 90°C a uma taxa de aquecimento de 60°C h^{-1} . Resfrie as celas e limpe-as com uma boa quantidade de água deionizada (500mL de água devem ser o suficiente). Após isso, lave as celas com a solução tampão que será usada no experimento.



Preencha as celas com a solução tampão degaseificada por pelo menos 5 minutos em vácuo forte. Aplique pressão em ambas as celas através da tampa/embolo que acompanha o calorímetro (é usada a pressão de trabalho entre 21-25 psi). Corra um experimento para obtenção da linha de base dentro do intervalo de temperatura e taxa de aquecimento requerido (para proteínas recomenda-se uma taxa de aquecimento de no máximo 60°C h^{-1}). Pode-se calibrar o calorímetro com respeito à temperatura caso haja necessidade.



Após o experimento de linha de base, remova a solução tampão da cela de amostra e preencha-a com a amostra de interesse previamente degaseificada (mínimo de 1 mL de amostra). Certifique-se que não há bolhas na cela de amostra e aplique novamente a pressão de trabalho. Bons resultados são obtidos com proteínas na concentração de 5-25 μM e com lipídeos na concentração de 1 mg/mL.



Configure o calorímetro para realizar pelo menos 2 varreduras dentro do intervalo de temperatura de interesse, para checar a reprodutibilidade da transição. O tempo de equilíbrio varia de experimento para experimento (recomenda-se usar o padrão estabelecido pelo fabricante num primeiro momento).



Subtraia o sinal da amostra de interesse do sinal de linha de base e faça a análise termodinâmica levando-se em consideração o volume e a concentração molar da amostra.



Repita o protocolo usando amostras frescas e variando as condições experimentais (taxa de aquecimento, concentração, pressão, etc).

Figura 15 – Protocolo típico para experimentos de DSC. Figura adaptada da referência (62).

1.2.4.1 Condições do experimento de DSC da interação entre Pp 1,2-CCD e ácido cis-cis-mucônico

Os experimentos de DSC foram realizados em um equipamento VP-DSC fabricado por MicroCal Inc. (Northampton, MA). Todas as amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl (20 mM Tris-HCl, 50 mM of NaCl, pH 8.0). As varreduras foram realizadas no intervalo de 10-70 °C, com taxa de aquecimento de 60 °C/h e pressão aplicada em ambas as celas de amostra e de referência de 22 PSI (pressão por polegada quadrada). A quantidade de lipídio usada nos experimentos foi de 1 mg/mL enquanto que a quantidade de proteína usada nos experimentos foi de 25 µg/mL. Para prevenir a formação de bolhas durante o experimento, as amostras foram exaustivamente degaseificadas antes de serem injetadas na cela de amostra do calorímetro. A aquisição da linha de base instrumental foi feita no mesmo intervalo de temperaturas preenchendo-se ambas as celas de amostra e de referencia do calorímetro com tampão. Os termogramas adquiridos foram normalizados pela concentração antes de analisá-los.

1.2.5 Calorimetria de perturbação por pressão (PPC)

Sabemos por experiência cotidiana que o aquecimento de um corpo leva a uma expansão do seu volume (64, 65) e que o caso reverso, dificilmente encontrado no dia-a-dia, é fisicamente equivalente, ou seja: a redução forçada do volume de um corpo pela aplicação de uma pressão isotrópica aumenta a temperatura deste corpo (6, 12). Pressões muito altas são necessárias para produção de calor mensurável. No entanto, com o recente desenvolvimento da técnica de PPC, é possível se medir pequenas variações de temperatura associadas à aplicação de pressões relativamente baixas (~5 bar) sobre a amostra de interesse. De uma maneira mais apropriada, PPC pode ser definida como sendo um novo método (recentemente criado pela MicroCal Inc), que mede o calor consumido ou liberado por uma amostra após uma mudança repentina de pressão aplicada (6, 12). O calor medido durante um experimento de PPC é usado para se calcular o coeficiente de expansão

volumétrica $[\alpha_v(T)]$ de uma amostra em função da temperatura, e no caso de transição de fase, o calor é usado para calcular a variação de volume ΔV da amostra que ocorreu durante a transição de fase.

Uma descrição de um experimento de PPC pode ser dada da seguinte maneira: seguindo um experimento de DSC, as celas de amostra e de referência são preenchidas com a amostra biológica dissolvida em tampão e tampão, respectivamente. Na maioria das vezes, principalmente quando se está trabalhando com lipídios, não é necessário re-preencher a cela de amostra após o experimento de DSC. Variações repentinas de pressão de até 5,5 bar são aplicadas sobre as celas do calorímetro de uma maneira controlada por computador. A pressão é aumentada geralmente usando um gás inerte (nitrogênio, hélio) armazenado em um tanque de alta pressão. Tal processo é ilustrado na Figura 16:

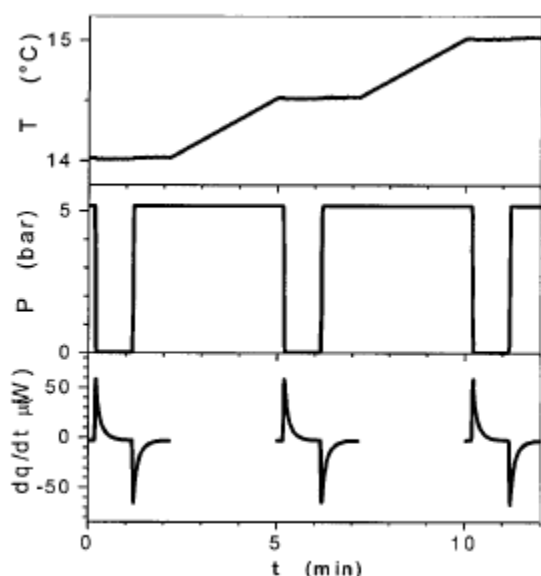


Figura 16 – Diagrama esquemático de um experimento de PPC. A figura representa o tempo t em que a cela permanece em determinada temperatura T , a variação de pressão aplicada sobre a cela durante este tempo t e, ainda, o sinal obtido durante este processo. Figura adaptada da referência (6).

A figura acima ilustra um experimento de PPC, onde três variações de pressão ocorridas em três temperaturas diferentes são mostradas. A parte de baixo da figura representa o sinal obtido através deste procedimento. Note que em um experimento de PPC real são feitas entre 20-100 variações de pressão para varrer completamente um intervalo de temperaturas de interesse. Cada procedimento para

se variar a pressão durante o experimento de PPC inicia-se com o calorímetro sendo equilibrado para o modo isotérmico, a uma dada temperatura T e com as celas sob alta pressão (~ 5 bar). Após o período de equilíbrio, a pressão sobre as celas é diminuída repentinamente até que o valor da pressão ambiente, no caso, 0 bar. A variação de temperatura da cela é compensada pelos aquecedores localizados nas celas de amostra e de referência do calorímetro, de modo a permanecer constante (Figura 16). Esta compensação dura em média 1 minuto até que o fluxo de calor entre as celas seja o mesmo e a potência de compensação retorne para a linha de base. O sinal obtido deste procedimento representa o calor liberado ou consumido pela amostra durante a variação de pressão. Após o completo equilíbrio desta primeira etapa, os controladores de pressão re-conectam as celas do calorímetro com o tanque de gás inerte de modo a aumentar repentinamente a pressão sobre estas novamente. O sinal obtido representa o calor liberado ou consumido pela amostra durante esta nova variação de pressão. Para ambos os procedimentos (diminuir e aumentar a pressão sobre as celas do calorímetro repentinamente), são feitas as aquisições de temperatura, pressão e fluxo de calor (potência térmica) em função do tempo. Geralmente a aquisição dos dados é feita com filtro de tempo de 1 s^{-1} (ou seja, a cada segundo o software de controle do calorímetro faz a aquisição de 1 ponto do experimento). Os picos de calor são diferentes em relação ao sinal, mas em geral devem concordar entre si em valores absolutos (Figura 16). Após o equilíbrio, o calorímetro é automaticamente aquecido ou resfriado para a próxima temperatura T desejada, onde os procedimentos descritos anteriormente vão ocorrer novamente. Integrando-se o sinal de PPC geramos dois valores Q_T (calor) para uma dada variação de pressão. Segundo o fabricante, as variações repentinas de pressão podem induzir pequenas diferenças de temperatura com relação ao DSC tradicional e esta diferença fica em torno de $\pm 0,05 \text{ K}$. Heerklotz e colaboradores (6), trabalhando com transição de fase de lipídios (MLV, LUV, SUV), determinaram uma diferença de $+0,02 \text{ K}$ durante a liberação de pressão e de $-0,04 \text{ K}$ para o aumento da pressão. Todos os pontos obtidos durante o experimento são geralmente reproduzíveis e dificilmente efeitos de histerese ocorrem. Como estamos interessados em obter informações sobre as propriedades volumétricas da amostra de interesse, três experimentos de controle são necessários para termos valores precisos. Estes são geralmente água (cela de amostra) contra água (cela de referência), água contra tampão e por último tampão contra tampão. Os resultados

destes controles são ajustados por funções polinomiais e então subtraídos do experimento principal de modo a obtermos o coeficiente de expansão térmica em função da temperatura, $\alpha_V(T)$, da amostra de interesse. Na Figura 17 é mostrado um experimento de PPC mais real durante o qual as celas foram preenchidas com água deionizada. Os cuidados no preenchimento das celas com água são idênticos aos adotados durante um experimento de DSC. Na verdade, o experimento de PPC pode ser realizado usando para isso a água que foi usada para coletar a linha de base no experimento de DSC.

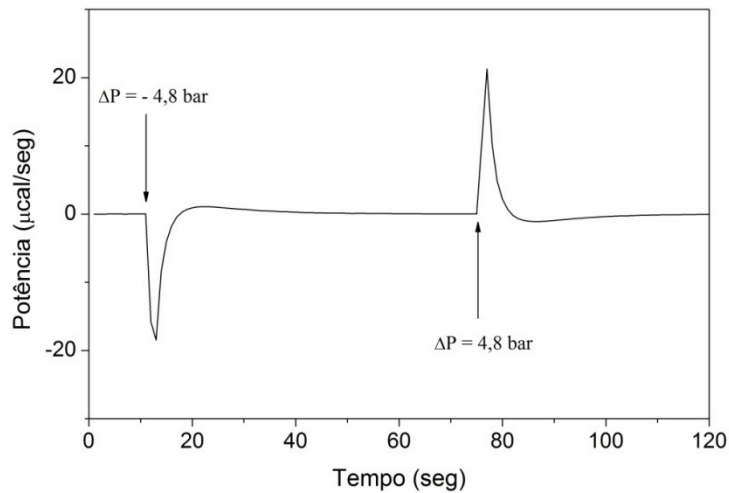


Figura 17 – Experimento de PPC de água versus água realizada a 10°C.

As relações básicas para se tratar os dados de PPC podem ser derivadas começando-se da segunda lei da termodinâmica, onde:

$$dS = \frac{dQ_{rev}}{T} \quad (12)$$

Aqui, dS é a variação infinitesimal da entropia para um processo reversível, onde a variação de calor trocado reversivelmente a uma dada temperatura é dQ_{rev} . Se diferenciarmos a equação acima com respeito à pressão, deixando-se a temperatura constante temos que:

$$\left(\frac{\partial Q_{rev}}{\partial P}\right)_T = T \left(\frac{\partial S}{\partial P}\right)_T \quad (13)$$

Uma das relações de Maxwell nos diz que:

$$\left(\frac{\partial S}{\partial P}\right)_T = -\left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P \quad (14)$$

Substituindo este resultado na Equação 13 resulta que:

$$\left(\frac{\partial Q_{rev}}{\partial P}\right)_T = -T\left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P = -TV\alpha \quad (15)$$

onde V é o volume e α é o coeficiente de expansão térmico dado pela seguinte equação:

$$\alpha = \frac{1}{V}\left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P \quad (16)$$

Se integrarmos a equação 15 acima, mantendo a temperatura constante em um curto intervalo de pressão ΔP , então teremos que:

$$\Delta Q_{rev} = -TV\alpha\Delta P \quad (17)$$

Ou seja,

$$\alpha = -\frac{\Delta Q_{rev}}{TV\Delta P} \quad (18)$$

Nesta situação, ΔQ_{rev} significa a variação de calor entre a cela de amostra, contendo a amostra de interesse em tampão, e a cela de referência, contendo apenas tampão, após uma mudança repentina de pressão ΔP . Também assumimos que V e α são invariantes a pequenas mudanças de pressão, o que é uma boa aproximação para todos os líquidos (6, 12). Usando a equação 18 pode-se, então, determinar o valor do coeficiente de expansão térmico em função da temperatura, e usá-lo como mais um parâmetro para caracterizar, por exemplo, as alterações induzidas em modelos de membrana quando da adição de moléculas.

1.2.5.1 Condições do experimento de PPC da interação de Pp 1,2-CCD com modelos de membranas

Seguindo o experimento de DSC, as celas do calorímetro foram acopladas a um tanque de Hélio (pureza 99,999%). Variações de pressão de 3,6 para 0 bar e de 0 para 3,6 bar foram aplicadas nas celas do calorímetro. Cada variação de pressão começou com o equilíbrio do calorímetro em modo isotérmico (sensibilidade alta, modo de baixo ruído) em uma temperatura previamente configurada e em mais alta pressão. O programa controlador de pressão iniciou a liberação repentina de gás

para a ambiente (0 bar). Neste procedimento, a temperatura da cela foi mantida constante pela compensação da diferença de calor causada pela variação de pressão e a potência térmica de compensação relacionada à expansão da amostra foi registrada em função do tempo. Após a potência de compensação retornar à linha de base, o software controlador de pressão conectou as celas do calorímetro com o tanque de Helio, fazendo com que a pressão voltasse a ser 3,6 bar. A potência térmica de compensação relacionada à compressão da amostra foi registrada em função do tempo. Após este procedimento, o calorímetro se equilibrou em outra temperatura desejada para dar seqüência ao experimento. O número de temperaturas de equilíbrio foi determinado de modo a cobrir toda a transição de fase do lipídio com o maior número de pontos possível. Todos os pontos foram totalmente reprodutíveis e nenhum efeito de histerese foi observado. Ao final do experimento, os calores integrados foram analisados por programa desenvolvido pelo fabricante do calorímetro. Três experimentos de controle foram realizados: no primeiro experimento, ambas as celas de amostra e de referência foram preenchidas com água; no segundo experimento a cela de amostra foi preenchida com tampão enquanto a cela de referência foi deixada com água; no terceiro experimento, ambas as celas de amostra e de referência foram preenchidas com tampão. Os resultados obtidos destes três experimentos de controle foram ajustados por funções polinomiais de segunda ordem e levados em consideração na determinação do coeficiente de expansão térmica $\alpha(T)$ dos lipídios estudados.

1.2.6 Experimento por RPE do íon Fe^{3+}

A aquisição dos espectros do íon Fe^{3+} em banda X (9.5 GHz) foi feita em um espectrômetro Bruker ELEXSYS E580 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) na temperatura de Helio líquido (4 K). O controle da temperatura foi feito com um sistema criogênico Oxford ITC503. As amostras de RPE contendo 25 μM de enzima em tampão 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0 foram previamente congelados por imersão em nitrogênio líquido antes de serem inseridas na cavidade do espectrômetro. A frequência de microonda foi medida por um frequencímetro HP5350B. Todos os espectros de RPE foram corrigidos subtraindo-se o sinal de

proveniente de uma amostra contendo apenas o tampão. Outras condições de aquisição foram: potência de microonda, 10 mW; amplitude de modulação, 1 G; frequência de modulação, 100 kHz.

1.2.7 Preparo de micelas para experimentos de RPE

Soluções concentradas de brometo de hexadeciltrimetilamônia (CTABr) e dodecilsulfato de sódio (SDS) foram preparadas em tampão Tris-HCl (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0). A concentração micelar crítica (cmc) de cada um dos surfactantes acima dissolvidos em tampão foi determinada por calorimetria de titulação isotérmica de acordo com o descrito nas referências (66, 67). Para isso, foi utilizado um calorímetro VP-ITC fabricado por MicroCal Inc. (Northampton, MA). Os valores da cmc destes surfactantes dissolvidos em tampão (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0) foram determinados como 2,4 mM e 0,12 mM para SDS (Figura 18) e CTABr (Figura 19), respectivamente.

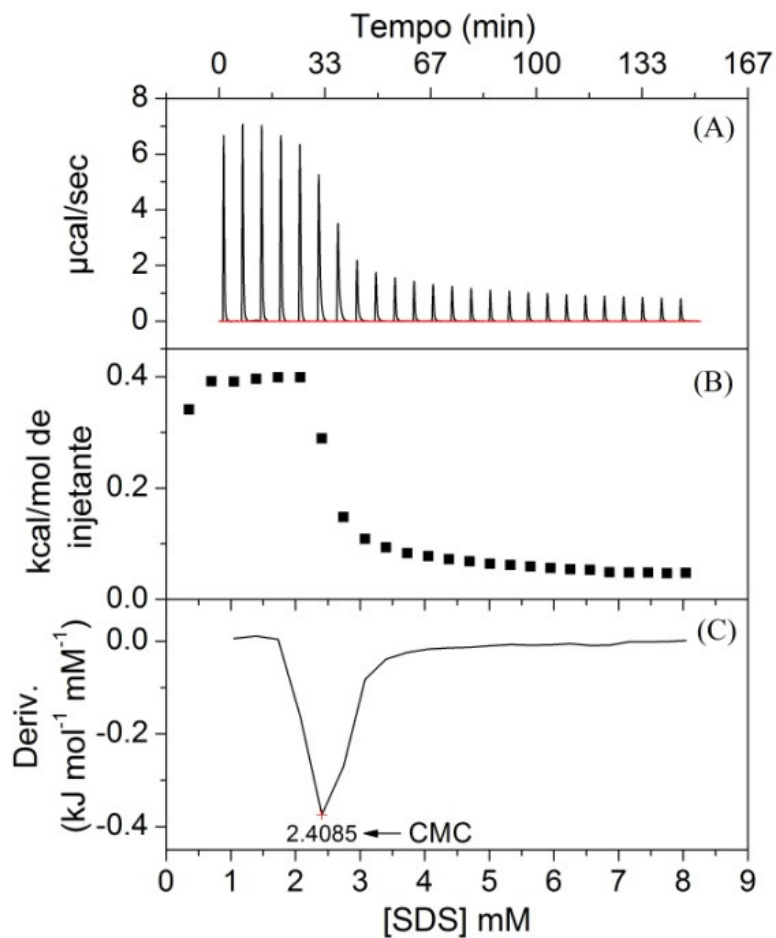


Figura 18 – Estimativa da concentração micelar crítica do surfactante SDS por ITC à 25 °C. (A) Dados não tratados da potência térmica em função do tempo durante múltiplas injeções. Alíquotas de 10 μL de uma solução de SDS (50 mM) foram injetadas dentro da cela de amostra contendo tampão (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0). (B) Calor observado de cada injeção em função da concentração de SDS dentro da cela de amostra do calorímetro. (C) Primeira derivada da isoterma obtida no gráfico B. O mínimo neste gráfico é tomado como sendo o valor da CMC para SDS nas condições acima citadas.

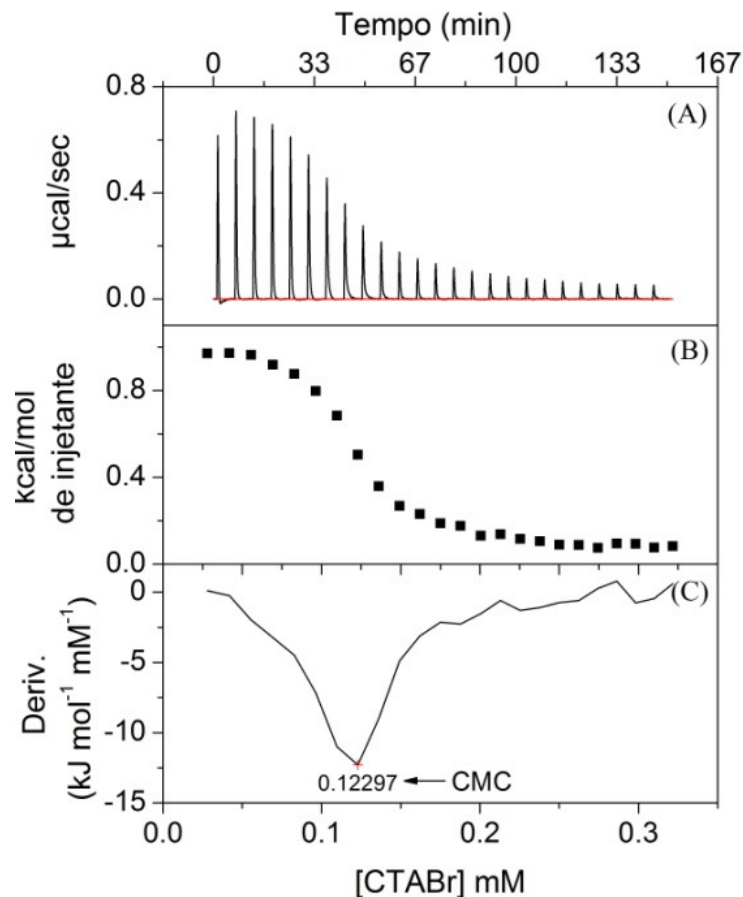


Figura 19 - Estimativa da concentração micelar crítica do surfactante CTABr por ITC à 25 °C. (A) Dados não tratados da potência térmica em função do tempo durante múltiplas injeções. Aliquotas de 10 μL de uma solução de CTABr (2 mM) foram injetadas dentro da cela de amostra contendo tampão (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0). (B) Calor observado de cada injeção em função da concentração de CTABr dentro da cela de amostra do calorímetro. (C) Primeira derivada da isoterma obtida no gráfico B. O mínimo neste gráfico é tomado como sendo o valor da CMC para CTABr nas condições acima citadas.

Uma vez determinados os valores de cmc nas condições a serem utilizadas nos experimentos subseqüentes, as soluções de surfactantes foram preparadas sempre em concentrações acima da cmc, ficando as concentrações finais em 5 mM e 1 mM de SDS e CTABr, respectivamente. Também adicionamos às micelas, em preparações distintas, os seguintes marcadores de spin: 4-(N,N-dimetil-N-hexadecil) amônio-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil iodido (CAT-16), 5-doxil ácido esteárico (5-SASL), 12-doxil ácido esteárico (12-SASL) e 16-doxil ácido esteárico (16-SASL). Os surfactantes foram adquiridos da empresa Sigma (St. Louis, MO, USA) e os marcadores de spin foram adquiridos da empresa Avanti Polar Lipids, Inc.

(Alabaster, AL, USA) e usados sem outras etapas de purificação que não aquelas realizadas pelos fabricantes.

As micelas contendo marcador de spin foram preparadas seguindo o protocolo: quantidades desejadas (previamente calculadas) provenientes de soluções estoque de surfactantes e marcadores de spin dissolvidos em água e clorofórmio, respectivamente, foram misturadas em tubo de vidro. A massa total de surfactante em cada preparação foi de 0,5 mg. A concentração de marcador de spin foi mantida em 0,5 mol% dos surfactantes presentes na amostra. Uma vez misturados surfactantes e marcadores de spin, a solução final foi evaporada em fluxo de gás nitrogênio até que se formasse um filme fino nas paredes do tubo de vidro. A fim de se garantir a completa eliminação de resíduos de clorofórmio das amostras, estas foram submetidas à centrifugação sob vácuo (Savant Speedvac plus-Thermo Quest) por 2 horas. A seguir, as amostras foram hidratadas em volume adequado de tampão Tris-HCl (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0). O filme formado na parede dos tubos de vidros foi, então, raspado e a solução mantida sob agitação em vórtex de modo a obtermos uma mistura mais homogênea. Em seguida, foi adicionado às amostras um volume específico da solução de proteína Pp 1,2-CCD de modo a conseguirmos uma razão proteína/micela igual a 40. As amostras assim preparadas foram armazenadas em geladeira à temperatura de 10°C por um período de, no mínimo, 2 horas para incubação.

1.2.8 Preparo de Lipossomos para experimentos de RPE, DSC e PPC

O procedimento aqui descrito é geral e vale para todas as amostras a serem usadas nos experimentos de RPE, DSC e PPC, com a exceção de que não foram acrescentados marcadores de spin nas amostras preparadas para os experimentos de DSC e PPC. Soluções estoque de lipídios e marcadores de spin em clorofórmio são misturadas em tubo de vidro. A massa total de lipídios em cada preparação foi de 0,5 mg para as medidas de RPE e 1 mg para as medidas de DSC. A concentração de marcador de spin é mantida em 0,5 mol% dos lipídios presentes na amostra. Uma vez misturados lipídios e marcadores de spin, a solução final foi

evaporada em fluxo de gás nitrogênio, com os lipídios secos formando um filme fino nas paredes do tubo de vidro. A fim de se garantir a completa eliminação de resíduos de clorofórmio das amostras, estas foram submetidas à centrifugação sob vácuo (Savant Speedvac plus-Thermo Quest) por 2 horas. A seguir, as amostras foram hidratadas em volume adequado de tampão Tris-HCl (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0). Os lipídios foram então raspados das paredes dos tubos com bastão de vidro, agitados em vórtex e a solução foi sonicada em um sonicador à banho por 15 minutos. A enzima Pp 1,2-CCD foi acrescentada às amostras de modo a obtermos uma razão molar lipídio/proteína igual a 40.

1.2.9 Experimento de RPE com micelas e lipossomos

Os experimentos de RPE foram realizados em banda X à 25 °C em um espectrômetro Varian E109. As amostras num volume final de 100 µL de solução contendo a mistura de vesículas de surfactante (ou fosfolipídios), marcador de spin e proteína foram postas em uma cela chata de quartzo (própria para se medir líquidos) e, em seguida, na cavidade ressonante do espectrômetro. As condições de aquisição de dados foram as seguintes: amplitude de modulação, 1.0 Gauss; frequência de modulação, 100 kHz; potência da microonda, 20 mW; varredura do campo magnético, 100 Gauss.

1.2.10 Experimentos de monocamadas de Langmuir

Medidas de pressão superficial foram realizadas em um aparelho KSV Langmuir *mini-trough* montado numa sala limpa de classe 10.000. As monocamadas de Langmuir foram preparadas espalhando-se 25 µL de uma solução estoque do fosfolipídio DPPC em clorofórmio de concentração 1 mM, na superfície de uma solução tampão Tris-HCl (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8.4). Todas as soluções foram preparadas em água pura MilliQ-Plus[®], Millipore, e as medidas foram

realizadas a 298 ± 0.5 K. A pressão de superfície (π) foi determinada usando-se o método do prato de Wilhelmy. A velocidade de compressão foi mantida constante a 10 mm min^{-1} .

Após espalhar o solvente, dez minutos de descanso foram permitidos para evaporação do solvente. A solução de proteína, no mesmo tampão citado acima, foi injetada na subfase abaixo da monocamada lipídica e sua adsorção no filme de lipídios foi monitorada em função do tempo.

1.2.11 Elasticidade dilatacional superficial

A elasticidade dinâmica para a monocamada de DPPC formada sobre tampão e sobre uma solução de Pp 1,2-CCD foi determinada para diferentes empacotamentos lipídicos. Este parâmetro foi medido pelo método de análise da assimetria da forma da gota (OCA-20, Dataphysics Instruments GmbH, Germany), com acessório para oscilação da gota ODG-20, como descrito na literatura (68, 69). Nestas medidas, uma alíquota da uma solução de DPPC em clorofórmio de concentração em torno de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi gentilmente tocada sobre a superfície de uma gota de tamanho reduzido, formada a partir de solução tampão na ausência e presença de Pp 1,2-CCD. A gota foi, então, expandida até atingir uma área predeterminada, criando assim a pressão superficial desejada. Os dados de elasticidade superficial dinâmica foram obtidos após a tensão superficial alcançar um valor constante usando-se um oscilação periódica da gota, cuja amplitude foi de 0,1 mm (relativa à variação da $\Delta A/A = 5.5\%$) e frequência de 1 Hz. O efeito de viscosidade, relacionado à parte imaginária do modulo da elasticidade, foi estimado a partir do ângulo de fase.

1.3 Resultados e discussão

1.3.1 Interação da Pp 1,2-CCD com seus ligantes naturais

O ensaio enzimático de Pp 1,2-CCD na catálise de oxigenação do catecol foi feito por calorimetria por titulação isotérmica (ITC). Primeiramente, determinamos a entalpia da reação catalisada por Pp 1,2-CCD para conversão de catecol a ácido cis-cis-mucônico (Figura 20) segundo descrito anteriormente. O valor da entalpia foi calculado em $\Delta H_{ap} = -101.5$ kcal/mol.

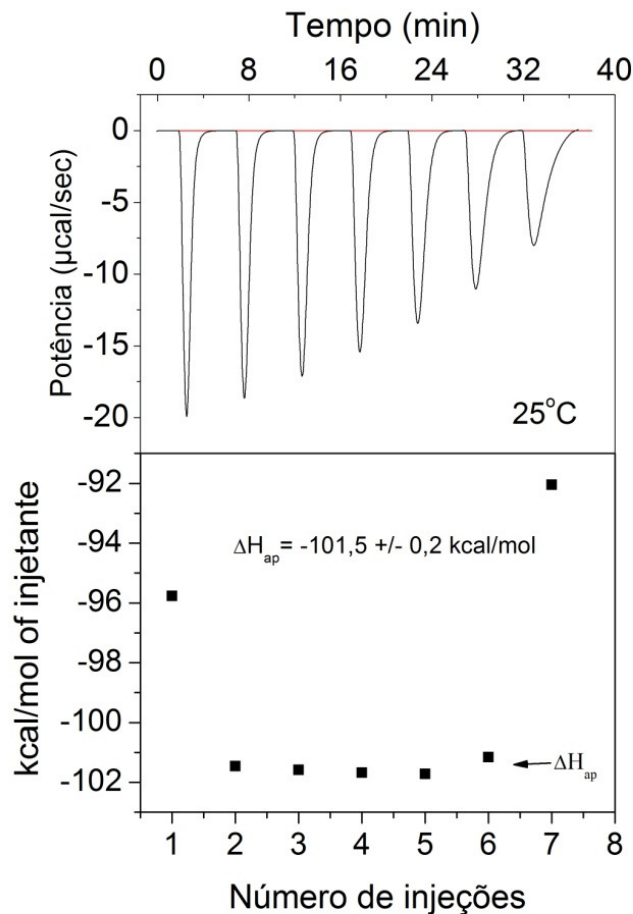


Figura 20 – Determinação do valor da entalpia aparente (ΔH_{ap}) da catálise do catecol em ácido cis-cis-mucônico realizada a 25°C

Após a determinação da entalpia da reação, passamos para o experimento de cinética propriamente dito em que alíquotas do substrato foram tituladas, em uma

série de injeções, à cela do calorímetro contendo solução da enzima Pp 1,2-CCD seguindo o protocolo apresentado na respectiva seção de Materiais e Métodos. A potência térmica medida a 25°C da catálise do catecol (Figura 21) foi medida e transformada em velocidade da reação usando-se para isso a equação 6. Os dados assim obtidos em função da concentração de substrato [S] estão mostrados na Figura 22, onde se vê claramente que a atividade catalítica diminui quando a concentração do substrato atinge níveis em torno de 25 μM . Este comportamento sugere um mecanismo de inibição ocorrendo quando o catecol (substrato em questão) é convertido para ácido cis-cis-mucônico. Os dados mostrados na Figura 22 indicam que a conversão do catecol em produto não pode, portanto, ser modelada por uma cinética de Michaelis-Menten (equação 3 e linha vermelha na Figura 22), já que o valor máximo da velocidade inicial da reação não alcança um patamar de saturação após determinada concentração de substrato.

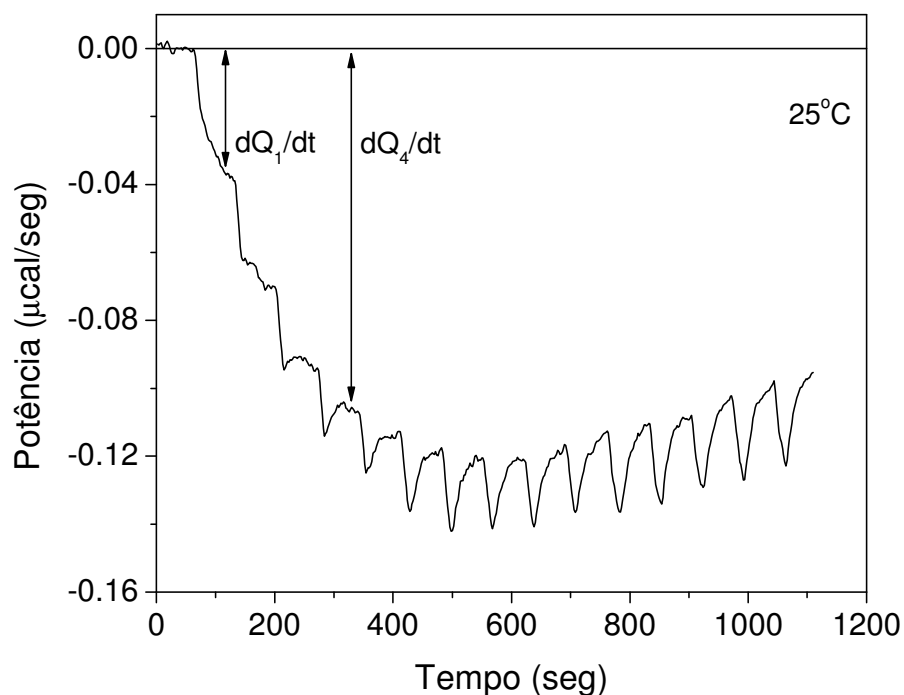


Figura 21 – Experimento de cinética enzimática por calorimetria a 25°C. A figura acima mostra que a atividade catalítica (refletida pela potência térmica) atinge um máximo por volta de 600 segundos seguido de um decréscimo a partir daquele ponto em diante.

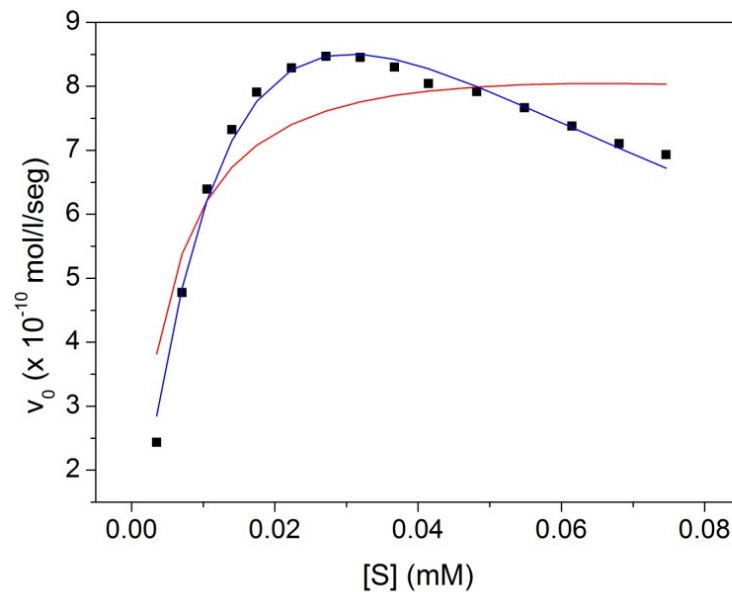


Figura 22 – Curva cinética da catálise do catecol em ácido cis-cis-mucônico realizada a 25 °C. A velocidade de reação foi calculada através da equação 6 usando-se os dados da Figura 21. Podemos ver claramente na figura acima que a atividade catalítica de Pp 1,2-CCD sofre um decréscimo quando a concentração de substrato dentro da cela atinge cerca de 25 μ M. A figura acima mostra ainda o ajuste dos pontos utilizando a equação 3 de Michaelis-Menten (—) e também o ajuste dos pontos utilizando a equação 19 (—), onde levamos em consideração um termo de inibição.

Para verificar se a inibição ocorre desde o começo da reação enzimática, um outro experimento foi feito onde a concentração de substrato dentro da cela do calorímetro foi menor do que 25 μ M (Figura 23). A velocidade da reação enzimática como função da concentração de substrato juntamente com o ajuste teórico dos dados experimentais assumindo uma cinética de Michaelis-Menten (Equação 3) são apresentados na Figura 24. Os parâmetros obtidos deste ajuste foram: $k_{\text{cat}} = 0.084 \text{ s}^{-1}$ e $K_M = 4.3 \text{ } \mu\text{M}$. Este último parâmetro está em boa concordância com o valor de K_M determinado por Broderick e O'Halloran (46), em trabalho onde os autores descreveram que não havia nenhuma inibição da Pp 1,2-CCD por substrato ou produto ocorrendo.

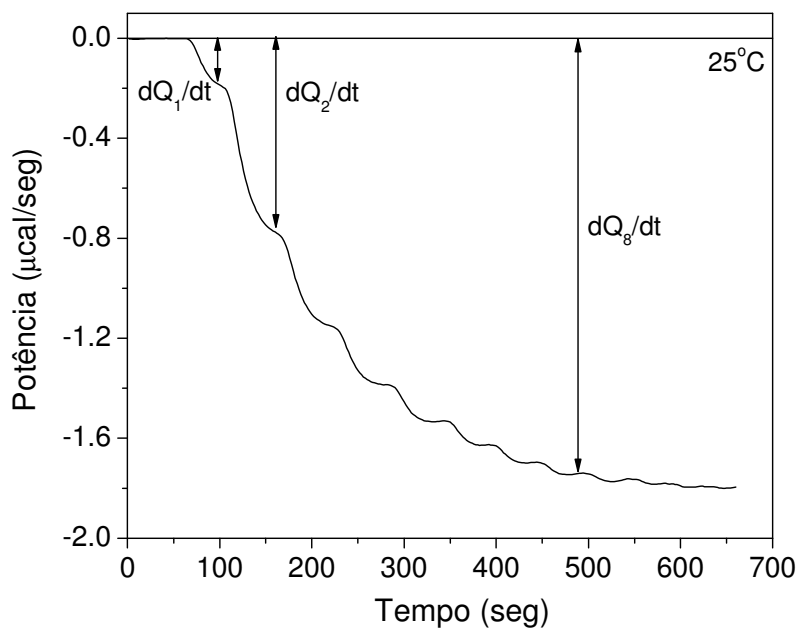


Figura 23 – Experimento de cinética enzimática por calorimetria a 25°C . O experimento acima foi otimizado de modo que a duração do experimento fosse cerca de 600 segundos.

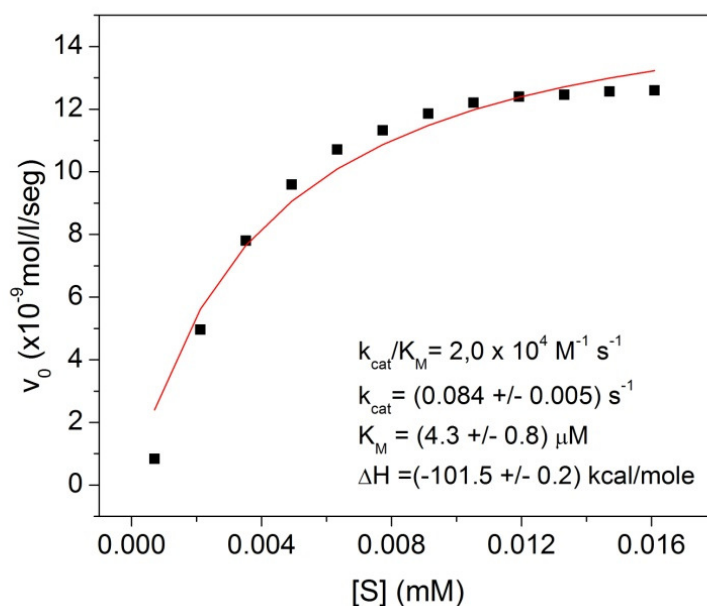


Figura 24 – Curva cinética da catálise do catecol em ácido cis-cis-mucônico realizado a 25°C . Neste segundo experimento, a concentração de substrato dentro da cela foi menor que $25 \mu\text{M}$, ou seja, a concentração limite onde o decréscimo da atividade catalítica tornou-se aparente.

Devido ao pobre ajuste dos dados cinéticos mostrados na Figura 24, acreditamos que a inibição ocorra desde baixas concentrações de substrato na cela

do calorímetro, tornando-se aparente quando os níveis de substrato atingem cerca de 25 μM . Esta hipótese é melhor evidenciada quando fazemos um gráfico de duplo recíprocos (Figura 25) referente à catálise enzimática mostrada a cima. Neste gráfico, podemos ver claramente que os dados provenientes da cinética enzimática anterior são ajustados por uma curva parabólica ($y = 72893,53049 + 71,51379 x + 0,43516 x^2$), indicando que a inibição por substrato deva ocorrer desde o começo da reação, assim desviando o comportamento observado da tradicional cinética de Michaelis-Menten.

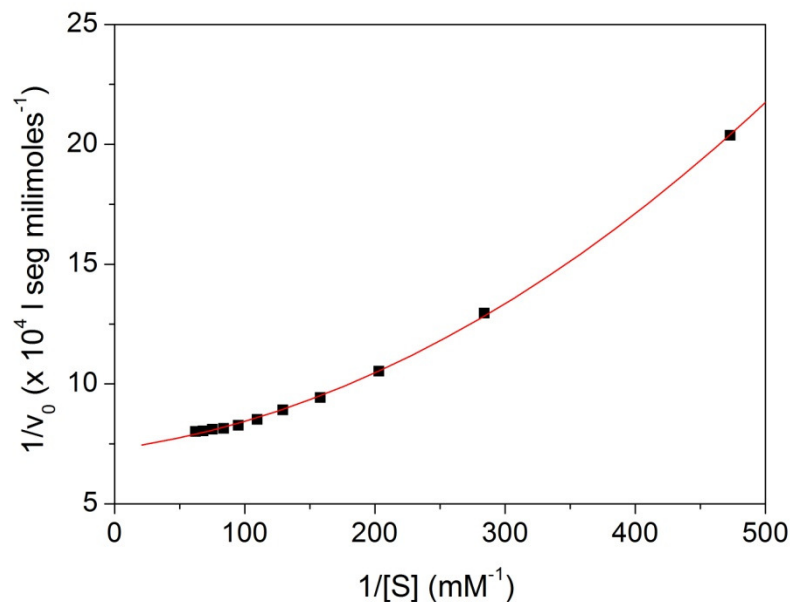


Figura 25 – Gráfico de duplos recíprocos mostrando o inverso da velocidade de reação em função do inverso da concentração de substrato. Os pontos referem-se aos dados cinéticos da Figura 24. O ajuste dos pontos por uma parábola ($y = 72893,53049 + 71,51379 x + 0,43516 x^2$) é um indicativo forte de que a inibição esteja ocorrendo desde o começo da reação enzimática.

Se a cinética enzimática não é bem descrita por um mecanismo simples de Michaelis-Menten, um esquema alternativo pode ser usado, onde um termo adicional é incluído na equação de Michaelis-Menten, de maneira a levar em consideração a inibição observada nos dados experimentais (46). Ou seja,

$$v = \frac{k_{cat} \cdot [E] \cdot [S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}} \quad (19)$$

(Figura 20) com a diferença que naquele experimento preenchemos a seringa com uma solução de 1 mM de catecol, de modo a obter uma baixa concentração de substrato dentro da cela de amostra, e no presente experimento preenchemos a seringa do calorímetro com uma solução de 50 mM de catecol. Deste modo, realizamos um experimento de ITC onde um excesso de substrato foi injetado na cela de amostra do calorímetro contendo enzima e a reação foi monitorada até o seu término (17). A Figura 26 mostra a taxa de variação do calor de reação enquanto o substrato está sendo catalisado. O fim desta reação é caracterizado pelo retorno da potência térmica instrumental para a linha de base inicial, o que indica que o substrato injetado na cela de amostra do calorímetro foi totalmente convertido em produto. Após esta primeira etapa, para testar a inibição por produto, a cela de amostra é deixada em repouso por um certo intervalo de tempo e outra injeção de substrato é realizada. Desta vez, moléculas de produto que foram geradas na primeira injeção de substrato já estão dentro da cela. Se não houver nenhuma inibição por produto ocorrendo no sistema, o sinal medido deveria ser idêntico ao sinal medido após a primeira injeção de substrato (2). A Figura 26 mostra claramente que o sinal medido após a segunda injeção de substrato é diferente do primeiro pico. Integrando-se as áreas sob os picos, obtivemos os seguintes valores de entalpia $\Delta H_{ap} = -115.91 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta H_{ap} = -106.70 \text{ kcal mol}^{-1}$ para o primeiro e segundo picos, respectivamente. Este resultado indica que menos moléculas de substrato foram catalisadas após a segunda injeção. Este comportamento tornou-se ainda mais dramático após uma terceira injeção de substrato na cela de amostra mantendo as mesmas condições das primeiras injeções. Neste caso, o valor da entalpia foi calculado como $\Delta H_{ap} = -35.10 \text{ kcal mol}^{-1}$. Como todas as condições foram mantidas fixas após cada injeção, somos levados a concluir que moléculas de produto ligam-se à enzima, assim inibindo de alguma maneira a atividade de Pp1,2-CCD.

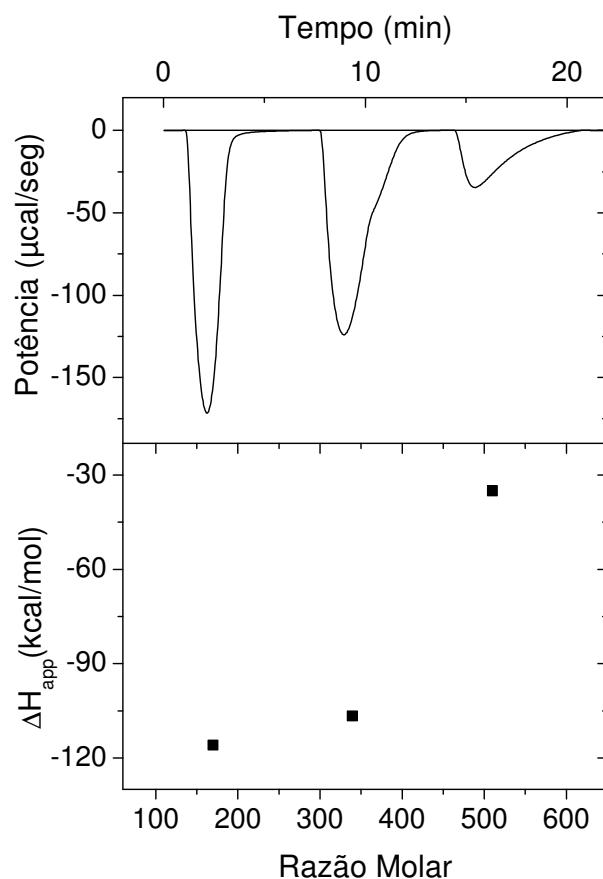


Figura 26 – Conversão completa de catecol em ácido cis-cis-mucônico. O painel superior mostra o calor produzido por três injeções de 3 μL de uma solução de 50 mM de catecol dentro da cela de amostra contendo 600 nM de enzima. O painel inferior mostra a área integrada sob cada pico. Os valores encontrados são o calor total de conversão do catecol em substrato, ou seja, ΔH_{ap} .

Após determinarmos que Pp 1,2-CCD é inibida tanto por catecol quanto por ácido cis-cis-mucônico durante a catálise, decidimos investigar o efeito da presença do ácido cis-cis-mucônico sobre a estrutura e estabilidade da proteína. Para isso, fizemos experimentos por calorimetria diferencial de varredura (DSC), onde foi monitorada a curva de desenovelamento da Pp 1,2-CCD em uma função da razão enzima/produto (Figura 27). Aqui vale lembrar que, nestes experimentos, o ácido cis-cis-mucônico, obtido comercialmente, foi adicionado diretamente à solução contendo a enzima e não oriundo da conversão de catecol. Na ausência do ácido cis-cis-mucônico, Pp 1,2-CCD desenovela-se a 54,8 °C. Como pode ser observado, a temperatura de transição (T_m) desloca-se para temperaturas menores quando os níveis de ácido cis-cis-mucônico aumentam, mostrando que a estrutura protéica é de alguma maneira desestabilizada após a ligação. Assim, calorimetria diferencial por

varredura mostra que a interação com o ácido cis-cis-mucônico reduz T_m de Pp 1,2-CCD de uma maneira consistente com ligações fracas, não covalentes das moléculas de ácido cis-cis-mucônico na cadeia de aminoácidos (71). Embora o decréscimo de T_m sugira uma interação preferencial com o estado desenovelado da proteína, ligação com a enzima em seu estado enovelado não pode ser descartada.

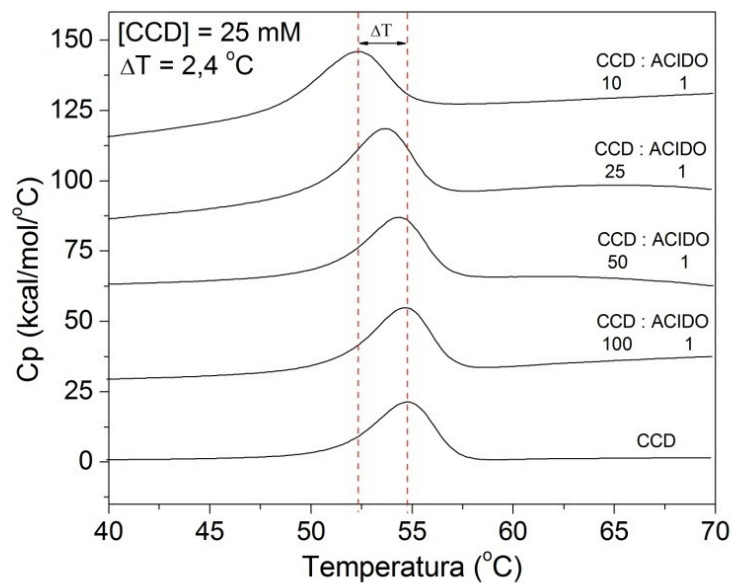


Figura 27 – Desenovelamento da Pp 1,2-CCD na presença de ácido cis-cis-mucônico. Vemos que a temperatura de transição T_m do desenovelamento de Pp.1,2-CCD desloca-se para temperaturas menores quando a razão entre proteína/ácido diminui. A figura mostra ainda que quando a razão proteína/ácido é igual a 10, a variação de temperatura vale $\Delta T_m = 2,4$ °C.

Para uma caracterização mais detalhada do efeito do ácido cis-cis-mucônico sobre o desenovelamento da Pp 1,2-CCD, podemos considerar um modelo simples de equilíbrio em que assumimos n sítios de ligação idênticos e independentes para o ácido cis-cis-mucônico na proteína desenovelada. Desta maneira, a variação da temperatura de transição ($\Delta T_m = T_m - T_{m0}$) deveria depender da concentração de ligante como se segue (71):

$$\Delta T_m \cdot \Delta H_{m0} = -n \cdot R \cdot K_b \cdot T_m \cdot T_{m0} \cdot \ln(1 + K_b \cdot [P]) \quad (20)$$

onde $[P]$ é a concentração de ligante, K_b é a constante de ligação por sítio na temperatura de transição, R é a constante universal dos gases perfeitos, ΔH_{m0} é a

entalpia na temperatura de transição, T_{m0} , na ausência de ligante. Para baixas concentrações de ligante e para ligações fracas, a equação acima pode, ainda, ser aproximada para uma forma linear (4, 71):

$$\Delta T_m \cong \frac{-n \cdot R \cdot K_b \cdot T_{m0}^2 \cdot [P]}{\Delta H_{m0}} \quad (21)$$

Portanto, a partir do comportamento de ΔT_m em função da concentração de ligantes e tomando $n=2$, já que Pp 1,2-CCD possui um sítio catalítico não heme de Fe^{3+} por monômero, podemos determinar $K_b \cong 47.2 \times 10^6 M^{-1}$ (Figura 28).

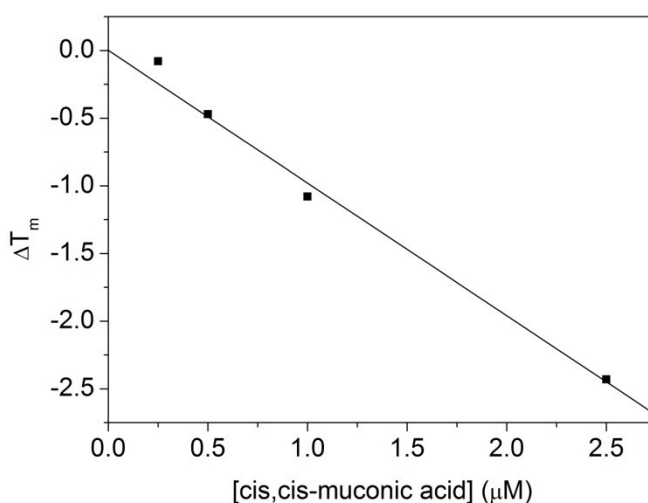


Figura 28 – Regressão linear para determinação da constante de ligação do ácido cis-cis-mucônico à Pp 1,2-CCD (Equação 21). O comportamento linear mostra que as aproximações feitas são válidas.

Uma vez determinado que o ácido cis-cis-mucônico age como inibidor enzimático, que altera a estabilidade estrutural da proteína, fez-se necessário avaliarmos se o produto da reação ligava-se ao mesmo sítio de ligação que o substrato catecol. Para tanto, realizamos experimentos de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) a fim de monitorarmos possíveis mudanças no espectro de RPE do centro metálico Fe^{3+} nativo da enzima Pp 1,2-CCD após a ligação do produto. O centro de Fe^{3+} está localizado exatamente no sítio ativo da enzima, logo a ligação de moléculas, tais como catecol e/ou ácido cis-cis-mucônico, deve perturbar o ambiente do elétron desemparelhado do ferro, perturbação esta refletida como uma mudança no sinal de RPE do íon Fe^{3+} . O sinal de RPE da enzima Pp 1,2-CCD na temperatura de 4 K mostra uma única ressonância em torno de $g = 4,3$ (Figura 29). Este sinal é característico de Fe^{3+} , estado de alto spin

($S=5/2$), em um ambiente de coordenação rômico como observado anteriormente em outras proteínas que possuem um sítio de ferro não heme em sua estrutura (28). Considerando que não existe nenhum alargamento de linha significativo no sinal de RPE, a intensidade (ou a área sob o sinal de RPE integrado) da ressonância é uma medida da concentração de spins contida na amostra em questão. Em tal espectro, podemos observar que a intensidade do sinal de RPE diminui drasticamente após mistura do ácido cis-cis-mucônico com Pp 1,2-CCD. Esse resultado sugere que tal decréscimo na intensidade da linha pode estar relacionado com a redução do íon Fe^{3+} para Fe^{2+} após a ligação do ácido cis-cis-mucônico. O íon Fe^{2+} em seus estados de spin tradicionais ou não é paramagnético ($S=0$) ou não pode ser detectado nas condições em que realizamos nosso experimento ($S=2$). Este resultado é similar ao comportamento observado quando medimos Pp 1,2-CCD na presença do substrato catecol (28) e, claramente, demonstra que o ácido cis-cis-mucônico liga-se ao mesmo sítio que o substrato.

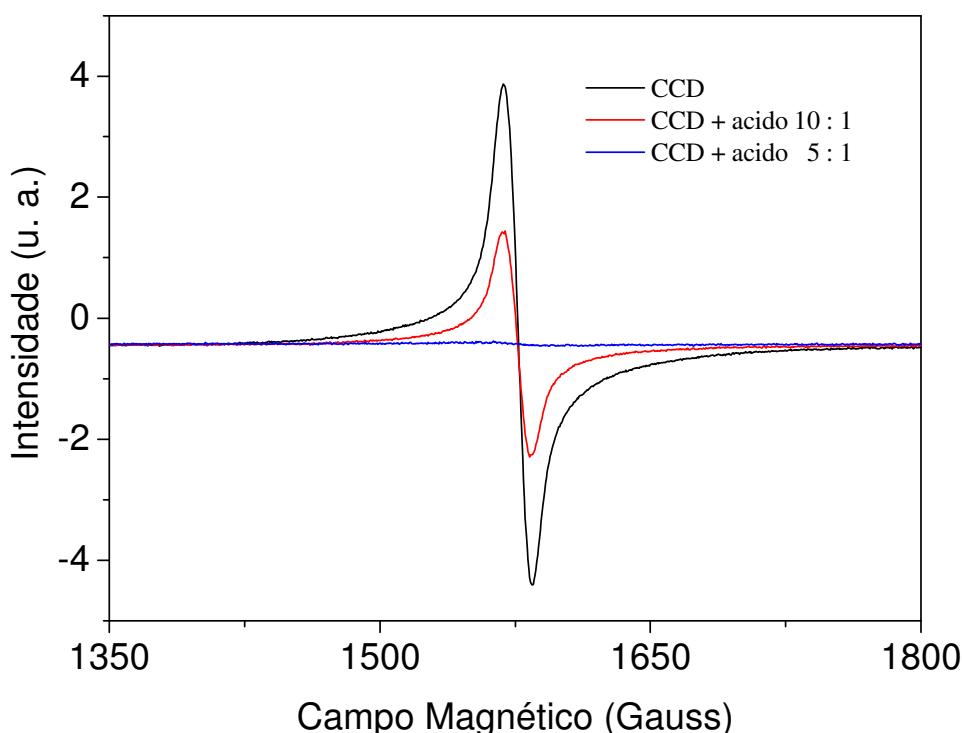


Figura 29 – Espectro de RPE do íon Fe^{3+} localizado no sítio ativo da Pp 1,2-CCD. Vemos que o sinal de RPE diminui conforme aumentamos a concentração de ácido cis-cis-mucônico na amostra.

Moléculas de produto geradas durante uma catálise enzimática apresentam frequentemente certo grau de similaridade com os substratos dos quais são derivados. Isso indicaria, então, no caso de inibição, que um mecanismo do tipo inibição competitiva seria o mais provável, com o produto ligando-se no mesmo sítio onde a catálise ocorre (72, 73). Na cinética de Michaelis-Menten original, assume-se que apenas o passo de ligação ao substrato está em equilíbrio e que a reação inversa, de transformação de produto em substrato, não ocorre. No entanto, devemos levar em consideração que a molécula de produto pode, de fato, permanecer ligada no sítio catalítico da proteína evitando assim a ligação do substrato, o que poderia levar a um efeito inibitório. Desta maneira, é esperado que a catálise do substrato na presença de um aumento progressivo da concentração de produto durante o curso de uma reação seja melhor descrita por um mecanismo que envolva uma inibição competitiva.

Nossos dados se encaixam bem dentro desse modelo de inibição competitiva pelo produto da reação. Dos experimentos de ITC de injeção única (Figura 26), podemos ver que a presença das moléculas de produto afeta a taxa de calor gerado durante a catálise. Os termogramas de DSC mostram que o ácido cis-cis-mucônico pode ligar-se à proteína com uma constante de ligação moderada e o espectro do íon Fe^{3+} obtido por RPE na presença e na ausência de produto identifica que o sítio de ligação do ácido cis-cis-mucônico como sendo o sítio ativo da enzima. A inibição por produto parece estar intimamente envolvida em mecanismos que *in vivo* seriam usados pela célula para controlar seu metabolismo (74-79). Podemos imaginar um mecanismo regulatório onde a quantidade de produto formado em uma reação enzimática é controlada pela concentração de substrato e produto formado, assim mantendo as condições intracelulares longe de extremos biológicos (75, 78). Este poderia ser um mecanismo usado pela bactéria *P. putida* para controlar os níveis de produto e evitar a toxicidade associada com as altas concentrações deste ácido dentro da célula (80).

1.3.2 Interação de Pp.1,2-CCD com micelas, monocamadas e lipossomos

A descoberta de moléculas anfipáticas na estrutura de clorocatecol e catecol dioxigenases junto à interface de ligação dos monômeros (28-32) fez emergir uma questão não antes cogitada em relação à capacidade dessa família de enzimas de se ligar a membranas biológicas. Esta seria uma característica nova e que poderia influenciar de forma significativa estudos em que se busca compreender não somente o mecanismo básico de ação da enzima, mas também seu potencial uso em aplicações biotecnológicas.

Com o objetivo de continuar gerando informações que ajudassem a compreender todas as variantes de atuação da enzima Pp 1,2-CCD, decidimos investigar a hipótese de interação com membranas e os resultados obtidos são apresentados e discutidos nesta parte de nosso trabalho. Resolvemos adotar uma estratégia em que os miméticos de membrana biológica apresentassem uma gradativa complexidade indo de micelas de surfactantes até lipossomos, passando por monocamadas de fosfolipídio. O interesse em se adotar tal estratégia reside no fato de que a interação com diversos miméticos, mesmo que estes muitas vezes não guardem todas as características de uma membrana biológica propriamente dita, é relevante porque ajuda a entender em um sistema simples, aspectos que poderiam ser obscurecidos caso utilizássemos, logo de início, sistemas modelo mais complexos. Além disso, quando se pensa em aplicações que envolvam o uso da enzima em, por exemplo, processos de detoxificação, os miméticos mais simples podem desempenhar papel importante no que diz respeito ao estudo de fatores como seu transporte, entrega, biodisponibilidade, dentre outros.

Sendo assim, às micelas dos surfactantes SDS (aniônico) e CTABr (zwitteriônico) foram incorporadas moléculas contendo sondas paramagnéticas (marcadores de spin), o que nos permitiu utilizar a técnica de RPE para monitorar a possível interação da enzima Pp 1,2-CCD com as micelas. As sondas consistiam de um derivado de ácido esteárico que continha um marcador de spin (radical nitróxido) localizado em posições diferentes ao longo de sua cadeia carbônica (5-SASL, 12-SASL e 16-SASL), além de uma sonda com o grupo repórter localizado na extremidade da cadeia carbônica (CAT-16). Os espectros obtidos de amostras

contendo micelas marcadas de SDS ou CTABr na ausência e na presença de Pp 1,2-CCD são mostrados na Figura 30 e Figura 31, respectivamente.

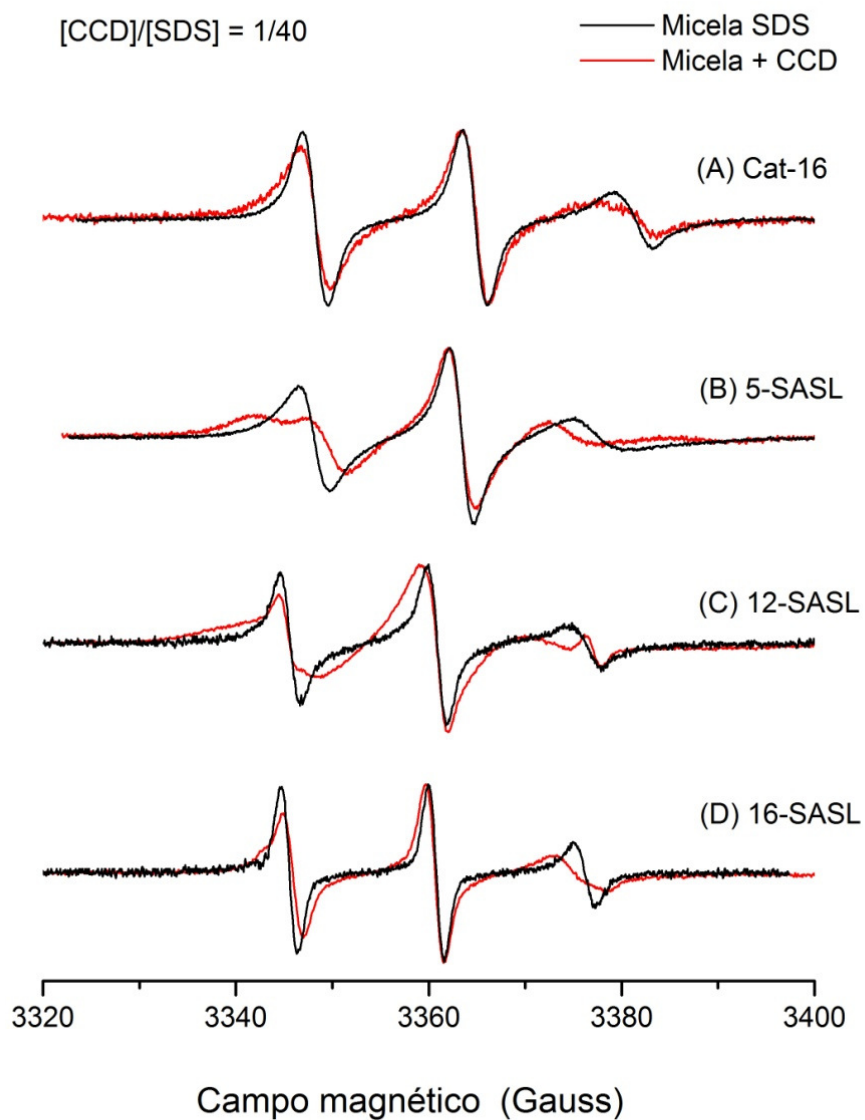


Figura 30 – Espectros de RPE dos marcadores: (A) CAT-16, (B) 5-SASL, (C) 12-SASL e (D) 16-SASL incorporados em micelas de SDS na ausência e presença de 0,125 mM de Pp 1,2-CCD em tampão Tris-HCl (20mM Tris, 50mM NaCl, pH 8,0). A concentração final de SDS foi 5 mM, contendo 0,5 mol% de cada marcador de spin.

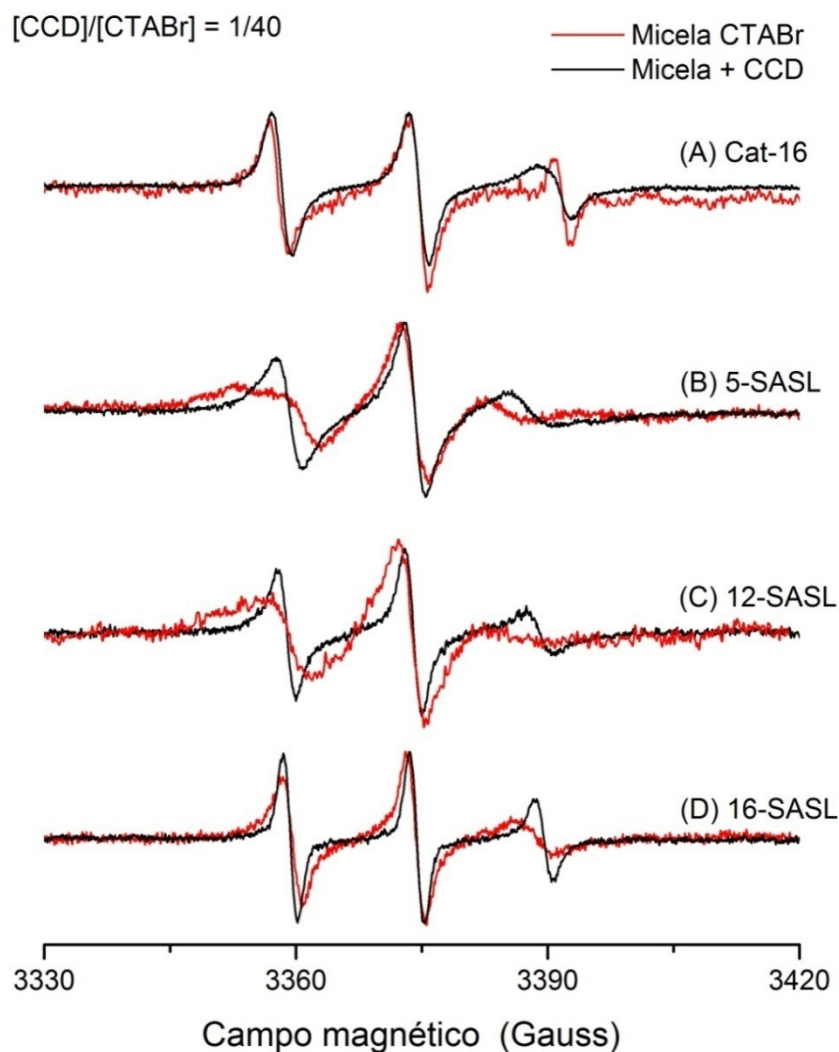


Figura 31 – Espectros de RPE dos marcadores: (A) CAT-16, (B) 5-SASL, (C) 12-SASL e (D) 16-SASL incorporados em micelas de CTABr na ausência e presença de 0,025 mM de Pp. 1,2-CCD em tampão Tris-HCl (20mM Tris, 50mM NaCl, pH 8,0). A concentração final de CTABr foi 1 mM, contendo 0,5 mol% de cada marcador de spin.

A primeira conclusão que pode ser tirada ao observarmos os espectros nas Figuras 30 e 31 é que a resposta para a questão colocada no início desta seção é afirmativa, ou seja, Pp 1,2-CCD é capaz de se ligar a micelas de surfactantes, já que em todos os espectros de RPE houve mudanças na forma de linha quando a proteína foi adicionada às micelas.

O espectro de RPE de um radical nitróxido é caracterizado pela presença de três linhas de ressonância associadas com as transições eletrônicas entre os níveis de energia hiperfinos, resultados da interação do momento magnético eletrônico com o momento magnético nuclear. A dinâmica experimentada pela molécula portadora do grupo NO é refletida nos espectros de RPE, já que as interações

magnéticas (Zeeman e hiperfina) passam a ser moduladas por tal dinâmica. O resultado final no espectro depende do jogo entre o grau de movimento da molécula (que define os chamados regimes de movimento: rápido, intermediário, lento, rígido) e a magnitude das interações magnéticas em questão. Se a dinâmica for muito rápida (frequência muito maior do que a anisotropia das interações magnéticas em unidades de energia), o espectro de RPE será resultado da quase completa promediação da anisotropia das interações magnéticas e conterá três linhas finas e de intensidades muito parecidas (por exemplo, o espectro do marcador Cat-16 na Figura 30). À medida que o movimento se torna mais lento, as três linhas do espectro de RPE vão se alterando (alargamentos e mudanças de intensidade), o que permite estabelecer uma clara correlação entre forma do espectro e regime de movimento.

A análise de espectros de RPE de marcadores de spin do tipo usado neste trabalho é, normalmente, feita ou através de simulações espectrais utilizando-se um pacote de programas desenvolvidos por Freed e colaboradores (81), ou pelo uso de parâmetros empíricos medidos diretamente nos espectros (82, 83). Embora as simulações espectrais forneçam uma descrição quantitativa bastante útil, sua utilização esbarra sempre no problema do tempo necessário para que se consigam bons ajustes. Neste trabalho, decidimos adotar, portanto, a estratégia que envolve o emprego dos parâmetros desdobramento hiperfino isotrópico (a_0), razão entre as alturas das linhas de campo baixo e central (h_{+1}/h_0) e desdobramento hiperfino máximo (a_{\max}) que estão definidos na Figura 32.

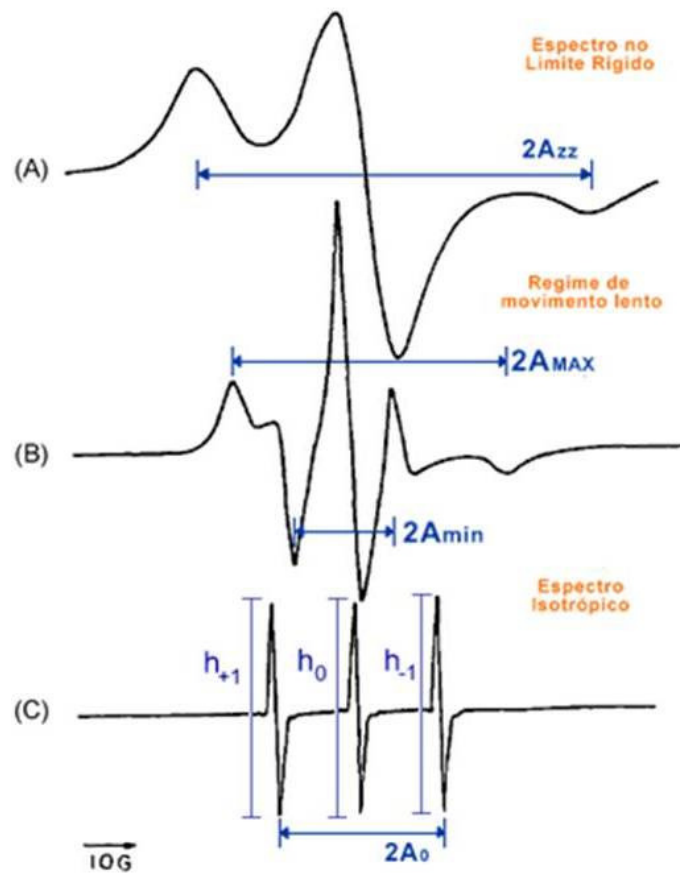


Figura 32 – Anisotropia do espectro de RPE do marcador de spin sob várias condições: (A) limite rígido – rotação em torno do eixo z somente, (B) aumento na amplitude de movimento devido à inclinação e oscilação das cadeias lipídicas na bicamada, e (C) movimento isotrópico rápido. Figura adaptada de (82).

Na Tabela 1 apresentamos os valores dos parâmetros medidos a partir dos espectros de RPE de amostras contendo micelas de SDS e CTABr na ausência e na presença de Pp 1,2-CCD. Podemos, ainda, utilizar os parâmetros na Tabela 1 como sendo uma medida da polaridade do ambiente ao redor do marcador de spin, associada à constante de desdobramento hiperfino isotrópico a_0 (84), e uma medida da mobilidade da molécula contendo o marcador, associada à razão h_{+1}/h_0 . Assim, quanto maior a polaridade do meio e mais rápido o movimento do marcador, maior o valor de a_0 e mais próximo de 1 estará a razão h_{+1}/h_0 , respectivamente.

Tabela 1 – Parâmetros de mobilidade e polaridade do meio ambiente ao redor dos marcadores de spin localizados na região polar e ao longo da cadeia acil do ácido esteárico em micelas de SDS e CTABr.

Parâmetros	Spin-Label	micela SDS		micela CTABr	
		pura	micela+proteína	pura	micela+proteína
(A) a_0 (Gauss)	Cat-16	16,1	15,4	16,0	16,9
	12-SASL	15,8	15,0	14,9	12,9
	16-SASL	15,2	14,1	15,0	13,9
(B) h_{+1}/h_0	Cat-16	1,0	0,8	0,9	0,8
	12-SASL	0,8	0,5	0,8	0,4
	16-SASL	0,9	0,7	1,0	0,7

Primeiramente, devemos observar na Tabela 1 que os parâmetros não apresentam mudanças significativas quando comparamos seus valores entre os dois sistemas micelares na ausência da enzima. Tanto a_0 quanto h_{+1}/h_0 são bastante similares, o que indica que do ponto de vista dos espectros de RPE os dois modelos são similares, o que também pode ser visto se comparamos os espectros nas Figuras 30 e 31. O marcador Cat-16 está localizado na interface micela/solvente (região polar) e exibe valores elevados de a_0 em ambas as micelas de SDS e CTABr indicando, como esperado, alta polaridade nesta região. Estes valores estão próximos daqueles encontrados para micelas de SDS com um marcador de spin similar (85). Para os outros marcadores de spin, é observado um decréscimo da polaridade no interior da micela, mas ainda com valores relativamente altos de a_0 .

A adição da enzima leva a alterações em todos os espectros medidos. Na região da interface micela-solvente, monitorada pelo marcador Cat-16, as alterações são em sentidos opostos. Enquanto em SDS, a presença da proteína leva a um espectro correspondente a um marcador em regime de movimento mais lento e com valor de a_0 diminuído (Figura 30 e Tabela 1), em CTABr, o espectro medido é típico de um regime mais rápido de movimento (linhas mais finas) e valor de a_0 aumentado.

Indo para uma posição próxima à interface, monitorada pelo marcador 5-SASL, vemos que a presença da Pp 1,2-CCD leva, desta feita, a mudanças similares em SDS e CTABr. Em ambos os casos, o espectro após adição de Pp 1,2-CCD é típico de um marcador experimentando dinâmica mais lenta quando

comparado com os espectros na ausência da enzima, caracterizado por linhas mais largas, com desdobramento da linha de campo baixo, o que impede a medida tanto de a_0 quanto de h_{+1}/h_0 (Figuras 30B e 31B). Mesmo assim, podemos inferir que a presença da proteína restringe o movimento do marcador nessa região, fazendo com que este apresente, portanto, o espectro correspondentemente mais lento.

No caso dos marcadores localizados mais internamente às micelas (12-SASL e 16-SASL), o efeito de se adicionar a Pp 1,2-CCD é expresso em mudanças semelhantes nos espectros. Nos dois casos, a presença da Pp 1,2-CCD leva o ácido esteárico marcado a experimentar uma dinâmica mais lenta (Figuras 30C-D e 31C-D), provavelmente oriunda de uma maior restrição de movimento induzida pela estrutura protéica, evidenciada na diminuição dos valores de h_{+1}/h_0 (Tabela 1) e na maior largura das linhas espectrais. Um fato interessante é observado no caso do marcador 12-SASL em micelas de SDS (Figura 30C), em cujo espectro podemos perceber o aparecimento de uma segunda componente espectral após inclusão da Pp 1,2-CCD. Isto significa que há duas populações distinguíveis, dentro da escala de tempo característica de RPE, de moléculas de marcador de spin, provavelmente uma próxima à Pp 1,2-CCD e outra referente ao marcadores no bulk da micela, que coexistem em dois ambientes estruturalmente distintos.

O efeito geral com relação à mobilidade do marcador de spin quando Pp 1,2-CCD é adicionada às micelas de SDS se mostra como um decréscimo deste parâmetro em todas posições ocupadas pelo marcador de spin na micela, sendo cerca de 20% da mobilidade em Cat-16, 38% da mobilidade em 12-SASL e 23% da mobilidade em 16-SASL (Figura 33). Assim, a mobilidade do marcador de spin é menor no interior da micela em torno do carbono 12 quando Pp 1,2-CCD liga-se à micela. Quanto às micelas de CTABr, o efeito da proteína na mobilidade do marcador de spin na região polar é pouco significativo, cerca de 10% da mobilidade, sendo mais pronunciado do que nas micelas de SDS nas posições 12-SASL e 16-SASL, com um decréscimo na mobilidade de cerca de 50% e 25%, respectivamente (Figura 34). Aqui cabe lembrar que a correlação entre alterações observadas e posição estrutural dentro do sistema micelar não pode ser feita de maneira extremamente rigorosa já que as micelas têm seu interior inerentemente desordenado e fluído. Logo, a associação entre mudança em um parâmetro e localização deve sempre ser feita com cautela.

Os dados de RPE obtidos a partir de amostras contendo micelas de surfactantes sugerem, portanto, uma efetiva interação entre a proteína Pp 1,2-CCD e os modelos de membrana em questão.

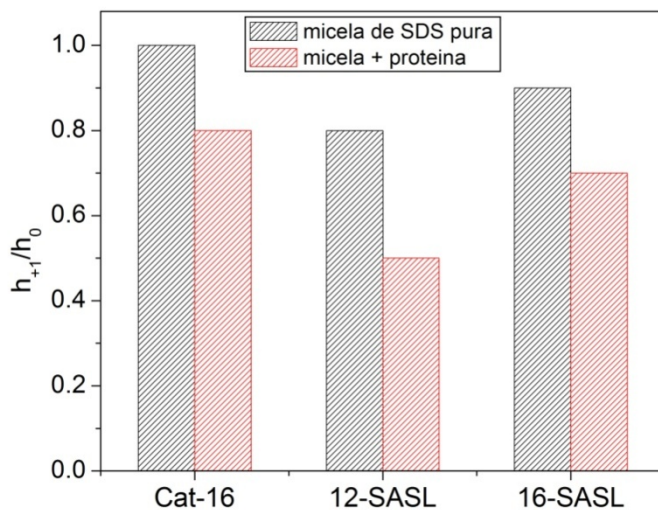


Figura 33 – Variação da mobilidade do meio ambiente ao redor dos marcadores de spin na região polar e ao longo da cadeia acil do ácido esteárico em micelas de SDS.

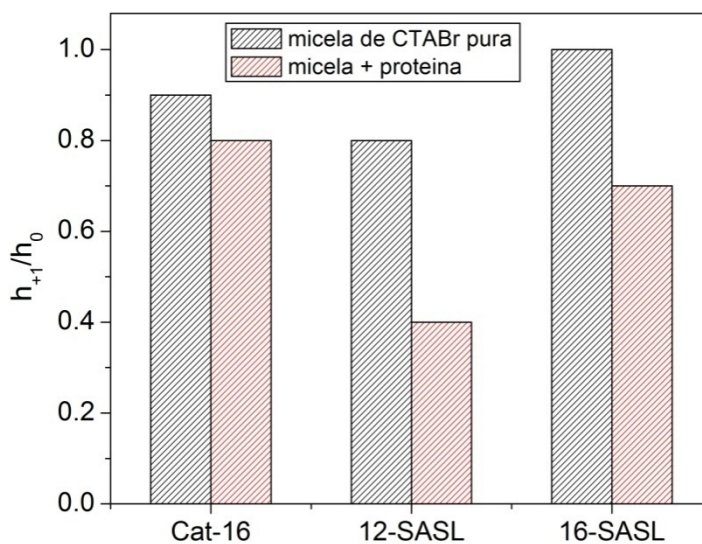


Figura 34 – Variação da mobilidade do meio ambiente ao redor dos marcadores de spin na região polar e ao longo da cadeia acil do ácido esteárico em micelas de CTABr

Com o intuito de avançarmos na compreensão em relação à interação de Pp1,2-CCD com modelos de membranas, também utilizamos monocamadas de Langmuir e os resultados serão apresentados e discutidos agora. Monocamadas de Langmuir são excelentes sistemas para se estudar interações em um arranjo bidimensional de moléculas anfifílicas, servindo de modelo para processos que ocorram na superfície de membranas biológicas (86-88). Nestas situações, o uso de monocamadas de Langmuir oferece vantagens já que a densidade e composição da interface podem ser variadas de forma bastante controlada e as interações podem ser estudadas através de medidas da tensão superficial, por exemplo.

No experimento com monocamadas de Langmuir, uma quantidade conhecida de material anfifílico dissolvida em solvente orgânico é espalhada na interface ar-água, sendo que essa substância deve ser insolúvel e apresentar um coeficiente de espalhamento favorável à ocorrência desse processo, ou seja, deve se orientar na interface de forma a minimizar sua energia livre (27). As monocamadas são formadas na superfície de uma solução aquosa, contida em um compartimento denominado cuba de Langmuir (Figura 35). Esta cuba é constituída por um material inerte, geralmente Teflon, sendo dotada de barreiras móveis capazes de varrer as moléculas presentes na interface.

A adsorção dessa substância anfifílica na interface provoca uma diminuição na tensão superficial da água (γ_0) até um novo valor de tensão (γ), medidos por uma placa de Wilhelmy. Essa variação de tensão superficial ($\gamma_0 - \gamma$) é denominada de pressão superficial, propriedade que fornecerá informações a respeito da adsorção da monocamada formada.

Após evaporação do solvente, a monocamada pode ser comprimida ou expandida pela movimentação das barreiras e o estado de compactação da monocamada é acompanhado através da curva que relaciona a pressão superficial com a área disponível por molécula da substância anfifílica, denominada isoterma de pressão superficial ($\pi - A$), obtida à temperatura constante (Figura 35).

Além de avaliarmos a interação entre os materiais formadores da monocamada, a técnica permite a investigação do efeito de diversas substâncias dissolvidas na subfase aquosa, que podem ou não apresentar atividade superficial com os filmes monomoleculares. Dessa forma, soluções de sais, polímeros,

peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos são exemplos de substâncias frequentemente empregadas como subfases de filmes de Langmuir.

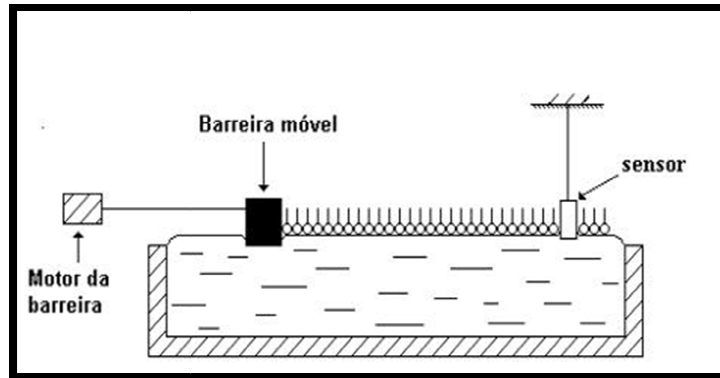


Figura 35 – Representação esquemática de uma cuba de Langmuir utilizada para as medidas da isoterma de pressão superficial. Figura adaptada da referência (27).

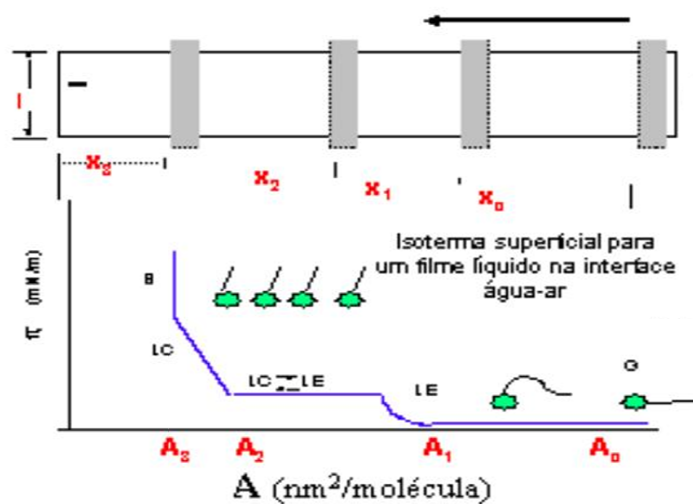


Figura 36 - Representação esquemática de uma isoterma de pressão superficial (π -A).

Sendo assim, utilizando a técnica de monocamadas de Langmuir compostas por fosfolipídios DPPC e a enzima Pp 1,2-CCD injetada na subfase aquosa, medimos a cinética de adsorção de Pp 1,2-CCD na interface ar-água em duas condições diferentes (Figura 37). Inicialmente, na Figura 37A, a enzima foi injetada na subfase contendo solução tampão e investigamos sua adsorção na interface ar-

água na ausência de lipídios. A pressão superficial, neste caso, começou a aumentar transcorridos 25 segundos após a injeção da enzima na subfase, intervalo considerado pequeno como tempo de indução para adsorção da proteína. A pressão superficial atingiu um valor constante de $\sim 13 \text{ mN m}^{-1}$ em aproximadamente 8 minutos. Posteriormente, avaliamos a adsorção de Pp1,2-CCD na presença de uma monocamada lipídica. Inicialmente, espalhamos o lipídeo sobre tampão Tris-HCl (20mM Tris, 50mM NaCl, pH 8,0) e, após evaporação do solvente, foi injetada na subfase quantidade suficiente de proteína. Imediatamente após a injeção da proteína, medidas de pressão superficial foram registradas em função do tempo, de modo a verificar a adsorção da proteína na presença da monocamada lipídica com baixo grau de empacotamento (115 \AA^2). A cinética de adsorção de Pp1,2-CCD em monocamada de DPPC resultou em um aumento brusco da pressão superficial nos segundos iniciais, até que se atingisse um valor constante de $\pi_f \sim 9 \text{ mN m}^{-1}$, após cerca de 6 minutos. O aumento no valor da pressão superficial da monocamada lipídica, posterior à injeção da proteína na subfase, deve ser considerado como um resultado do aumento do número de moléculas adsorvidas na monocamada lipídica. Entretanto, verificamos que a adsorção ocorreu de maneiras distintas, conforme ilustrado na Figura 37. A diferença observada nos valores de pressão superficial de equilíbrio (π_{final}) é esperada e pode ser atribuída a diferenças nos sítios de adsorção disponíveis para a proteína, visto que a presença da monocamada, mesmo em baixo empacotamento, pode afetar a área disponível para adsorção da proteína.

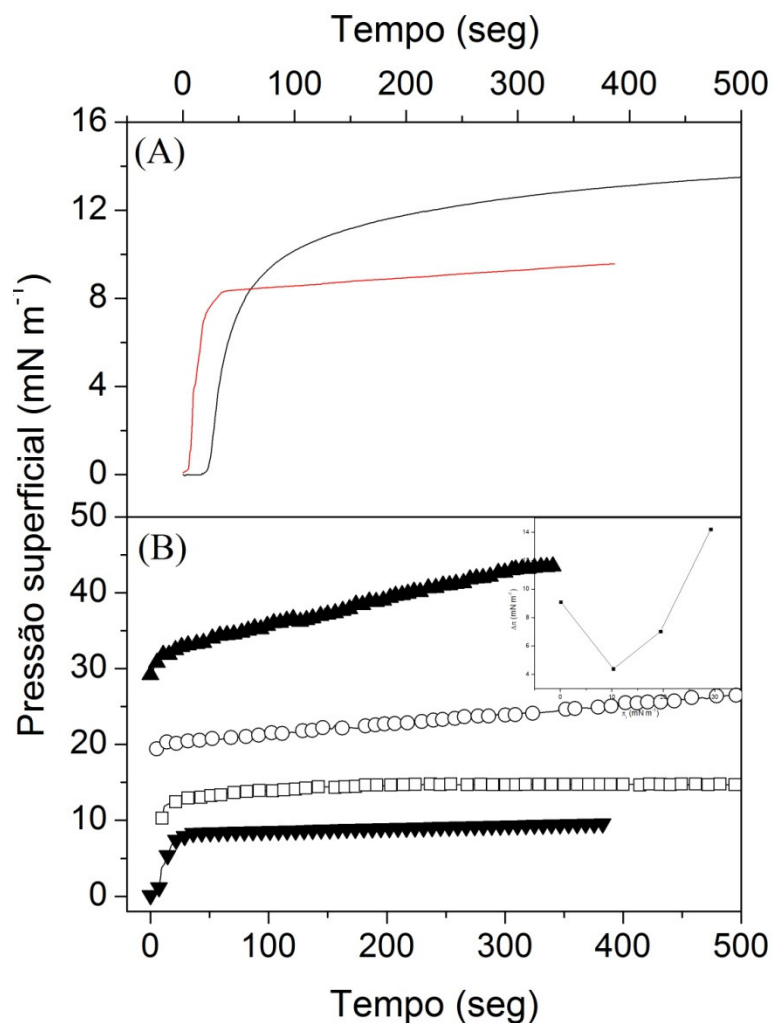


Figura 37 – Cinética de adsorção de Pp1,2-CCD em monocamadas de DPPC (A) na interface sem lipídios e (B) a diferentes níveis de empacotamento de lipídios.

A adsorção de proteínas na interface líquido-ar é um processo bastante complexo e que vêm sendo bastante estudado nos últimos anos. Tripp e colaboradores (89) apresentaram um estudo comparativo sobre a adsorção de algumas proteínas globulares na interface líquido-ar. As proteínas estudadas apresentavam diferenças em sua composição, estrutura secundária, estabilidade conformacional e distribuição superficial dos resíduos de aminoácidos. Dentre os parâmetros investigados, os autores verificaram, por exemplo, que a proteína albumina de soro bovino (BSA) apresentou uma rápida adsorção na interface líquido-ar, sem que tenha sido observado tempo de indução, mesmo a proteína apresentando um valor de hidrofobicidade superficial efetiva menor dentre todas as proteínas estudadas. Neste caso, os autores concluíram que a adsorção ocorreu

devido ao desenovelamento parcial da proteína, resultante da exposição à interface líquido-ar. Tronin e colaboradores (90) também verificaram a atividade superficial de duas proteínas, a imunoglobulina G (IgG) e a peroxidase de raiz forte (HRP), e compararam diretamente a atividade biológica de cada uma dessas proteínas, em termos de imunoenaios para IgG e atividade enzimática para HRP. O trabalho chegou à conclusão de que a adsorção na interface líquido-ar destas proteínas também levava a um desenovelamento parcial ou completo das proteínas adsorvidas, visto que a redução na atividade relacionada a cada proteína foi semelhante ao resultado de atividade biológica obtido na presença de agentes denaturantes. Os autores concluem o trabalho questionando a natureza desta perda de estrutura secundária das proteínas, se apenas uma quantidade de moléculas encontra-se desnaturada ou se uma região específica de cada molécula de proteína é que apresentou perda de estrutura. Mais recentemente, Schmidt e colaboradores (91), avaliaram a adsorção da mesma HRP na interface líquido-ar através da técnica de PM-IRRAS (Polarization-Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy). Os experimentos indicaram, através da posição das bandas do espectro obtido, que de fato, as moléculas adsorvidas na interface encontravam-se desnaturadas, fato que corrobora com a hipótese inicialmente levantada.

A Figura 37B mostra as cinéticas de adsorção de Pp1,2-CCD em monocamadas de DPPC a diferentes empacotamentos lipídicos. Através da figura, podemos notar que o processo de adsorção em função da estrutura do filme lipídico parece ocorrer de duas maneiras distintas, de acordo com a densidade lipídica inicial. Primeiramente, a adsorção da proteína diminuiu quando aumentamos o empacotamento lipídico de 0 mN m^{-1} para 10 mN m^{-1} . Neste caso, podemos concluir que a presença da monocamada lipídica em maior empacotamento diminui a quantidade de enzima adsorvida, provavelmente por menor área disponível para a adsorção da cadeia polipeptídica, visto a competição com maior quantidade de moléculas lipídicas. Esta observação está de acordo com dados reportados na literatura para casos de interação de outras proteínas com filmes lipídicos como fitase (92), urease (93) e creatina quinase mitocondrial (94). Nestes casos, com o aumento da pressão superficial inicial, a variação de π provocada pela presença de proteínas torna-se menor até que o sistema alcance a pressão de inserção máxima

(ou pressão de exclusão), onde nenhuma alteração em π é observada, porque a proteína não pode mais penetrar na monocamada.

No entanto, para os valores de π_{in} de 20 e 30 mN m⁻¹, observamos uma mudança neste comportamento, pois notamos que com o aumento da pressão inicial, a variação de π foi maior. Este comportamento não usual indica que a proteína, ao contrário do que se esperava, parece manter sua capacidade de penetrar na monocamada lipídica, mesmo com esta apresentando alto grau de compactação, fato que provavelmente ocorra devido a fortes interações hidrofóbicas entre a proteína e a cadeia alquílica do fosfolípido.

Um estudo anterior de nosso grupo indicou a capacidade de Pp 1,2-CCD em se ligar a moléculas anfifílicas (28), no qual foi possível concluir que esta ligação ocorre em um canal hidrofóbico da enzima, de modo que a região polar da molécula anfipática aponta em direção ao solvente, enquanto a cadeia carbônica é mantida dentro do canal. Além disso, a atividade catalítica desta enzima foi verificada na presença de moléculas de ácido graxo, resultando em um decréscimo significativo de sua atividade catalítica (28), podendo este ser um indicativo de que a ligação ao fosfolípido possa atuar como um processo de regulação da atividade catalítica da enzima, desenvolvido pela célula. Correlacionando esta proposição com os dados obtidos, verificamos que, de fato, uma significativa quantidade de proteína encontra-se adsorvida quando há altas densidades lipídicas na monocamada, inclusive em π correspondente ao empacotamento dos lipídios na biomembrana, próximo a 30 mN m⁻¹ (95), revelando um caráter hidrofóbico de, pelo menos, uma região da proteína, facilitando a sua penetração. Além disso, a ausência do substrato no meio pode ter facilitado a adsorção da enzima na interface, visto que o excesso de substrato no meio pode ser o mecanismo pelo qual a proteína desliga da membrana e torna-se ativa.

Ainda interessados em melhor avaliar a adsorção da proteína na interface, os dados da cinética de adsorção de Pp1,2-CCD, nos diferentes graus de empacotamento, foram tratados com a aproximação sugerida por Magett-Dana (96), que aplicou uma equação de primeira ordem para analisar o fenômeno de adsorção de proteínas em interfaces líquidas (Figura 38):

$$\ln \left[\frac{\pi_f - \pi_t}{\pi_f - \pi_i} \right] = -kt \quad (22)$$

onde π_i é a pressão superficial inicial, π_f é a pressão superficial de equilíbrio, π_t é a pressão superficial no tempo t e k é a constante de velocidade.

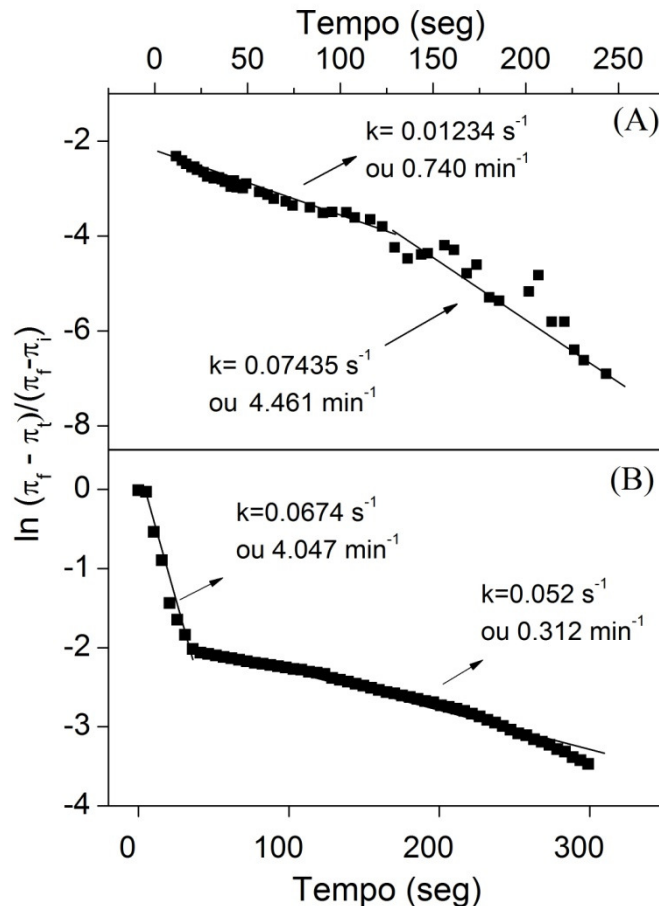


Figura 38 – Adsorção de Pp12-CCD em monocamadas de DPPC. Foi usada a aproximação de Magett-Dana para analisar o processo de adsorção desta proteína à interface de lipídios.

A Figura 38 ilustra o tratamento aplicado às curvas obtidas em π inicial de 0 mN m^{-1} . De acordo com a Figura 38 e a Tabela 2, duas constantes de velocidade puderam ser identificadas para cada condição de empacotamento lipídico. Para π em 0 mN m^{-1} , o mecanismo de adsorção ocorre em duas etapas que envolvem, inicialmente, um processo de penetração da proteína que, pela ausência de tempo de indução, mostra que a difusão da enzima é bastante rápida. Já a constante de

velocidade k_2 , que apresenta valor menor, provavelmente está associada a processos de rearranjos conformacionais da proteína adsorvida à interface. Dados da literatura indicaram diferentes valores para a constante de velocidade de adsorção de outras proteínas, com pressão superficial inicial de 0 mN m^{-1} , da ordem de 100 vezes menor que os valores obtidos para Pp 1,2-CCD, indicando mais uma vez a forte adsorção da enzima na interface ar-água. Por outro lado, os valores foram bastante similares em ordem de magnitude, com aqueles obtidos para adsorção de fitase (92).

Aumentando-se o empacotamento lipídico para 10 mN m^{-1} , duas observações podem ser apontadas. A primeira delas é um decréscimo no valor de k_1 , que pode ser corroborado com um decréscimo na pressão π , indicando maior dificuldade de penetração da enzima na interface. Além disso, a partir deste ponto, k_2 passa a ser maior do que k_1 , para todas as densidades lipídicas. Esta observação pode ser um indicativo de que, inicialmente, a enzima adsorva na interface lipídica através de sua região hidrofóbica conforme discutido. Entretanto, esta adsorção passa a ser dificultada pelo elevado grau de compactação do filme superficial. Porém, a presença de uma quantidade de moléculas adsorvidas resulta em um gradiente de concentração entre a interface e o volume da solução, podendo este ser a força motriz para a subsequente adsorção de outras moléculas de proteína.

Tabela 2 – Constantes de velocidade para adsorção de Pp1,2-CCD em monocamadas de DPPC.

π in (mN m^{-1})	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})
0	4,047	0,312
10	0,74	4,461
20	0,17	0,458
30	0,354	2,21

A Figura 39 mostra a isoterma de pressão superficial-área por molécula superficial (π -A) para monocamadas de DPPC e na presença da enzima na subfase. Para a monocamada de DPPC pura formada sobre tampão, uma leve modificação no comportamento da isoterma é observada quando comparada ao obtido em água, pois o patamar correspondente à coexistência de fases líquido-expandido líquido-condensado, no caso da subfase tampão, foi observado em torno de π igual a 9.0 mN m⁻¹. Já o colapso da monocamada ocorreu em aproximadamente 65 mN m⁻¹, sendo a área mínima por volta de 53 Å². A adição de Pp1,2-CCD na subfase alterou fortemente o comportamento da curva π -A, mesmo a elevados valores de pressão superficial, fato já sugerido através das curvas de cinética de adsorção, onde pudemos evidenciar a grande penetração da proteína. Através da compressão da monocamada, podemos concluir que, não apenas a proteína se incorpora na monocamada, como também permanece na interface, mesmo após compressão do filme. Além disso, a presença da proteína afeta a fluidez do filme lipídico, pois a área disponível por molécula passou a ser duas vezes maior. Sendo assim, na presença da proteína, ocorre uma maior dificuldade no empacotamento das moléculas do lipídeo, tornando o filme muito menos denso. Outra evidência desta alteração de fluidez do sistema mimético consiste da diminuição no valor de pressão de colapso do filme, que na presença da proteína passa a ser da ordem de 50 mN m⁻¹. A alteração de fluidez aqui detectada é compatível com as mudanças observadas em nossos dados de RPE com o sistema mimético constituído por micelas de surfactantes, indicando que este possa ser, portanto, um efeito geral da presença da enzima sobre modelos de membrana.

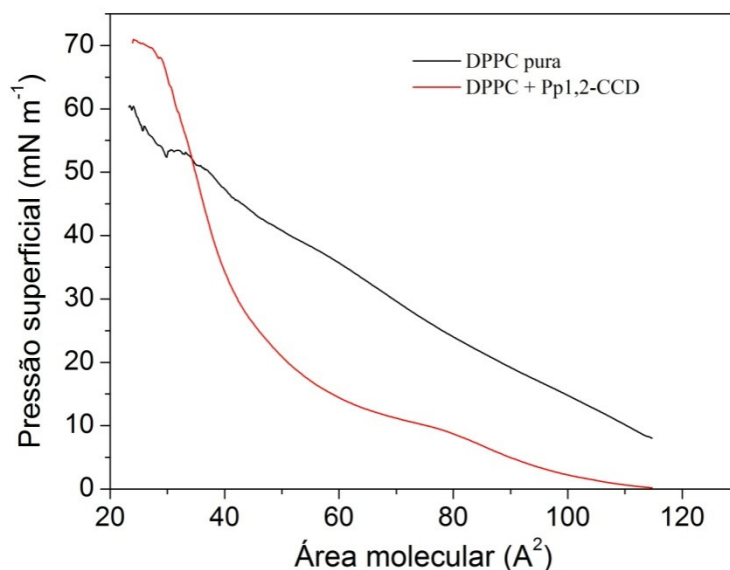


Figura 39 – Isoterma π -A de monocamada de DPPC em solução tampão e na presença de Pp 1,2-CCD.

Diante da evidenciada alteração na fluidez do filme lipídico, verificamos as propriedades reológicas da interface, de modo a melhor estimar o efeito da proteína adsorvida ao filme, através da técnica de elasticidade dilatacional superficial (E). Os valores de E para monocamada de DPPC pura aumentam com a pressão superficial inicial (Tabela 3), visto que seu alto estado de empacotamento mantém mais fortes as interações entre as moléculas do filme, o que torna esse filme rígido mais difícil de ser desestruturado. Já para a monocamada mista (lipídio + proteína), verificamos uma redução em E bastante significativa, principalmente no sistema formado a partir de 10 mN m^{-1} . A partir deste valor de π , notamos que a incorporação da proteína diminui o módulo de elasticidade da interface, devido à presença de um material flexível que afeta a rigidez da monocamada estruturada.

Tabela 3 - Valores de elasticidade dilatacional superficial (E) de monocamada de DPPC na presença e ausência de Pp1,2-CCD em função da pressão superficial

π (Mn m ⁻¹)	E Pure DPPC(mN m ⁻¹)	E DPPC + CCD (mN m ⁻¹)
0	-	11.56
10	80.53	58.23
20	109.14	162.28
30	304.6	417.04

Entretanto, para empacotamentos lipídicos mais altos, a presença de Pp1,2-CCD aumenta o valor de E, comparado com a monocamada de DPPC puro. Neste caso, a presença da proteína, mesmo sendo um material com elevada liberdade conformacional, o que contribuiria para uma perda da estrutura de equilíbrio do sistema misto, torna este filme mais rígido. Este comportamento foi previamente observado para outras enzimas, onde este valor mais alto de E foi correlacionado com a formação de uma camada muito estruturada, pela possibilidade da proteína estar adsorvendo justamente em pontos do filme lipídico que apresentavam certa fluidez.

Uma vez tendo demonstrado que Pp 1,2-CCD é capaz de provocar alterações em micelas de surfactantes e de investigar os efeitos de superfície decorrentes de sua adsorção em monocamadas lipídicas, passamos ao estudo da interação da enzima com vesículas (bicamadas) lipossômicas. Para tanto, nos valem das técnicas calorimétricas de DSC e PPC e também da espectroscopia por RPE, assim tentando obter uma descrição que aliasse aspectos globais, oriundos da calorimetria, com aspectos locais, obtidos das perturbações provocadas pela proteína no entorno de sondas magnéticas inseridas nos lipossomos.

Mais especificamente, utilizamos DSC e PPC para monitorar a transição de fase lipídica na ausência e na presença da proteína. Como Pp 1,2-CCD sofre transição de fase (enovelada para desenovelada) por volta de 54 °C (Figura 40), tivemos o cuidado de escolher fosfolípidios que sofressem transição de fase longe dessa temperatura. Desta maneira, foi escolhido o fosfolípido DMPC, cujas vesículas multilamelares exibem dois eventos endotérmicos quando são aquecidas. Na temperatura de cerca de 13 °C é observada uma transição de fase menos

energética e menos cooperativa, denominada de pré-transição, surgida da conversão da fase gel lamelar $L_{\beta'}$ para a fase gel *ripple* $P_{\beta'}$ (Figura 41). Uma segunda transição, mais energética e apresentando uma maior cooperatividade intermolecular entre os fosfolípidios das vesículas de DMPC, denominada de transição principal, surge da conversão da fase $P_{\beta'}$ para fase lamelar líquido-cristalino L_{α} (Figura 41) e é exibida na temperatura de cerca de 23 °C.

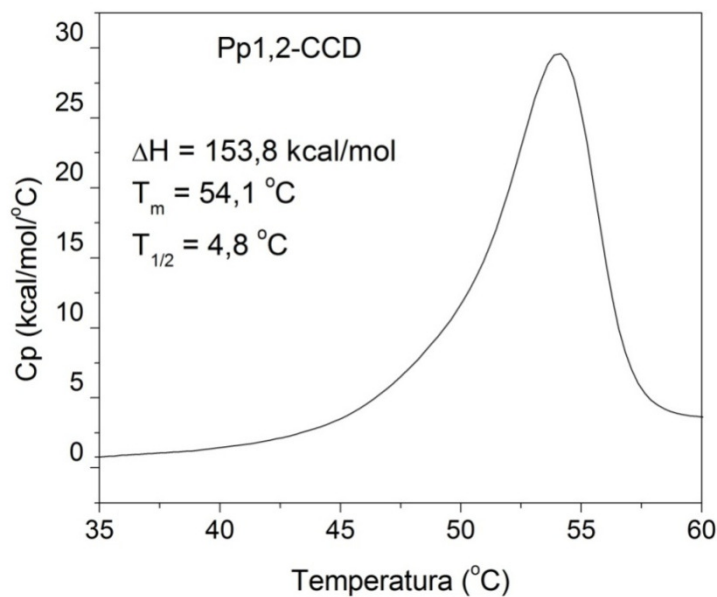


Figura 40 – Transição de fase de Pp 1,2-CCD determinada por DSC. A velocidade de aquecimento foi configurada em 60°C/h e a quantidade de proteína dentro da cela de amostra foi de 25 mM.

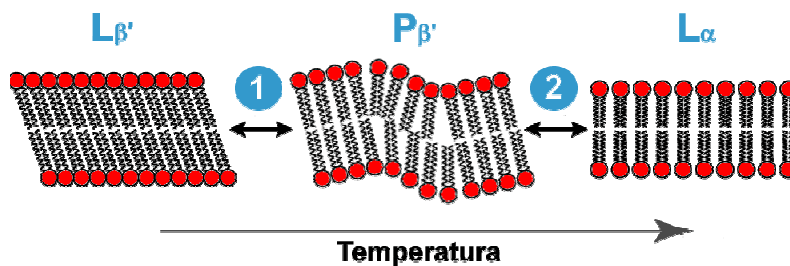


Figura 41 – Transições de fase de vesículas lipídicas de DMPC. O evento 1 refere-se à chamada pré-transição surgida da conversão da fase gel *tilted* ($L_{\beta'}$) para a fase gel *ripple* ($P_{\beta'}$) e o evento 2, denominado de transição principal, surge da conversão da fase $P_{\beta'}$ para a fase líquido-cristalino (L_{α}). Figura adaptada da referência (97).

Na Figura 42 é mostrado o resultado do experimento de DSC em que acompanhamos o comportamento termotrópico de vesículas de DMPC. Como dito acima, este fosfolípido sofre duas transições de fase (em torno de 13 °C e 23 °C). Obviamente tais temperaturas de transição dependem de parâmetros como pH, força iônica e hidratação, mas as temperaturas de transição aqui obtidas, onde o DMPC foi ressuspendido em tampão Tris-HCl (20mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0), têm boa concordância com os dados disponíveis na literatura (98, 99).

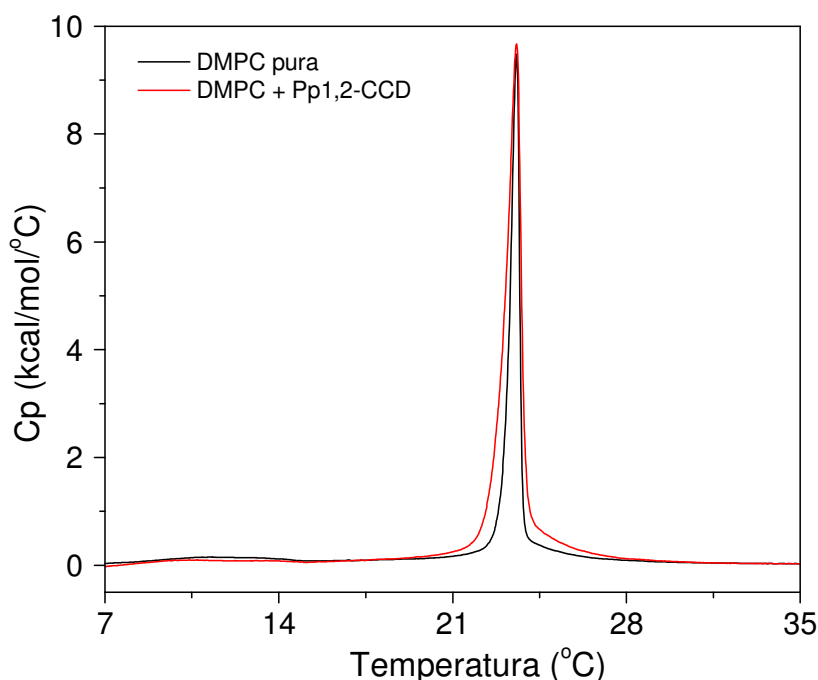


Figura 42 – Transição de fase de vesículas multilamelares de DMPC na ausência (—) e na presença (—) de Pp 1,2-CCD determinada por DSC. A velocidade de aquecimento foi configurada para ser 60°C/h e a razão molar lipídio/proteína usada foi de 31.

Vemos na figura acima que o efeito da presença de Pp 1,2-CCD na transição de fase da DMPC resume-se em uma diminuição da cooperatividade da transição principal evidenciada no alargamento da transição. O deslocamento da temperatura de transição de fase principal dos lipídios para valores menores foi insignificante. A diminuição da cooperatividade da transição é um indicativo de forte interação entre a proteína e as membranas constituídas por fosfolípidios de DMPC. Os valores termodinâmicos obtidos da transição lipídica do DMPC na ausência e na presença de Pp 1,2-CCD estão apresentados na **Erro! Auto-referência de indicador não válida..**

Tabela 4 – Dados termodinâmicos obtidos da transição de fase das vesículas de DMPC multilamelar na ausência e presença de Pp1,2-CCD.

Amostra	Pré-Transição		Transição principal		
	T_p (°C)	ΔH_p (kcal/mol)	T_m (°C)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol.°C)
DMPC	~ 12	~ 0,800	23,5	6,5	276,7
DMPC + CCD	-	-	23,5	9,4	401,1

Analisando os dados da Tabela 4 com relação à pré-transição do DMPC em sua forma multilamelar, vemos que a transição lipídica com a proteína ausente ocorreu por volta de 12 °C, absorvendo para isso uma energia da ordem de 800 calorias por mol de lipídio. A presença da proteína neste caso foi capaz de silenciar a pré-transição do DMPC. Voltando nossa atenção agora para a transição principal vemos que a variação de T_m das vesículas de DMPC na presença e ausência de Pp1,2-CCD foram insignificantes. No entanto, a energia absorvida na transição lipídica foi maior cerca de 30% na presença de Pp 1,2-CCD. Esta variação de energia ocorreu acompanhada de um aumento significativo da entropia do sistema durante a transição lipídica (vide Tabela 4). Vemos ainda em ambas as transições lipídicas um alargamento da curva de DSC devido à diminuição da cooperatividade da transição (7). Deste modo, a incorporação de Pp 1,2-CCD foi capaz de induzir mudanças significativas no perfil termotrópico destes lipídios (Tabela 4).

Além disso, dos termogramas tradicionais de DSC, complementamos as medidas calorimétricas com experimentos de PPC que mostram como variam os parâmetros volumétricos das vesículas multilamelares de DMPC durante a transição de fase. A técnica de PPC é baseada em medidas do calor diferencial liberado ou absorvido em resposta a pequenos pulsos de pressão sobre a amostra dentro da cela do calorímetro. Este calor está diretamente relacionado com a diferença da expansividade térmica das moléculas de soluto comparado com o volume de solvente deslocado por estas moléculas. A expansão térmica de qualquer substância ocorre do aumento das distâncias intermoleculares médias em função da temperatura e isso decorre predominantemente da interação não covalente entre os ligantes, uma vez que ligações covalentes não são excitadas a temperaturas próximas à ambiente e neste caso, o volume intrínseco de qualquer molécula

geralmente permanece constante. Deste modo, qualquer mudança no volume molecular aparente de uma vesícula devido a uma molécula será causada por uma mudança da separação média entre lipídios e também em sua solvatação (100). Sendo assim, vemos na Figura 43, assim como no experimento de DSC convencional, que a presença de Pp 1,2-CCD faz com que o volume da vesícula mude significativamente durante a transição lipídica. A variação do volume ($\Delta V/V$) associada com a transição de fase lipídica é obtida diretamente integrando-se a área sob as curvas obtidas do experimento de PPC. Sendo assim, a Figura 43 mostra que a presença de Pp1,2-CCD na razão lipídio/proteína igual a 31, aumentou seu volume em cerca de 2%. No entanto, sem mudar variar T_m . Podemos ver ainda que a presença da proteína aumenta o coeficiente de dilatação térmica $\Delta\alpha(T)$ da transição lipídica em cerca de $2,6 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$. Sendo assim, este é mais um resultado que indica a interação desta enzima com lipossomos.

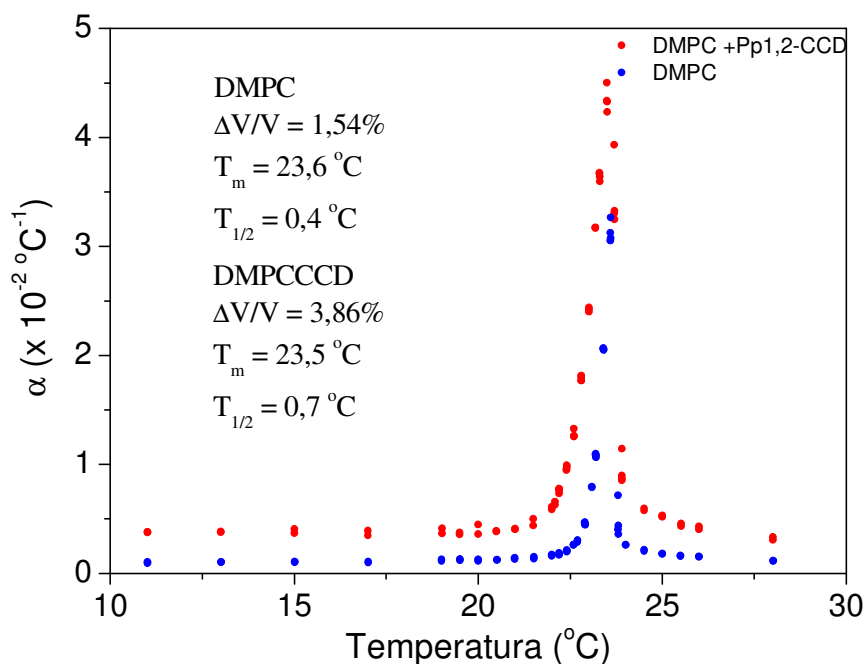


Figura 43 – Coeficiente de dilatação térmica em função da temperatura da transição de fase de vesículas multilamelares de DMPC na ausência (••••) e na presença (•••••) de Pp 1,2-CCD determinada por PPC. A razão molar lipídio/proteína usada foi de 31.

PPC é baseada em medidas do calor diferencial liberado ou absorvida em resposta a pequenos pulsos de pressão sobre a amostra dentro da cela do calorímetro. Este

calor está diretamente relacionado com a diferença da expansividade térmica das moléculas de soluto comparado com o volume de solvente deslocado por estas moléculas. A expansão térmica de qualquer substância ocorre do aumento das distâncias medias intermoleculares em função da temperatura e isso ocorre predominantemente da interação não covalente entre os ligantes, uma vez que ligações covalentes não são excitadas a temperaturas próximas à ambiente e neste caso, o volume intrínseco de qualquer molécula geralmente permanece constante. Deste modo, qualquer mudança no volume molecular aparente de uma vesícula devido a uma molécula, será causada por uma mudança da separação media entre lipídios e também em sua solvatação (100). Sendo assim, vemos Figura 43, assim como no experimento de DSC convencional, a presença de Pp 1,2-CCD faz com que o volume da vesícula mude significativamente durante a transição lipídica. A variação do volume ($\Delta V/V$) associado com a transição de fase lipídica é obtida diretamente integrando-se a área sob as curvas obtidas do experimento de PPC. Sendo assim, a Figura 43 mostra que a presença de Pp1,2-CCD na razão lipídio/proteína igual a 31, aumentou seu volume em cerca de 2%. No entanto, sem mudar variar T_m . Podemos ver ainda que a presença da proteína aumenta o coeficiente de dilatação térmica $\Delta\alpha(T)$ da transição lipídica em cerca de $2,6 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$. Sendo assim, esta é mais um resultado que indica a interação desta enzima com lipossomos.

Por fim, realizamos experimentos de RPE exploratórios utilizando lipossomos de DPPC e DMPC com o derivado de fosfolipídio 5-PC como sonda magnética. Monitoramos, assim, a região próxima à cabeça polar dos fosfolipídios e para a qual havíamos encontrado mudanças significativas nos resultados de RPE obtidos a partir de micelas de surfactantes (SDS e CTABr) contendo o marcador 5-SASL (Figuras 30 e 31). A preparação dos lipossomos de DMPC e DPPC seguiu o protocolo previamente descrito com as amostras apresentando uma razão lipídio/proteína igual a 40. Os espectros medidos, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, para o marcador 5-PC em vesículas de DMPC e DPPC na ausência e na presença de Pp 1,2-CDD estão mostrados nas Figuras 45 e 46, respectivamente.

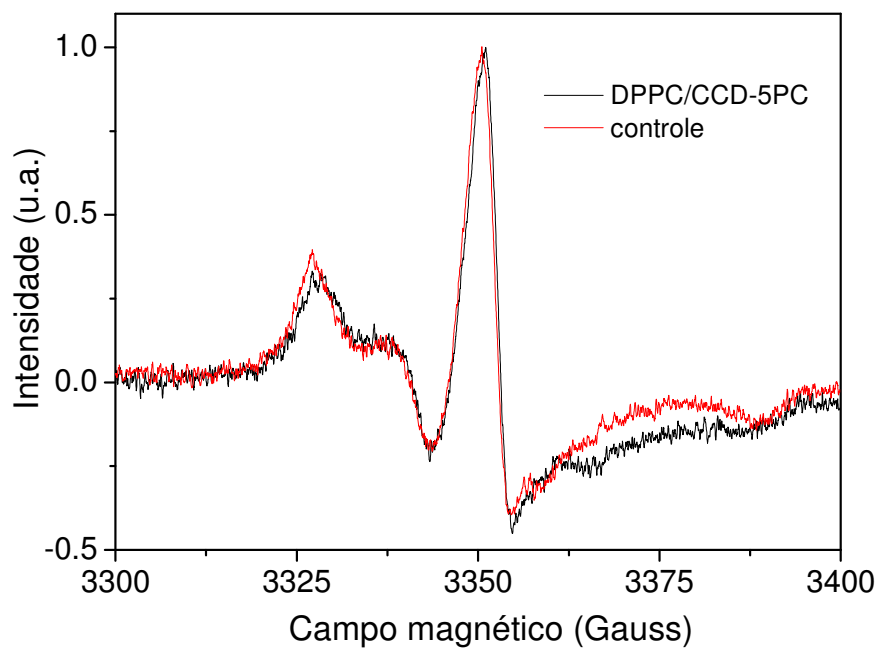


Figura 44 – Espectro de RPE do marcador 5-PC (fosfatidil colina) em vesículas multilamelares de DPPC na ausência (—) e presença (—) de Pp1,2-CCD. A razão molar lipídio/proteína foi de 40, contendo 0,5 mol% de cada marcador de spin.

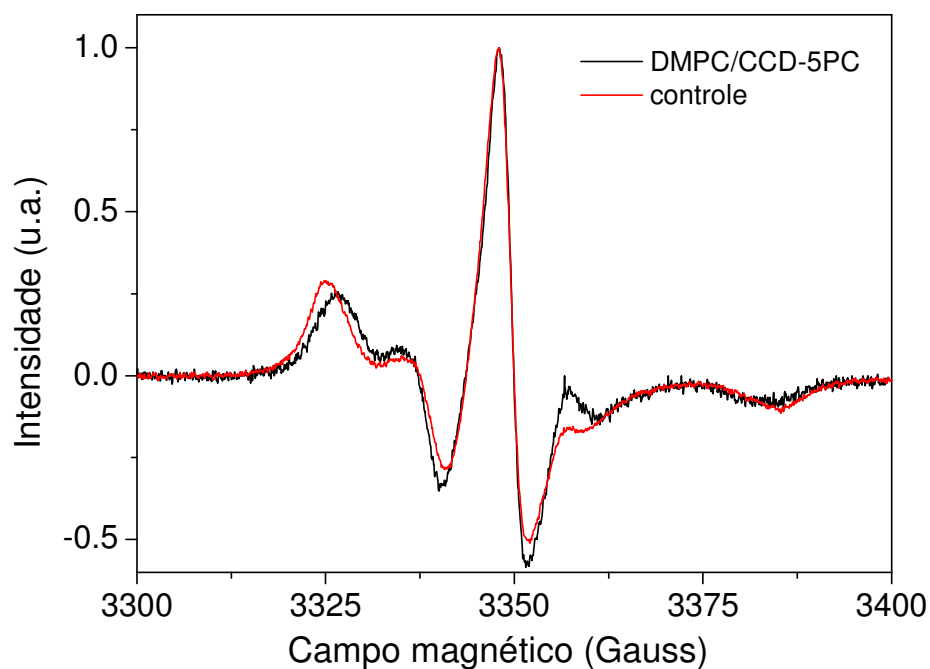


Figura 45 – Espectro de RPE do marcador 5-PC (fosfatidil colina) em vesículas multilamelares de DMPC na ausência (—) e presença (—) de Pp1,2-CCD. A razão molar lipídio/proteína foi de 40, contendo 0,5 mol% de cada marcador de spin.

O espectro do marcador 5-PC reflete, com suas linhas largas e de intensidades bem distintas, o ambiente de pouca mobilidade (alta restrição de movimento) experimentado pela sonda nessa região bem estruturada da vesícula (carbono $n=5$ da cadeia acil do fosfolípido). A adição de Pp 1,2-CCD levou a mudanças pequenas tanto no caso de vesículas de DPPC quanto de DMPC. O efeito mais significativo observado está em uma redução do parâmetro a_{\max} (desdobramento hiperfino máximo – v. definição na Figura 32) e uma alteração na forma de linha, principalmente da ressonância em campo alto. Em ambos os casos, as mudanças apontam para um aumento de mobilidade do marcador de spin 5-PC após adição de Pp 1,2-CCD. Apesar de apontarem no sentido contrário ao que observamos para micelas de surfactantes, em que encontramos uma maior restrição de movimento na presença de proteína, os dados obtidos a partir de lipossomos também sinalizam que a Pp 1,2-CCD pode alterar a estrutura dinâmica do modelo de membrana. Esses resultados de RPE em lipossomos de DMPC e DPPC, apesar de incipientes, se somam àqueles dados já obtidos e reforçam a hipótese de interação entre a Pp 1,2-CCD e membranas biológicas.

Uma análise global mostra que os resultados obtidos pelas diversas técnicas biofísicas usadas neste estudo sugerem fortemente que Pp1,2-CCD é capaz de interagir com todos os modelos de membranas biológicas empregados e que, provavelmente, este comportamento é compartilhado com outras proteínas da família das dioxigenases. Além disso, os dados aqui apresentados vão ao encontro do que havia sido proposto por nosso grupo e outros autores que esse deva ser o mecanismo pelo qual a atividade catalítica da enzima é regulada.

A Tirosina Quinase FGFR2

Para tornarem-se ativas, proteínas quinases (PTKs) se autofosforilam hidrolisando moléculas de ATP em ADP em uma reação sequencial e precisamente ordenada (101). Uma vez ativas, interagem com proteínas adaptadoras que são conseqüentemente fosforiladas pelo intermédio de PTK. Assim que são fosforiladas, as proteínas adaptadoras tornam-se aptas a interagir com outras proteínas importantes no processo de sinalização celular para formar os chamados complexos de sinalização primários (ESC) (36). Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos do estudo de interação entre as proteínas FGFR2 quinase e a adaptadora p52Shc. Discutiremos a respeito do processo de sinalização celular destacando a importância destas duas proteínas na formação dos ESCs

2.1 Introdução

A capacidade que as células têm em responder a estímulos extracelulares é fundamental para a manutenção da vida. Uma célula bacteriana possui receptores de membrana que monitoram o meio extracelular em relação ao pH, à pressão osmótica, à disponibilidade de alimentos, oxigênio, luz, à presença de substâncias tóxicas ou de competidores por alimento dentre outros. Estes sinais promovem uma resposta específica na célula que pode ser, por exemplo, a sua movimentação em direção ao alimento ou a fuga devido a uma substância tóxica. Em animais, estes sinais são chamados autócrinos (que agem na mesma célula que o produz), parácrinos (que agem em uma célula vizinha), ou endócrinos (transportados pela corrente sanguínea até uma célula alvo distante). Em todos os três casos, o sinal é detectado por um receptor específico e convertido em uma resposta celular (33, 55, 57).

A fosforilação reversível da cadeia lateral de aminoácidos é um princípio de regulação da atividade de enzimas e sinalização de proteínas largamente utilizado pelas células. Por meio desta função, proteínas quinases exercem um papel fundamental na regulação do metabolismo celular, expressão gênica, crescimento, divisão e diferenciação celular. O sinal regulatório funciona como um comutador nas vias de sinalização e o éster fosfato formado em proteínas alvo pela ação de uma proteína quinase causa profundas mudanças na atividade metabólica da célula. A ação altamente reguladora e harmônica das quinases é o mecanismo usado pela

célula para criar um sinal temporal e espacialmente restrito de modo a influenciar a atividade celular em uma via altamente específica (33).

Um mecanismo fundamentalmente diferente de transdução de sinais é realizado pelos receptores enzimáticos do tipo quinases (RTKs). Essas proteínas possuem um domínio de ligação a um ligante na superfície extracelular da membrana plasmática e um sítio ativo de uma enzima no lado citosólico, com os dois domínios conectados por um único segmento transmembrana. Mais comumente, o receptor enzimático é uma proteína que fosforila resíduos de Tyr em proteínas-alvo específicas (55). Um exemplo clássico deste tipo de mecanismo são os receptores de insulina (Figura 46).

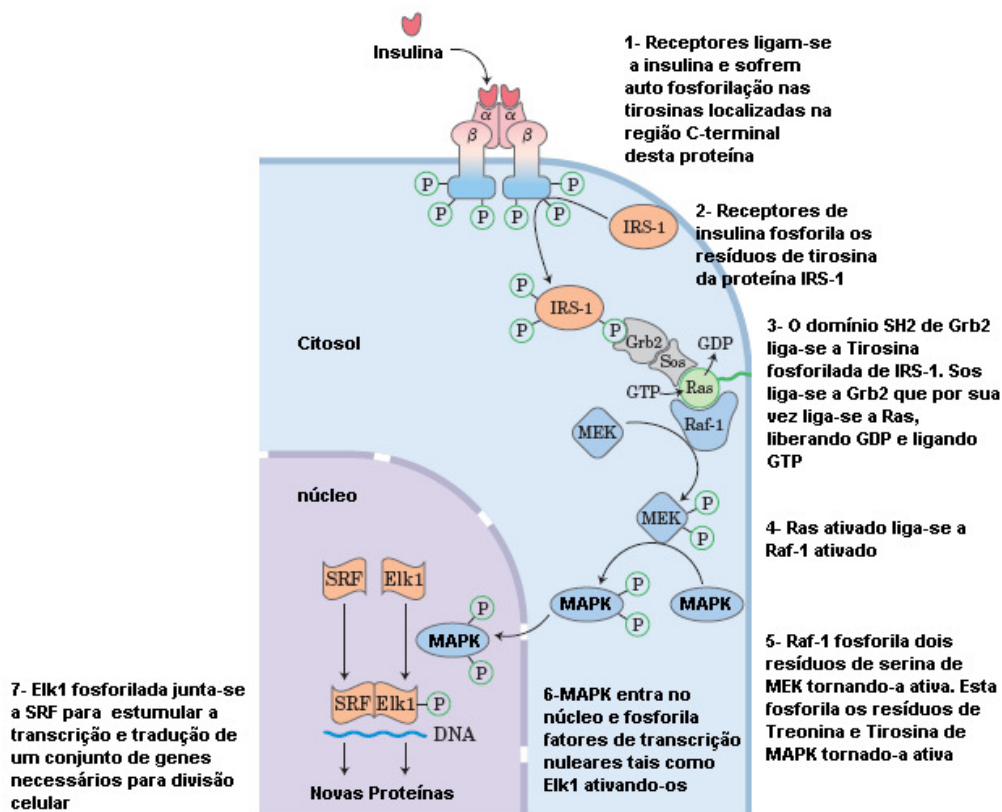


Figura 46 – Regulação da expressão gênica pela insulina. A via de sinalização pela qual a insulina regula a expressão de genes específicos envolve uma cascata de proteínas quinases cada uma ativando a seguinte. O receptor da insulina é uma Tirosina quinase específica, as outras quinases (todas mostradas em azul) fosforilam resíduos de Ser e Thr. MEK é uma quinase de dupla especificidade, que fosforila tanto um resíduo de Thr quanto um de Tyr em MAPK. MAPK é às vezes chamada de ERK (“extracellular regulated kinase”). Figura adaptada da referência (55).

O processo acima começa (etapa 1) quando insulina liga-se na cadeia α do receptor. Esta por sua vez ativa os domínios de Tirosina quinase na cadeia β . O

receptor ativo primeiramente autofosforila seus domínios quinase, permitindo que esta proteína fosforile outras proteínas alvo. Uma destas proteínas alvo (etapa 2) é a IRS-1 (“insulin receptor substrate”). Assim que seus resíduos de tirosina são fosforilados, IRS-1 torna-se o ponto de nucleação de um complexo de proteínas (etapa 3) que transporta a mensagem do receptor de insulina aos alvos finais do citosol e do núcleo, através de uma longa série de proteínas intermediárias. Primeiramente, um resíduo de tirosina fosforilado de IRS-1 liga-se ao domínio SH2 (SH2 é a abreviação de “Src homology 2”) da proteína Grb2. Esta por sua vez faz o recrutamento da proteína Sos (“Pro-rich domain of the GTP-GDP exchange factor”), para o complexo em crescimento. Quando ligado a Grb2, Sos catalisa a substituição de GDP por GTP ligado em Ras, integrante de uma família de proteínas de ligação de nucleotídeos de guanosina; proteínas G) que faz a mediação de uma grande quantidade de sinais. Quando GTP está ligado a Ras, as proteínas Raf1, MEK e MAPK (proteínas que mediam a transmissão do sinal) (etapas 4 e 5) são ativadas por meio de uma reação em cascata, na qual cada quinase ativa a seguinte pela fosforilação de um resíduo de serina. MAPK, então, se desloca para dentro do núcleo onde fosforila proteínas como Elk1 (fator de transcrição), responsável pela modulação da transcrição de certos genes regulados por insulina (etapa 6). A via da insulina é apenas um exemplo de um tema mais geral em que sinais hormonais, semelhantes ao mostrado acima, levam à fosforilação de enzimas alvo por proteínas quinases (55).

Estima-se que mais de mil quinases estejam codificadas no genoma de mamíferos e entre este grande número de proteínas as enzimas Serina/Treonina (Ser/Thr) e Tirosina (Tyr) quinases são as mais estudadas. Com base na natureza dos aminoácidos aceitadores, podemos dividir as proteínas quinases em quatro classes distintas (33):

- Ser/Thr quinase – proteínas que esterificam um resíduo de fosfato com o grupamento álcool dos resíduos de Serina e Treonina.
- His quinase – proteínas que formam uma amida fosforilada com a posição 1 ou 3 da Histidina. Os membros desta família de enzimas também fosforilam resíduos de Lys e Arg.
- Asp/Glu quinase – proteínas que criam uma mistura de carboxilato fosfato anidro.

- Tyr quinase – proteínas que criam um éster fosfato com o grupo OH fenólico do resíduo de Tirosina.

Células de animais possuem dois tipos de proteínas quinases: aquelas que adicionam fosfato ao grupo hidroxila de um resíduo de Tyr e aquelas que adicionam fosfato ao grupo hidroxila de um resíduo de Ser ou Thr (ou ambas). As fosfatases, que catalisam a reação de remoção dos grupos fosfato, podem agir concomitantemente com quinases de modo a ativar ou desativar várias proteínas dentro da célula (33, 55, 57, 102).

Embora as proteínas sinalizadoras intracelulares que se ligam a resíduos de pTyr (fosfotirosinas) em receptores ativados de Tirosinas quinases tenham uma variedade de estruturas e funções, estas usualmente compartilham dois domínios não catalíticos altamente conservados. Estes domínios são chamados de SH2 e SH3 devido à homologia com as regiões 2 e 3 da proteína *Src* (famosa por desempenhar função importante em processos de câncer). A proteína *Src* foi a primeira Tirosina quinase a ser conhecida. Esta enzima foi descoberta em retrovírus de aves que induz o sarcoma. Mais tarde, descobriu-se que esta proteína fazia parte de um repertório de enzimas associadas com o crescimento e a diferenciação de células de mamíferos (33, 55, 57, 102, 103).

O domínio SH2 (Figura 47) é formado por uma estrutura compacta de mais ou menos 100 resíduos, que se enovela em uma folha- β antiparalela composta pelas fitas A, B, C, D e G. Esta folha- β central divide o domínio em dois sítios com funcionalidades diferentes. Um dos sítios, flanqueado pela hélice- α A, liga-se a fosfotirosina, enquanto que o outro lado, flanqueado pela hélice- α B e os “loops” EF e BG, fornecem resíduos que interagem com cadeias laterais de proteínas/peptídeos que são C-terminal à fosfotirosina (104).

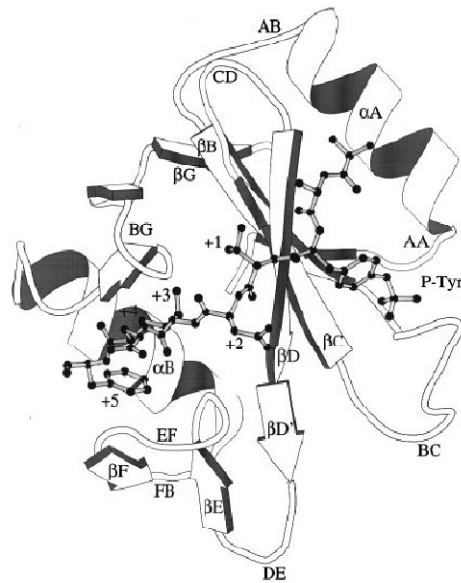


Figura 47 – Diagrama esquemático da região N-terminal do domínio SH2 de SH-PTP2 complexada com um peptídeo derivado da Tyr895 de IRS-1. Figura adaptada da referência (104).

Os domínios SH2 reconhecem resíduos de pTyr e tornam as proteínas que os contêm capazes de ligar-se aos receptores ativos de Tirosinas quinase bem como a outras proteínas sinalizadoras intracelulares que tiveram resíduos de Tyr transientemente fosforilados.

A função do domínio SH3 é menos clara, mas acredita-se que este se liga a outras proteínas dentro da célula. Sugere-se que o domínio SH3 tenha esta função de ligar proteínas devido a estudos com uma classe de pequenas proteínas adaptadoras, que possuem somente os domínios SH2 e SH3. Estas pequenas adaptadoras SH não têm nenhuma função catalítica intrínseca e servem para acoplar proteínas que possuem pTyr, tais como a Tirosina quinase, a outras proteínas que não tem seus próprios domínios SH2 e SH3 (33, 55, 57, 103). Os domínios SH3 são pequenos módulos contendo por volta de 60 aminoácidos que se ligam a seqüências contendo resíduos de prolina arranjados em motivos característicos PxxP (x é qualquer resíduo). Seu enovelamento é altamente conservado e consiste em duas pequenas folhas- β antiparalelas empacotadas uma contra a outra (Figura 48) (104).

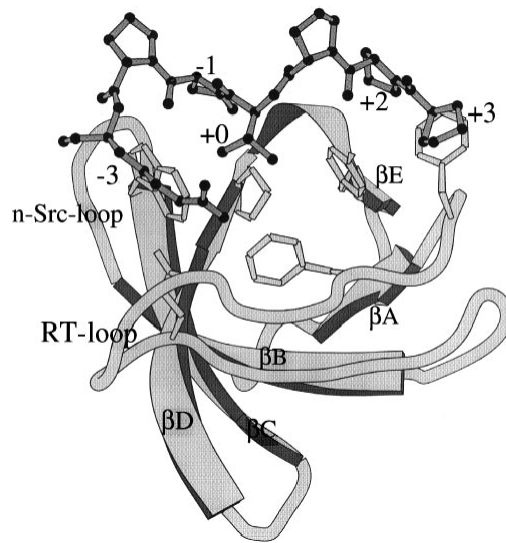


Figura 48 – Domínio SH3 do complexo protéico Grb2/Sem-5 complexado com peptídeo de motivo PxxP. Figura adaptada da referência (104).

No começo da década passada, os dogmas levantados para explicar os processos de sinalização intracelular devido a estudos de sistemas mediados por Tirosina quinase foram baseados em simples processos lineares de sinais. Isso exige que o restabelecimento das interações biomoleculares do receptor seja individual e altamente específico para evitar “linhas cruzadas”. Muitas destas interações, em vias de sinalizações distintas, envolvem domínios de proteínas que são altamente parecidas (homólogas) com respeito às estruturas primárias e secundárias apesar de estarem dentro de um contexto muito diferente.

A transdução de sinais de Tirosinas quinases receptoras (RTKs) segue uma série de passos conservados referentes àquela classe de receptores. Moléculas que transportam informação ligam-se aos receptores localizados em tais proteínas fazendo com que estas sofram oligomerização seguida da autofosforilação de múltiplos resíduos de Tirosina. Os resíduos autofosforilados servem como sítios de ligação para proteínas que contêm os domínios SH2 e PTB (“phosphotyrosine binding domain”) (101, 105, 106).

Dentre as muitas RTKs conhecidas encontra-se a família das FGFRs (“fibroblast growth factor receptor”), constituída por várias isoformas de FGFRs homólogas e que apresentam identidade sequencial de até 90% (101, 106). Estão envolvidas em uma grande variedade de funções celulares como apoptose, proliferação, migração e diferenciação (107).

Neste trabalho, estaremos discutindo os resultados obtidos referentes à proteína FGFR2 quinase. Sabe-se que a autofosforilação de resíduos de Tirosinas localizados em seu sítio ativo é crucial para a manutenção de seu estado ativo (108), enquanto a fosforilação de outros resíduos do domínio citoplasmático é essencial para o recrutamento e ativação de diversas vias de sinalização que regulam vários processos tal qual crescimento e diferenciação celular, metabolismo e sobrevivência celular (34). Sinalização anormal devido a FGFs está relacionada com múltiplas displasias humanas e diferentes tipos de câncer (34, 35). Deste modo, a autofosforilação de FGFR2 quinase, bem como outras RTKs, regula a atividade catalítica destas enzimas e a subsequente iniciação dos eventos de sinalização.

A proteína Shc (“Src homology collagen-like”) é uma proteína adaptadora que exerce papel crucial em formar complexos de sinalização primários estimulados pela fosforilação de seus resíduos de tirosina realizada por proteínas Tirosina quinase (109-111). A família Shc compreende, em mamíferos, três diferentes formas: ShcA, ShcB, ShcC. A forma ShcA, comumente chamada apenas de Shc, pode, por sua vez, existir em três isoformas: p66Shc (66 kDa Shc), p52Shc (52 kDa Shc) e p46Shc (46 kDa Shc). A estrutura de Shc contém um domínio PTB em sua região N-terminal, um domínio CH1 (“collagen homology 1”) na região central da proteína com três sítios de fosforilação (Tyr) e um domínio SH2 na região C-terminal (36). A fosforilação de Shc promove a interação desta com o complexo Grb2/Sos e conseqüente ativação das vias de Ras e MAP quinase (112, 113). Shc geralmente é considerada um adaptador passivo para a ativação de Ras (113). Esta proteína é usualmente recrutada por receptores em Tirosina quinase por meio de seu domínio PTB (“*phosphotyrosine binding domain*”) enquanto acredita-se que seu domínio SH2 ligue-se a outras proteínas sinalizadoras. No entanto, pouca informação está disponível com respeito à interação de seu domínio SH2 (36, 114). Foi publicado recentemente que, embora o domínio PTB de Shc possa ligar-se a receptores ligados à membrana plasmática, o domínio SH2 permanece inativo até que sejam fosforilados três resíduos de tirosinas localizados no domínio CH (36). Isto sugere um mecanismo de portão no qual, após ser fosforilada em seu domínio CH1, Shc sofre uma mudança conformacional que propicia uma configuração aberta do domínio SH2 para se ligar a outras proteínas que participam do processo de sinalização e, então, formação dos ESCs (36).

Todas as informações acima mostram quão complexo é o processo de sinalização celular mediado por RTKs e, desta maneira, quão fundamental é caracterizar o mecanismo cinético de fosforilação dessas quinases, bem como sua interação com proteínas como Shc. Assim, nesta parte de nosso trabalho estamos focados na autofosforilação de FGFR2 quinase e na fosforilação da isoforma p52 da proteína Shc humana (p52Shc) mediada por FGFR2 quinase, para o entendimento das bases de sinalização celular protagonizadas por estas duas proteínas. Para isso, utilizamos a técnica de ITC (17) para acessar as cinéticas de fosforilação de ambas as proteínas a fim de caracterizarmos este sistema.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Expressão e purificação de p52Shc

Colônia da bactéria *E. coli* (Rosetta2) contendo o plasmídeo pET28aShc, codificador da enzima p52Shc, foi utilizada para inocular um volume de 10 mL de meio de cultura LB (*Luria-Bertani*). As células foram, então, cultivadas durante 12 horas em incubadora a 37°C sob agitação de 200 rpm. Após este período, esta quantidade de células foram usadas para inocular 1 L de meio LB suplementado com 50 µg/mL de kanamicina. As células foram mantidas sob agitação de 200 rpm a 30°C até que a densidade óptica a 600 nanômetros (DO_{600nm}) atingisse 0,6, quando, então, a expressão Shc foi induzida pela adição de IPTG, cuja concentração final foi de 0,75 mM. A cultura foi mantida sob agitação de 200 rpm a 37°C, por 5 horas, sendo colhidas por centrifugação (4000xg, a 4°C) logo após este período. O pellet formado foi armazenado a -20°C. Células provenientes de dez litros de meio de cultura foram utilizadas em cada purificação. As células foram descongeladas em geladeira a 4 °C e ressuspensas em 100 mL de tampão de lisagem contendo 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10%(v/v) de glicerol a 1 mM de inibidores de protease AEBSF, E64 e benzamidina, pH 8. A lise das células foi feita por sonicação (15 ciclos de 10 segundos, com intervalo de 50 segundos para resfriar as células) e os restos de células foram removidos por centrifugação durante 40 minutos a 20.000 rpm, 4°C. A fração solúvel obtida da centrifugação foi aplicada em coluna cromatográfica contendo 20 mL da resina Talon equilibrada com tampão A (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM de β-mercaptoetanol e 1 mM dos inibidores de proteases citados acima, pH 8). A resina foi então lavada com 200 mL do mesmo tampão e, em seguida, com mais 200 mL do tampão A contendo 10 mM de imidazol. A proteína Shc foi eluída da coluna pela adição de tampão A contendo 100 mM de imidazol. A próxima etapa foi juntar as frações contendo Shc e aplicá-las em coluna de troca iônica Q-Sepharose previamente equilibrada com tampão A. A coluna foi lavada com um volume de tampão A correspondente a 10 volumes da coluna. A eluição de Shc foi feita pela aplicação de um gradiente crescente de NaCl (de 0 a 290 mM), sob um fluxo de 2 mL/min. As frações contendo Shc foram novamente

coletadas e, nesta nova etapa, concentradas até o volume de 5 mL. Após este procedimento, Shc foi aplicada em coluna de gel filtração Superdex 70 previamente equilibrada em tampão contendo 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM β-mercaptoetanol, pH 8. As frações de Shc provenientes desta coluna foram então armazenadas em geladeira a 4°C. Após estes procedimentos de purificação foi possível se obter p52Shc em quantidade e pureza necessárias para os experimentos de calorimetria. Na Figura 49 são visualizados, em gel de eletroforese SDS/PAGE, os resultados de todas as etapas de purificação de p52SHC.

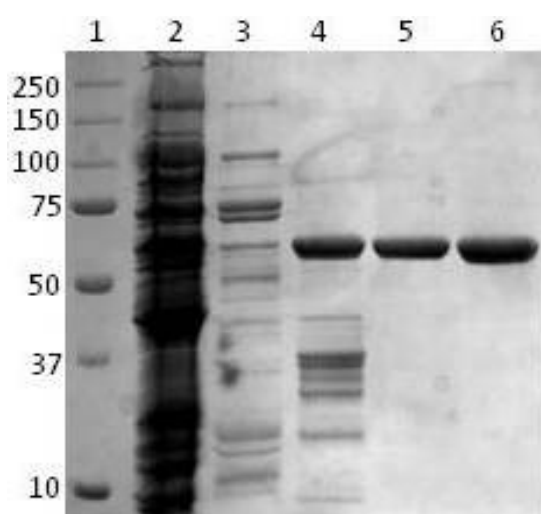


Figura 49 – Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% das etapas de purificação de p52SHC. (1) marcadores; (2) pellet; (3) coluna Thalon; (4) coluna de troca iônica Q-Sefarose; (5,6) coluna de gel filtração SuperDex 75.

2.2.2 Expressão e purificação de FGFR2 Quinase

Colônia da bactéria *E. coli* (Rosetta2), contendo o plasmídeo pET28a FGFR2 quinase, foi utilizada para inocular um volume de 10 mL de meio de cultura LB, então cultivado durante 12 horas, sob agitação de 200 rpm, a 37°C. Após este período, as células foram usadas para inocular 1 L de meio LB suplementado com 50 µg/ml de kanamicina. As células cresceram em incubadora a 37°C e agitação de 200 rpm até que se atingisse DO_{600nm} de 0,6. A expressão de FGFR2 quinase foi induzida pela adição de IPTG, cuja concentração final foi de 0,2 mM. O processo de expressão durou 12 horas a 20°C, sendo as células colhidas por centrifugação logo

após este período. O pellet formado foi armazenado a -20°C . Células provenientes de dez litros de meio de cultura foram utilizadas em cada purificação. As células foram descongeladas em geladeira a 4°C e ressuspensas em 100 mL de tampão de lise contendo 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10%(v/v) de glicerol e 1 mM de cada um dos inibidores de protease AEBSF, E64 e benzamidina, pH 8. A lise das células foi feita por sonicação (15 ciclos de 10 segundos com intervalos de 50 segundos) e os restos de células foram removidos por centrifugação durante 40 minutos a 20.000 rpm, 4°C . A fração solúvel obtida da centrifugação foi aplicada em coluna cromatográfica contendo 20 mL da resina Thalon (verificar nome da resina com seção anterior) equilibrada com tampão A (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM de β -mercaptoetanol e 1 mM dos inibidores de proteases citados acima a pH 8). A resina foi então lavada com 200 mL do mesmo tampão e, em seguida, com mais 200 mL do tampão A contendo 20 mM de imidazol. A proteína FGFR2 quinase foi eluída da coluna pela adição de tampão A contendo 100 mM de imidazol. A próxima etapa foi juntar as frações contendo quinase e aplicá-la em coluna de troca iônica Q-Sepharose previamente equilibrada com tampão A. A coluna foi então lavada com um volume de tampão A correspondente a 10 volumes da coluna. A eluição de quinase foi feita pela aplicação de um gradiente de NaCl (0 a 290 mM), sob fluxo de 2 mL/min, com eluição da quinase a de NaCl. As frações contendo quinase foram novamente coletadas e, nesta nova etapa, concentradas até o volume de 5 mL. Após este procedimento, a proteína quinase foi aplicada em coluna de gel filtração Superdex 70 previamente equilibrada em 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM β -mercaptoetanol, pH 8. As frações de quinase provenientes desta coluna foram armazenadas em geladeira a 4°C . Na Figura 50 são mostrados, por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, os resultados de todas as etapas de purificação de FGFR2 quinase.

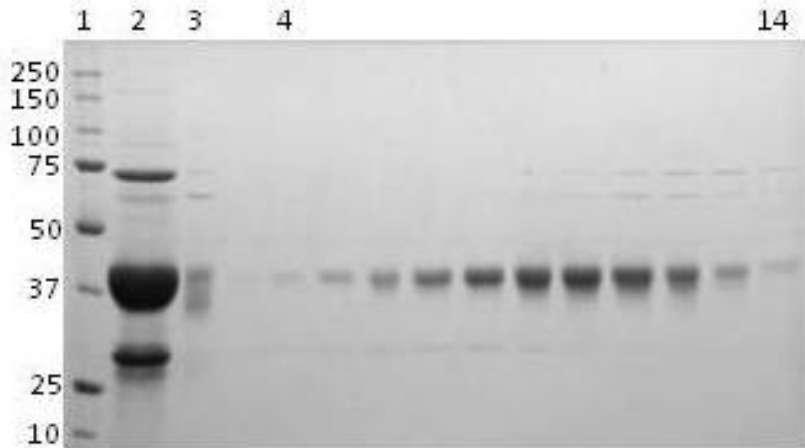


Figura 50 – Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% das etapas de purificação de FGFR2 Quinase: (1) marcadores; (2) coluna Thalon; (3) coluna de troca iônica Q-Sepharose; (4-14) coluna de gel filtração SuperDex 75

2.2.3 Cinética Enzimática e equação de Hill

Já foi descrito em outra seção (1.2.3) que a dependência das velocidades iniciais v_0 com a variação de $[S]$ durante um experimento de cinética enzimática tem a mesma forma geral para a maioria das catálises enzimáticas e se aproxima de uma hipérbole retangular, e que este comportamento pode ser expresso algebricamente pela equação de Michaelis-Menten (Equação 3). Existem casos, porém, em que a enzima possui sítios catalíticos de alta e baixa afinidade pelo substrato. Estas enzimas são chamadas de cooperativas (56). Nestes casos, quando uma molécula de substrato liga-se a um dos sítios ativos faz com que a enzima sofra uma mudança em sua configuração estrutural ou eletrônica de modo que a afinidade do sítio ativo que está livre pelo substrato é alterada. Teoricamente, esta afinidade pode tanto aumentar (cooperativismo positivo) quanto diminuir (cooperativismo negativo). No entanto, o aumento da afinidade é uma resposta mais comum (56). A cinética enzimática neste caso resulta em uma curva v versus $[S]$ com características similares a uma sigmóide (Figura 51).

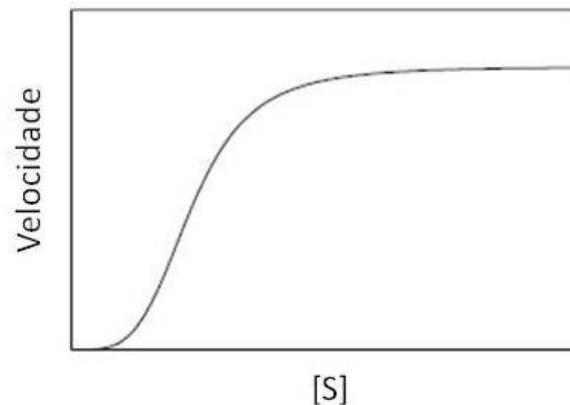


Figura 51 – Velocidade inicial versus concentração de substrato típico para uma enzima cooperativa. Figura adaptada da referência (56).

O modelo criado por Michaelis-Menten não pode ser aplicado neste caso e para se tratar os dados obtidos de uma cinética cooperativa o modelo mais simples é aquele proposto por Hill (56). A premissa básica deste modelo é que mudanças significativas na conformação da enzima ocorrem após esta ligar-se ao substrato, e isso leva à mudança da afinidade por parte dos sítios ativos restantes (Figura 52) (56).

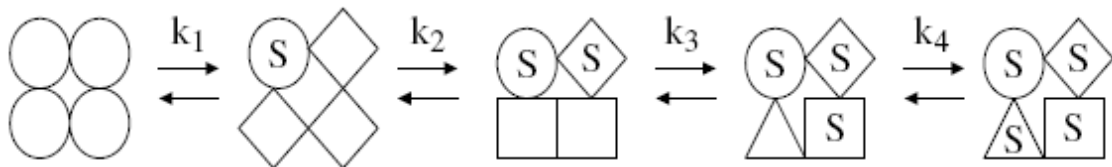


Figura 52 – Representação esquemática da interação sequencial do substrato com uma enzima cooperativa de quatro sítios. A ligação de um dos substratos altera a afinidade do outro sítio ativo da enzima pelo substrato (56).

No modelo de Hill, a velocidade de reação é dada por:

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{[S]^n}{k^n + [S]^n} \quad (23)$$

onde k é um índice de afinidade da enzima pelo substrato, porém, não é a constante de dissociação do sistema enzima-substrato e n é um índice de cooperatividade nos processos de ligação do substrato (quanto maior o valor de n , maior é a cooperatividade). No caso de $n=1$ não há cooperatividade e o sistema pode ser tratado pelo modelo de Michaelis-Menten (56). Se a cooperatividade dos sites é

baixa, n não corresponderá ao número de sítios por substrato, mas o mínimo de sítios efetivos por molécula de substrato. Apesar desta limitação, a equação de Hill pode, ainda assim, ser usada para caracterizar o comportamento cinético de enzimas cooperativas. Neste caso, n torna-se um mero índice de cooperatividade que pode assumir valores não inteiros (56). A seguir é mostrado o comportamento cinético esperado de um experimento hipotético, quando variamos os parâmetros n (Figura 53) e k' (Figura 54).

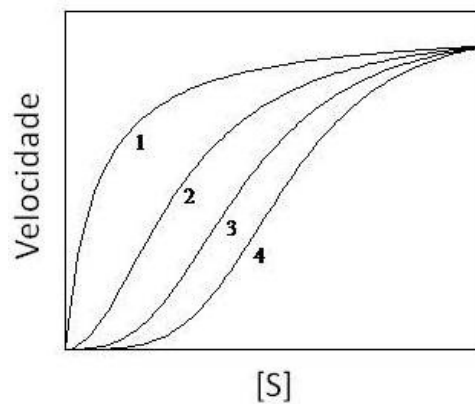


Figura 53 – Simulação de um experimento hipotético para enzimas cooperativas onde o parâmetro que está sendo variado é o índice n . Note que para $n=1$, a equação de Hill transforma-se na equação de Michaelis-Menten. Figura adaptada da referência (56).

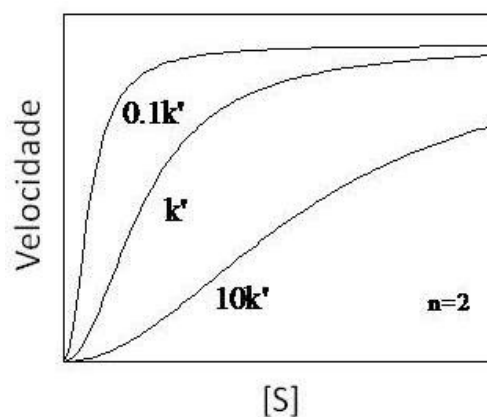


Figura 54 – Simulação de um experimento hipotético para enzimas cooperativas onde o parâmetro que está sendo variado é o índice k' e o índice n foi fixado em $n=2$. Figura adaptada da referência (56).

2.2.4 Calorimetria por Titulação Isotérmica (ITC)

Os experimentos de cinética foram feitos em um instrumento VP-ITC da MicroCal Inc. (Northampton, MA) equipado com software de aquisição de dados VP-Viewer. Em todos os experimentos realizados, a cela de referência foi preenchida com água pura. Durante os experimentos, a aquisição da potência térmica foi feita a cada 1 segundo, a velocidade de agitação foi de 300 rpm e o tempo de resposta do equipamento (feedback/mode gain) foi deixado como alto. Todas amostras foram preparadas em tampão Tris-HCl (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM β-mercapto-etanol, pH 8,0). O pH destas soluções foi ajustado para 8,0 para evitar erros por incompatibilidade de tampão e todas soluções foram previamente degaseificadas em baixo vácuo por cerca de 3 minutos para evitar a formação de bolhas durante o experimento.

Para o experimento de interação entre FGFR2 quinase e p52Shc, a cela de amostra foi preenchida com quinase (concentração de 5 μM), enquanto a seringa foi preenchida com uma solução de Shc (concentração de 50 μM), titulado em 24 injeções de volume 10 μL cada. O experimento foi realizado a 15 °C.

Para o experimento de auto-fosforilação de FGFR2 quinase, a seringa foi preenchida com 2,5 mM de ATP enquanto que a cela de amostra foi preenchida com uma solução de FGFR2 quinase (concentração de 5 μM). Este experimento também foi realizado a 15 °C. Uma única injeção de ATP, de volume 10 μL, foi feita na cela de amostra e a reação foi monitorada até o seu final (a potência térmica instrumental retorna para a linha de base).

Para os experimentos onde p52Shc foi fosforilada por intermédio de FGFR2 quinase, a seringa foi preenchida com uma solução de 25 mM de ATP enquanto que a cela de amostra foi preenchida com uma solução de FGFR2 e p52Shc nas concentrações de 0,1 μM e 10 μM, respectivamente. Uma única injeção de ATP, de volume 10 μL, foi feita na cela de amostra e a reação foi monitorada até o seu final.

O método usado para realizar o experimento de cinética foi o da injeção única. A entalpia molar aparente em todos os experimentos foi obtida integrando-se a área sobre a curva isoterma (RawITC) do qual foi calculada a curva cinética. Para isso, foi injetado ATP em excesso na cela e deixando a cinética de fosforilação

acabar e, então, dividindo o valor da entalpia pela concentração final de ATP dentro da cela de reação. A autofosforilação de FGFR2 quinase e a fosforilação de p52Shc foram confirmadas através de uma análise de *Western blot* e os parâmetros cinéticos foram obtidos por meio de regressão não linear de mínimos quadrados, implementando-se um modelo cinético (equação de Hill) no software Origin 7.0.

2.2.5 Análise da fosforilação por Western blotting

A análise de Western blot é um método em biologia molecular e bioquímica largamente utilizado na detecção de proteínas ou partes específicas de proteínas por meio de anticorpos. Nesta seção, nós fazemos uma pequena apresentação da seqüência de procedimentos experimentais que utilizamos para detectar resíduos de tirosinas fosforilados nas proteínas FGFR2 kinase e p52Shc após os ensaios cinéticos de fosforilação. Primeiramente, alíquotas das proteínas em questão antes e depois dos ensaios cinéticos foram preparadas e logo em seguida separadas por massa por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS/PAGE 15%. Os poços do gel foram preenchidos de modo a obter a mesma quantidade de proteínas fosforiladas e seus respectivos controles. Foi utilizado neste experimento um padrão de massas do tipo “pre-stilling”. Em seguida, para tornas estas proteínas acessíveis para detecção do anticorpo, estas foram movidas do gel para uma membrana de PVDF. Para este procedimento a membrana e o gel foram postas face-a-face entre placas condutoras, e então acomodados em uma cuba apropriada para este procedimento, previamente preenchida com 400 mL de tampão de transferência (25 mM Tris, 200 mM glicina, 20% metanol, pH 8,5). Nesta cuba foi aplicada uma corrente contínua de 250 mA, fazendo as proteínas (negativamente carregadas) migrarem do gel para a membrana pela criação de um campo elétrico entre as placas onde o sistema gel/membrana foram acomodados. Este procedimento durou um período de 2 horas e foi realizado em geladeira a uma temperatura de 4 °C. Para a detecção das fosfotirosinas nos utilizamos os anticorpos pY99 e anti-horse HRP num processo de dois passos. Ambos os anticorpos usados nesta análise foram adquiridos de *Santa Cruz Biotechnology*. A fim de impedir interações não específicas entre a membrana de PVDF e o anticorpo usado para a detecção das fosfotirosinas ou a contaminação

da membrana por outras proteínas, esta foi bloqueada na incubação com uma solução de 5% de BSA preparada em tampão TBS (2,42 g Tris, 8 g NaCl, pH 7,6) por um período de 12 horas. Após este procedimento, a membrana foi lavada 3 vezes (20 minutos cada lavagem) com tampão TBS para retirada do excesso de BSA, e então incubada novamente em tampão TBS contendo o primeiro anticorpo para detecção dos resíduos de tirosinas fosforiladas (pY99) diluído 1000 x, por um período de 12 horas à 4 °C. Após este período a membrana foi novamente lavada 1 vez sob leve agitação em tampão TBS para a retirada do excesso do primeiro anticorpo para ser logo em seguida incubada novamente em tampão TBS contendo o segundo anticorpo (anti-horse HRP) por um período de 1 hora à temperatura ambiente. Este último anticorpo é usado para detectar o primeiro anticorpo (pY-99) usado neste ensaio. O método de detecção (revelação do blot) utilizado foi a fluorescente, sendo que para isso, após uma rápida lavagem da membrana em tampão TBS por 5 minutos para retirada do segundo anticorpo, a membrana foi incubada com 10 mL LumiGLO[®] (0,5 mL 20x LumiGLO[®], 0,5 mL 20 x peróxido de hidrogênio e 9 mL de água mili-Q) sob leve agitação por 1 minuto à temperatura ambiente. Em seguida, sonda fluorescentemente (pTyr) foi excitada por luz e a emissão da excitação foi então detectada em quarto escuro por meio da exposição da membrana à um papel foto-sensível. Em seguida o papel foto-sensível foi revelado por calor em equipamento próprio para este procedimento. Após todo este procedimento fomos capazes de obter os *blots* mostrados na Figura 58 e Figura 64.

2.3 Resultados e discussão

Nos estudos sobre o mecanismo de sinalização mediado por PTKs é fundamental dispormos de informação sobre os processos de fosforilação de resíduos de tirosina presentes nas PTKs, no nosso caso uma FGFR2 quinase, e em proteínas que com elas interagem. Sendo assim, iniciamos nossa investigação do assunto apresentando e discutindo os resultados obtidos dos experimentos que seguem na ordem: autofosforilação de FGFR2 quinase, interação entre FGFR2 e p52Shc e, por último, a cinética de fosforilação de p52Shc mediada por FGFR2 quinase.

Primeiramente, realizamos a cinética de autofosforilação da FGFR2 quinase. Para isso, uma purificação foi feita e as alíquotas mais puras, ou seja, alíquotas 8-11 foram utilizadas (Figura 50). Antes do experimento de cinética, uma alíquota de 40 μ M de FGFR2 foi tratada com CIP (Calf Alkaline Intestinal Phosphatase) para desfosforilar quinase e assim garantir que nenhum resíduo de tirosina estivesse fosforilado em FGFR2 anteriormente ao processo de autofosforilação. Para isso, incubamos FGFR2 quinase com de 2 μ M desta enzima digestiva, que foi primeiramente imobilizada em resina de agarose. Uma alíquota contendo FGFR2 foi então adicionada à resina para sua desfosforilação. O conjunto FGFR2 e CIP (imobilizada em resina de agarose) foi levado à geladeira onde ficou sob baixa agitação por 12 horas. Após este período, os constituintes foram separados por centrifugação.

Com a proteína desfosforilada foi realizada a cinética de autofosforilação propriamente dita. As condições experimentais para a medida no ITC podem ser encontradas na seção 2.2.7 e o resultado deste experimento pode ser visto na Figura 55.

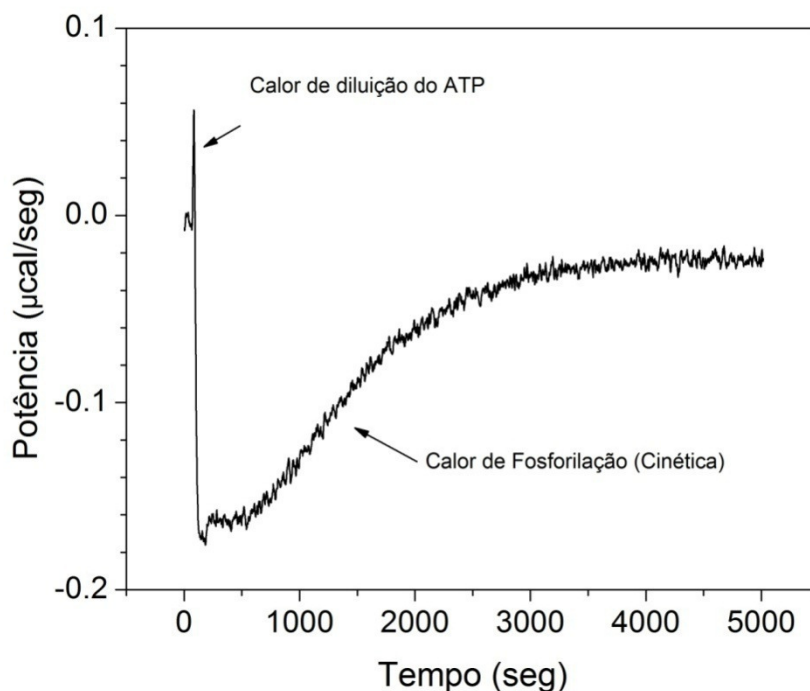


Figura 55 – Experimento da cinética de autofosforilação de FGFR2 quinase realizado por ITC a 15 °C. A isoterma acima é composta por dois processos. O primeiro é endotérmico e está relacionado ao calor de diluição do ATP após injeção dentro da cela seguida por um processo exotérmico referente ao processo de autofosforilação da FGFR2 quinase

A isoterma obtida acima (Figura 55) nos mostra dois processos ocorrendo após a injeção de 10 µL da solução de ATP, subsequente à aquisição de 60 segundos de linha de base. O primeiro processo refere-se ao calor de diluição do ATP que se mostrou endotérmico (deflexão positiva da potência térmica instrumental medida). Já o segundo processo refere-se à cinética de autofosforilação de FGFR2, que, como previsto, mostrou-se exotérmica (deflexão negativa da potência térmica instrumental medida). A potência instrumental foi monitorada até o término da reação de autofosforilação (potência térmica de volta à linha de base). Foi calculado que a concentração de ATP dentro da cela após a injeção era de aproximadamente 17 µM e a variação de entalpia referente à hidrólise desta quantidade de ATP (numericamente igual à área da parte exotérmica mencionada acima) foi calculada como $\Delta H = -10.251 \text{ cal mol}^{-1}$. Após este experimento, a potência térmica foi convertida para velocidade de reação v_0 por meio de software Origin 7.0 (MicroCal Inc) e o gráfico de v_0 versus [S] foi construído (Figura 56).

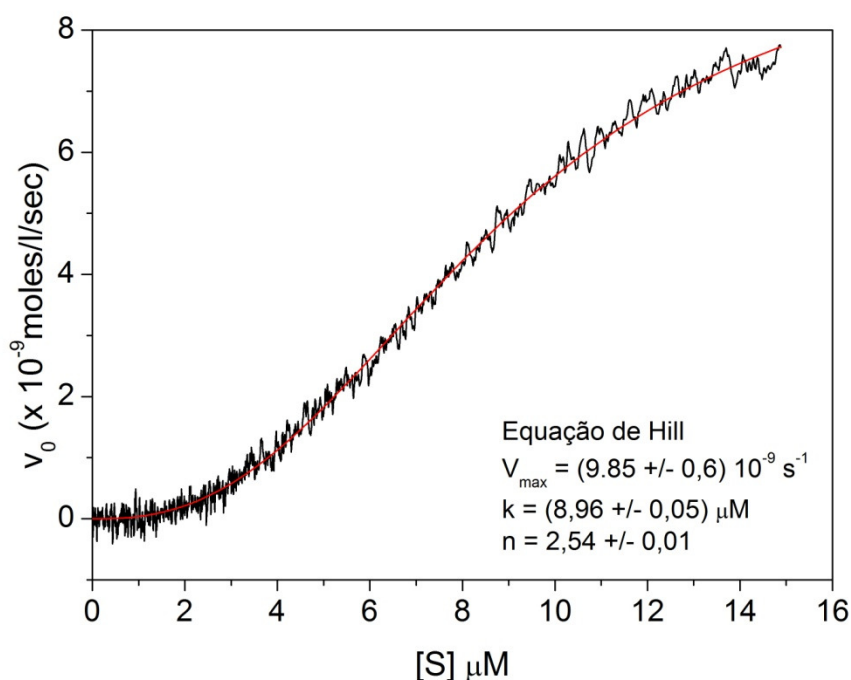


Figura 56 – Cinética de auto-fosforilação de FGFR2 quinase realizada a 15 °C. Podemos ver nesta figura um comportamento cinético que se assemelha aos processos cinéticos apresentados por enzimas cooperativas.

A figura acima nos mostra uma cinética muito semelhante às obtidas para enzimas cuja função é regida por um processo cooperativo. Neste caso, decidimos usar a equação de Hill (eq. 23) para ajustar os pontos e assim obter os parâmetros cinéticos da reação: $V_{\max} = (9,85 \pm 0,06) \times 10^{-9} \text{ M s}^{-1}$; $K_m = (8,96 \pm 0,05) \mu\text{M}$; $n = 2,54$. Este é o primeiro estudo em que foi possível se determinar diretamente parâmetros cinéticos para a autofosforilação de uma FGFR quinase, no entanto não podemos fazer uma digressão a respeito da ordem de fosforilação ou quais resíduos de Tyr foram fosforilados. Furdui e colaboradores (101) em estudos de autofosforilação, onde foi usada a proteína FGFR1 quinase, demonstraram que a autofosforilação desta proteína ocorre de uma maneira seqüencial e estritamente ordenada. Em outra publicação dos mesmos autores (115), foi possível determinar que autofosforilação de FGFR1 ocorre em três etapas distintas. No primeiro estágio, um dos resíduos de tirosina localizado no *loop* de ativação de FGFR1 é fosforilado e isso promove um aumento de 50 a 100 vezes em sua atividade catalítica. Este processo é seguido por um segundo estágio, onde três outros resíduos de tirosina, que serão utilizados como sítios de ligação para proteínas sinalizadoras, são autofosforilados. Finalmente, em um terceiro estágio, o segundo resíduo de tirosina

localizado no *loop* de ativação de FGFR1 torna-se fosforilado, o que promove um aumento adicional de 10 vezes na atividade catalítica da FGFR1 como tirosina quinase.

Utilizando a FGFR1 nativa foi possível se determinar que a autofosforilação dos resíduos de tirosinas ocorre na seguinte ordem (Y⁶⁵³, Y⁵⁸³, Y⁴⁶³, Y⁵⁸⁵ e Y⁶⁵⁴) (115), no entanto, o design experimental utilizado nesse trabalho possui uma dificuldade inerente para se medir com precisão a “afinidade” ao substrato (K_m) para cada um dos substratos, ou seja, os resíduos de tirosinas individuais. Esta problemática dá-se devido ao fato de que em solução, quinase e substrato são essencialmente a mesma molécula, e o sistema experimental utilizado não consegue distinguir entre os heterodímeros de quinase e substrato e homodímeros de substrato ou quinase sozinhos (monômeros quinase sozinha). Nestas condições de subsaturação de substrato para se determinar K_m, a fosforilação não pode ser explicada por uma cinética simples de Michaelis-Menten (115), o que está em acordo com nossos dados experimentais da Figura 56.

Além disso, após fazermos um alinhamento entre a seqüência primária de FGFR1 x FGFR2 podemos ver que além de possuir um alto grau de identidade entre os resíduos (mais de 80%), todos os resíduos de Tyr do domínio quinase são conservados, inclusive os resíduos do sítio ativo (Y⁶⁵³ e Y⁶⁵⁴) como pode ser visto na figura a seguir (Figura 57). Sendo assim, somos levados a pensar que muito provavelmente FGFR2 e FGFR1 compartilham características parecidas (ou idênticas) no que diz respeito aos processos utilizados por ambas as proteínas para autofosforilarem-se, e que a ordem com que a autofosforilação ocorre pode estar relacionada a um papel fisiológico relevante *in vivo* no que diz respeito ao recrutamento de proteínas parceiras em vias de sinalização.

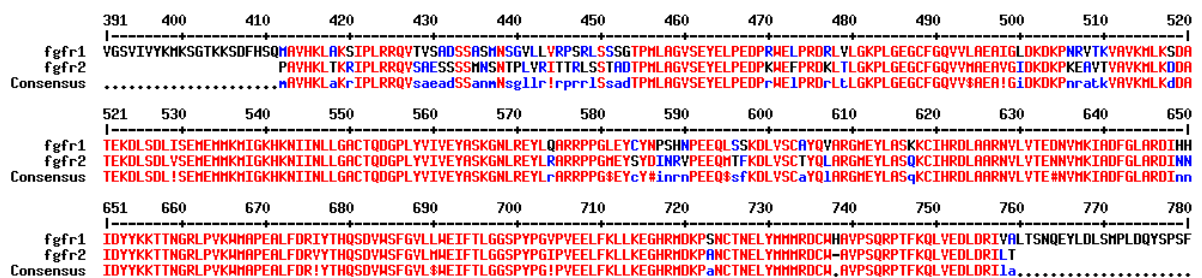


Figura 57 – Alinhamento das seqüências primárias de FGFR2 e FGFR1 quinases mostrando que no domínio quinase todos os resíduos de tirosinas são conservados, além de mostrar o alto grau de identidade deste domínio em ambas as proteínas. O sítio ativo das proteínas estão localizados nas posições 653 e 654.

Os resultados acima mostram que o processo de autofosforilação da FGFR2 é governado por uma cinética cooperativa como aquela descrita acima para FGFR1, com a ordem de fosforilação dos resíduos de tirosina em FGFR2 provavelmente idêntica àquela previamente determinada para FGFR1. Essas conclusões, além de estabelecerem características da autofosforilação de FGFR2 ainda não reportadas, também validam o método calorimétrico utilizado para determinar os parâmetros cinéticos associados àquele processo.

Para verificarmos se FGFR2 quinase havia realmente se autofosforilado após o experimento de cinética, um experimento de *Western Blot* foi realizado e o resultado está mostrado na Figura 58 (116, 117). As bandas 1 e 2 nessa figura representam, respectivamente, a fração de proteína tratada previamente com CIP (desfosforilação de quinase) e a mesma fração de proteína que não foi tratada com CIP. Podemos observar que a banda que representa a fração tratada com CIP está mais clara que a banda subsequente, confirmando assim que quinase apresentou um grau de desfosforilação considerável após tratamento com CIP. Vale ressaltar que foi utilizada a mesma quantidade de amostra na mesma concentração para realizar este experimento. A fração 2 foi, então, usada nos experimentos cinéticos descritos acima. As bandas 3 e 4 representam o ensaio de *western blot* para a primeira cinética descrita (Figura 56) e as bandas 5 e 6 representam o ensaio de *western blot* para a segunda cinética realizada (dados não mostrados). Em ambos os casos, uma alíquota da solução previamente preparada para o experimento de cinética foi separada para ser utilizada como controle no experimento de *western blot* nas bandas 3 e 5 (Figura 58). As bandas 4 e 6 representam as frações de FGFR2 quinase imediatamente após o experimento de cinética e podemos perceber que essas bandas são mais escuras que suas parceiras. Isto definitivamente mostra que FGFR2 quinase sofreu autofosforilação após a injeção de ATP na cela de amostra do calorímetro.

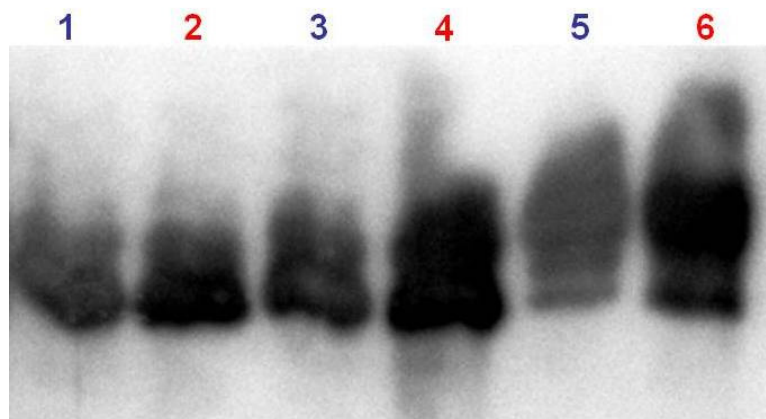


Figura 58 – Ensaio de *Western Blot* mostrando que FGFR2 quinase foi fosforilada após o experimento de cinética. (1) a fração de quinase que foi tratada com CIP antes do experimento cinético, (2) fração de quinase antes do tratamento com CIP. As bandas (4) e (6) representam alíquotas em duplicata de quinase logo após a realização do experimento de autofosforilação, enquanto que as bandas (3) e (5) são os seus respectivos controles.

No entanto, podemos ver da figura anterior que FGFR2 quinase não foi totalmente desfosforilada por CIP, o que nos priva de uma análise mais detalhada a respeito de quais resíduos de tirosina foram fosforilados. Porém, dentre os resultados obtidos por Lew e colaboradores (115), no que diz respeito aos primeiros resíduos de tirosina fosforilados, temos que o resíduo Y^{653} é um substrato melhor para ser fosforilado do que Y^{583} . E embora estes resíduos apresentem uma cinética de fosforilação similares, Y^{653} deveria ser reconhecido primeiro devido ao fato deste resíduo aumentar a atividade catalítica da proteína e também por ser um resíduo crítico para manter a enzima em seu estado ativo. Sendo assim, correlacionando estes resultados com os dados obtidos em nosso experimento cinético, temos que o valor de n de 2,54 por nós encontrado, representa o grau de cooperatividade com que o processo cinético ocorre, mas também é possível associarmos este número, em casos especiais, à quantidade de sítios que foram fosforilados durante o processo cinético (56). Assim, podemos supor que aquelas tirosinas foram fosforiladas em nosso experimento por serem os resíduos que mais rápido ficam fosforilados na proteína FGFR1, em detrimento dos outros resíduos que devem depender de mudanças conformacionais da proteína para que a energia livre de fosforilação torne-se favorável.

Após termos realizado o experimento de autofosforilação de FGFR2 quinase com sucesso, onde validamos a técnica de ITC como uma importante ferramenta

para acessar processos cinéticos deste sistema, decidimos fazer um experimento de ligação entre FGFR2 quinase e a isoforma p52 da proteína Shc. Como foi visto anteriormente, sabemos que a autofosforilação dos resíduos de tirosina presentes em PTKs é um processo crucial para manter esta enzima em um estado ativo e também importante para o recrutamento de proteínas parceiras importantes em várias vias de sinalização (101, 106, 108, 118). Desta maneira, antes de realizarmos um experimento que monitorasse apenas a ligação entre a quinase e p52Shc e no qual não houvesse fosforilação de p52Shc por FGFR2, uma alíquota de 40 μM de FGFR2 quinase foi incubada com 1 mM de ATP por 12 horas em geladeira à 4 °C. Após este período, a proteína foi dialisada exaustivamente para a retirada do excesso de ATP contra tampão sem MgCl_2 (50mM Tris, 100mM NaCl, 1mM βME , pH 8,0). Todo este procedimento foi tomado para garantir que FGFR2 estivesse completamente fosforilada (i.e., ativa), mas que, em uma provável interação com p52Shc, não fosse possível que esta segunda proteína fosse fosforilada por intermédio de FGFR2. Sendo assim, os experimentos de ITC da interação de FGFR2 quinase e p52Shc foram realizados a 15 °C, e o resultado pode ser visto na Figura 59 a seguir. Também realizamos experimentos de ligação a 10 e 20 °C, porém, nenhuma curva de ligação satisfatória foi obtida. Talvez esta carência de dados acima e abaixo de 15 °C deva-se ao fato deste sistema de proteínas ser bastante instável e também não ser possível obter muito material para os experimentos de ligação. Para o experimento realizado a 15 °C, foram utilizadas as concentrações de 5 μM de FGFR2 quinase dentro da cela de amostra do calorímetro e 50 μM de p52Shc dentro da seringa. O modelo matemático usado para ajustar a isoterma foi o de sítio único e os parâmetros obtidos foram: $N = 1,16 \pm 0,08$, $K = (1,2 \pm 0,5) \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ ($K_d = 0,83 \mu\text{M}$), $\Delta H = (-6,3 \pm 0,6) \text{ kcal mol}^{-1}$, $\Delta S = 5,78 \text{ cal mol}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$. O número de sítios N encontrado a partir do ajuste nos diz que a interação dá-se na razão molar de 1:1. Além disso, as variações dos parâmetros termodinâmicos indicam que o processo de ligação FGFR2-p52Shc é favorável tanto do ponto de vista entálpico quanto entrópico. Os valores obtidos deste experimento estão em acordo com os obtidos por Ahmed e colaboradores (119) que determinaram os valores de K_d no intervalo de μM na interação direta entre FGFR2 quinase e Grb2 e vários peptídeos provenientes de domínios específicos de Grb2, outra proteína

adaptadora que exerce um papel ubíquo em sinalização celular desde as RTKs até a via de sinalização mediada por MAPK (120).

Apesar dos muitos estudos, poucas proteínas que se associam diretamente com FGFR2 foram identificadas (119). Os resultados da Figura 59 mostram que a interação direta em FGFR2 e p52Shc é possível e que FGFR2 tem um sítio de ligação para Shc em sua estrutura. A identificação da existência de tal sítio de ligação em FGFR2 contribui para aumentar a percepção de que esta deva ser uma característica comum no recrutamento de proteínas adaptadoras para toda a família FGFR.

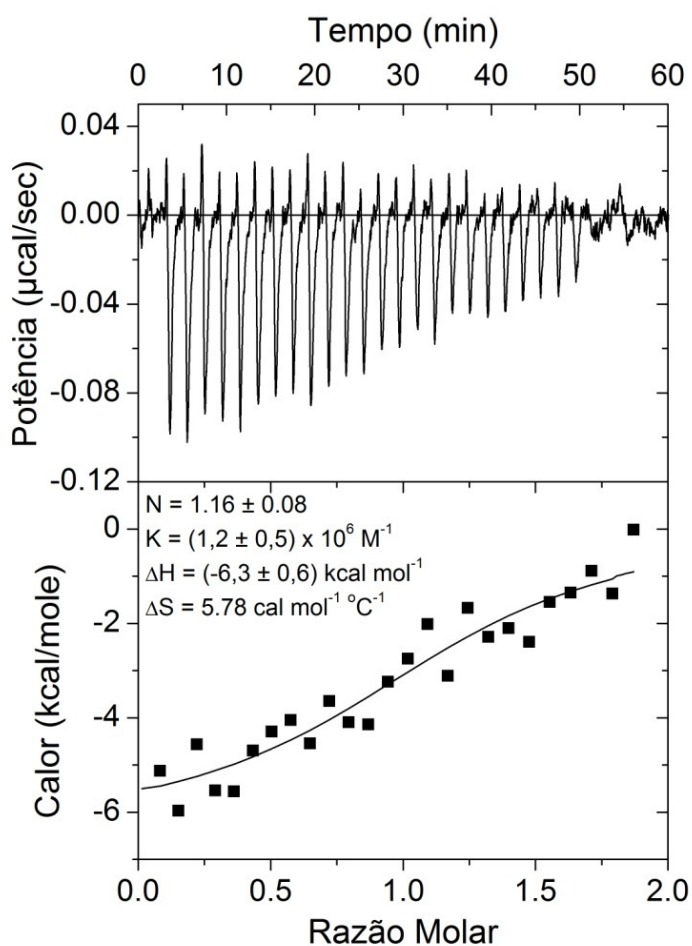


Figura 59 – Interação entre FGFR2 quinase e p52Shc por ITC. No painel acima é mostrado a variação de potência gerada após cada injeção de Shc em quinase. No painel abaixo é mostrado o calor gerado após cada injeção. Os dados acima foram ajustados segundo o modelo de um sítio de ligação.

Sabemos que as FGFR quinases tornam-se ativas após sua autofosforilação (35,102,107,109). Portanto, o próximo estudo realizado foi a cinética de fosforilação de p52Shc mediada por FGFR2 quinase ativada. Para isso, uma purificação foi feita e à FGFR2 quinase resultante foi acrescentado excesso de ATP para que a enzima sofresse autofosforilação. Este processo durou 12 horas na temperatura de 4 °C e após este procedimento, a FGFR2 quinase foi dialisada exaustivamente para a retirada do ATP. A proteína p52Shc por sua vez foi usada sem nenhum tratamento prévio. As cinéticas enzimáticas em três temperaturas diferentes juntamente com as respectivas isotermas no qual as curvas cinéticas foram calculadas e são mostradas a seguir. Nestes experimentos, a seringa foi preenchida com uma solução de 25 mM de ATP enquanto que a cela de amostra foi preenchida com uma solução de FGFR2 e p52Shc nas concentrações de 0,1 μ M e 10 μ M, respectivamente. Uma única injeção de ATP, de volume 10 μ L, foi feita na cela de amostra e a reação foi monitorada até o seu final. A entalpia molar aparente em todos os experimentos foi obtida integrando-se a área sobre a curva isoterma (RawITC) do qual foi calculada a curva cinética. Para isso, foi injetado ATP em excesso na cela e deixando a cinética de fosforilação acabar e, então, dividindo o valor da entalpia pela concentração final de ATP dentro da cela de reação.

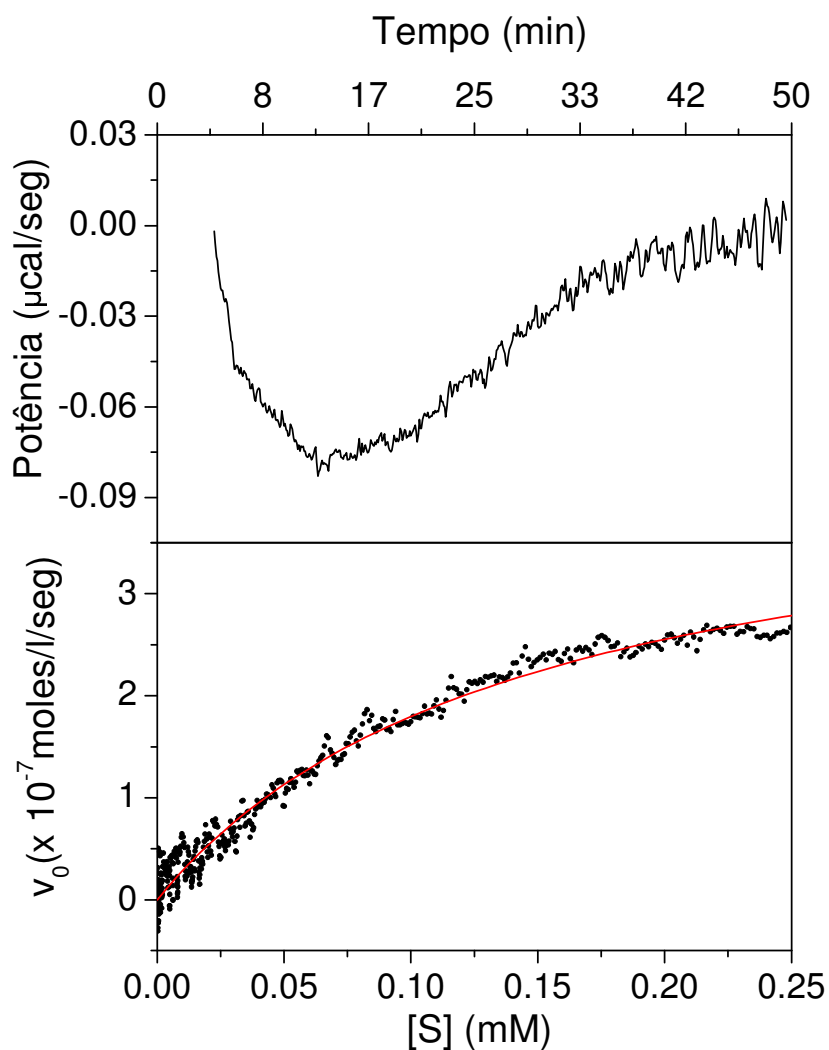


Figura 60 – Cinética de fosforilação de p52Shc mediada por FGFR2 quinase realizada na temperatura de 10 °C. No painel superior vemos a variação da potência térmica instrumental após injeção de 10 μL de ATP à 25 mM dentro da cela de amostra contendo 0,1 μM FGFR2 quinase e 10μM p52Shc. No painel inferior vemos a curva cinética calculada da isoterma acima juntamente com melhor ajuste usando-se o modelo de Michaelis-Menten para este caso.

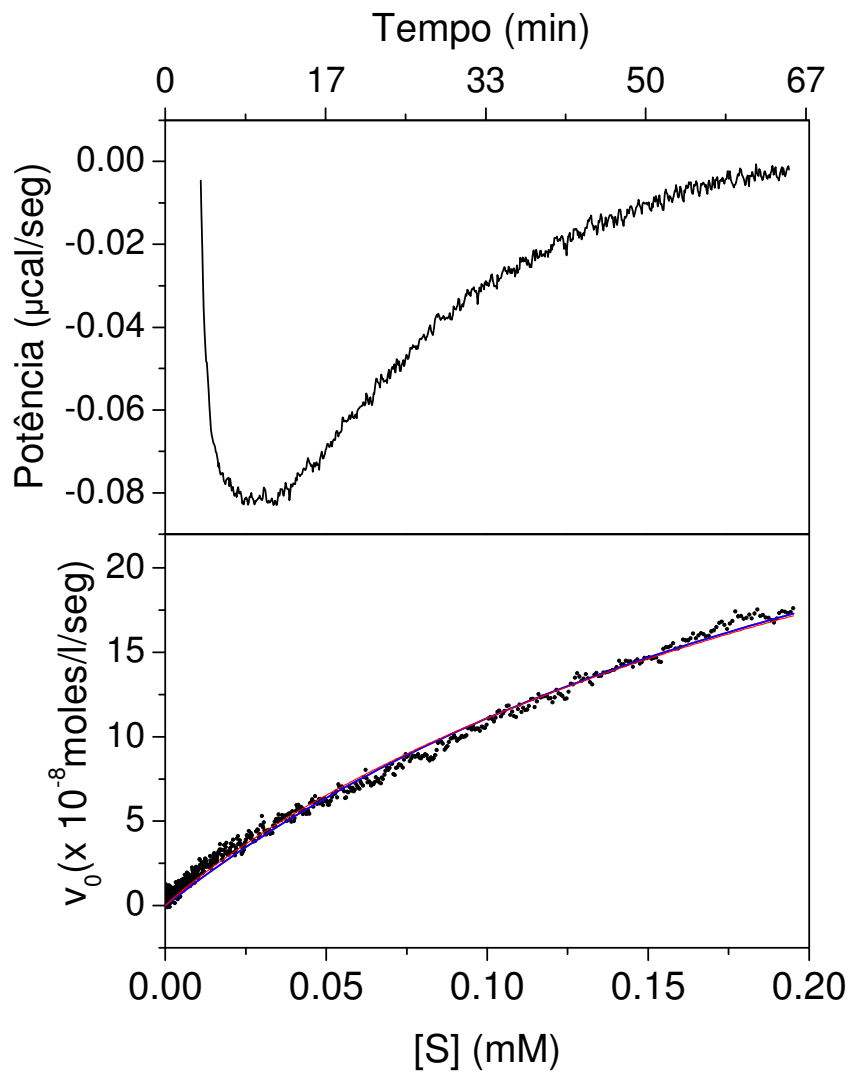


Figura 61 – Cinética de fosforilação de p52Shc mediada por FGFR2 quinase realizada na temperatura de 15 °C. No painel superior vemos a variação da potência térmica instrumental após injeção de 10 µL de ATP à 25 mM dentro da cela de amostra contendo 0,1 µM FGFR2 quinase e 10µM p52Shc. No painel inferior vemos a curva cinética calculada da isoterma acima juntamente com melhor ajuste usando-se o modelo de Michaelis-Menten (—) sobreposto ao modelo de Hill (—).

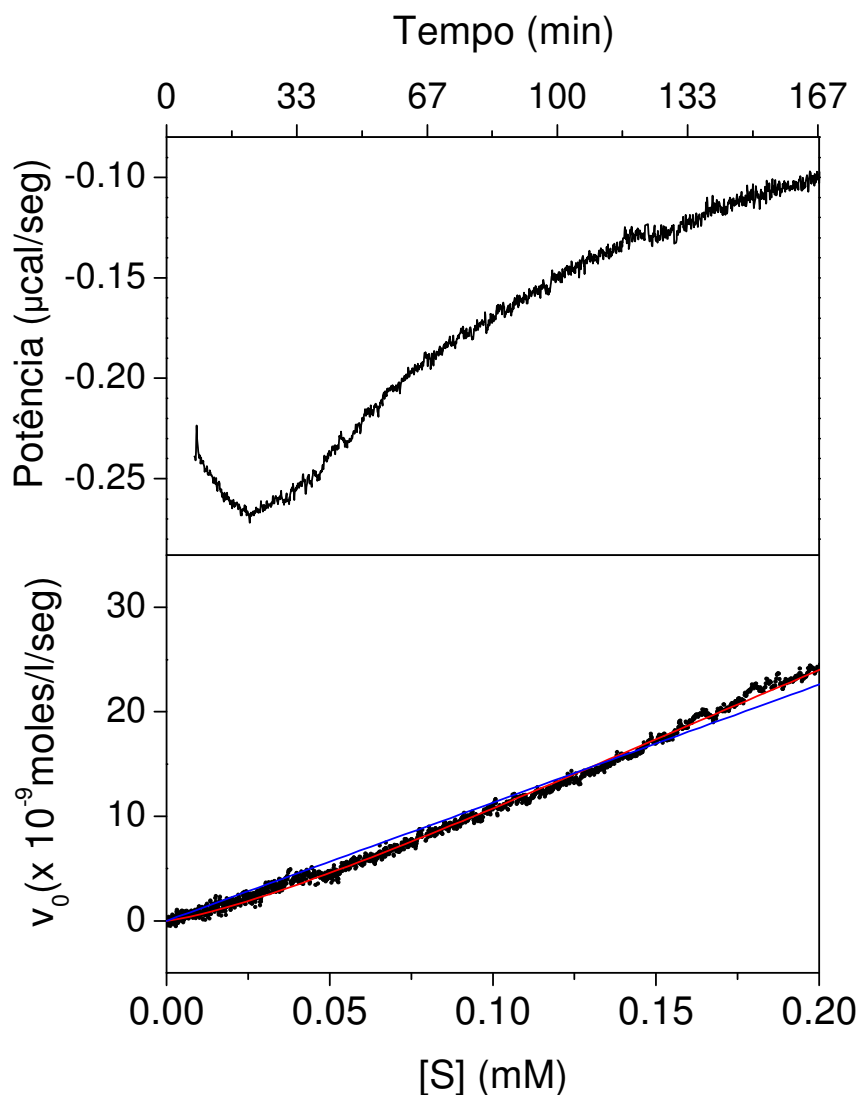


Figura 62 – Cinética de fosforilação de p52Shc mediada por FGFR2 quinase realizada na temperatura de 20 °C. Podemos notar que não é possível ajustar os dados segundo o modelo de Michaelis-Menten (—). No entanto, podemos ver um bom ajuste dos dados pelo modelo de Hill (—)

Das figuras anteriores percebemos que a cinética de fosforilação de p52Shc mediada por FGFR2 quinase tende a mudar com a temperatura. Na temperatura de 10 °C a cinética ocorre segundo um mecanismo de Michaelis-Menten, onde os parâmetros obtidos foram $k_{cat} = (4,46 \pm 0,09) \text{ s}^{-1}$, $K_m = (146 \pm 5) \text{ } \mu\text{M}$ e $\Delta H = -197,6 \text{ cal/mol}$ (Figura 60). Porém, a 15°C podemos identificar uma indefinição de comportamento deste sistema, uma vez que os dados podem ser ajustado com ambos modelos (Michaelis-Menten e Hill) (Figura 61). Sendo assim, os parâmetros cinéticos obtidos por Michaelis-Menten foram: $k_{cat} = (4,19 \pm 0,08) \text{ s}^{-1}$, $K_m = (277 \pm 8)$

μM e $\Delta H = -292,4 \text{ cal/mol}$, e quando foi utilizado o modelo de Hill os parâmetros cinéticos obtidos neste caso foram: $k_{\text{cat}} = (4,6 \pm 0,9) \text{ s}^{-1}$, $K_m = (332 \pm 5) \mu\text{M}$, $n = 0,94$ e $\Delta H = -197,6 \text{ cal/mol}$. Já para 20°C vemos uma mudança no perfil catalítico, como se fosse uma transição de fase, de modo que passamos a observar um certo grau de cooperatividade. Neste caso, foi usada a equação de Hill para ajustar os dados cinéticos da fosforilação de Shc, uma vez que não foi possível o ajuste com o modelo de Michaelis-Menten (Figura 62). Neste caso os parâmetros cinéticos obtidos foram: $k_{\text{cat}} = (1,5 \pm 0,2) \text{ s}^{-1}$, $K_m = (701 \pm 5) \mu\text{M}$, $n = 1,3$ e $\Delta H = -750 \text{ cal/mol}$. A seguir mostramos as variações de ΔH e K_m com a temperatura durante a fosforilação de $10 \mu\text{M}$ de Shc (Figura 63). Vale ressaltar também que as concentrações de quinase e ATP dentro da cela de amostra após injeção foram de $0,1 \mu\text{M}$ e $250 \mu\text{M}$, respectivamente.

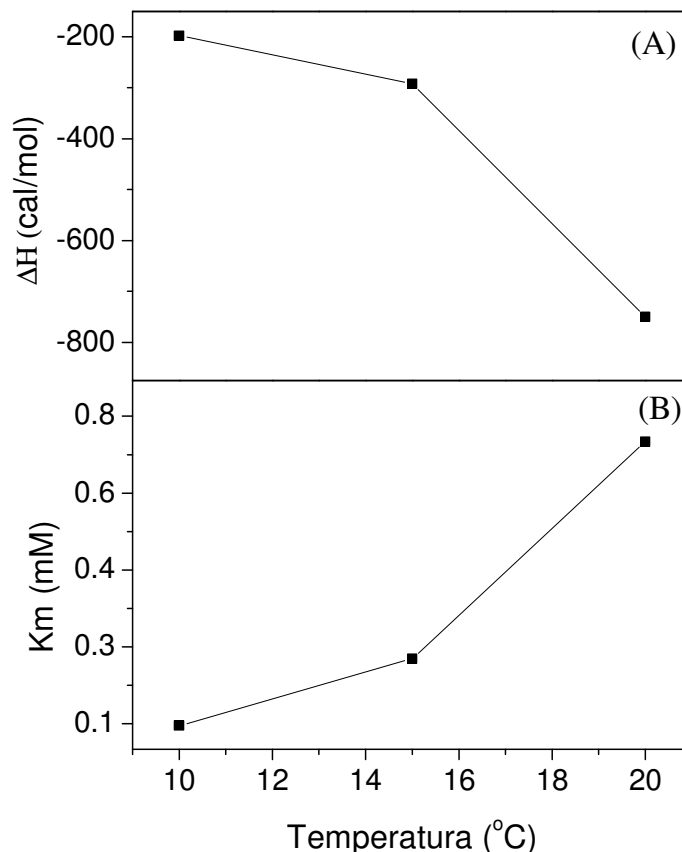


Figura 63 – Variação de ΔH em função da temperatura durante a fosforilação de $10\mu\text{M}$ de Shc.

Da figura anterior (parte A) é possível determinarmos a variação da capacidade térmica à pressão constante (ΔC_p) para a interação baseada na seguinte equação (62):

$$\Delta C_p = \frac{\Delta H_{T_2} - \Delta H_{T_1}}{T_2 - T_1} \quad (23)$$

onde T_2 e T_1 são duas temperaturas experimentais diferentes. Deste modo, em um gráfico de ΔH contra temperatura para uma série de experimentos de ITC a inclinação do gráfico corresponde a ΔC_p . Uma vez que estabelecemos como calcular este parâmetro, é preciso determinar como pode ser usado. Esta questão pode ser respondida se nos basearmos na observação de que existem fortes indícios de que este parâmetro está relacionado com a área da superfície “enterrada”, ou seja, a área de superfície que é removida da interação com o solvente quando um complexo é formado (121, 122). A remoção da área de superfície da proteína da exposição com o solvente faz com que ΔC_p tenha uma grande variação negativa (123) e esta afirmação está baseada no fato de que o solvente se comporta de maneiras diferentes na superfície da proteína e em seu “bulk”. Este é, particularmente, o caso em que moléculas de água interagem com superfícies hidrofóbicas e, de fato, a capacidade térmica do sistema é diferente para uma solução na qual existem moléculas de água livres daquele caso onde as moléculas de água interagem com a biomolécula (62). Este comportamento pode ser demonstrado durante uma desnaturação térmica de proteínas, onde após a desnaturação os resíduos hidrofóbicos são expostos ao solvente mudando assim a capacidade térmica do sistema. Deste modo, a mudança na capacidade térmica do sistema para um processo onde há liberação de água da superfície da proteína em virtude da formação de um complexo é negativa e espera-se que seja proporcional à quantidade de superfície envolvida (62). Sendo assim, os gráficos da Figura 63A mostram um aumento significativo do valor de ΔC_p da temperatura de 10 para 15 °C e depois um aumento drástico de ΔC_p quando se vai 15 para 20 °C. Este comportamento é seguido de um aumento nas mesmas proporções para o valor de K_M (Figura 63B). Esta mudança deve-se provavelmente ao aumento da atividade enzimática com a temperatura levando assim ao aumento nos parâmetros supracitados.

Para verificar se Shc foi fosforilada por quinase após o experimento de cinética, um experimento de *Western Blot* foi feito e o resultado está apresentado na Figura 64.

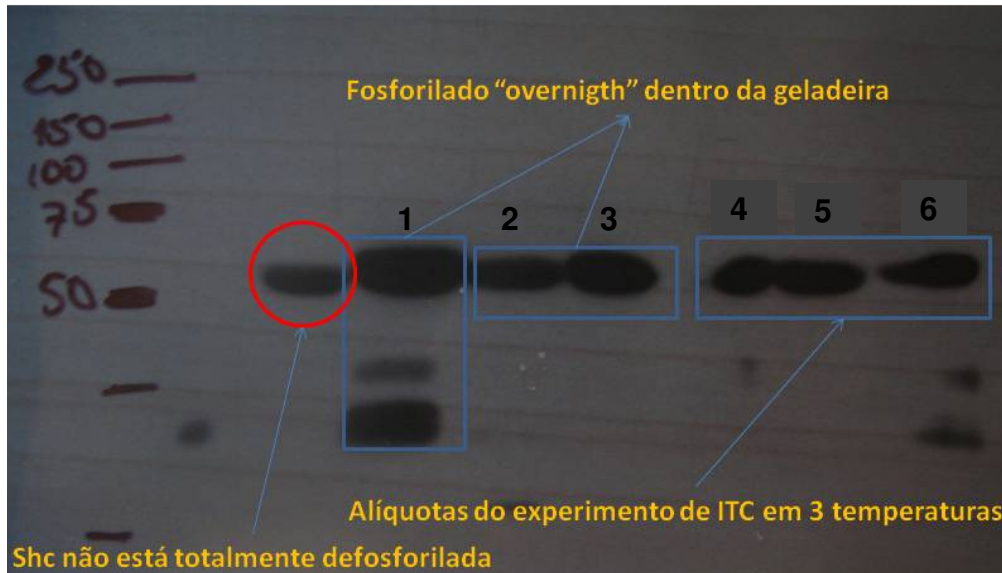


Figura 64 – Western blot referente à cinética de fosforização de p52Shc mediada por FGFR2 quinase.

Na figura acima é mostrado a bandas das alíquotas de FGR2 quinase que foram utilizadas neste experimento (bandas 2 e 3). Em 1, nos mostramos as bandas de p52Shc (entre 50 e 75 kDa) e FGFR2 quinase abaixo, onde foi feito um experimento prévio, apenas juntando as proteínas com excesso de ATP e mantendo esta alíquota em geladeira a 4 °C por um período de 12 horas (vale lembrar que neste experimento FGFR2 quinase já estava fosforilada, como podem ser visto em 2 e 3) (Figura 64). Tendo a comprovação de que quinase esta ativa e que fosforila de fato Shc, passamos para a outra etapa de nosso experimento onde a fosforilação foi feita dentro da cela do calorímetro e então monitorada em forma de cinética pelo calor gerado durante este processo. Estes experimentos estão representados em 4 à 6 onde as temperaturas de casa experimento foram 10, 15 e 20 °C respectivamente. Deste modo, vemos que a fosforilação neste caso funcionou e conseguimos monitorar o calor gerado durante este processo. No entanto, nesta mesma análise de Western blot vemos que uma nova banda aparece (círculo vermelho) que a princípio esperava-se não pudesse acontecer. Trata-se da alíquota de p52Shc usada para os experimentos e que acreditávamos estivesse defosforilada. Mesmo assim esta banda é mais clara que aquelas cujas amostras

foram retiradas logo após o experimento cinético. P52Shc possui três resíduos de tirosina capazes de serem fosforilados por quinase e assim fazer a adaptação de outras proteínas (Sos, Grb2, etc.) durante o processo de sinalização num mecanismo de “gate” (36). Então, acreditamos que pelo menos uma das tirosinas de Shc esteja fosforilada. Isto está de acordo com o valor de $n = 1,30$ obtido na cinética realizada na temperatura de 20°C. Sendo assim, novos experimentos são necessários com o intuito de otimizarmos os dados já obtidos acerca do grau de fosforilação de p52Shc. Mesmo assim, o conjunto de experimentos realizados e discutidos nesta seção foram importantes para consolidar a técnica de ITC como uma ferramenta padrão para acessar qualquer tipo de cinética, onde não é possível fazer por métodos convencionais (espectrofotometro). Além do mais, com esta técnica é possível medir diretamente e com precisão a energia gasta nestes processos, e assim, obter informações a respeito do perfil termodinâmico destas reações, o que é uma vantagem sobre os métodos convencionais.

Conclusões Gerais e Perspectivas

O objetivo deste trabalho de tese foi estudar as bases de interações moleculares protagonizadas por duas enzimas que possuem funções biológicas distintas, por meio de um esquema experimental que envolveu diversas técnicas biofísicas. Dentre as técnicas utilizadas, destacamos a versatilidade da técnica calorimétrica de ITC, que nos permitiu acessar as cinéticas de conversão da molécula de catecol em ácido cis-cis-mucônico mediada pela enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida*, bem como as primeiras cinéticas de fosforilação das proteínas humana FGFR2 Tirosina quinase e p52Shc obtidas de maneira direta. Com isso, conseguimos validar a técnica de ITC como uma ferramenta padrão para obter cinéticas de sistemas onde não é possível utilizar métodos convencionais.

Através de um esquema multitécnicas, que contou com ITC, DSC e RPE, conseguimos mostrar que o produto da catálise mediada pela enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase, o ácido cis-cis-mucônico, é capaz de inibir esta enzima durante a catálise, sendo que DSC mostrou que na presença do produto da reação a estabilidade térmica de 1,2-CCD foi fortemente afetada, com a temperatura da transição T_m deslocando-se para uma temperatura menor do que aquela obtida para a transição da proteína na ausência do produto. Além disso, experimentos de RPE do centro de Fe(III) localizado no sítio ativo desta proteína mostraram que o ácido cis-cis-mucônico liga-se diretamente no sítio ativo de Pp 1,2-CCD. A inibição por produto parece estar intimamente envolvida com mecanismo de regulação que *in vivo* poderia ser usado pela célula para controlar seu metabolismo. Deste modo, podemos imaginar um mecanismo regulatório onde a quantidade de produto formada durante uma reação enzimática é controlada pelas concentrações de substrato e produto formados, de modo que este tipo de mecanismo poderia manter a célula protegida contra extremos biológicos. Ainda no âmbito dos estudos envolvendo 1,2-CCD e baseados em estudos prévios realizados em nosso grupo, mostramos através da combinação das técnicas RPE, DSC, PPC e monocamadas de Langmuir, que esta proteína é capaz de ligar-se a modelos de membranas. Este comportamento chama atenção porque junto com a inibição por produto poderia ser mais um mecanismo utilizado pela célula para regular seu metabolismo. Desta maneira, novos experimentos poderiam ser feitos onde o sistema 1,2-CCD/ácido cis-cis-mucônico seria posto para interagir com miméticos de membranas a fim de investigar se existe alguma relação entre estes dois mecanismos. Acreditamos que

na presença do produto, 1,2-CCD mudaria sua conformação de maneira a expor domínios que interagem ainda mais efetivamente com a membrana celular. Esta suposição está em total acordo com os dados obtidos por DSC do desenovelamento de 1,2-CCD na presença de ácido cis-cis-mucônico.

Com relação ao estudo realizado com as proteínas Tirosina quinase e Shc, os dados obtidos nesta tese foram os primeiros resultados referentes às cinéticas de fosforilação onde estas foram monitoradas de maneira direta. Como dito anteriormente, ITC mostrou-se bastante versátil para estudos que envolvem cinéticas de reações, uma vez que em apenas um conjunto de experimentos somos capazes de não apenas determinar os parâmetros cinéticos da reação, mas também traçar o perfil termodinâmico da reação enzimática no que diz respeito às contribuições entálpicas e entrópicas da reação. Neste sentido, mostramos que Tirosina quinase FGFR2 experimenta um processo de autofosforilação do tipo cooperativo, o que está de acordo com os dados obtidos para outra proteína da família das Tirosina quinases, a FGFR1, onde os resíduos de tirosinas localizados em seu sítio ativo e outros próximos a ele fosforilam-se em uma maneira sequencial e ordenada. Sabe-se que a autofosforilação de resíduos de Tirosinas localizados em seu sítio ativo é crucial para a manutenção do estado ativo destas proteínas, enquanto a fosforilação de outros resíduos do domínio citoplasmático é essencial para o recrutamento e ativação de diversas vias de sinalização que regulam o metabolismo celular. Conseguimos também mostrar que FGFR2 quinase interage diretamente com a isoforma p52 da proteína Shc, e que além disso é capaz de fosforilar os resíduos de tirosina localizados em seu domínio CH1. Shc é uma proteína adaptadora e importante integrante do grupo de proteínas que formam os ESC. Sabe-se que esta proteína interage com Tirosina quinase via seu domínio PTB, porém, só é capaz de interagir com outras proteínas após seu domínio CH1 tornar-se fosforilado, num mecanismo de portão. A cinética de fosforilação desta proteína apresenta um comportamento com a temperatura que sofre uma transição no que diz respeito ao modelo utilizado para ajustar os pontos. A 10°C a cinética pode ser ajustada pelo modelo de Michaelis-Menten, porém, a 15°C a cinética experimentada por esta proteína mostra um indefinição de comportamento cinético sendo possível ajustar seus dados tanto por Michaelis-Menten quanto pelo modelo de Hill. Já para 20°C a cinética apresenta um caráter cooperativo, não sendo mais

possível ajustar os pontos pelo modelo de Michaelis-Menten. Estes resultados abrem um leque de perspectivas grande uma vez que as razões pelas quais a cinética de fosforilação de Shc ocorre desta maneira ainda não são bem entendidas.

Obviamente novos experimentos precisam ser realizados para se entender melhor os mecanismos de fosforilação utilizados por FGFR2 e Shc para tornarem-se ativas, bem como o papel dos outros resíduos de tirosina ao longo da estrutura de FGFR2 no recrutamento de proteínas adaptadoras importantes nos processos de sinalização celular. A proposta seria silenciar alguns resíduos de tirosina, inclusive os localizados no sítio ativo da proteína, para sabermos como se comporta o perfil catalítico de autofosforilação e a interação desta proteína com Shc. Também temos a intenção de realizar novos experimentos de fosforilação de Shc, de maneira à confirmar a reprodutibilidade dos resultados obtidos, tomando-se o devido cuidado para que não haja resíduos de tirosinas fosforilados nesta proteína antes do experimento cinético.

REFERÊNCIAS

- 1 O'BRIEN, R.; LADBURY, J. E.; CHOWDHRY, B. Z., Isothermal titration calorimetry of biomolecules, In: HARDING, S.E. (Ed.) **Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry**. Oxford: Oxford University Press, 2001. p. 263-286.
- 2 CAI, L. F.; CAO, A. N.; LAI, L. H. An isothermal titration calorimetric method to determine the kinetic parameters of enzyme catalytic reaction by employing the product inhibition as probe. **Analytical Biochemistry**, v. 299, n. 1, p. 19-23, 2001.
- 3 CELEJ, M. S.; DASSIE, S. A.; GONZALEZ, M.; BIANCONI, M. L.; FIDELIO, G. D. Differential scanning calorimetry as a tool to estimate binding parameters in multiligand binding proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 350, n. 2, p. 277-284, 2006.
- 4 COOPER, A.; MCAULEYHECHT, K. E. Microcalorimetry and the Molecular Recognition of Peptides and Proteins. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A - Mathematical Physical and Engineering Sciences**, v. 345, n. 1674, p. 23-35, 1993.
- 5 EPAND, R. M. Detecting the presence of membrane domains using DSC. **Biophysical Chemistry**, v. 126, n. 1-3, p. 197-200, 2007.
- 6 HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. Application of pressure perturbation Calorimetry to lipid Bilayers. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 3, p. 1445-1452, 2002.
- 7 KISS, M.; BELAGYI, J.; LORINCZY, D. Vanadate(V-i) and ADP induced domain motions in myosin head by DSC and EPR. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 72, n. 2, p. 573-580, 2003.
- 8 MEIROVITCH, E.; NAYEEM, A.; FREED, J. H. Analysis of Protein Lipid Interactions Based on Model Simulations of Electron-Spin Resonance-Spectra. **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 16, p. 3454-3465, 1984.
- 9 PIERCE, M. M.; RAMAN, C. S.; NALL, B. T. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. **Methods - a companion to methods in enzymology**, v. 19, n. 2, p. 213-221, 1999.

10 WISEMAN, T.; WILLISTON, S.; BRANDTS, J. F.; LIN, L. N. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Analytical Biochemistry**, v. 179, n. 1, p. 131-137, 1989.

11 JELESAROV, I.; BOSSHARD, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. **Journal of Molecular Recognition**, v. 12, n. 1, p. 3-18, 1999.

12 KUJAWA, P.; WINNIK, F. M. Volumetric studies of aqueous polymer solutions using pressure perturbation calorimetry: A new look at the temperature-induced phase transition of poly(N-isopropylacrylamide) in water and D₂O. **Macromolecules**, v. 34, n. 12, p. 4130-4135, 2001.

13 BIANCONI, M. L. Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions. **Biophysical Chemistry**, v. 126, n. 1-3, p. 59-64, 2007.

14 EFTINK, M. R.; JOHNSON, R. E.; BILTONEN, R. L. The Application of flow microcalorimetry to the study of enzyme-kinetics. **Analytical Biochemistry**, v. 111, n. 2, p. 305-320, 1981.

15 LONHIENNE, T.; BAISE, E.; FELLER, G.; BOURIOTIS, V.; GERDAY, C. Enzyme activity determination on macromolecular substrates by isothermal titration calorimetry: application to mesophilic and psychrophilic chitinases. **Biochimica Et Biophysica Acta - protein structure and molecular enzymology**, v. 1545, n. 1-2, p. 349-356, 2001.

16 OLSEN, S. N. Applications of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics and activity in complex solutions. **Thermochemica Acta**, v. 448, n. 1, p. 12-18, 2006.

17 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.

18 WATT, G. D. A microcalorimetric procedure for evaluating the kinetic-parameters of enzyme-catalyzed reactions - kinetic measurements of the nitrogenase system. **Analytical Biochemistry**, v. 187, n. 1, p. 141-146, 1990.

19 ATHERTON, N. M., **Electron spin resonance** : theory and applications. Chichester: E. Horwood, 1973. 438 p. (Ellis Horwood series in physical chemistry).

20 BERLINER, L. J.; REUBEN, J., **Spin labeling** : theory and applications. New York ; London: Plenum, 1989. 650 p. (Biological magnetic resonance,).

21 ORTON, J. W., **Electron paramagnetic resonance** : an introduction to transition group ions in crystals. London: Iliffe, 1968. 240 p.

22 GE, M. T.; BUDIL, D. E.; FREED, J. H. An electron-spin-resonance study of interactions between phosphatidylcholine and phosphatidylserine in oriented membranes. **Biophysical Journal**, v. 66, n. 5, p. 1515-1521, 1994.

23 GE, M. T.; FREED, J. H. Electron-spin resonance study of aggregation of gramicidin in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers and hydrophobic mismatch. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 1, p. 264-280, 1999.

24 KAR, L.; NEYIGNER, E.; FREED, J. H. Electron-spin resonance and electron-spin-echo study of oriented multilayers of L-alpha-dipalmitoylphosphatidylcholine water-systems. **Biophysical Journal**, v. 48, n. 4, p. 569-595, 1985.

25 CORNUT, I.; DESBAT, B.; TURIET, J. M.; DUFOURCQ, J. In situ study by polarization modulated Fourier transform infrared spectroscopy of the structure and orientation of lipids and amphipathic peptides at the air-water interface. **Biophysical Journal**, v. 70, n. 1, p. 305-312, 1996.

26 BREZESINSKI, G.; MOHWALD, H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 100, n., p. 563-584, 2003.

27 DYNAROWICZ-LATKA, P.; DHANABALAN, A.; OLIVEIRA, O. N. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 91, n. 2, p. 221-293, 2001.

28 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 amphipathic molecules. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 5, p. 3502-3508, 2005.

29 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.

30 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.

31 OHLENDORF, D. H.; LIPSCOMB, J. D.; WEBER, P. C. Structure and assembly of protocatechuate 3,4-dioxygenase. **Nature**, v. 336, n. 6197, p. 403-405, 1988.

32 OHLENDORF, D. H.; ORVILLE, A. M.; LIPSCOMB, J. D. Structure of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas-aeruginosa* at 2.15 angstrom resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 244, n. 5, p. 586-608, 1994.

33 KRAUSS, G., **Biochemistry of signal transduction and regulation**. 3rd ed., Weinheim: Wiley-VCH, 2003. 541 p.

34 ESWARAKUMAR, V. P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, n. 2, p. 139-149, 2005.

35 GROSE, R.; DICKSON, C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, n. 2, p. 179-186, 2005.

36 GEORGE, R.; SCHULLER, A. C.; HARRIS, R.; LADBURY, J. E. A phosphorylation-dependent gating mechanism controls the SH2 domain interactions of the Shc adaptor protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 377, n. 3, p. 740-747, 2008.

37 LADBURY, J. E.; AROLD, S. Searching for specificity in SH domains. **Chemistry & Biology**, v. 7, n. 1, p. R3-R8, 2000.

38 LADBURY, J. E.; LEMMON, M. A.; ZHOU, M.; GREEN, J.; BOTFIELD, M. C.; SCHLESSINGER, J. Measurement of the Binding of Tyrosyl Phosphopeptides to Sh2 Domains - a Reappraisal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 8, p. 3199-3203, 1995.

39 O'ROURKE, L.; LADBURY, J. E. Specificity is complex and time consuming: Mutual exclusivity in tyrosine kinase-mediated signaling. **Accounts of Chemical Research**, v. 36, n. 6, p. 410-416, 2003.

40 PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A., **Microbiology**. 3rd ed., Dubuque, IA: Wm. C. Brown Publishers, 1996. 935 p.

41 ORNSTON, L. N.; STANIER, R. Y. Conversion of catechol and protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 16, p. 3776-3786, 1966.

42 SCHLÖMANN, M. Evolution of chlorocatechol catabolic pathways. **Biodegradation**, v. 5, n., p. 301–321, 1994.

43 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.

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

45 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.

46 BRODERICK, J. B.; OHALLORAN, T. V. Overproduction, purification, and characterization of chlorocatechol dioxygenase, a nonheme iron dioxygenase with broad substrate tolerance. **Biochemistry**, v. 30, n. 29, p. 7349-7358, 1991.

47 VETTING, M. W.; OHLENDORF, D. H. The 1.8 angstrom 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.

48 BHAT, M. A.; ISHIDA, T.; HORIIKE, K.; VAIDYANATHAN, C. S.; NOZAKI, M. Purification of 3,5-dichlorocatechol 1,2-dioxygenase, a nonheme iron dioxygenase and a key enzyme in the biodegradation of a herbicide, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d), from *pseudomonas-cepacia* Csv90. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 738-746, 1993.

49 CAGLIO, R.; VALETTI, F.; CAPOSIO, P.; GRIBAUDO, G.; PESSIONE, E.; GIUNTA, C. Fine-tuning of catalytic properties of catechol 1,2-dioxygenase by active site tailoring. **ChemBiochem**, v. 10, n. 6, p. 1015-1024, 2009.

50 SCHLOSRIK, J.; ELEY, K. L.; CROWLEY, P. J.; BUGG, T. D. H. Directed evolution of a non-heme-iron-dependent extradiol catechol dioxygenase: Identification of mutants with intradiol oxidative cleavage activity. **ChemBioChem**, v. 7, n. 12, p. 1899-1908, 2006.

51 ARAUJO, A. P. U.; OLIVA, G.; HENRIQUE-SILVA, F.; GARRATT, 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.

52 GILL, S. C.; VONHIPPEL, P. H. Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino-Acid Sequence Data. **Analytical Biochemistry**, v. 182, n. 2, p. 319-326, 1989.

53 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-&, 1970.

54 COPELAND, R. A., **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery** : a guide for medicinal chemists and pharmacologists. Hoboken, N.J. ; Chichester: Wiley-Interscience, 2005. 271 p. (Methods of biochemical analysis ; v. 46).

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

56 MARANGONI, A. G., Enzyme kinetics : a modern approach. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2003. 229 p.

57 STRYER, L., **Biochemistry**. 4th ed., New York: W.H. Freeman, 1999.

58 HONDA, Y.; KITAOKA, M.; TOKUYASU, K.; SASAKI, C.; FUKAMIZO, T.; HAYASHI, K. Kinetic studies on the hydrolysis of N-acetylated and N-deacetylated derivatives of 4-methylumbelliferyl chitobioside by the family 18 chitinases ChiA and ChiB from *Serratia marcescens*. **Journal of Biochemistry**, v. 133, n. 2, p. 253-258, 2003.

59 MORIN, P. E.; FREIRE, E. Direct Calorimetric Analysis of the Enzymatic-Activity of Yeast Cytochrome-C-Oxidase. **Biochemistry**, v. 30, n. 34, p. 8494-8500, 1991.

60 HAQ, I., **Calorimetry in the fast lane: The use of ITC for obtaining enzyme kinetics constants**. Microcal, LLC application note, 2002

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

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

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

64 TIPLER, P. A.; MOSCA, G., **Physics for scientists and engineers** : with modern physics. 6th ed., New York, NY: W.H. Freeman, 2008. 1412 p.

65 WALKER, J.; HALLIDAY, D.; RESNICK, R., **Fundamentals of physics**. 8th ed., Hoboken, NJ: Wiley, 2008. v.1.

66 LI, Z. G.; MINTZER, E.; BITTMAN, R. The critical micelle concentrations of lysophosphatidic acid and sphingosylphosphorylcholine. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 130, n. 2, p. 197-201, 2004.

67 PAULA, S.; SUS, W.; TUCHTENHAGEN, J.; BLUME, A. Thermodynamics of Micelle Formation as a Function of Temperature - a High-Sensitivity Titration Calorimetry Study. **Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 30, p. 11742-11751, 1995.

68 NOBRE, T. M.; WONG, K.; ZANIQUELLI, M. E. D. Equilibrium and dynamic aspects of dodecyltrimethylammonium bromide adsorption at the air/water interface in the presence of lambda-carrageenan. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 305, n. 1, p. 142-149, 2007.

69 CASELI, L.; MASUI, D. C.; FURRIEL, R. P. M.; LEONE, F. A.; ZANIQUELLI, M. E. D. Adsorption kinetics and dilatational rheological studies for the soluble and anchored forms of alkaline phosphatase at the air/water interface. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 5, p. 969-977, 2005.

70 KLECKA, G. M.; GIBSON, D. T. Inhibition of Catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas-putida* by 3-Chlorocatechol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1159-1165, 1981.

71 COOPER, A. Effect of cyclodextrins on the thermal-stability of globular-proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 23, p. 9208-9209, 1992.

72 GERHART, J. C.; PARDEE, A. B. Enzymology of control by feedback inhibition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 3, p. 891-&, 1962.

73 WALTER, C.; FRIEDEN, E. Kinetics of oxidase activity of ceruloplasmin. **Federation Proceedings**, v. 21, n. 2, p. 246-&, 1962.

74 CUNNINGHAM, T. J.; YAO, L. H.; LUCENA, A. Product inhibition of secreted phospholipase A2 may explain lysophosphatidylcholines' unexpected therapeutic properties. **Journal of Inflammation-London**, v. 5, 2008. Doi: 10.1186/1476-9255-5-17.

75 FRIEDEN, E.; WALTER, C. Prevalence and significance of product inhibition of enzymes. **Nature**, v. 198, n. 488, p. 834-&, 1963.

76 SAWADA, S.; KUNINAKA, M.; WATANABE, K.; SATO, A.; KAWAMURA, H.; KOMINE, K.; SAKAMOTO, T.; KASAI, M. The mechanism to suppress photosynthesis through end-product inhibition in single-rooted soybean leaves during acclimation to CO₂ enrichment. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 10, p. 1093-1102, 2001.

77 STEWART, P. S.; ROBERTSON, C. R. Product inhibition of immobilized Escherichia-coli arising from mass-transfer limitation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 2464-2471, 1988.

78 WALTER, C.; FRIEDEN, E. The prevalence and significance of the product inhibition of enzymes. **Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry**, v. 25, n., p. 167-274, 1963.

79 SEN, A. K.; SCHULZ, A. R. Effects of product inhibition in metabolic pathways - stability and control. **Mathematical Biosciences**, v. 96, n. 2, p. 255-277, 1989.

80 GAINES, G. L.; SMITH, L.; NEIDLE, E. L. Novel nuclear magnetic resonance spectroscopy methods demonstrate preferential carbon source utilization by Acinetobacter calcoaceticus. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 23, p. 6833-6841, 1996.

81 BUDIL, D. E.; LEE, S.; SAXENA, S.; FREED, J. H. Nonlinear-least-squares analysis of slow-motion EPR spectra in one and two dimensions using a modified Levenberg-Marquardt algorithm. **Journal of Magnetic Resonance Series A**, v. 120, n. 2, p. 155-189, 1996.

82 KNOWLES, P. F.; MARSH, D.; RATTLE, H. W. E., **Magnetic resonance of biomolecules** : an introduction to the theory and practice of NMR and ESR in biological systems. London: Wiley, 1976. 343 p.

83 ATHERTON, N. M., **Principles of electron spin resonance**. New York: Ellis Horwood ; PTR Prentice Hall, 1993. 585 p. (Ellis Horwood PTR Prentice Hall physical chemistry series).

84 CAMPANA, P. T.; BELTRAMINI, L. M.; COSTA, A. J.; TONARELLI, G.; LOTTERSBERGER, J.; BIANCONI, M. L. Conformation of a synthetic antigenic peptide from HIV-1 p24 protein induced by ionic micelles. **Biophysical Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 175-182, 2005.

85 RISKE, K. A.; NASCIMENTO, O. R.; PERIC, M.; BALES, B. L.; LAMY-FREUND, M. T. Probing DMPG vesicle surface with a cationic aqueous soluble spin label. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1418, n. 1, p. 133-146, 1999.

86 MCCONNELL, H. M. Structures and transitions in lipid monolayers at the air-water-interface. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 42, p. 171-195, 1991.

87 KNOBLER, C. M.; DESAI, R. C. Phase-transitions in monolayers. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 43, p. 207-236, 1992.

88 MOHWALD, H. Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 41, p. 441-476, 1990.

89 TRIPP, B. C.; MAGDA, J. J.; ANDRADE, J. D. Adsorption of globular-proteins at the air/water interface as measured via dynamic surface-tension - concentration-dependence, mass-transfer considerations, and adsorption-kinetics. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 173, n. 1, p. 16-27, 1995.

90 TRONIN, A.; DUBROVSKY, T.; RADICCHI, G.; NICOLINI, C. Optimisation of IgG Langmuir film deposition for application as sensing elements. **Sensors and Actuators B - chemical**, v. 34, n. 1-3, p. 276-282, 1996.

91 SCHMIDT, T. F.; CASELI, L.; VIITALA, T.; OLIVEIRA, O. N. Enhanced activity of horseradish peroxidase in Langmuir-Blodgett films of phospholipids. **Biochimica Et Biophysica Acta - biomembranes**, v. 1778, n. 10, p. 2291-2297, 2008.

92 CASELI, L.; MORAES, M. L.; ZUCOLOTTI, V.; FERREIRA, M.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; RODRIGUES, U. P.; OLIVEIRA, O. N. Fabrication of phytic

acid sensor based on mixed phytase-lipid Langmuir-Blodgett films. **Langmuir**, v. 22, n. 20, p. 8501-8508, 2006.

93 CASELI, L.; CRESPILO, F. N.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA, O. N. Using phospholipid Langmuir and Langmuir-Blodgett films as matrix for urease immobilization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 319, n. 1, p. 100-108, 2008.

94 VERNOUX, N.; MANITI, O.; BESSON, F.; GRANJON, T.; MARCILLAT, O.; VIAL, C. Mitochondrial creatine kinase adsorption to biomimetic membranes: A Langmuir monolayer study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 310, n. 2, p. 436-445, 2007.

95 MARSH, R. J.; JONES, R. A. L.; SFERRAZZA, M. Adsorption and displacement of a globular protein on hydrophilic and hydrophobic surfaces. **Colloids and Surfaces B - biointerfaces**, v. 23, n. 1, p. 31-42, 2002.

96 MAGET-DANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1462, n. 1-2, p. 109-140, 1999.

97 DE VRIES, A. H.; YEFIMOV, S.; MARK, A. E.; MARRINK, S. J. Molecular structure of the lecithin ripple phase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 15, p. 5392-5396, 2005.

98 ANDRUSHCHENKO, V. V.; VOGEL, H. J.; PRENNER, E. J. Interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides with model membranes studied by differential scanning calorimetry. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1768, n. 10, p. 2447-2458, 2007.

99 LEWIS, R. N. A. H.; MAK, N.; MCELHANEY, R. N. A Differential scanning calorimetric study of the thermotropic phase-behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing linear saturated fatty acyl chains. **Biochemistry**, v. 26, n. 19, p. 6118-6126, 1987.

100 COOPER, A.; CAMERON, D.; JAKUS, J.; PETTIGREW, G. W. Pressure perturbation calorimetry, heat capacity and the role of water in protein stability and interactions. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1547-1550, 2007.

101 FURDUI, C. M.; LEW, E. D.; SCHLESSINGER, J.; ANDERSON, K. S. Autophosphorylation of FGFR1 kinase is mediated by a sequential and precisely ordered reaction. **Molecular Cell**, v. 21, n. 5, p. 711-717, 2006.

102 VAN HOLDE, K. E.; JOHNSON, W. C.; HO, P. S., **Principles of physical biochemistry**. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall, 1997. 657 p.

103 ALBERTS, B., **Molecular biology of the cell**. 4th ed., New York: Garland Science, 2002. 1463 p.

104 KURIYAN, J.; COWBURN, D. Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 26, n., p. 259-288, 1997.

105 BAE, J. H.; LEW, E. D.; YUZAWA, S.; TOME, F.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. The selectivity of receptor Tyrosine Kinase signaling is controlled by a secondary SH2 domain binding site. **Cell**, v. 138, n. 3, p. 514-524, 2009.

106 HSU, C. Y. J.; HURWITZ, D. R.; MERVIC, M.; ZILBERSTEIN, A. Autophosphorylation of the intracellular domain of the Epidermal Growth-Factor Receptor results in different effects on its Tyrosine Kinase-activity with various peptide-substrates - phosphorylation of peptides representing Tyr(P) sites of Phospholipase C-gamma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 1, p. 603-608, 1991.

107 SCHULLER, A. C.; AHMED, Z.; LEVITT, J. A.; SUEN, K. M.; SUHLING, K.; LADBURY, J. E. Indirect recruitment of the signalling adaptor Shc to the fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2). **Biochemical Journal**, v. 416, n., p. 189-199, 2008.

108 MOHAMMADI, M.; DIKIC, I.; SOROKIN, A.; BURGESS, W. H.; JAYE, M.; SCHLESSINGER, J. Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 3, p. 977-989, 1996.

109 GUSTAFSON, T. A.; HE, W. M.; CRAPARO, A.; SCHAUB, C. D.; ONEILL, T. J. Phosphotyrosine-dependent interaction of Shc and Irs-1 with the Npey motif of the Insulin-Receptor via a novel (Non-Sh2) domain. **Diabetes**, v. 44, n., p. A49-A49, 1995.

110 GUSTAFSON, T. A.; HE, W. M.; CRAPARO, A.; SCHAUB, C. D.; ONEILL, T. J. Phosphotyrosine-dependent interaction of Shc and Insulin-Receptor Substrate-1 with the Npey motif of the Insulin-Receptor via a novel Non-Sh2 domain. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 5, p. 2500-2508, 1995.

111 OBERMEIER, A.; LAMMERS, R.; WIESMULLER, K. H.; JUNG, G.; SCHLESSINGER, J.; ULLRICH, A. Identification of Trk binding-sites for Shc and Phosphatidylinositol 3'-Kinase and formation of a multimeric signaling complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 31, p. 22963-22966, 1993.

112 PELICCI, G.; LANFRANCONE, L.; GRIGNANI, F.; MCGLADE, J.; CAVALLO, F.; FORNI, G.; NICOLETTI, I.; GRIGNANI, F.; PAWSON, T.; PELICCI, P. G. A novel transforming protein (Shc) with an Sh2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. **Cell**, v. 70, n. 1, p. 93-104, 1992.

113 ROZAKISADCOCK, M.; MCGLADE, J.; MBAMALU, G.; PELICCI, G.; DALY, R.; LI, W.; BATZER, A.; THOMAS, S.; BRUGGE, J.; PELICCI, P. G.; SCHLESSINGER, J.; PAWSON, T. Association of the Shc and Grb2/Sem5 Sh2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by Tyrosine Kinases. **Nature**, v. 360, n. 6405, p. 689-692, 1992.

114 GEORGE, R.; CHAN, H. L.; AHMED, Z.; SUEN, K. M.; STEVENS, C. N.; LEVITT, J. A.; SUHLING, K.; TIMMS, J.; LADBURY, J. E. A complex of Shc and Ran-GTPase localises to the cell nucleus. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 4, p. 711-720, 2009.

115 LEW, E. D.; FURDUI, C. M.; ANDERSON, K. S.; SCHLESSINGER, J. The precise sequence of FGF Receptor autophosphorylation is kinetically driven and is disrupted by oncogenic mutations. **Science Signaling**, v. 2, n. 58, p. ra6-, 2009.

116 RENART, J.; REISER, J.; STARK, G. R. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera - method for studying antibody specificity and antigen structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 7, p. 3116-3120, 1979.

117 TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

118 PEARSON, G.; ROBINSON, F.; GIBSON, T. B.; XU, B. E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M. H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways:

Regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 2, p. 153-183, 2001.

119 AHMED, Z.; GEORGE, R.; LIN, C. C.; SUEN, K. M.; LEVITT, J. A.; SUHLING, K.; LADBURY, J. E. Direct binding of Grb2 SH3 domain to FGFR2 regulates SHP2 function. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 1, p. 23-33, 2010.

120 MARGOLIS, B.; SKOLNIK, E. Y. Activation of Ras by Receptor Tyrosine Kinases. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, n. 6, p. 1288-1299, 1994.

121 LIVINGSTONE, J. R.; SPOLAR, R. S.; RECORD, M. T. Contribution to the thermodynamics of protein folding from the reduction in water-accessible nonpolar surface-area. **Biochemistry**, v. 30, n. 17, p. 4237-4244, 1991.

122 SPOLAR, R. S.; RECORD, M. T. Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. **Science**, v. 263, n. 5148, p. 777-784, 1994.

123 STURTEVANT, J. M. Heat-Capacity and Entropy Changes in Processes Involving Proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 6, p. 2236-2240, 1977.