

LAUREANA STELMASTCHUK BENASSI FONTOLAN

Identificação dos determinantes estruturais de Fe/MnSODs necessários à especificidade por metal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2015

LAUREANA STELMASTCHUK BENASSI FONTOLAN

Identificação dos determinantes estruturais de Fe/MnSODs necessários à especificidade por metal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Fontolan, Laureana Stelmastchuk Benassi.
Identificação dos determinantes estruturais de Fe/M nSODs
necessários à especificidade por metal / Laureana Stelmastchuk
Benassi Fontolan. – São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biologia estrutural.

Versão do título para o inglês: Identification of Fe/M nSODs structural
determinants necessary to metal specificity.

1. Superóxido dismutase 2. Análise de acoplamento estatístico 3.
Especificidade por metal 4. Trypanosoma brucei 5. Trichoderma
reesei 6. Oxidorredutase I. Ferreira Júnior, Prof. Dr. José Ribamar
dos Santos II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0179/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Laureana Stelmastchuk Benassi Fontolan.

Título da Dissertação: Identificação dos determinantes estruturais de Fe/MnSODs necessários à especificidade por metal.

Orientador(a): Prof. Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



EACH

Escola de Artes, Ciências e Humanidades
da Universidade de São Paulo

São Paulo, 14 de setembro de 2012.

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira-Júnior

Orientador do projeto de Mestrado: "SMOLBnet 2.0: Identificação dos determinantes estruturais de Fe/MnSODs necessários a especificidade por metal"

Prezado Professor,

De acordo com a Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, somente estão sujeitos à análise pelo CEUA os projetos de pesquisa ou atividade de ensino que envolvam animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata.

Dessa forma, declaro que o referido estudo não se enquadra nessas normas e, portanto, não está sujeito à análise ou aprovação por esse CEUA.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Tânia Araújo Viel
Coordenadora do CEUA EACH/USP
Escola de Artes, Ciências e Humanidades
Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Aos professores José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior e Richard Charles Garratt pela orientação.

Aos amigos Lucas Bleicher e Fernando Bacheга pela ajuda e noites de jogatina (que deveriam ser retomadas)

Ao Carioca e ao João por me ensinarem que enzimas como as SODs são Crossovers, HC com elementos de metal

À todos os companheiros de laboratório, principalmente Natália, Ana Laura, Dimitri, B2, Paola, Diego, Érika e Larissa

Ao militar por toda ajuda com EPR

Ao Juan

Ao Abraão

Ao Maxim

À Gabi e Beth

À Cora

Ao menino Guilherme

Ao financiamento CAPES/CNPq

“Overground I’ll be worse than me”

Siouxie and the Banshees

“A velha suspirou e calou-se. Sua voz rangia, soava como se todos os séculos esquecidos murmurassem, encarnados em seu peito como sombras de lembranças. O mar ecoava silenciosamente o início de uma daquelas antigas lendas que talvez tenham surgido em suas margens”.

Maximo Gorki em A velha Izerguil

RESUMO

FONTOLAN, L. S. B. **Identificação dos determinantes estruturais de Fe/MnSODs necessários à especificidade por metal.** [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Superóxido dismutases (SODs) são metaloenzimas que convertem o ânion superóxido em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A presença de metal nessas enzimas está diretamente relacionada com seus mecanismos de catálise e com suas estruturas tridimensionais. Evolucionariamente, FeSOD e MnSOD podem ter evoluído de um gene ancestral comum, porque possuem sequências homólogas e estruturas cristalográficas sobreponíveis. Entretanto, a nível catalítico, ambas as proteínas divergiram o suficiente para que seus metais não possam ser intercambiáveis, produzindo uma enzima funcional, indicando que essas proteínas possuem alta especificidade por metal. O objetivo deste projeto de pesquisa é Identificar os determinantes estruturais do ajuste fino da especificidade por metal de MnSOD e FeSOD. Inicialmente, pretende-se selecionar resíduos para mutagênese sítio-dirigida em TrMnSOD e TbFeSODB2, a partir de análise de acoplamento estatístico (SCA). Em seguida, mutantes serão construídos, expressos, purificados e cristalizados. A estrutura tridimensional dos mutantes será resolvida por cristalografia e sua atividade enzimática determinada, bem como a acomodação estrutural dos metais por Ressonância Paramagnética Eletrônica. Nossa hipótese de trabalho é que através de SCA é possível elencar resíduos de aminoácidos candidatos para mutagênese sítio-dirigida para desenhar novas SODs, com características intermediárias de ligação por Fe/Mn, como possibilidade de interconversão de especificidade, caminhando na história evolutiva dessas moléculas.

Palavras-chave: Superóxido dismutase. Análise de Acoplamento Estatístico. Especificidade por metal. *Trypanosoma brucei*. *Trichoderma reesei*.

ABSTRACT

FONTOLAN, L. S. B. **Identification of Fe/MnSODs structural determinants necessary to metal specificity.** [Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2015.

Superoxide dismutases (SODs) are metalloenzymes that convert the superoxide anion in molecular oxygen (O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2). The metal in the catalytic center of such enzymes is directly related to their catalysis mechanisms and tridimensional structures. Evolutionarily, FeSOD and MnSOD may have evolved from a common ancestor, because both proteins have homologous primary sequences and superposable crystallographic structures. However, at the catalytic level, both proteins diverged sufficiently to prevent interchange of their metallic centers, which would generate non-functional enzymes, indicating that these proteins have high metal specificity. The objective of this research project is to identify structural determinants of Fe/MnSODs necessary to metal specificity. We intend to use statistical coupling analysis (SCA) to select amino acid residues for site-directed mutagenesis in TrMnSOD e TbFeSODB2. Mutant genes will be constructed and their proteins expressed, purified and crystallized. The tridimensional structure of such mutants will be solved by X-ray crystallography and their enzymatic activities determined, as well as their electron paramagnetic resonance spectra. We hypothesize that SCA is useful to identify amino acid candidates for site-directed mutagenesis to design new SODs with intermediated Fe/Mn specificity, and even metal specificity interconversion, by studying the evolutionary history of these proteins.

Keywords: Superoxide dismutase. Statistical Coupling Analysis. Metal specificity. *Trypanosoma brucei*. *Trichoderma reesei*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.2.1 - Modelo da concentração de oxigênio no período Paleozóico em relação aos níveis atuais.....	26
Figura 1.2.2 - Frequências relativas da presença de metais em funções catalíticas das 6 classes EC e frequências de metais encontrados apenas em oxidoredutases.....	28
Figura 1.2.3 - Representatividade de ferro e manganês em relação à enzimas de diferentes classes: EC1, oxidoredutases; EC2, tranferases; EC3, hidrolases; EC4, liases; EC5, isomerases; EC6 ligases.....	30
Figura 1.2.4 - Interações de ligação entre metais e grupamentos presentes em resíduos de histidina, aspartato e glutamato.....	32
Figura 1.2.5 - Representação das duas formas tautoméricas do grupamento imidazol presente em histidinas.....	32
Figura 1.3.1 - Representação esquemática ligação entre dois átomos de oxigênio e seus derivados.....	35
Figura 1.3.2 - Representação dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial e os sítios de geração de radicais livres.....	37
Figura 1.3.3 - Representação esquemática dos intermediários entre água e oxigênio molecular.....	39
Figura 1.4.1 - Comparação entre quatro estruturas de superóxido dismutases.....	42
Figura 1.4.2 - Representação do sítio catalítico das superóxido dismutases de ferro e manganês nas formas oxidada, reduzida e com ligante.....	44
Figura 1.4.3 - Representação esquemática das reações envolvidas no mecanismo de ação das superóxido dismutases de ferro e manganês.....	45
Figura 1.4.4 - Representação esquemática do ajuste do Em em FeSODs e MnSODs ou por enzimas com metais substituídos.....	46
Figura 1.5.1 - Método de perturbação estatística para medir acoplamentos entre resíduos de proteínas.....	48
Figura 1.5.2 - Análise de acoplamento estatístico na família das Fe/MnSODs.....	49
Figura 1.6.1 - Aspectos característicos de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>T. reesei</i> e b <i>T. atroviride</i> propagando em placas.....	54

Figura 3.2.1 - Mutagênese sítio-dirigida por sobreposição e extensão, mediada por PCR.....	58
Figura 3.3.1 - Fotos das etapas de tratamento de amostras viscosas para serem aplicadas em SDS-PAGE.....	61
Figura 4.1.1 - Fragmento que compreende as posições de 1 a 96 do alinhamento de sequências de aminoácidos entre 18 SODs de ferro (Fe) e 16 de manganês (Mn).....	71
Figura 4.1.2 - Fragmento que compreende as posições de 97 a 192 do alinhamento de sequências de aminoácidos entre 18 SODs de ferro (Fe) e 16 de manganês (Mn).....	71
Figura 4.1.3 - Fragmento que compreende as posições de 193 a 286 do alinhamento de sequências de aminoácidos entre 18 SODs de ferro (Fe) e 16 de manganês (Mn).....	72
Figura 4.1.4 - Representação das posições 25, 71, 72, 145, 159 e 170 em um monômero da TbFeSODB2.....	74
Figura 4.2.1 - Padrões de migração comuns à TbFeSODB2 e os mutantes em gel poliacrilamida SDS-PAGE 15% obtidos durante os testes de expressão.....	75
Figura 4.2.2 - Padrão de eluição gerado a partir das duas injeções de material lisado e as lavagens subsequentes.....	76
Figura 4.2.3 - Padrão de eluição gerado com o gradiente de imidazol, variando de 10 a 500 mM do reagente.....	76
Figura 4.2.4 - Padrão de eluição gerado por cromatografia de exclusão por tamanho para a proteína nativa (TbFeSODB2) e seus mutantes.....	77
Figura 4.2.5 - Gel poliacrilamida 15% mostrando os padrões de migração comuns à TbFeSODB2 e os mutantes após a lise (B), sobrenadante recuperado após a centrifugação (S) e o sedimento (P). A eluição das proteínas em 100 (1), 250 (2) e 500 mM de imidazol (3). A clivagem parcial (4) e total (5) com trombina é mostrada. MM representa o marcador de massa.....	78
Figura 4.2.6 - Gel poliacrilamida 15% mostrando os padrões de migração da TbFeSODB2 e os mutantes (V25M, A71G, Q72G, A145Q, A159G e D170Q), após a purificação, clivagem e cromatografia de exclusão por tamanho.....	78
Figura 4.3.1 - Padrões de migração da TrMnSOD em gel poliacrilamida SDS-PAGE 15%..	80
Figura 4.3.2 - Gel poliacrilamida SDS-PAGE 15% mostrando os padrão de migração da TrMnSOD após a lise (B), sobrenadante recuperado após a centrifugação (S) e o sedimento (P). A eluição das proteínas em 100 (1), 250 (2) e 500 mM de imidazol (3). A clivagem parcial (A) e total (B) com Ulp1p é mostrada.....	80
Figura 4.4.1 - Atividade das enzimas selvagens de ferro (TbFeSODB2) e manganês (TrMnSOD) e dos mutantes da TbFeSODB2.....	82

Figura 4.4.2 - Verificação de atividade superóxido dismutásica em gel de poliacrilamida 10% PAGE-nativo	84
Figura 4.5.1.1 - Cristais obtidos para TbFeSODB2 na fase de rastreamento com os kits Classics II, PEGs II e Index HT.....	86
Figura 4.5.1.2 - Cristais obtidos para V25M na fase de rastreamento com os kits Classics e PEG II.....	87
Figura 4.5.1.3 - Cristais obtidos para A71G na fase de rastreamento com os kits Classics II, Classics e PEG II.....	87
Figura 4.5.1.4 - Cristais obtidos para Q72G na fase de rastreamento com o kit PEG II.....	88
Figura 4.5.1.5 - Cristais obtidos para A145Q na fase de screening com os kits Index HT.....	88
Figura 4.5.1.6 - Cristais obtidos para A159G na fase de screening com o kit PEG II.....	89
Figura 4.5.1.7 - Cristais obtidos para D170Q na fase de screening com o kit PEG II.....	89
Figura 4.5.2.1 - Cristais obtidos para TrMnSOD na fase de rastreamento com o kit Classics II.....	90
.	
Figura 4.5.2.2 - Cristais obtidos para TrMnSOD na fase de rastreamento com o kit PEGs II.....	90
.	
Figura 4.5.2.3 - Cristais obtidos para TrMnSODna fase de rastreamento com o kit PEGs II, uma comparação entre as fotos dos cristais obtidos em 2013 e os mesmos em 2015.....	91
Figura 4.6.1 - Empacotamento da proteína TrMnSOD dentro da rede monoclinica. A unidade assimétrica representada em cinza é composta por seis cadeias que compõem 1/4, 1/2 e 3/4 de tetrâmeros. Estas complementam as cadeias azuis (1/4), vermelhas (1/2) e verde (3/4), geradas por simetria.....	93
Figura 4.6.2 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da TrMnSOD e a MnSOD de <i>Aspergillus fumigatus</i> (1KKC), a qual foi usada para substituição molecular. As sequências possuem 62% de identidade entre si.....	94
Figura 4.6.3 - Distribuição dos ângulos torcionais Φ e Ψ dos resíduos da estrutura refinada da TrMnSOD no diagrama de Ramachandran.....	95
Figura 4.6.1.1 - Estrutura quaternária da TrMnSOD resolvida por substituição molecular com resolução de 1.7 Å.....	96
Figura 4.6.1.2 - Monômero da TrMnSOD com o sítio ativo em destaque.....	97
Figura 4.6.1.3 - Representação da interação entre resíduos de cadeias distintas na interface dimérica.....	98
Figura 4.6.1.4 - Importantes interações de resíduos relacionadas à formação do tetrâmero	

contornada por sua superfície.....	99
Figura 4.6.1.5 - Formação do canal de acesso ao substrato.....	100
Figura 4.6.2.1 - Sobreposição dos dímeros de duas MnSODs tetraméricas (1KKC e TrMnSOD) e da FeSOD dimérica de Trypanosoma brucei (3ESF).....	101
Figura 4.7.1 - TrMnSOD representada por dímero com os triptofanos de uma das cadeias destacados.....	103
Figura 4.7.2 - Espectros de fluorescência da TrMnSOD resultantes do monitoramento da emissão de fluorescência no intervalo de 300 a 450 nm em diferentes temperaturas.....	104
Figura 4.8.1 - Espectros de EPR-CW para a TbFeSODB2 e TrMnSOD.....	106
Figura 4.8.2 - Espectros de EPR-CW para os seis mutantes da TbFeSODB2.....	108
Figura 4.8.3 - Espectros de EPR-CW dos mutantes Q72G, A145G, A159G e D170Q apresentados na figura 4.8.2 no intervalo de 50 à 125 mT, onde uma mudança na estrutura superfina sugere a presença de manganês.....	109
Figura 4.8.4 - Espectros com a presença de manganês e ferro com a curva de absorção resultante da integração do espectro inserida no canto superior direito de cada gráfico.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.1 - Características químicas de 10 metais de transição.....	23
Tabela 1.2.1 - Estimativas para a disponibilidade de metais nas condições atmosféricas original e aeróbia e as concentrações atuais dos metais em células e nos oceanos.....	26
Tabela 1.2.2 - Diferentes características de raio iônico, números de coordenação, geometria e estados de spin para diferentes estados de oxidação de átomos de ferro (Fe) e manganês (Mn).....	29
Tabela 1.3.1 - Espécies Reativas geradas por átomos de oxigênio, cloro, bromo e nitrogênio.	34
Tabela 3.2.1 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na subclonagem do fragmento correspondente ao gene de TbFeSODB2.....	58
Tabela 3.2.2 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a mutagênese sítio dirigida com sítios de restrição incluídos (destacados em azul).....	59
Tabela 3.3.1 - Composição dos meios de cultura utilizados para propagação celular.....	60
Tabela 3.3.2 - Composição das soluções empregadas na eletroforese de proteínas.....	62
Tabela 3.4.1 - Composição dos sistemas tamponantes empregados na purificação das proteínas.....	63
Tabela 3.6.1 - Composição dos sistemas tamponantes empregados na diálise para retirada e substituição do metal.....	65
Tabela 3.7.1 - Composição das soluções empregadas no método de análise de atividade superóxido dismutásica em gel.....	65
Tabela 4.1.1 - Posições relevantes para resíduos estatisticamente acoplados para enzimas de ferro ou de manganês.....	70
Tabela 4.1.1 - Resíduos presentes no sítio catalítico e na interface dimérica das FeSODs com suas numerações para quatro organismos e para o alinhamento das figuras 4.1.1 – 4.1.3	73
Tabela 4.1.2 - Resíduos presentes no sítio catalítico e na interface dimérica das MnSODs com suas numerações para quatro organismos e para o alinhamento das figuras 4.1.1 – 4.1.3.....	73
Tabela 4.2.1 - Quantificação de proteínas produzidas em três condições, com ferro, manganês ou sem metal, após todas as etapas de purificação.....	79

Tabela 4.4.1 - Taxas de inibição das enzimas nativas de ferro e manganês e para os mutantes da TbFeSODB2 expressos com ferro ou manganês.....	83
Tabela 4.6.1 - Dados obtidos a partir da coleta de dados e processamento das imagens de difração.....	92
Tabela 4.6.2 - Dados estatísticos do refinamento do modelo da TrMnSOD.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS

- A_{600} – Densidade celular a 600 nm
- ATP – Adenosina trifosfato
- BSA – Albumina sérica bovina
- CD – Dicroísmo circular
- VC – Volumes de coluna
- DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz
- FC – Concentração final
- DTT – Ditioneitol
- DA – Dalton
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- EDTA – Ácido etileno-diamino-tetracético
- EPR – Ressonância Paramagnética Eletrônica
- EPR-CW - Ressonância Paramagnética Eletrônica – Onda Contínua
- G – Gravidade
- IPTG – Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
- KD – Constante de dissociação
- KDA – Quilodalton
- KB – Quilopares de bases
- NBT – *Nitroblue tetrazolium*
- ORF – Fase aberta de leitura
- PB – Pares de bases
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PDB – *Protein Data Bank*
- PEG – Polietilenoglicol
- PET – *Plasmid for expression by T7 RNA Polimerase*
- PH – Potencial hidrogeniônico
- PMSF - *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
- PPM – Partes por milhão
- RMSD – Raiz quadrada da média dos quadrados
- RPM – Rotações por minuto
- SDS – Sódio dodecilsulfato
- SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
- SEC – Cromatografia de exclusão molecular por tamanho

TM – Temperatura de hibridização

Tris-HCl – Solução de tris-(hidroximetil)-aminometano, com pH ajustado pela
adição de ácido clorídrico

U – Unidade

UA – Unidade assimétrica

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius

Å - Ângstrom

nm - Nanômetro

L - Litro

GHz – Giga Hertz

pH - Potencial Hidrogeniônico

kDa - Quilodalton (10^3 G/Mol)

pKa - Constantes De Dissociação Ácida.

mV - Milivolts

mW - Miliwatts

RPM - Rotações Por Minuto

mM - Milimolar

nm - Nanômetro

mT – Mili Tesla

ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) - Coeficiente De Extinção Molar

MM - Massa Molecular

pI - Ponto Isoelétrico

P(x) - Probabilidade Binomial

ΔG - Variação de energia (em unidades arbitrárias)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Metais de transição em sistemas biológicos	22
1.2 Metaloenzimas	25
1.3 Radicais livres	33
1.3.1 <i>Espécies reativas de oxigênio</i>	34
1.3.2 <i>Cadeia respiratória</i>	36
1.3.3 <i>Mecanismos de defesa antioxidante</i>	37
1.4 Superóxido Dismutases	40
1.4.1 <i>Superóxido dismutases de ferro e manganês</i>	43
1.5 Análise por Acoplamento Estatístico e evolução de proteínas	47
1.5.1 <i>SCA e evolução das SODs de ferro e manganês</i>	48
1.6 Proteínas modelo do estudo	50
1.6.1 <i>Trypanosoma brucei</i>	50
1.6.2 <i>Trichoderma reesei</i>	52
2 OBJETIVOS	56
2.1 Objetivo Geral	56
2.2 Objetivos Específicos	56
3 MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1 Análise de alinhamento por acoplamento estatístico	57
3.2 Mutagênese sítio-dirigida por PCR e clonagem dos mutantes	57
3.3 Ensaio de expressão das proteínas mutantes	60
3.4 Expressão e purificação dos mutantes	62
3.5 Expressão e purificação da TrMnSOD	64
3.6 Substituição do metal por diálise	64
3.7 Atividade de SOD	65
3.7.1 <i>Atividade em gel</i>	65
3.7.2 <i>Atividade por espectrofotometria</i>	66
3.8 Estabilidade térmica por Fluorescência para TrMnSOD	66
3.9 Cristalografia de raios-X	66
3.9.1 <i>Monodispersão das amostras</i>	66
3.9.2 <i>Ensaio de cristalização</i>	67
3.9.3 <i>Coleta das imagens de difração e processamento do dados</i>	68
3.9.4 <i>Substituição molecular, refinamento e validação estrutural</i>	68
3.10 Ressonância Paramagnética Eletrônica	68
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1 Predição das mutações por Análise de Acoplamento Estatístico	70
4.2 Expressão e purificação da TbFeSODB2 e seus mutantes	74
4.3 Expressão e purificação da TrMnSOD	79
4.4 Ensaio de atividade superóxido dismutásica	81
4.5 Ensaio de cristalização	86
4.5.1 <i>TbFeSODB2 e seus mutantes</i>	86
4.5.2 <i>Ensaio de cristalização da TrMnSOD</i>	90
4.6 Coleta de dados, processamento e substituição molecular	91
4.6.1 <i>Análise estrutural</i>	95
4.6.2 <i>Análise comparativa</i>	100
4.7 Estudo de estabilidade térmica da TrMnSOD por análise de fluorescência intrínseca	102
4.8 Características dos centros metálicos por Ressonância Paramagnética Eletrônica	105

5 CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS.....	114

1 INTRODUÇÃO

Superóxido dismutases foram descritas pela primeira vez em 1969 por Joe McCord e Irwin Fridovich (1). Ao contrário do que se acreditava a proteína de coloração azul isolada de sangue bovino, denominada hemocupreína ou eritrocupreína, não era apenas um depósito inerte de cobre, também apresentava atividade catalítica convertendo radicais superóxido em peróxido de hidrogênio. Radicais superóxido podem reagir entre si e formar peróxido de hidrogênio, porém a enzima é capaz de acelerar a reação de formação de peróxido em um fator de um bilhão (2). A hemocupreína foi então renomeada como superóxido dismutase (SOD) e novas formas dessas enzimas foram descobertas gradativamente. Um ano após o relato da hemocupreína, o mesmo grupo descreveu uma nova forma contendo manganês (MnSOD) (3) e, em 1973, outra forma contendo ferro (FeSOD) (4), ambas isoladas de *Escherichia coli*. Assim como *E. coli*, muitos organismos possuem mais de uma forma da enzima que podem fazer parte de diferentes compartimentos celulares (5). Organismos como *Trypanosoma brucei* apresentam compartimentalização dessas enzimas e apesar de não serem de todo semelhantes entre si, todas as quatro SODs de *T. brucei* são formas de ferro (6), uma delas é alvo de estudo no presente trabalho.

Diversos aspectos podem ser abordados no estudo das superóxido dismutases. Seu papel no *stress* oxidativo como mecanismo de defesa e a existência de diferentes tipos de SODs com a mesma função; as particularidades estruturais das SODs de diferentes organismos e a exploração de características de interesse biotecnológico, por exemplo, a termoestabilidade de algumas SODs como a de *Trichoderma reesei* (7), cuja estrutura tridimensional foi resolvida neste trabalho e; finalmente, a relação dessas enzimas com elementos inorgânicos, especialmente os metais de transição envolvidos em reações de óxido-redução, assunto que levanta a questão de especificidade por metal entre SODs de ferro e manganês que são muito semelhantes entre si e mantém atividade especificamente com apenas um desses metais.

Primeiramente, algumas características dos metais de transição e a sua relação com sistemas biológicos serão apresentadas, em seguida, as possibilidades de interação entre metais e proteínas em metaloproteínas. Além de explorar as características estruturais e catalíticas das superóxido dismutases, serão contextualizadas, também, como elementos intrinsecamente relacionados aos tópicos de radicais livres e *stress* oxidativo, participando da regulação de espécies radicalares intracelulares geradas em condições fisiológicas e patológicas.

Existe um vasto conteúdo sobre superóxido dismutases na literatura, sequências gênicas e estruturas protéicas depositadas em bases de dados como PFAM (8) e PDB (9), isso faz dessas

proteínas alvos interessantes para estudos de bioinformática. A correlação entre os resíduos das superóxido dismutases de ferro e manganês feita por acoplamento estatístico, resultou na predição de resíduos envolvidos na especificidade por metal e oligomerização (10). Essa predição foi testada neste trabalho para avaliação da afinidade por metal da superóxido dismutase de *T. brucei*.

1.1 Metais de transição em sistemas biológicos

O contexto biológico no qual um metal de transição é escolhido em relação a outro para desempenhar uma função depende de características químicas do elemento e de sua disponibilidade. Ainda que sejam menos abundantes que outros átomos em sistemas biológicos, são indispensáveis para diversas funções, principalmente em proteínas. Quatro elementos correspondem a 99% de composição de um organismo como o humano, sendo eles átomos de hidrogênio (62,8%), oxigênio (25,4%), carbono (9,4%) e nitrogênio (1,4%) (11). Contudo, a pequena parcela de 1% atribuída a outros elementos como os metais de transição não condiz com a importância das atividades nas quais estão envolvidos.

Metais de transição são organizados na tabela periódica entre os grupos 3 e 12, totalizando 40 elementos, porém apenas os de importante participação em reações de óxido-redução ou presentes no sistema estudado (superóxido dismutases), serão apresentados em detalhes.

Nestes átomos, os elétrons de maior energia estão em orbitais d, sendo que a maioria deles possui orbitais parcialmente preenchidos. Cada átomo apresenta distribuição eletrônica distinta de acordo com o estado de oxidação, o que atribuirá ao elemento diferentes características: o manganês na forma Mn^{2+} possui cinco elétrons nos orbitais d ($3d^5$) e é mais facilmente oxidado quando comparado ao Fe^{2+} que possui seis elétrons nos orbitais d ($3d^6$). Isso ocorre porque o manganês (Mn^{2+}) consegue acomodar um quinto elétron em um orbital d vago, enquanto o ferro (Fe^{2+}) deve acomodar um sexto elétron e não possui orbitais vagos. Este elétron é acomodado em um orbital já ocupado e dessa forma é mais passível de ser oxidado e mais estável como Fe^{3+} (12).

Os metais de transição do período 4 formam cátions estáveis de carga +2 e +3, porém muitos outros estados são possíveis com a mudança de apenas um elétron, esta variação e outras características químicas de alguns desses elementos podem ser comparadas na tabela 1.1.1.

Tabela 1.1.1 – Características químicas de 10 metais de transição (vanádio, cromo, molibdênio, tungstênio, manganês, ferro, cobalto, níquel, cobre e zinco).

Grupo	5	6	6	6	7	8	9	10	11	12
Elemento	V	Cr	Mo	W	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn
Número atômico (Z)	23	24	42	74	25	26	27	28	29	30
Distribuição eletrônica	4s ² 3d ³	4s ¹ 3d ⁵	5s ¹ 4d ⁵	6s ² 5d ⁴ 4f ¹	4s ² 3d ⁵	4s ² 3d ⁶	4s ² 3d ⁷	4s ² 3d ⁸	4s ¹ 3d ¹⁰	4s ² 3d ¹⁰
Eletronegatividade	1,63	1,66	2,16	1,7	1,55	1,83	1,88	1,91	1,9	1,65
Raio metálico (pm)	134	128	139	139	127	126	125	124	128	134
Estados de oxidação possíveis		I	I	I					I	
	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II
	III	III	III	III	III	III	III	III	III	
	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV		
	V	V	V	V	V	V	V			
		VI	VI	VI	VI	VI				
					VI					

Além da distinção desses átomos pela distribuição eletrônica nos orbitais d, diferentes características magnéticas são atribuídas ao *spin*. O número quântico de *spin* (*ms*) está relacionado ao momento angular do elétron que, por possuir carga, resulta em um campo magnético associado. No caso de um átomo possuir todos os elétrons com *spins* pareados é chamado de diamagnéticos e não sofre influência de um campo magnético. No caso de um átomo possuir elétrons com *spins* desemparelhados pode ser chamado de paramagnéticos ou ferromagnético se seus elétrons alinharem-se com o campo de forma transitória ou permanente, respectivamente.

É dito desemparelhado o elétron que ocupa um orbital atômico ou molecular sem estar pareado com outro elétron (13). A possibilidade de possuírem elétrons desemparelhados de forma estável, com a variação de apenas um elétron, permite que os metais de transição possuam muitos estados de ionização possíveis e que sejam considerados paramagnéticos. Esses elétrons encontram-se nos orbitais d, portanto fazem parte do bloco d da tabela periódica. A maioria dos elementos do grupo p, por exemplo, não possui espécies estáveis com elétrons desemparelhados e são considerados diamagnéticos.

Metais podem estabelecer ligações coordenadas estáveis com diversos ligantes orgânicos fazendo parte de dada função biológica ou participando de interações não fisiológicas que causam toxicidade. Existem diversos mecanismos responsáveis por regular as concentrações de metais envolvendo principalmente a captação, distribuição, compartimentalização e armazenamento. Em

condições homeostáticas, átomos de vanádio, cromo, molibdênio, tungstênio, manganês, ferro, cobalto, níquel e cobre participam de diversas funções biológicas e alguns podem ser considerados nutrientes essenciais para humanos.

A interação entre metal e ligante pode ser descrita como uma interação ácido-base de Lewis, atuando como ácidos os metais tendem a aceitar pares de elétrons disponíveis. Essa analogia pode ser estendida para os conceitos de orbital molecular mais alto ocupado (HOMO, do inglês, '*Highest Occupied Molecular Orbital*'), em relação ao doador de elétrons e orbital molecular mais baixo desocupado (LUMO, do inglês, '*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*'), em relação ao receptor de elétrons. Se ambos, doador e receptor, possuírem energias semelhantes a transferência de elétrons resulta em ligação covalente (interação entre ácidos e bases fracas), enquanto que se a diferença for grande resulta em interação eletrostática (interação entre ácidos e bases fortes) (14).

Esses sistemas também podem ser descritos pelo potencial de redução (E°), uma quantidade que determina a viabilidade e a direção da reação tendo como referência eletrodo de hidrogênio padrão (*NHE*, do inglês, '*Normal Hydrogen Electrode*') (13). Um sistema com valor negativo de E° reduzirá outros sistemas com valores maiores e inversamente, um sistema com valor positivo de E° irá oxidar sistemas de menor valor positivo, zero, ou negativo. Quando analisados em solução com controle de pH, convencionou-se denominar os sistemas que estão sob um valor de pH 7,0 por E° . Potenciais de redução são usados para descrever reações de transferências de elétrons e oxido-redução, empregados em sistemas que possuem metais, radicais livres, entre outros de grande importância biológica.

Dependendo do número de átomos do ligante que interagem com o metal, estes podem ser classificados como mono, bi, tri ou polidentados se um, dois, três ou mais átomos estão envolvidos. Ligantes polidentados normalmente formam complexos mais estáveis e são considerados agentes quelantes. As estruturas formadas a partir dessas interações obedecem uma geometria de coordenação que corresponde aos arranjos de menor energia para n pares de elétrons ao redor do átomo metálico central (número de coordenação). Em geral a estabilidade formada por metais de transição divalentes do 4º período com ligantes aumenta conforme e o raio do íon diminui, seguindo uma ordem que ficou conhecida como a série de Irwin-Williams (15):

Estabilidade do complexo	Mn ⁺²	<	Fe ²⁺	<	Co ⁺²	<	Ni ⁺²	<	Cu ⁺²	<	Zn ⁺²
Raio iônico (pm)	83		78		74,5		69		73		74

A formação de íons estáveis com a variação de apenas um elétron possibilita a participação desses metais em diversas reações biológicas como as que necessitem de múltiplas transferências de

elétrons em reações de óxido-redução e ativação de reagentes por aumentar a eletrofilicidade ou nucleofilicidade das espécies (16).

1.2 Metaloenzimas

Diversas enzimas dependem de um cofator metálico para desempenhar a sua função, essa associação promove a estabilidade estrutural do complexo e frequentemente o metal tem participação direta em catálises enzimáticas. Como centro redox, ao tomar parte direta na reação, o metal pode receber ou doar elétrons com a alteração concomitante do seu número de oxidação. Quando o metal não participa da catálise como centro redox pode estar envolvido na ativação de algumas espécies tornando-as mais reativas ou na estabilização eletrostática de espécies intermediárias e estados de transição (16). Metaloenzimas são capazes de catalisar diversas reações e são encontradas desempenhando o papel de dismutases, oxidases e oxigenases, nitrogenases e hidrogenases, oxotransferases, hidrolases, entre outras. Algumas ainda podem participar do armazenamento de metais (17).

Associadas aos metais algumas proteínas (holoenzimas) ancestrais se tornaram mais reativas em comparação às formas desprovidas dos mesmos (apoenzimas) e o seu emprego tornou-se obrigatório, uma vez que normalmente as apoenzimas tem a sua função prejudicada (18). Comoceptor de elétrons o metal atua como ácido de Lewis e atribui ao complexo a capacidade de formar ligações com átomos ou moléculas negativamente carregadas por meio dos elétrons presentes nos orbitais d. As interações ocorrem de acordo com as características químicas de cada metal e com o microambiente do sítio de ligação provido pela enzima (19).

A história evolutiva destas proteínas está associada às características químicas dos metais como o raio atômico, solubilidade, número de coordenação, polarizabilidade, bem como à disponibilidade ambiental que por sua vez é influenciada pelas características oxidantes ou redutoras da atmosfera, dado que a solubilidade desses compostos depende do seu estado de oxidação. A variação da concentração de oxigênio no decorrer de eras geológicas (Figura 1.2.1), sugere que em alguns períodos a biosfera adaptou-se a condições atmosféricas predominantemente redutoras ou oxidantes. Acompanhando as novas condições ambientais de cada período, algumas formas de vida foram beneficiadas enquanto outras extintas. Essa adaptação teria imposto a permanência ou estimulado o surgimento de características metabólicas específicas impulsionando a formação de novas enzimas ou o recrutamento de proteínas já existentes para novas funções (20).

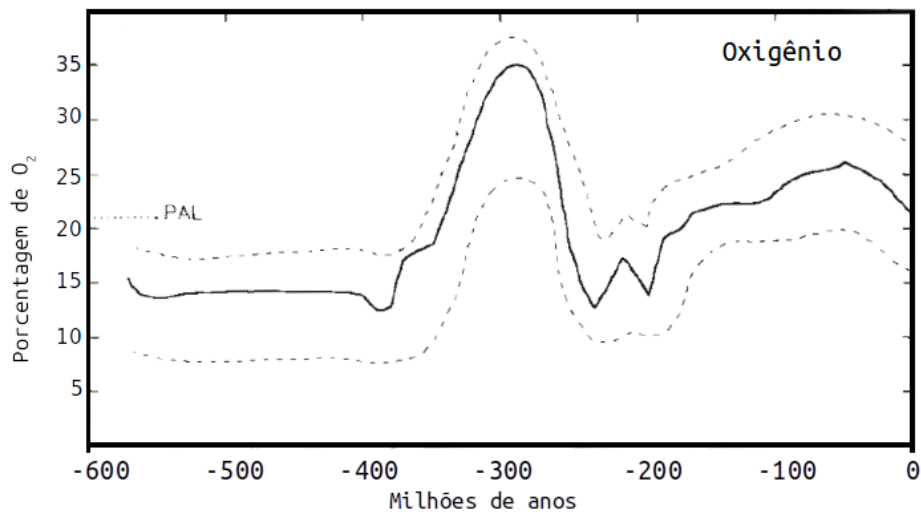


Figura 1.2.1 – Modelo da concentração de oxigênio no período Paleozóico em relação aos níveis atuais (PAL), mostrando uma estimativa (linha) e a variação (pontilhado). O modelo foi construído a partir da taxa de troca de carbono fixado entre a atmosfera, oceano e sedimentos e outros dados publicados. Adaptado de (21).

O estado de oxidação da superfície terrestre aumentou gradativamente devido à produção de oxigênio via fotossíntese, sendo esta a principal contribuição para o aumento da concentração do gás na atmosfera (2,22). Uma das principais evidências geológicas da oxigenação atmosférica são os depósitos de óxidos de ferro datados entre 2,6 e 1,8 bilhões de anos atrás (2,22). Os óxidos possuem características químicas diferentes dos primeiros compostos, a formação dos óxidos ou hidróxidos os converteu em compostos insolúveis e pouco disponíveis, como os de ferro $\text{Fe}(\text{OH})_3$, ou em óxidos solúveis e disponíveis, como os de cobre na forma de Cu^{+2} (Tabela 1.2.1) (23,24).

Tabela 1.2.1 – Estimativas para a disponibilidade de metais nas condições atmosféricas original e aeróbia e as concentrações atuais dos metais em células e nos oceanos. Adaptado de (16,24).

Íon metálico	Condições originais (M)	Condições aeróbias (M)	Concentração nos oceanos (M)	Concentração nas células (M)
Mo	$<10^{-10}$	$<10^{-8}$	10^{-7}	10^{-6}
Mn^{2+}	$\sim 10^{-6}$	$\sim 10^{-8}$	10^{-9}	10^{-7}
Fe	$\sim 10^{-7}$ (Fe^{+2})	$\sim 10^{-19}$ (Fe^{+3})	10^{-17}	10^{-7}
Co^{2+}	$<10^{-9}$	$\sim 10^{-9}$	10^{-11}	10^{-8}
Cu	$<10^{-20}$ (Cu^{+1})	$<10^{-10}$ (Cu^{+2})	10^{-9}	10^{-15}
Zn^{2+}	$<10^{-12}$	$<10^{-8}$	10^{-8}	10^{-11}

Essas restrições ambientais em relação ao emprego de metais ditaram a evolução das metaloproteínas (25). Enzimas que possuem metais como centro redox são designadas oxidoredutases e grande parte delas possui metais envolvidos diretamente na catálise (19).

Acredita-se que o surgimento da vida esteve intrinsecamente relacionado com reações de transferência de elétrons. Quando desempenhadas por oxidorreduções, essas reações de transferência de elétrons teriam sido aceleradas, aumentando a eficiência do processo e tornando-se indispensáveis posteriormente para a respiração e fotossíntese. Formas primitivas de enzimas oxidorreduções tiveram grande influência sobre os ciclos biogeoquímicos que levaram ao surgimento de diversas formas de vida (19).

Existem diversas formas de classificar enzimas. Uma delas faz uso de um número de catalogação conhecido por código EC (do inglês, '*Enzyme Commission number*'), que as divide em seis classes de acordo com a reação catalisada: Oxidorreduções (1), Transferases (2), Hidrolases (3), Liases (4), Isomerases (5) e Ligases (6) (26). A classe das oxidorreduções que recebe o número 1 ainda é subdividida em relação ao átomo ou molécula que toma parte na reação como aceptor ou doador de elétrons. O número 1.15, por exemplo, refere-se a oxidorreduções que têm como aceptor de elétrons o radical superóxido e os números 1.15.1.1 e 1.15.1.2 referem-se às enzimas superóxido dismutase e superóxido redutase, respectivamente.

Os ligantes mais comuns para metais de transição em proteínas são os grupos prostéticos e cofatores, pequenos íons e moléculas, bases nitrogenadas, grupos fosfato e diol presentes em ácidos nucleicos e cadeias laterais de aminoácidos (25). Um levantamento feito em 2008 (16) mostrou que dos 1371 códigos EC de enzimas com estruturas conhecidas, 558 (40%) eram de enzimas dependentes de metais, variando de 36% em liases e isomerases, até 59% em ligases, sendo que a classe das oxidorreduções é a que possui a maior quantidade de enzimas dependentes de metais de transição, como pode ser deduzido da Figura 1.2.2 A. O ferro é o metal encontrado mais frequentemente em oxidorreduções, contudo outros metais também são encontrados nestas enzimas na seguinte ordem de representatividade: Fe > Cu > Mn > Ni > Mo > V > W (Figura 1.2.2 B).

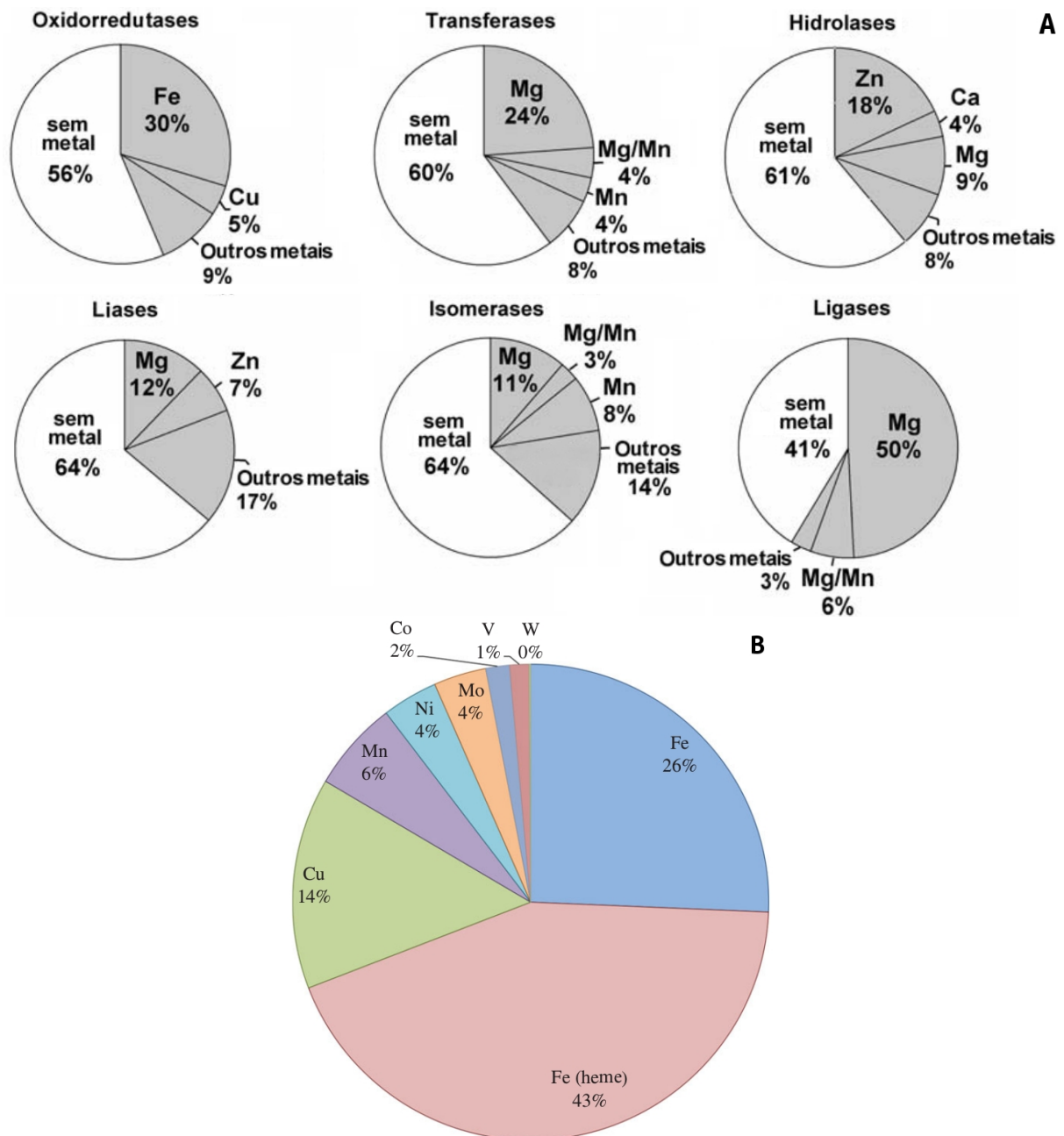


Figura 1.2.2 – A) Frequências relativas da presença de metais em funções catalíticas das 6 classes EC. Cada gráfico representa uma classe com estruturas conhecidas: 310 estruturas para oxidoreductases, 365 para transferases, 432 para hidrolases, 130 para liases, 71 para isomerases e 63 para ligases. B) Frequências de metais encontrados apenas em oxidoreductases. Adaptado de (14,12).

Em relação apenas às oxidoreductases que possuem ferro, representadas na figura acima, cerca de 65% delas têm o átomo metálico ligado a um grupo prostético chamado heme e os outros 35% compreendem ferro ligado a átomos de enxofre (S), nitrogênio (N) e oxigênio (O) presentes nas cadeias laterais de aminoácidos da própria proteína. Quando esses átomos se encontram protonados, o metal compete com o hidrogênio pela ligação e apenas o substituirá se possuir

características favoráveis que estabilizem o complexo. Dentre essas características, o preenchimento dos orbitais d dos metais de transição que correspondem a determinados estados de *spin*, número de oxidação e raio iônico, determinam quais as possibilidades de interação com ligantes no que diz respeito ao número e geometria de coordenação. Por exemplo, para cada estado de oxidação do ferro Fe^{+2} (d^6), Fe^{+3} (d^5) e Fe^{+4} (d^4), alguns números de coordenação são mais comuns e terão estados de *spin* e geometria relacionados, o mesmo se aplica para o manganês como apresentado na tabela 1.2.2.

Tabela 1.2.2 – Diferentes características de raio iônico, números de coordenação, geometria e estados de *spin* para diferentes estados de oxidação de átomos de ferro (Fe) e manganês (Mn). *Notações de simetria são usadas para designar as geometrias normalmente observadas: O_h , octaédrica; T_d , tetraédrica; C_{4v} , pirâmide quadrada; D_{3h} , bipirâmide trigonal; e D_{4h} plana quadrada. Adaptado de (17)

	Estados de oxidação	d^n	Raio iônico (Å)	Números de coordenação	Geometria *	Estados de <i>spin</i>
Ferro (Fe)	+2	d^6	0,63	4	T_d	2
			0,64		D_{4h}	
				0,61	5	
			0,78			
	+3	d^5	0,49	4	O_h	0
			0,58		5	T_d
				0,55		6
			0,65		O_h	
	+4	d^4	0,59	6	O_h	1/2
	Manganês (Mn)	+2	d^5	0,66	4	O_h
0,75				5		T_d
					0,67	6
0,83				O_h		
+3		d^4	0,58	5	C_{4v}	2
			0,58		6	D_{3h}
				0,65		6
			0,39		4	
0,53		6		T_d		
					O_h	

Além da competição com átomos de hidrogênio nas formas protonadas das cadeias laterais de aminoácidos, os metais podem competir entre si em relação a determinados sítios proteicos. Íons divalentes como os de ferro (Fe^{2+}) e manganês (Mn^{2+}) possuem similar preferência de coordenação e afinidade por ligantes, tornando mais difícil o discernimento entre um cofator ou outro quando

uma proteína tem acesso a dois metais com características similares (27). A escolha está normalmente relacionada ao contexto biológico, sendo relevante a localização da enzima e o acesso ao cofator, bem como a necessidade celular da atividade desempenhada pela enzima que pode variar de acordo com o metabolismo celular e condições de *stress*. Enquanto o ferro é prevalente em metaloenzimas da classe das oxidorreduções (EC1), o manganês encontra-se melhor distribuído entre outras classes de enzimas. Assim como alguns outros íons divalentes (magnésio, cálcio e zinco), o manganês pode conferir estabilidade eletrostática à estrutura e também fazer parte de reações redox como o ferro, cobre, cobalto e molibdênio (16) (Figura 1.2.3).

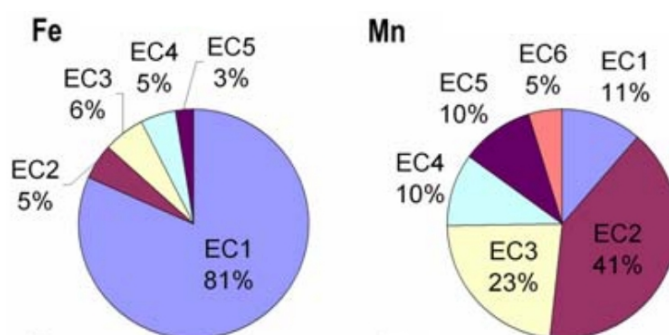


Figura 1.2.3 – Representatividade de ferro e manganês em relação à enzimas de diferentes classes: EC1, oxidorreduções; EC2, transferases; EC3, hidrolases; EC4, liases; EC5, isomerases; EC6 ligases. Adaptado de (16).

O acesso ao cofator na célula pode estar restrito espacialmente por compartimentalização e o emprego de um metal ocorre por ser mais acessível do que outros no ambiente em que a proteína é expressa (18). Adicionalmente, o ajuste da atividade enzimática está relacionada às propriedades redox do metal, sendo estas possivelmente as principais determinantes de especificidade. Apesar de similares, ferro e manganês possuem características redox distintas: os pares $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ e $\text{Mn}^{3+}/\text{Mn}^{2+}$ hexaidratados, possuem potenciais médios de redução (E_m) de 770 e 1510 mV (vs. NHE), respectivamente (12,18). É importante destacar que, em um contexto celular, o cofator usado pela enzima não necessariamente é aquele que contribui para maior atividade enzimática e sim aquele que condiz com as necessidades da célula. A estrutura protéica é possivelmente estabilizada ao estabelecer geometria adequada de coordenação do metal e portanto esses cofatores influenciam diretamente o enovelamento das metaloproteínas. Consequentemente o conteúdo de estruturas secundárias também é afetado pela presença desses cofatores e alguns enovelamentos podem ser encontrados mais frequentemente ao redor do sítio de interação com metal em oxidorreduções (19).

Tanto os ligantes que interagem diretamente com o metal quanto os átomos ou moléculas que se encontram na vizinhança podem articular essa interação em relação aos mecanismos de catálise, sendo que normalmente é a segunda esfera de coordenação do metal que está envolvida no

ajuste fino do metal no sítio (27). Quando os ligantes são as cadeias laterais de aminoácidos a interação dá-se por grupamentos tiol, tioéter, fenil, alcoxil, carbonil, carboxil e imidazol (17). A coordenação do metal está frequentemente associada a múltiplos grupamentos imidazol de histidinas e carboxil de resíduos negativamente carregados, como glutamato e aspartato. A interação dá-se principalmente entre os orbitais σ e π do ligante. Para os grupamentos imidazol presentes em histidinas os orbitais π_1 , π_2 estão possivelmente envolvidos em interações, porém o mais relevante é o σ . Carboxilatos podem ligar metais de maneira bidentada ou monodentada, esta última apresenta dois arranjos possíveis *syn* e *anti* em relação aos pares de elétrons disponíveis. Os orbitais σ $3b_1$ e $4a_1$ interagem preferencialmente com o metal, porém o orbital π $1b_2$ também pode estabelecer interações (17). As interações possíveis entre ligantes e os resíduos histidina, aspartato e glutamato estão representados na figura 1.2.4. Grupamentos imidazol atuam como eletrófilos e a sua interação com nucleófilos pode ser descrita de acordo com forma tautomérica: na forma ND1-protonada pode coordenar metais por NE2 (nitrogênio distal), já na forma NE2-protonada pode coordenar por ND1 (nitrogênio proximal) (28) (Figura 1.2.5).

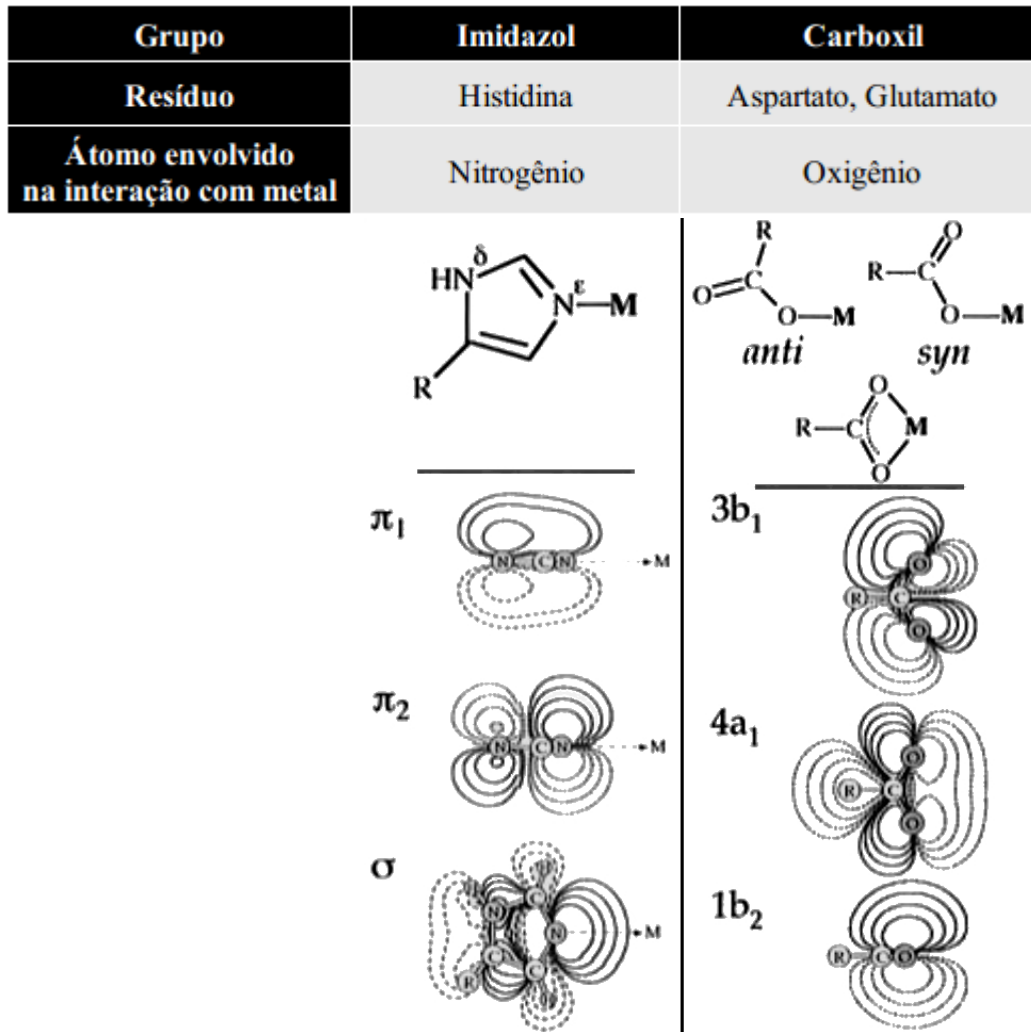


Figura 1.2.4 – Interações de ligação entre metais e grupamentos presentes em resíduos de histidina, aspartato e glutamato. Acima, as orientações angulares típicas e abaixo, os orbitais envolvidos na ligação em organizados em ordem de aumento da energia. Adaptado de (17).

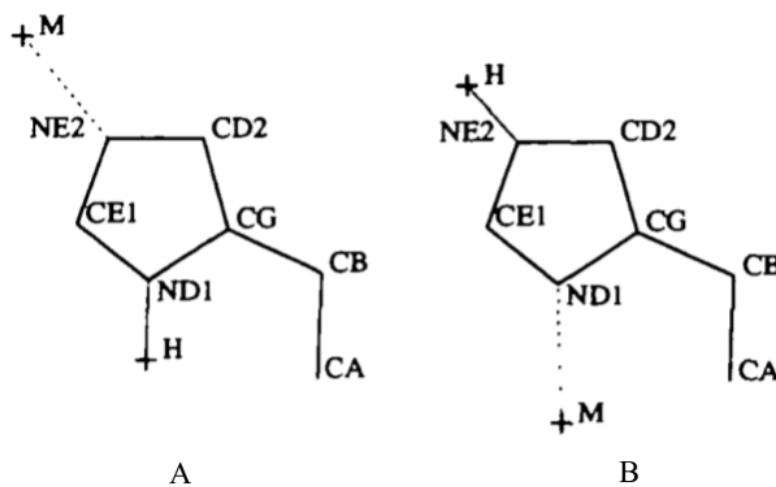


Figura 1.2.5 – Representação das duas formas tautoméricas do grupamento imidazol presente em histidinas. A) A forma ND1-protonada pode coordenar metais por NE2 (nitrogênio distal). B) A forma NE2-protonada pode coordenar por ND1 (nitrogênio proximal). Adaptado de (28).

Enquanto em algumas metaloenzimas a coordenação do metal dá-se principalmente pela interação de grupamentos imidazol e carboxil, noutras estão presentes grupos prostéticos ou núcleos de ferro e enxofre. Superóxido dismutases fazem parte do primeiro grupo e catalizam a eliminação de radicais superóxido, gerando peróxido de hidrogênio. Metais associados a grupos prostéticos, como o heme, são muito comuns e participam tanto do armazenamento e transporte de ferro e oxigênio, quanto de reações de transferência de elétrons, como o Citocromo C e Catalase.

Diversas metaloenzimas estão envolvidas no metabolismo de radicais livres em sistemas biológicos. O Citocromo C é um componente da cadeia respiratória mitocondrial, fazendo parte de um importante mecanismo de geração de energia, já a catalase reage formando água e oxigênio molecular a partir do peróxido de hidrogênio. Frente a geração celular de radicais livres, as SODs e catalase devem atuar simultaneamente para que não haja acúmulo de radical superóxido ou peróxido de hidrogênio (2).

Enzimas com núcleos de ferro e enxofre também desempenham reações de transferência de elétrons (17), esse tipo de estrutura está presente em importantes enzimas da biossíntese de aminoácidos (Di-hidroxiácido desidratase) e do ciclo de Krebs (aconitase e fumarases) de *E. coli*. Quando a retirada do radical superóxido não é eficiente, esses núcleos de ferro e enxofre podem ser oxidados, liberando os átomos de ferro e inativando as enzimas (13).

1.3 Radicais livres

Radical livre é definido como qualquer espécie que contenha um ou mais elétrons desemparelhados capaz de existir independentemente (13). É indicado por um ponto sobrescrito após a fórmula química: o radical hidroxil, por exemplo, possui elétrons desemparelhados no oxigênio e pode ser representado por OH[·].

Também são referidos na literatura como 'Espécie reativa' seguido do nome átomo de origem: Espécies Reativas de Oxigênio (ERO ou do inglês ROS para '*Reactive Oxygen Species*'). Os principais radicais livres são provenientes de átomos de oxigênio, cloro, bromo e nitrogênio, os mesmos encontram-se listados na tabela 1.3.1.

Tabela 1.3.1 – Espécies Reativas geradas por átomos de oxigênio, cloro, bromo e nitrogênio.

Espécies Reativas de Oxigênio (ERO/ROS)	Superóxido $O_2^{\cdot -}$
	Hidroxil OH^{\cdot}
	Hidroperoxil OH_2^{\cdot}
	Carbonato $CO_3^{\cdot -}$
	Peroxil RO_2^{\cdot}
	Alcoxil RO^{\cdot}
	Oxigênio singlete $O_2\ ^1\Sigma_g^+$
Espécies Reativas de Cloro (ERC/RCS)	Cloro atômico Cl^{\cdot}
Espécies Reativas de Bromo (ERB/RBS)	Bromo atômico Br^{\cdot}
Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN/RNS)	Óxido nítrico NO^{\cdot}
	Dióxido de Nitrogênio NO_2^{\cdot}
	Nitrato NO_3^{\cdot}

1.3.1 Espécies reativas de oxigênio

O oxigênio molecular possui dois elétrons desemparelhados no orbital π^* , porém não segue a notação usual para radicais livres. Esses elétrons possuem o mesmo número quântico de *spin* (*ms*), sendo estes considerados *spins* paralelos. Ao oxidar outro átomo ou molécula aceitando um par de elétrons, estes devem possuir o mesmo *spin* para que entrem nos orbitais π^* do oxigênio. Devido a essa restrição o oxigênio normalmente recebe elétrons um elétron por vez, dificilmente reagindo com espécies não radicalares. Espécies reativas não possuem a mesma restrição e interagem com outras moléculas provocando uma reação em cadeia caracterizada por três etapas: iniciação, na qual um radical reage com um átomo ou molécula não radicalar modificando-a de forma a se tornar um radical; propagação, na qual o novo radical formado pode adquirir habilidade igual ou maior em atacar outras moléculas quando comparada à espécie que a atacou inicialmente e; terminação, na qual um radical reage com outro, formando uma espécie não radicalar ou quando o radical formado na fase de propagação não é muito reativo.

A adição de apenas um elétron a um dos orbitais π^* do oxigênio molecular leva à formação do radical superóxido. O próximo elétron adicionado forma o íon peróxido, uma espécie não radicalar (Figura 1.3.1). Quando excitada a molécula de oxigênio, $O_2\ (^3\Sigma_g^-)$, pode chegar ao primeiro estado excitado, $O_2\ (^1\Delta_g)$, ou ao segundo estado $O_2\ (^1\Sigma_g^+)$ (29). Essas formas conhecidas por oxigênio singlete também não são espécies radicalares, porém possuem maior capacidade oxidante que o oxigênio molecular (triplete), por não possuírem a restrição de *spin*. A redução do O_2

em dois elétrons resulta em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) enquanto a redução em quatro elétrons gera água (H_2O), de acordo com a disponibilidade de prótons.

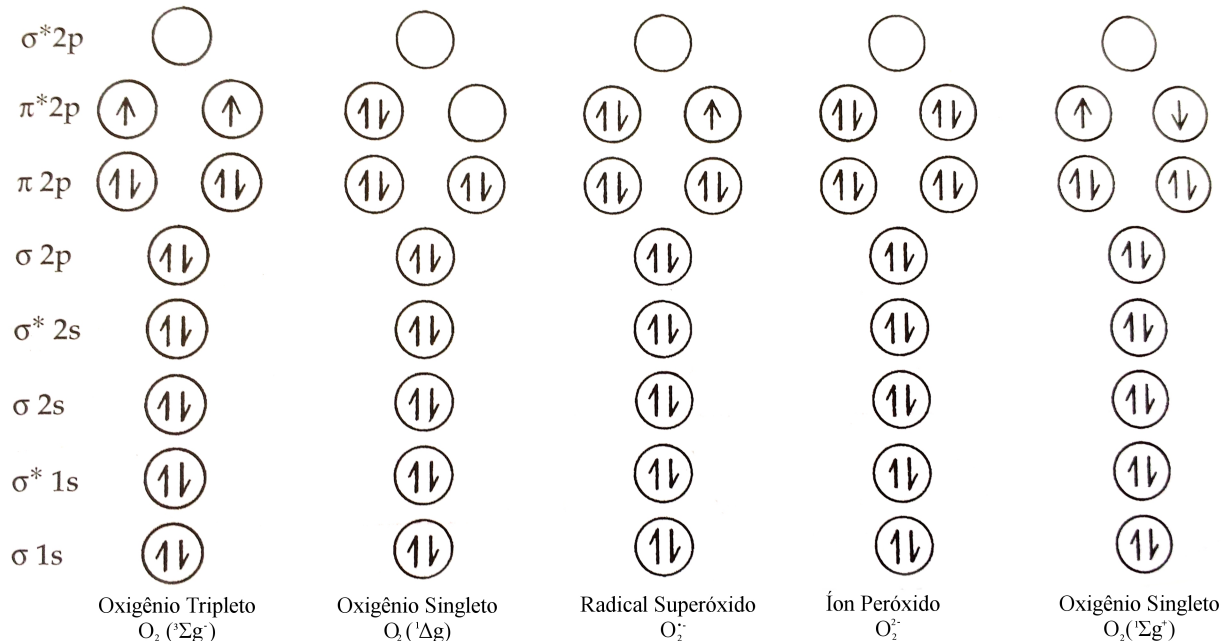


Figura 1.3.1 – Representação esquemática ligação entre dois átomos de oxigênio e seus derivados: Oxigênio molecular ($^3\Sigma_g^- \text{O}_2$), Oxigênio singlete ($^1\Delta_g \text{O}_2$), Superóxido (O_2^-), Íon Peróxido (O_2^{2-}) e Oxigênio singlete ($^1\Sigma_g^+ \text{O}_2$). Adaptado de (2).

Atualmente muito é conhecido sobre a dependência de oxigênio pelo metabolismo aeróbio e os efeitos colaterais desencadeados a longo prazo. Durante desenvolvimento deste conhecimento, a relação entre necessidade e prejuízo que permeava o assunto ficou conhecida como o 'Paradoxo do Oxigênio' (11).

Os danos causados por exposição a alta pressão de O_2 estão relacionadas à inativação de biomoléculas por espécies radiculares provenientes desse oxigênio molecular. Uma das principais descrições sobre os efeitos da exposição ao oxigênio foi feita em 1954 por Rebecca Gershmman e Daniel L. Gilbert, na qual os danos provocados foram comparados aos causados por radiação ionizante (30). Espécies reativas tem a capacidade de modificar biomoléculas como proteínas, carboidratos e lipídeos que podem ser recuperadas ou eliminadas e produzidas novamente pelo organismo sem grandes prejuízos se a reação não for extensiva, como nos casos de alta exposição à radiação. A modificação do DNA porém pode ter consequências mais significantes. A alteração dessa molécula pode levar à inativação de genes ou à produção de proteínas truncadas, incapazes de desempenhar a função original; se o sistema de reparo do DNA não for suficiente para corrigir um erro que compromete o desempenho de funções importantes, a célula como um todo estará comprometida. Desta forma, a vantagem do uso de oxigênio deve compensar o risco relacionado à

geração de espécies reativas de oxigênio.

1.3.2 Cadeia respiratória

Na fase aeróbia do catabolismo, denominada respiração, o piruvato produzido na glicólise é oxidado à água (H_2O) e dióxido de carbono (CO_2), diferente do processo de fermentação no qual o piruvato seria reduzido à lactato ou etanol, por exemplo. A reação na qual o piruvato é reduzido à CO_2 e acetil-CoA gera NADH e FADH_2 que por sua vez transferirão elétrons para oxigênio molecular (O_2). A redução do O_2 à H_2O em eucariotos ocorre na mitocôndria e denomina-se fosforilação oxidativa.

Assim como bactérias gram-negativas, as mitocôndrias possuem duas membranas. A membrana externa possui porinas e é caracterizada por ser mais permeável, enquanto a membrana interna possui transportadores específicos e é impermeável a íons pequenos, incluindo prótons (H^+). Esta membrana interna carrega os componentes da cadeia respiratória (31).

A cadeia respiratória mitocondrial consiste no conjunto de complexos transportadores de elétrons, a Coenzima Q e a ATP sintase. Os elétrons provenientes de NADH e FADH_2 são carreados de maneira sequencial pelos Complexos I, II, III e IV presentes na membrana interna da mitocôndria. Este fluxo de elétrons está associado ao bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranar e o retorno desses prótons pelo poro da ATP sintase acaba por ativar a síntese de ATP (32). Nesta etapa, fica evidente a vantagem energética resultante do emprego de oxigênio: sob condições aeróbias, a completa oxidação da glicose rende de 30 a 32 moléculas de adenosina trifosfato (ATP), enquanto a fermentação produz apenas duas (33).

Partindo de um carreador de menor potencial de redução (E°) para um de maior potencial, os elétrons são transportados por complexos supramoleculares na seguinte ordem: Complexo I – NADH \rightarrow Ubiquinona (Coenzima Q), Complexo II – Succinato \rightarrow Ubiquinona, Complexo III – Ubiquinona \rightarrow Citocromo c, Complexo IV – Citocromo c \rightarrow O_2 (Figura 1.3.2).

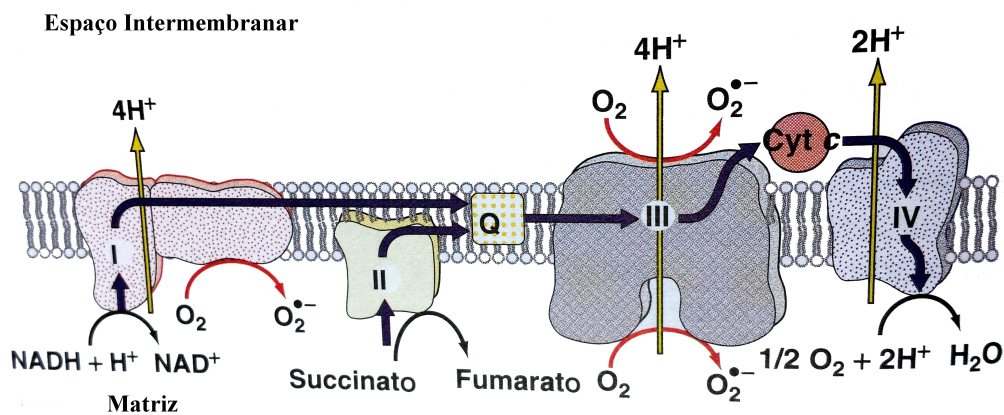


Figura 1.3.2 – Representação dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial e os sítios de geração de radicais livres. As setas representam o fluxo de elétrons pelos complexos, sendo os maiores sítios de escape de elétrons e consequente formação de radicais como o superóxido são os complexos I e III. Adaptado de (34).

Apesar do seu papel na síntese de ATP, a mitocôndria tem importante participação na geração de radicais livres. O extravazamento de elétrons da cadeia respiratória localizada na membrana interna da mitocôndria é a principal fonte de geração de radicais livres nesta organela. O radical superóxido pode ser gerado durante a passagem de elétrons dos Complexos I e II (35) para a Ubiquinona, quando a forma radicalar desta ($\text{CoQ}^{\cdot -}$) pode reduzir O_2 . A semiquinona, forma intermediária da Ubiquinona, é capaz de doar elétrons para o O_2 , como esse intermediário é formado no Complexo III, este também pode ser considerado um ponto de geração de radical superóxido.

Cerca de 0,1% a 4% do O_2 utilizado na respiração é convertido para superóxido. Em *Escherichia coli*, 0,1% do seu consumo de O_2 resultaria no acúmulo de superóxido em $5 \mu\text{M/s}$, contudo a concentração se mantém em aproximadamente $1 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ – manutenção em parte atribuída à enzimas que catalisam a transmutação deste radical à peróxido de hidrogênio, as Superóxido Dismutases (8).

1.3.3 Mecanismos de defesa antioxidante

Os mecanismos de defesa antioxidante exploram a fase de terminação das reações em cadeia provocadas por espécies reativas, normalmente provocando a formação de um radical não é muito reativo na fase de propagação. Os mecanismos utilizados na diminuição da exposição ao oxigênio e controle podem ser divididas em: evasão, prevenção, contenção, redução de danos e resposta ao stress (33).

- Evasão: O primeiro mecanismo se refere ao abrigo em relação à exposição ambiental de oxigênio, por produção de barreiras como mucos ou aglomeração celular. Enquanto a pressão de oxigênio (pO_2) atmosférica encontra-se em 159 mmHg, no sangue venoso esta é de 40 mmHg, adicionalmente, a maioria das células eucarióticas possuem um gradiente de concentração de oxigênio que diminui da membrana para a mitocôndria: normalmente a pO_2 intracelular varia de 1 a 10 mmHg enquanto que na mitocôndria é $\leq 0,5$ mmHg (13).
- Prevenção e contenção: estão relacionadas à moléculas capazes de transformar espécies radicalares em outros compostos menos reativos, sendo que a prevenção refere-se à produção de enzimas com função antioxidante enquanto a contenção refere-se ao recrutamento de moléculas de diversas características químicas com capacidade de capturar espécies radicalares, como por exemplo a bilirrubina (2).
- Redução de danos e resposta ao *stress*: estão relacionados aos mecanismos de reparo de biomoléculas e recrutamento de moléculas envolvidas na prevenção e contenção. O sistema de reparo do DNA é um exemplo da redução de danos e os fatores de transcrição que aumentam ou diminuem a expressão de proteínas específicas são exemplos de mecanismos de resposta ao *stress*.

Diversos estudos indicam que a existência de mecanismos de defesa e proteção contra *stress* oxidativo sejam anteriores ao aumento de oxigênio na atmosfera, refutando a hipótese do 'Holocausto de Oxigênio' proposta em 1986 por Lynn Margulis e Dorion Sagan (2), na qual grande parte da vida anaeróbia teria sido extinta com o aumento de oxigênio atmosférico provocado pelo desenvolvimento da fotossíntese (37). Margulis é uma das principais referências na teoria da endossimbiose, na qual as células eucarióticas teriam surgido a partir da associação estável entre procariotos autotróficos, dessa forma as organelas presentes em células eucarióticas teriam origens procarióticas distintas, sendo a mitocôndria derivada de uma α -protobactéria (38). Porém, diversos estudos contradizem a sua posição sobre a sensibilidade dos organismos anaeróbios em relação aos níveis de oxigênio.

Especulações acerca da origem do sistema fotossintético, responsável por clivar a água (do inglês – '*water splitting*'), apontam a sua evolução a partir de uma forma ancestral da catalase (2,13), enzima que catalisa a reação de formação de água e oxigênio molecular a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Partindo dessa linha de raciocínio, enzimas envolvidas na eliminação de radicais livres precederam a fotossíntese e seriam extremamente necessárias para as primeiras formas de vida a colonizar ambientes expostos a uma atmosfera composta principalmente por

nitrogênio e dióxido de carbono, sem qualquer proteção contra a entrada de radiação UV, como a camada de ozônio.

A associação entre os danos causados por radiação ionizante e alta pressão de oxigênio levantada por Gershmman e Gilbert em 1954 (30) reforça a teoria da existência prévia das defesas antioxidantes. A relação se dá com a exposição da água à radiação ionizante que teria bombardeado a Terra antes da formação da camada de ozônio, desencadeando uma série de reações produtoras de radicais livres (Figura 1.3.3).

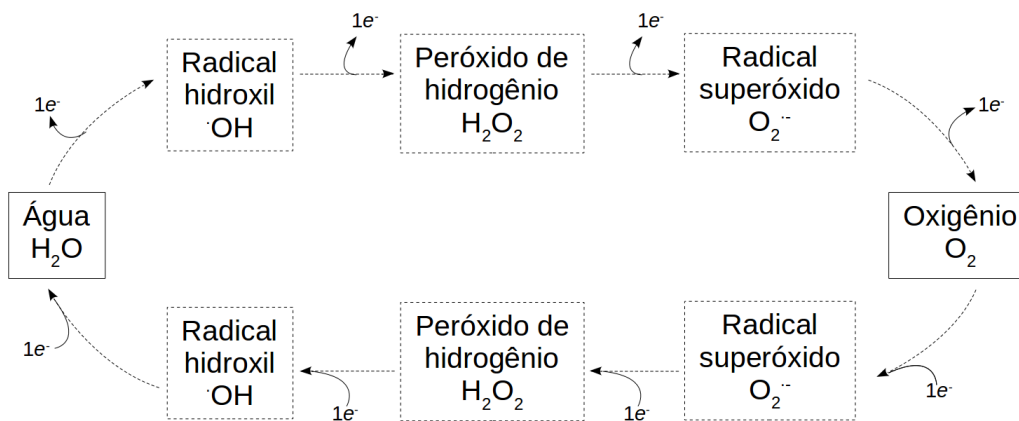
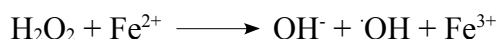


Figura 1.3.3 – Representação esquemática dos intermediários entre água e oxigênio molecular que são obtidos a partir de reações de oxidação e redução, a movimentação de prótons é omitida. Adaptado de (2).

Apesar de não ser um radical, o peróxido de hidrogênio é potencialmente perigoso por ter grande capacidade de difusão, podendo alcançar o núcleo celular e desencadear reações geradoras de radicais livres como o hidroxil, muito reativo e inespecífico.

Sob uma atmosfera de características não oxidantes, elementos metálicos não estariam expostos à oxidação como nos dias atuais. Radicais livres também poderiam ter sido gerados devido à abundância de ferro solúvel responsável por desencadear reações de Fenton. Estas foram relatadas pela primeira vez em 1876 por Henry Fenton como fonte de radicais hidroxil a partir de peróxido de hidrogênio e ferro (13). Em um processo análogo à passagem de elétrons para o oxigênio na cadeia respiratória, o ferro fornece elétrons gradativamente ao peróxido de hidrogênio, produzindo radicais hidroxil.



O radical superóxido não é tão reativo quanto radicais hidroxila, mas tem a capacidade de recuperar o ferro férrico para o estado ferroso, podendo restabelecer as reações de Fenton.



Diferente do radical superóxido, o hidroxil é um forte e não-específico agente oxidante que pode reagir com ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos.

Os macrófagos produzem radical superóxido com o auxílio da enzima leucócito NADPH oxidase, quando o radical reage com o óxido nítrico produz peroxinitrito, um agente oxidante e nitrificante usado pelos macrófagos como primeira linha de defesa durante a fagocitose.

1.4 Superóxido Dismutases

Superóxido dismutases são oxidorredutases que metabolizam o radical superóxido evitando o desencadeamento de reações oxidativas e prevenindo a formação de espécies reativas responsáveis por causar dano celular extensivo (2,13,39). A existência dessas enzimas era associada anteriormente apenas a organismos aeróbios (40), atualmente consideradas ubíquas, a presença dessas foi confirmada em anaeróbios como *Mathanobacterium thermoautotrophicum* (41). Acredita-se que algumas formas SODs teriam surgido antes da diferenciação entre Eubacteria e Archaea (12) e ainda poderiam fazer parte do elenco de enzimas presentes no último ancestral universal comum (LUCA, do inglês, *Last Universal Common Ancestor*) (2).

A necessidade da metabolização do radical superóxido teria favorecido ao menos três eventos nos quais versões diferentes de SODs foram produzidas – enzimas estruturalmente distintas e com funções semelhantes são consideradas exemplo de evolução convergente (20). Apesar de possuírem diferentes metais em seus centros catalíticos, as SODs apresentam grande similaridade em termos de atividade enzimática. Essa diferença permite classificá-las em: SODs de ferro (FeSODs), manganês (MnSODs), cobre-zinco (CuZnSODs) e níquel (NiSODs) (42) (Figura 1.4.1 A). Os metais estão diretamente relacionados com os mecanismos de catálise e com a estrutura tridimensional dessas proteínas (43).

As CuZnSODs teriam surgido em um evento posterior ao das demais SODs, uma vez que são encontradas predominantemente em organismos mais complexos (Figura 1.4.1 B). Adicionalmente, a baixa solubilidade do cobre em condições anaeróbias teria tornado inviável seu emprego como cofator enzimático nas primeiras formas de vida devido à sua baixa disponibilidade

ambiental (44). Encontradas na forma de enzimas diméricas, diversas estruturas semelhantes foram determinadas para as CuZnSODs, inclusive para a enzima SOD1 humana (45), indicando alta similaridade estrutural. Essa estrutura também permitiu estudar, detalhadamente, o papel de mutações na SOD1 envolvidas na esclerose amiotrófica lateral (46), uma doença neurodegenerativa, progressiva e fatal, que causa degeneração dos neurônios motores do sistema nervoso central, os quais controlam o movimento muscular voluntário (47).

Em contrapartida, as formas de superóxido dismutases que possuem ferro estão presentes em organismos mais ancestrais, possivelmente devido abundância desse metal na natureza e alta disponibilidade como Fe^{+2} antes do aumento da concentração de oxigênio na atmosfera, durante o surgimento das primeiras formas de vida. O gene da FeSOD foi encontrado em eucariotos primitivos, em cloroplastos de plantas e em bactérias (48); a proteína codificada forma dímeros com íons ferro coordenados por três histidinas, um aspartato e uma molécula de água (49).

A MnSOD está presente no citoplasma de bactérias, formando dímeros, e na matriz mitocondrial das células eucarióticas, organizada em tetrâmeros (48). A enzima eucariótica precisa ser importada para a mitocôndria, porque é codificada por um gene nuclear. Isso ocorre por ação de um peptídeo sinalizador N-terminal, o qual é clivado após a importação para a organela. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a proteína MnSOD (Sod2p), codificada pelo gene *SOD2*, acumula no citosol, quando expressa sem o peptídeo sinalizador. Além disso, essa proteína citoplasmática não possui metal no seu centro catalítico e é inativa, o que indica que Sod2p requer sua localização mitocondrial para ser carregada apropriadamente com manganês (50).

Recentemente encontrada no genoma de diversas bactérias (39) e isolada pela primeira vez a partir do citoplasma de bactérias do gênero *Streptomyces*, a NiSOD possui níquel em seu centro catalítico e mecanismo de catálise não completamente elucidado (42). As estruturas cristalográficas de duas NiSODs, de *S. seoulenses* e *S. coelicolor*, foram resolvidas por dois grupos distintos (51,52) que mostraram a organização homohexamérica da enzima além da presença de um motivo de nove aminoácidos (His-Cys-X-X-Pro-Cys-Gly-X-Tyr) na porção catalítica N-terminal. Esses resíduos formam um gancho para complexação de íons níquel e provê interações essenciais para ligação do metal e catálise.

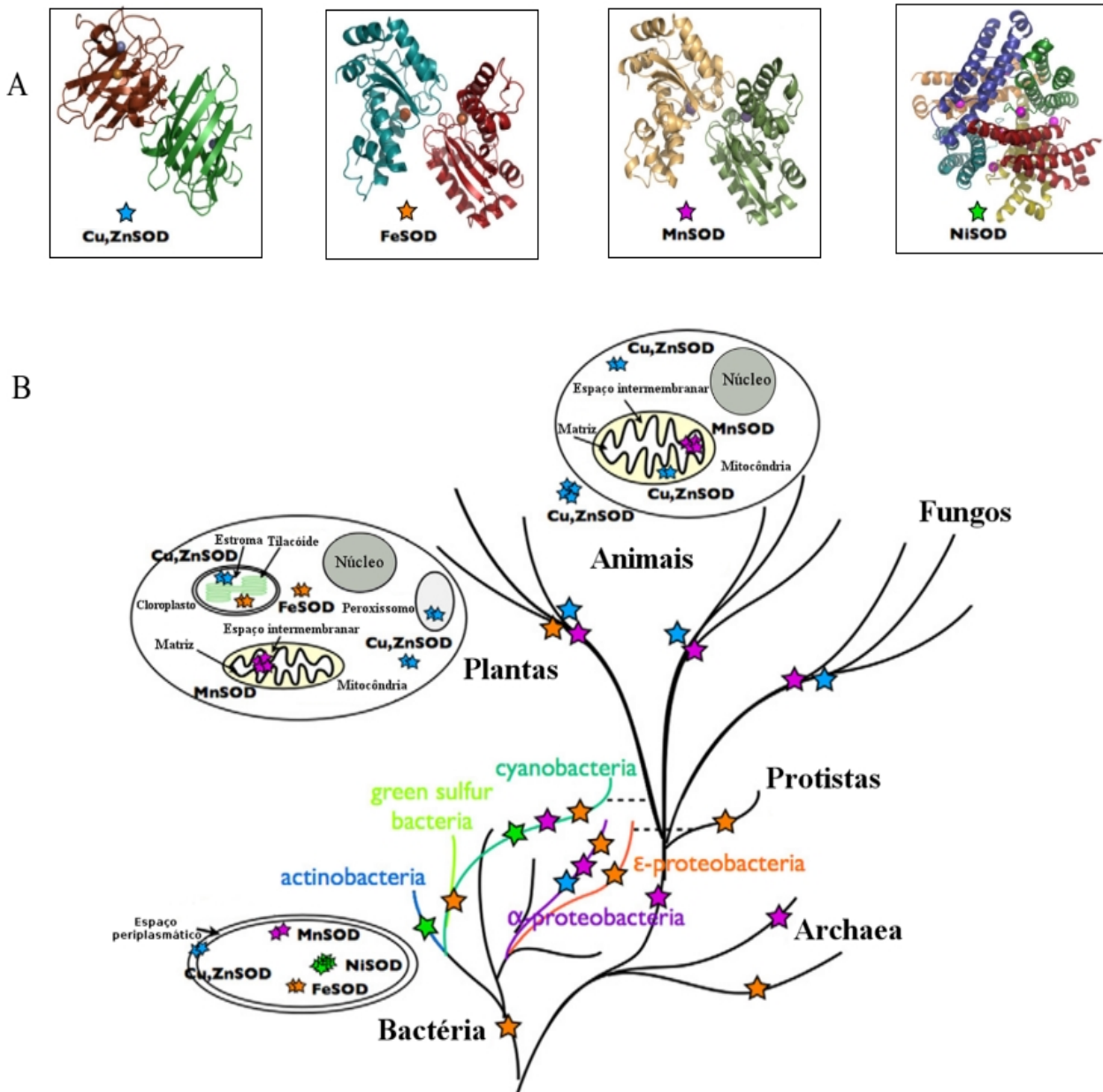
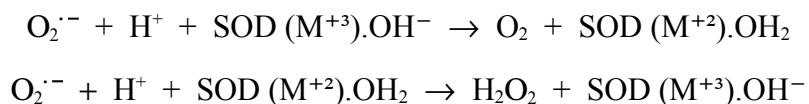


Figura 1.4.1 – A) Comparação entre quatro estruturas de superóxido dismutases, da esquerda para a direita: *Streptomyces coelicolor* NiSOD (PDB: 1t6u), CuZnSOD humana (PDB: 1pu0), *E. coli* FeSOD (PDB: 1isa) e *E. coli* MnSOD (PDB: 1vev). B) Distribuição ubíqua de superóxido dismutases em diferentes compartimentos celulares, as cores das estrelas indicam o tipo de SOD: azul, CuZnSODs; laranja, FeSODs; roxa, MnSODs; e verde NiSODs. A quantidade de estrelas indica a estrutura quaternária das enzimas, sendo duas para dímeros e quatro para tetrâmeros. Adaptado de (12,42)

Apesar de possuírem estruturas e cofatores distintos, todas as classes de superóxido dismutases são capazes de converter duas moléculas de superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio consumindo dois prótons por meio de reações de oxidação e redução cíclicas que envolvem o átomo metálico (49):



Apesar de gerar peróxido de hidrogênio, acredita-se que as SODs diminuiriam a concentração celular desta molécula por evitar reações não enzimáticas de formação de peróxido de hidrogênio a partir do radical superóxido (53). Esta molécula deve ser posteriormente processada por peroxidases, como a catalase, para que não haja acúmulo de peróxido de hidrogênio no organismo. Em humanos, o excesso de superóxido dismutase, que faz parte de uma das alterações causadas pela trissomia do cromossomo 21, condição da doença conhecida como síndrome de Down, resulta em acúmulo de peróxido de hidrogênio e neste caso o excesso de SOD pode ser prejudicial ao organismo (2).

1.4.1 Superóxido dismutases de ferro e manganês

Embora as estruturas de NiSOD e CuZnSOD sejam muito distintas, o mesmo não ocorre entre Fe e MnSODs. Estas possuem sequências homólogas e estruturas cristalográficas muito similares (com estrutura do sítio de ligação ao metal praticamente sobreponível) e provavelmente evoluíram de um gene ancestral comum (48). Entretanto, a nível catalítico, ambas as proteínas divergiram o suficiente para que seus metais não possam ser intercambiáveis, produzindo uma enzima funcional com a troca do cofator. Isso ocorre para a maioria das superóxido dismutases estudadas, isto é, quando ferro substitui o manganês na MnSOD (Fe(Mn)SOD), ou Mn substitui o sítio catalítico da FeSOD (Mn(Fe)SOD), há perda parcial o total de atividade enzimática, indicando que essas proteínas possuem alta seletividade por metal (42). Ambas as FeSODs e MnSODs poderiam ter evoluído a partir de uma enzima cambialística funcional com ferro ou manganês e seriam versões mais recentes e específicas de SODs ancestrais (12). As formas cambialísticas ainda são encontradas em Archaea, Bacteria e Eucarya, este último grupo com menor representatividade, até a presente data, enzimas cambialísticas eucarióticas foram encontradas apenas nos fungos *Antrodia camphorata* (54) e *Thalassiosira weissflogii* (55). Dentre os organismos não eucariotos que possuem enzimas cambialísticas estão: aeróbios estritos (*Aeropyrum pernix* (56)), aerotolerantes (*Propionibacterium shermanii* (57)), anaeróbios facultativos (*Streptococcus mutans* (58)), anaeróbios (*Porphyromonas gingivalis* (59)) e bactérias fotossintéticas (*Rhodobacter capsulatus* – uma α -proteobactéria (60) e *Chloroflexus aurantiacus* (61)).

As superóxido dismutases de ferro e manganês tem a estrutura dividida em dois domínios, N-terminal e C-terminal, o primeiro é composto por duas hélices antiparalelas e o segundo possui

estrutura mista α/β (62). Cada domínio contribui com dois dos resíduos que coordenam o metal e portanto somente as formas diméricas são ativas, sendo que os tetrâmeros são a união de dois dímeros. Todas as subunidades da estrutura são iguais e portanto os oligômeros são considerados homodímeros ou homotetrâmeros. Ambos os tipos de SODs compartilham 28 aminoácidos conservados, 4 deles diretamente envolvidos na coordenação do metal em um arranjo de bipirâmide trigonal: His²⁶ (NE2), His⁷³ (NE2), Asp¹⁵⁶ (OD1) e His¹⁶⁰ (NE2) de acordo com a numeração da FeSOD de *E. coli*. A histidina H¹⁶⁰ faz uma ponte salina na interface dimérica com Glu¹⁵⁹, outro resíduo conservado em ambas as SODs. A interface dimérica é o principal canal que conduz o substrato ao sítio catalítico, neste canal outros 8 resíduos conservados estão presentes e cada cadeia contribui com 4 resíduos: His³⁰, Ser¹²⁰, Trp¹⁵⁸, His¹⁶⁰ e Gly¹¹⁹, E¹⁵⁹, Tyr¹⁶³, Asn¹⁶⁸ (39). O mecanismo de reação mais aceito é: Três ligantes da cadeia polipeptídica, His⁷³, Asp¹⁵⁶ e His¹⁶⁰, coordenam o metal no plano equatorial, de forma a compôr a base da bipirâmide trigonal, nas posições axiais o metal é coordenado por His²⁶ e por um quinto ligante proposto ser OH⁻ em pH neutro (Figura 1.4.2 A). Não há grande diferença estrutural dos sítios entre as formas reduzida ou oxidada, porém a distância da ligação entre o metal e o hidróxido aumenta e pelo pKa acredita-se que, na forma reduzida, este ligante seja uma água (Figura 1.4.2 B). A aproximação do radical superóxido é permitida pela orientação na qual se encontram os anéis imidazol das duas histidinas His⁷³ e His¹⁶⁰ que formam um funil de acesso ao substrato. A ligação do radical ao sítio parcialmente aberto, trans ao Asp¹⁵⁶ (OD1) (Figura 1.4.2 C) resulta na formação de um octaedro distorcido.

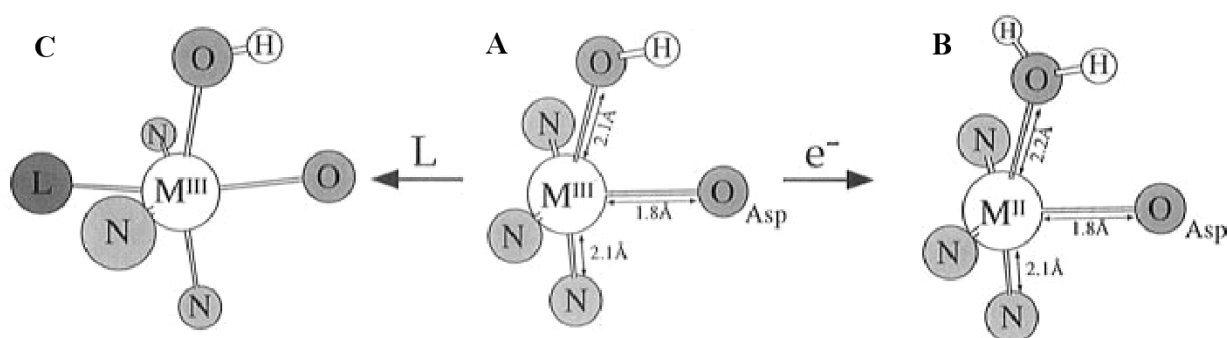


Figura 1.4.2 – Representação do sítio catalítico das superóxido dismutases de ferro e manganês nas formas oxidada (A), reduzida (B) e com ligante (C). Adaptado de (17).

Após a ligação do superóxido, o metal é reduzido e a transferência de elétron gera o oxigênio molecular. Para restaurar a carga total +1, o solvente que coordena o metal é protonado à H_2O e a enzima pode receber o segundo superóxido. Esse será reduzido e receberá dois prótons, sendo que um deles é proveniente da água que coordena o metal reduzido (49). Acredita-se que a etapa limitante da catálise é a dissociação do peróxido de hidrogênio (63). Uma representação do

mecanismo de ação das SODs pode ser verificada na figura 1.4.3.

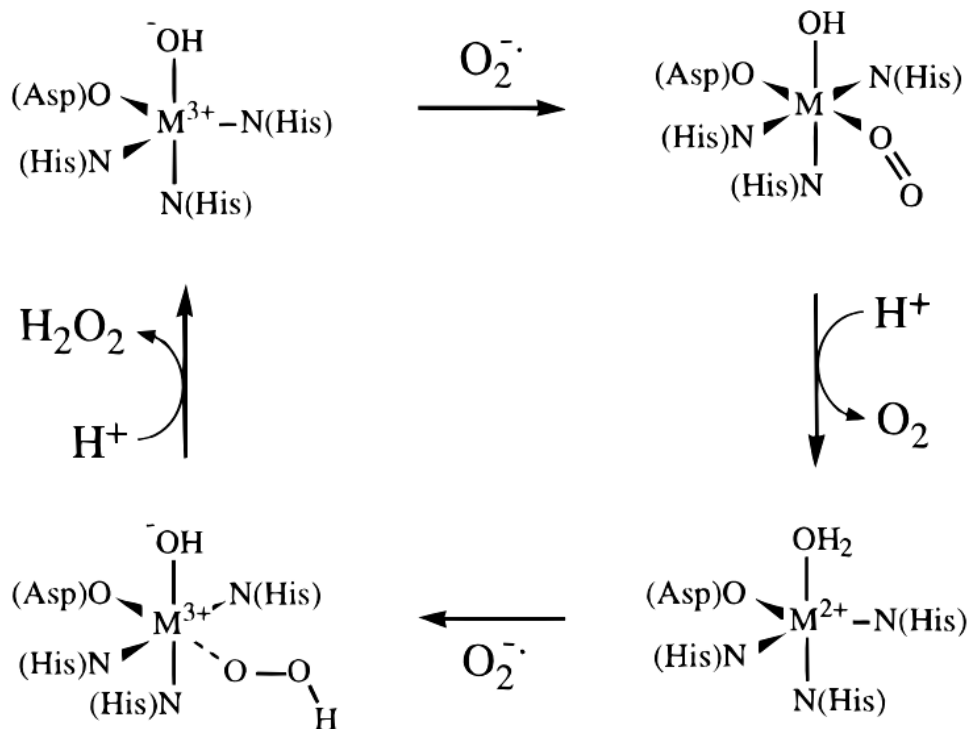
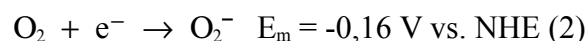
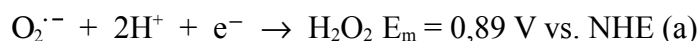


Figura 1.4.3 – Representação esquemática das reações envolvidas no mecanismo de ação das superóxido dismutases de ferro e manganês. O ciclo envolve a redução e oxidação do metal no sítio ativo, representado pela letra M. Adaptado de (17).

A molécula de solvente que coordena o metal faz parte de uma rede de ligações de hidrogênio que facilita a movimentação de prótons entre o solvente do sítio catalítico e os resíduos das posições 34 e 141 (64), sendo que a posição 34 é sempre ocupada por uma tirosina (Tyr^{34}) e a 141 pode variar entre uma alanina (Ala^{141}) ou glutamina (Gln^{146} – de acordo com a numeração da MnSOD de *E. coli*), em FeSODs ou MnSODs, respectivamente. Os prótons envolvidos nessa rede, além de participar da reação de catálise, ajustam o potencial de redução do sítio de forma que a modulação dos pKs desses prótons ajustam o E_m necessário para as seguintes reações (65):



Para que a enzima se utilize do metal para a catálise, esta deve diminuir o E_m dos pares Fe^{3+}/Fe^{2+} e Mn^{3+}/Mn^{2+} (valores citados anteriormente no item 1.2), para um E_m que esteja entre os valores das das reações 2a (0,89 V) e 2b (-0,16 V), considerado ótimo quando próximo a 360mV vs. NHE (12). Nessa faixa de E_m , a enzima é capaz de oxidar o radical superóxido e manter o E_m baixo o suficiente

para que possa passar um elétron para um segundo radical, ao mesmo tempo é capaz de reduzir superóxido mantendo E_m alto o suficiente para subtrair um elétron deste. O valor de E_m para enzimas de ferro é de aproximadamente 0,1 V enquanto que para as de manganês é de aproximadamente 0,3 V, enzimas com metal substituído podem apresentar E_m muito alto oxidando o radical e não passando o elétron (Mn(Fe)SOD) ou podem apresentar E_m muito baixo reduzindo o radical sem conseguir extrair um elétron (Fe(Mn)SOD) (12,66,67) (Figura 1.4.4).

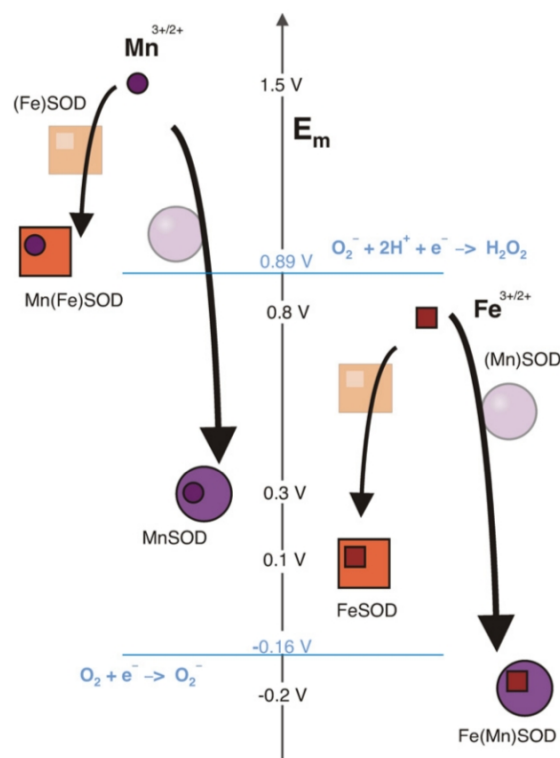


Figura 1.4.4 – Representação esquemática do ajuste do E_m em FeSODs ($\sim 100\text{mV}$) e MnSODs ($\sim 300\text{mV}$) ou por enzimas com metais substituídos, Mn(Fe)SODs ($> 870\text{mV}$) e Fe(Mn)SODs ($\sim -200\text{mV}$), em relação ao E_m necessário para que as semi-reações de catálise ocorram (12).

A capacidade de reestabelecer o estado de oxidação inicial do metal faz das SODs independentes de outros sistemas de transporte de elétrons. SODs substituídas podem continuar consumindo radical superóxido, mas dependeriam de outros sistemas para manter a reação de dismutação do radical em série (12).

Apesar das diferenças clássicas encontradas nestas SODs, alguns organismos possuem enzimas tetraméricas ligadas a ferro com características de MnSODs, como resistência a íons azoteto e peróxido de hidrogênio (41). Embora essa substituição de metais possa ser obtida, as atividades dismutásicas resultantes são muito reduzidas quando comparadas com as proteínas na presença dos metais próprios (39,64). Usualmente FeSODs são diméricas e MnSODs tetraméricas,

porém algumas excessões já foram encontradas. Uma cianobactéria, *Anabaena* PCC 7120, possui MnSOD ligada à membrana (68) e assim como as MnSODs de *Bacillus Anthracis* (*SODA1* e *SODA2*) (69), são diméricas. Alguns resíduos estão relacionados ao estado de oligomerização das SODs, em tetrâmeros as posições 22 e 65 são ocupadas pelos resíduos treonina e fenilalanina, respectivamente. Estes são trocados por isoleucina e asparagina em dímeros. As posições 22 e 65 estão localizadas nas duas extremidades da interface dimérica e as interações do resíduo 65 são responsáveis por unir as hélices da porção N-terminal de ambas as cadeias. Em dímeros essas hélices terminais são mais curtas.

Diversos métodos são usados para análise de centros metálicos em enzimas, principalmente métodos espectroscópicos e magnéticos em conjunto com diferentes tipos de perturbação química: modificação de resíduos, ligação de inibidores, oxidação seletiva dos centros metálicos, remoção do metal para obtenção da apoenzima e reconstituição com diferentes metais. Outras abordagens são usadas para predição de sítios de ligação e modulação da atividade. Neste sentido, diversas ferramentas de bioinformática vem sendo desenvolvidas com o intuito de analisar centros metálicos por meio de informações como o conteúdo de aminoácidos ou de estruturas secundárias presentes nas proteínas.

1.5 Análise por Acoplamento Estatístico e evolução de proteínas

A análise de acoplamento estatístico requer um alinhamento de múltiplas sequências (MSA, do inglês *multiple sequence alignment*) de diversos organismos, utilizado como fonte de dados evolucionários de uma determinada família de proteínas. A partir deste alinhamento são calculados dois parâmetros, ΔG^{stat} e $\Delta\Delta G^{\text{stat}}$, os quais estão relacionados, respectivamente, à conservação de um dado resíduo no alinhamento e ao acoplamento entre dois resíduos distintos (70). O parâmetro ΔG^{stat} mede o quanto a distribuição de aminoácidos em uma dada posição do MSA distancia-se da frequência observada aleatoriamente na natureza. O segundo parâmetro, $\Delta\Delta G^{\text{stat}}$, mede a variação de frequências de aminoácidos em uma dada posição, quando outra é fixada (Figura 1.5.1).

Se o MSA é composto por um número suficientemente grande e diverso de sequências individuais, admite-se que se um resíduo *l* não contribui para a estrutura e função da proteína sua frequência no MSA deve ser próxima do valor médio calculado para todas as proteínas. Entretanto, se resíduos *i*, *j*, *k* fazem alguma contribuição, suas distribuições deveriam desviar dos valores médios, e a extensão desses desvios quantificaria a pressão evolucionária recebida nestes sítios. Se

dois sítios *i* e *j* estão acoplados, ambos devem exercer restrição evolucionária mútua, representada por seu acoplamento estatístico; isto é, a distribuição de aminoácidos na posição *i* deve depender da distribuição na posição *j*. Resíduos não acoplados *i* e *k* apresentariam independência entre suas distribuições de aminoácidos, apesar de sua conservação local no MSA.

Essas considerações são mais evidentes em um experimento de perturbação, no qual se fixa a distribuição de aminoácidos em um dado resíduo e observam-se as alterações de distribuição dos demais sítios (Figura 1.5.1 B, 1.5.1 C). Se o resíduo *i* for fixado em histidina, obtém-se um subalinhamento a partir do MSA (1.5.1 C). Se esse subalinhamento é suficientemente grande e diverso, o sítio *l* permanece com distribuição média aleatória, *k* mostra-se independente de *i*, porque sua distribuição não muda significativamente e o sítio *j* mostra um acoplamento ao sítio *i*, porque sua distribuição altera após a perturbação escolhida (compare Figura 1.5.1 B com 1.5.1 C). É essa alteração na distribuição de aminoácidos de resíduos acoplados que pode se mensurada como acoplamento estatístico de energia $\Delta\Delta G^{\text{stat}}$.

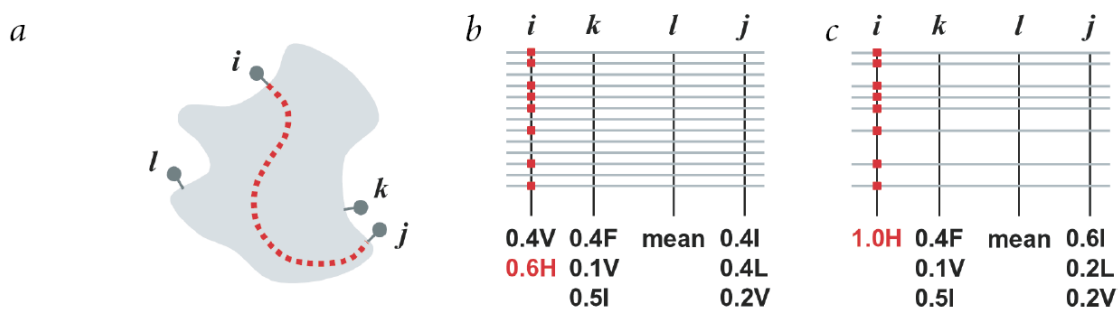


Figura 1.5.1 – Método de perturbação estatística para medir acoplamentos entre resíduos de proteínas. **A** – proteína hipotética contendo quatro resíduos *i*, *j*, *k* e *l*. O resíduo *l* não contribui para a estrutura tampouco função; *i*, *j* e *k* contribuem, em alguma extensão; *l* e *k* atuam, independentemente, um do outro; *i* e *j*, cooperativamente. Portanto, *l* é energeticamente fraco, *i* e *k* são energeticamente aditivos, *i* e *j*, energeticamente acoplados. **B** – representação esquemática de um MSA de uma família de proteínas. Linhas horizontais representam sequências de proteínas individuais. As frequências dos aminoácidos no MSA estão indicadas. **C** – Subalinhamento resultante de um experimento de perturbação onde o sítio *i* é fixado em histidina. Adaptado de (71)

1.5.1 SCA e evolução das SODs de ferro e manganês

Essa abordagem foi aplicada a família das Fe/MnSODs, obtendo-se 3 aglomerados distintos de resíduos acoplados, envolvidos na oligomerização e na distinção entre FeSOD e MnSOD (10).

As posições relacionadas à oligomerização, encontradas no primeiro aglomerado (Figura 1.5.2), incluíam os aminoácidos Glu⁵⁶, Asn⁶⁸, Thr²⁴, Pro¹⁴⁸ e Phe¹²¹, previamente apontados por Wintjens e colaboradores (39,72). Dois resíduos adicionais (Ala⁷⁰ e Trp⁷⁴) foram encontrados no

aglomerado 2, que define resíduos característicos de enzimas diméricas de ferro (Phe⁷⁸, Ala⁷¹, Ala¹⁴⁵, Gln⁷² e Phe⁶⁷) ou FeSOD em geral (Asp¹⁷⁰). O terceiro aglomerado continha os resíduos presentes nos membros das MnSODs (Gln¹⁴⁵, Gly⁷², Asp¹⁴⁶ e Met²⁵), descritos por Wintjens, e outros três adicionais ainda não descritos: Ala⁴³, Gly¹⁵⁹ e Gly⁷¹. Assim, a análise mostrou padrões diferentes entre os acoplamentos de resíduos para as proteínas de Fe e Mn, e os aminoácidos estatisticamente acoplados agruparam-se próximo ao núcleo de resíduos responsáveis pela formação dos centros metálicos, sugerindo que são responsáveis pelo ajuste fino da especificidade por metal.

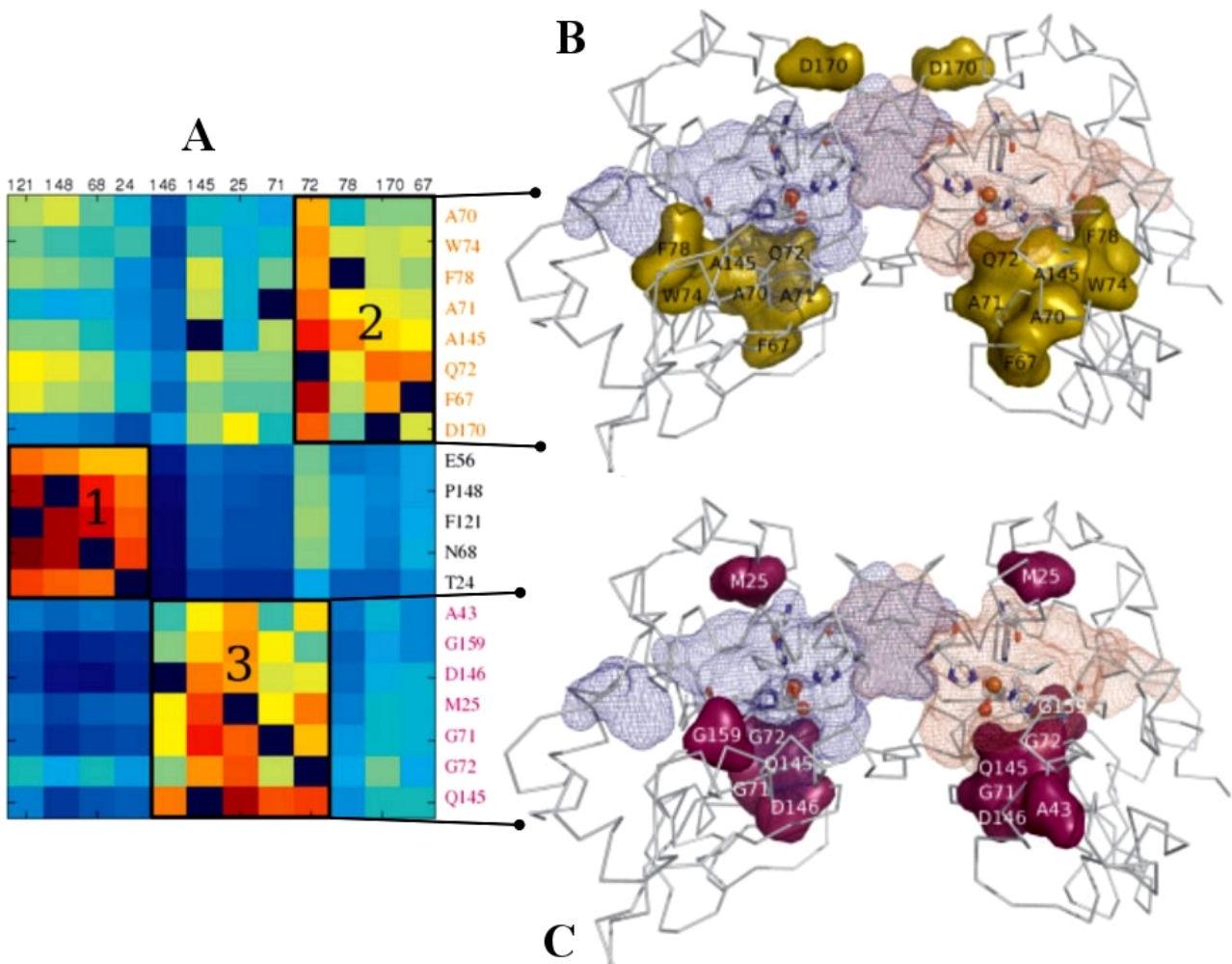


Figura 1.5.2 – Análise de acoplamento estatístico na família das Fe/MnSODs. A) Aglomerado final de resíduos acoplados estatisticamente. No eixo vertical estão os experimentos de perturbação estatística e no eixo horizontal os aminoácidos acoplados. Os números correspondem aos diferentes aglomerados, sendo 1 para os resíduos associados com dimerização; 2 com FeSODs em amarelo, também mapeado na estrutura da TbFeSODB2 (B) e; 3 com MnSODs em violeta, também mapeado na estrutura da TbFeSODB2 (C). O núcleo de resíduos altamente conservados é representado por uma malha. Adaptado de (10).

Corroborando com essa hipótese, estudos de mutagênese sítio-dirigida na SOD cambialística de *Porphyromonas gingivalis* permitiram convertê-la em uma enzima ferro-específica, substituindo-se a glicina 159 por treonina (73). Esse resíduo faz parte do aglomerado 3 obtido por

SCA, e sugere que outros resíduos deste aglomerado podem estar relacionados ao ajuste fino da especificidade por metal; o que pode ser explorado em futuros experimentos de mutagênese.

Em geral, SCA proporciona aglomerados únicos para um MSA, mas pode gerar resultados similares aos de Fe/MnSODs em outras famílias de proteínas, onde se obtém mais de um aglomerado de resíduos na análise. Todavia, até recentemente, esse fenômeno não tinha recebido nenhuma interpretação, restringindo SCA à identificação de redes de aminoácidos energeticamente acoplados, descrita anteriormente. O trabalho de Bacheга e colaboradores mostra que esse particionamento dos aglomerados está intimamente ligado à função das proteínas de uma família; neste caso à escolha por metal ou estado oligomérico (10). O grupo de Rama Ranganathan, no mesmo ano, aplicou SCA à família das S1A serina-proteases; uma análise que resultou na decomposição da família em 3 aglomerados quase independentes, denominados “setores protéicos” (74). Cada setor estava relacionado a um domínio específico da estrutura terciária e possuía um papel funcional distinto na família, indicando divergências estruturais independentes, como observado nas SODs de ferro e manganês.

Os setores protéicos expressos na forma de aglomerados obtidos em SCA refletem a história evolucionária das proteínas de uma dada família. Logo, como as SODs de Fe e Mn possuem estruturas tridimensionais sobreponíveis, indicando grande conservação em seu arcabouço, mas apresentam especificidades por metal distintas, tanto biologicamente, quanto evidenciado por SCA, deve ser possível traçar um caminho evolutivo no qual uma proteína de Fe pode ser convertida em MnSOD (e vice-versa), através de mutagêneses nos resíduos identificados nos setores protéicos. Essa idéia de construção de novas proteínas também é reforçada pelos resultados obtidos com o desenho de novos domínios WW supracitados (75).

1.6 Proteínas modelo do estudo

Os organismos cujas proteínas serviram de modelo para o estudo são o protozoário *Trypanosoma brucei* (TbFeSODB2) e o fungo *Trichoderma reesei* (TrMnSOD).

1.6.1 *Trypanosoma brucei*

Protozoários da família *Trypanosomatidae* pertencem à ordem *Kinetoplastida* que forma o filo Euglenozoa junto com dois outros grupos de organismos, *Diplonemida* e *Euglenida*. A ordem

Kinetoplastida compreende eucariotos flagelados ancestrais que divergiram logo após a aquisição da mitocôndria (76,77), dentre eles estão tripanossomatídeos de grande importância médico-veterinária como os protozoários dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. Estes parasitas são transmitidos para mamíferos por diferentes vetores artrópodes, sendo responsáveis por manifestações clínicas como a tripanossomíase africana – *Trypanosoma brucei*, Doença de Chagas – *Trypanosoma cruzi* e Leishmaniose – *Leishmania* spp., todas consideradas Doenças Tropicais Negligenciadas pela OMS (Organização Mundial da Saúde). O ciclo de vida do protozoário compreende a alternância entre o vetor inseto e o hospedeiro mamífero, bem como entre formas celulares proliferativas e não proliferativas passando por complexas mudanças morfológicas e bioquímicas. Na primeira fase, no intestino do hospedeiro invertebrado, adotam forma flagelada e estilo de vida extracelular com formas designadas procíclica, epimastigota ou promastigota para *T. brucei*, *T. cruzi* ou *Leishmania* spp., respectivamente. Já no hospedeiro vertebrado, a morfologia e o sítio de infecção varia de acordo com a espécie. *T. brucei* permanece flagelado e com estilo de vida extracelular presente no sistema circulatório e linfático, forma conhecida como sanguínea ou tripomastigota.

A tripanossomíase africana, também conhecida como doença-do-sono consiste na transmissão de protozoários da espécie *Trypanosoma brucei* ao vetor mamífero por insetos do gênero *Glossina* (mosca tsé-tsé, *G. palpalis*) encontradas apenas na região da África subsaariana restringindo o foco da doença para esta região (78). *T. brucei* pode provocar doenças de características diferentes dependendo da sub-espécie do parasita. Manifestações agudas ou crônicas são causadas pelas sub-espécies *T. brucei rhodesiense* ou *T. brucei gambiense*, respectivamente. O primeiro é encontrado no leste da África enquanto o segundo na região central.

Estes parasitas possuem características únicas como a presença de uma única mitocôndria tubular que se estende pela célula, a compartimentalização quase completa da via glicolítica dentro de uma organela designada glicosomo, uma estrutura discóide denominada cinetoplastídeo que contém o DNA mitocondrial (kDNA), dentre outros aspectos particulares do metabolismo dos tripanossomatídeos (79). Os mecanismos de remoção de radicais livres e de defesa antioxidante também são característicos, não possuem catalase ou glutatona peroxidase, mas tripanotiona, triparredoxina peroxidase e ascorbato peroxidase (79).

Assim como outros tripanossomatídeos, *T. brucei* possui múltiplas superóxido dismutases de ferro muito semelhantes entre si reguladas de acordo com o ciclo evolutivo do parasita (80). As quatro enzimas são encontradas em compartimentos celulares diferentes, FeSODA e FeSODC são expressas na mitocôndria de formas procíclicas enquanto FeSODB1 é encontrada no citoplasma e

FeSODB2 no glicossoma. As relações filogenéticas sugerem que os genes dessas enzimas foram adquiridos em mais de um evento de transferência gênica e um de duplicação (6). Nenhuma outra forma além da FeSOD foi relatada até o momento nos protozoários da família *Trypanosomatidae*.

A presença de múltiplas superóxido dismutases de ferro muito semelhantes entre si em um mesmo organismo ocorre em outros protozoários como *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum* pertencentes ao filo Apicomplexa, acredita-se que essa característica seja resultado de duplicação gênica recente. As enzimas de *Perkinsus marinus*, um trofozoário que prolifera em homócitos de ostras – Alveolata como os Apicomplexa – não são tão semelhantes entre si, compartilham menos de 40% de identidade sequencial, apresentando divergências notáveis entre resíduos da interface dimérica e da segunda camada ao redor do sítio ativo. Bem como as enzimas dos tripanossomatídeos, as PmSOD 1 e 2 de *P. marinus* também fazem parte de compartimentos celulares distintos (81).

Outros mecanismos estão envolvidos na retirada de radicais livres nesses protozoários. Por não possuírem catalase, outras enzimas estão envolvidas na retirada de peróxido de hidrogênio como as tiol peroxidases e citocromo c peroxidase na mitocôndria. A morfologia dessa organela varia de acordo com o ciclo de vida do parasita, volumosa nas formas procíclicas e reprimida nas formas sanguíneas quando o protozoário obtém energia apenas da glicólise (82). Essa característica altera o padrão de geração de radicais livres na mitocôndria e explica em parte a regulação das SODs de acordo com o ciclo evolutivo do protozoário.

Com o intuito de verificar as predições feitas pela análise de acoplamento estatístico e de estudos prévios em relação à especificidade por metal das superóxido dismutases de ferro ou manganês, o presente estudo utilizou a proteína TbFeSODB2 como modelo para conduzir a produção de proteínas com alterações de aminoácidos capazes de modificar a especificidade desta enzima de ferro por manganês.

1.6.2 *Trichoderma reesei*

Organismos pertencentes ao gênero *Trichoderma* tem como habitat o solo, são fungos colonizadores ubíquos de materiais compostos por celulose, estando presentes na madeira em decomposição e matéria vegetal. Seu metabolismo versátil e natureza competitiva permite que sejam predominantes em diversas zonas climáticas. É encontrado normalmente no solo próximo às raízes de plantas (rizóforo), o qual é afetado pela secreção proveniente dessas raízes e onde há grande proliferação de outros microrganismos, podendo colonizar a própria raiz se tornando um

endófito (83)

O gênero contém mais de 200 espécies definidas molecularmente (84). *T. longibrachium* e *T. orientale* podem atuar como patógenos oportunistas em indivíduos imunodeprimidos, porém com consequências menos severas que outros fungos. *T. aggressivum*, *T. pleurotica*, *T. pleurotum* e *T. mienum* são micoparasitas de cogumelos comerciais, como *Agaricus bisporus* (Champignon), resultando em grande perda econômica neste setor.

Os estudos mais detalhados sobre o organismo foram iniciados nos anos 70 nos Estados Unidos durante a 'Primeira Crise do Petróleo', quando novos métodos de obtenção de combustível foram explorados. Um organismo isolado durante a Segunda Guerra Mundial, responsável por acelerar o processo de decomposição de objetos dos soldados, foi alvo de estudo devido a sua capacidade celulolítica. A espécie designada *Trichoderma viride* foi identificada como o organismo responsável pela decomposição dos objetos feitos de algodão dos soldados que estavam na região do Pacífico Sul. Após uma série de mudanças de classificação e nomenclatura, a espécie ficou conhecida como *Trichoderma reesei* (85), sendo a forma assexuada de um Ascomiceta tropical muito comum, *Hypocrea jecorina* (83).

T. reesei é um fungo filamentosos que produz esporos esverdeados (Figura 1.6.1). O isolado original (QM6^a), clone haplóide assexual, tem sido propagado em laboratório e estudado principalmente em relação à sua importante capacidade celulolítica. É um organismo de ampla aplicação industrial para produção de enzimas, metabólitos secundários e subprodutos, outras espécies do gênero são empregados na agricultura. Como ferramenta de biocontrole possui a habilidade micoparasita que permite a competição com fungos patogênicos de plantas, impedindo que os vegetais sejam afetados. Podem ser encontrados em quase qualquer tipo de planta, participando de diversos processos que beneficiam a lavoura: indução de resistências, aumento da disponibilidade e captação de nutrientes, promovendo o desenvolvimento vegetal e degradando pesticidas xenobióticos. Desta forma é comercializado como biofungicidas, biofertilizantes e melhoradores de solo.

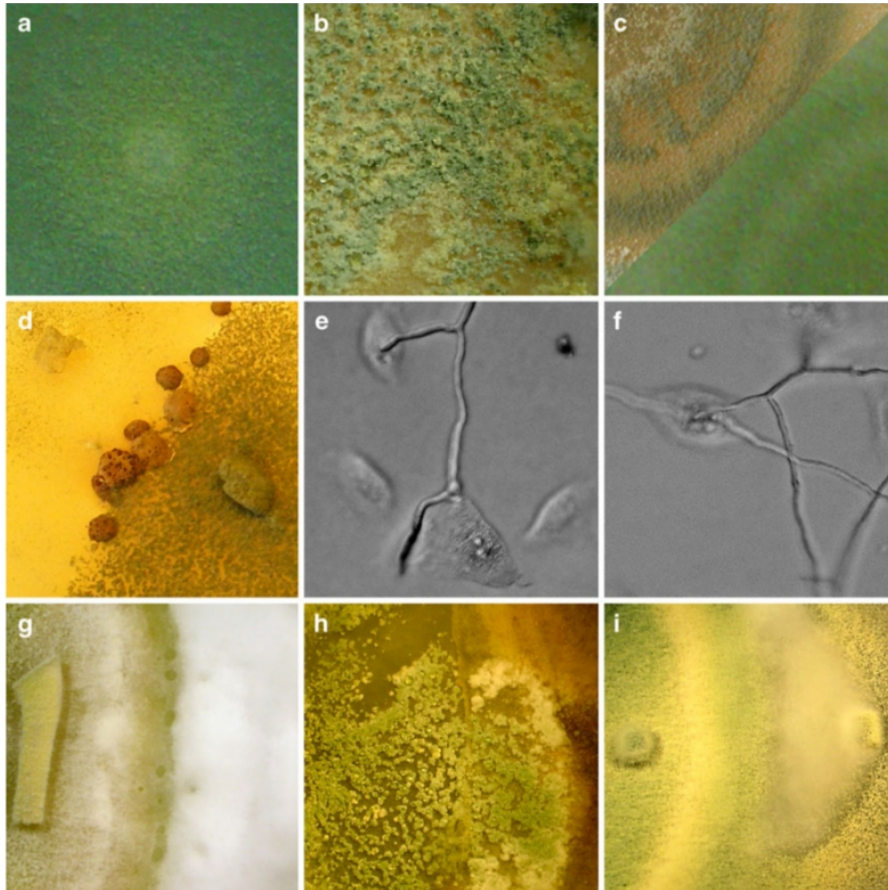


Figura 1.6.1 – Aspectos característicos de *Trichoderma* spp. **a** *T. reesei* e **b** *T. atroviride* propagando em placas, **c** *T. reesei* ou *H. jecorina* crescendo sob a luz do dia e demonstrando conidia dependente da luz, **d** formação de corpos frutíferos de *T. reesei* cruzando com um isolado selvagem de *H. jecorina*, (**e**, **f**) *T. longibrachiatum* germinando e crescendo em células humanas, (**g**, **i**) *T. reesei* (esquerda) em confronto com *Pythium ultimum* (direita), **h** *T. atroviride* (esquerda) em confronto com *R. solani* (direita). Adaptado de (86)

Também produz enzimas hidrolíticas capazes de agir sobre diferentes materiais vegetais que contenham celuloses e hemiceluloses. Diversos estudos envolvendo mutagênese da sequência codificante dessas proteínas visaram a produção de enzimas com atividade catalítica aprimorada, diversificando os substratos usados para produção de açúcares fermentáveis, tornando o uso deste organismo uma importante ferramenta de produção de enzimas a nível industrial.

As enzimas produzidas pelo organismo tem aplicações no tratamento de fibras têxteis e de papel, no setor de bebidas e alimentos industrializados, bem como na produção de etanol de segunda geração. Posteriormente um método eficiente de transformação foi desenvolvido para *T. reesei* e o organismo começou a ser usado para expressão heteróloga de proteínas.

Uma superóxido dismutase de manganês (TrMnSOD), já foi caracterizada em *T. reesei* e pode estar intimamente relacionada ao uso de celulose pelo organismo. O metabolismo da celulose

necessita de maior atividade mitocondrial, fator considerado responsável pelo aumento da geração de radical superóxido e maior mobilização para retirada dos radicais gerados. Apesar de normalmente serem encontradas na mitocôndria em eucariotos, a MnSOD de *T. reesei* não possui o peptídeo sinal necessário para importação para a mitocôndria e deve fazer parte de uma resposta de defesa no citosol contra a geração mitocondrial de radicais livres (7).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar os determinantes estruturais do ajuste fino da especificidade por metal de MnSOD e FeSOD.

2.2 Objetivos Específicos

- Construir mutantes de TbFeSODB2, a partir de resíduos identificados nos aglomerados 2 e 3 no estudo de acoplamento estatístico feito anteriormente, de modo que se possa converter uma enzima de ferro em manganês;
- Expressar e purificar, cristalizar e resolver a estrutura da MnSOD de *Trichoderma reesei*;
- Expressar, purificar, cristalizar e resolver a estrutura cristalográfica dos mutantes de TbFeSODB2;
- Analisar a atividade enzimática das SODs mutantes;
- Analisar a geometria local dos metais nos mutantes através de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada ou purificada no sistema Milli-Q (Millipore), de acordo com métodos já descritos (87).

3.1 Análise de alinhamento por acoplamento estatístico

Com o intuito de verificar a consistência dos resultados, a análise de acoplamento estatístico foi refeita com a versão mais recente do PFAM (27.0), anteriormente a análise havia empregado a versão PFAM 22.0 (10). O PFAM divide a família das superóxido dismutases em dois domínios, o N-terminal (PF00081) e o C-terminal (PF02777). O alinhamento dos dois domínios foram obtidos diretamente do PFAM e um arquivo de alinhamento único foi gerado cruzando todas as sequências presentes nos dois alinhamentos, a partir do programa alignmerge do pacote PFSTATS (88). O alinhamento final foi filtrado de forma a eliminar fragmentos e sequências mal alinhadas usando um mínimo de 80% de cobertura e 20% de identidade em relação à superóxido dismutase de *T. brucei* (Q2KN30_9TRYYP). Para evitar redundância, comparou-se todas as sequências no alinhamento e a cada vez que são encontradas duas sequências com mais de 70% de identidade entre si a menor delas é eliminada. Os alinhamentos das sequências foram visualizados e editados no programa Jalview (89).

3.2 Mutagênese sítio-dirigida por PCR e clonagem dos mutantes

O isolamento de DNA, análise com enzimas de restrição, eletroforese em gel de agarose e procedimentos de clonagem foram realizados utilizando técnicas já estabelecidas (87).

O fragmento correspondente à TbFeSODB2 clonado no vetor pET-28a(+) (Novagen) (90), concedido por J.F.R. Bachega, foi extraído deste vetor por digestão com as enzimas de restrição NdeI e XhoI e subclonado no vetor pSMT3.

A mutagênese sítio-dirigida foi realizada conforme método previamente descrito (91). As sequências dos primers de extremidade utilizados são descritas na tabela 3.2.1 e as mutações foram inseridas por um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*) (tabela 3.2.2) que continham as mutações a serem propagadas por *PCR* (do inglês, “*Polymerase Chain Reaction*”), pelo método de sobreposição e extensão (do inglês, “*Overlap Extension PCR*”) (92).

Para que as mutações de interesse fossem introduzidas, oligonucleotídeos parcialmente

complementares ao alvo foram desenhados, de tal modo que ainda se liguem à molécula, mas introduzam a mutação desejada ao produto de *PCR* (Figura 3.2.1). Um sítio de restrição artificial foi inserido por mutagênese silenciosa, para verificação dos clones obtidos. Essa estratégia produz, inicialmente, duas reações de mutagênese, cujos produtos de *PCR* possuem extremidades que se sobrepõem (aproximadamente 20 pb). Esses produtos foram combinados, e uma nova amplificação por dez ciclos foi realizada para permitir a formação da molécula completa e, em seguida, *primers* nas extremidades amplificaram o produto de *PCR* final, que resultou na molécula desejada com a mutação inserida.

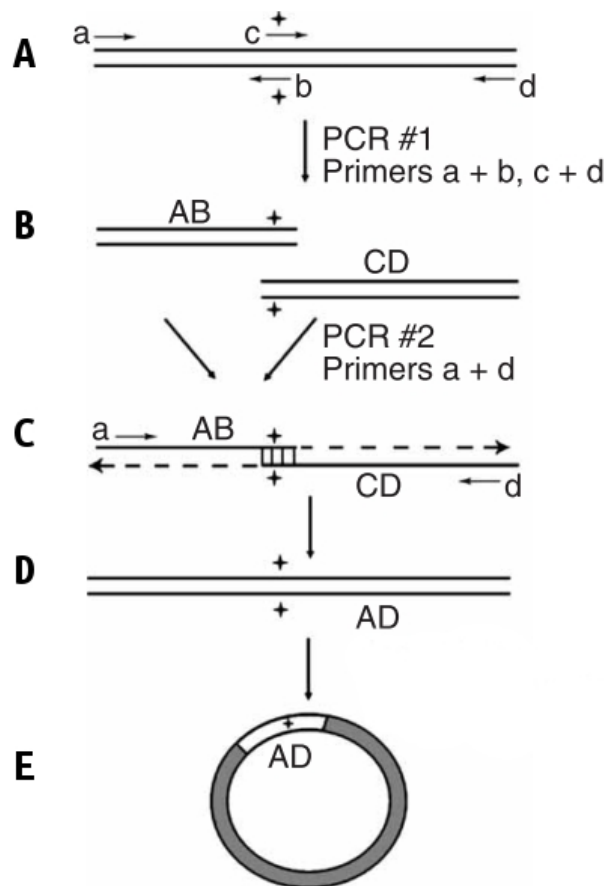


Figura 3.2.1 – Mutagênese sítio-dirigida por sobreposição e extensão, mediada por *PCR*. A) *Primers* internos (c e b), parcialmente complementares à fita molde, são usados para introduzir a mutação de interesse e *primers* das extremidades (a e d) são utilizados no primeiro experimento de *PCR*; B) Fragmentos resultantes da primeira série de ampliações (AB e CD); C) Fragmentos AB e CD sendo unidos pelo segundo experimento de *PCR* utilizando apenas *primers* a e d ; D) Fragmento resultante da segunda série de ampliações e; E Inserção do fragmento em vetor de expressão.

Tabela 3.2.1 – Sequências dos *primers* de extremidade utilizados na mutagênese sítio-dirigida por *Overlap Extension PCR* para fragmento correspondente ao gene de *TbFeSODB2*.

Primer	Sequência (5' - 3')
p-SMT3-F	GACTGACCTAGGGCAGCAGCCATCATCATC
p-SMT3-R	GCTAGTTATTGCTCAGCGGTGCAGCAGCCAAC

Tabela 3.2.2 – Sequências dos primers internos utilizados para a mutagênese sítio dirigida por *Overlap Extension PCR* para fragmento correspondente ao gene de TbFeSODB2. Os sítios de restrição incluídos encontram-se destacados em azul.

Mutação	Sequência (5'-3')	Sítio de restrição
V25M	PrimerF(V25M-F)	BstBI
	GGATTAGCCGCAAAGGGTAT TTCGAAGGAAATGGTGACGTTTCAC	
	PrimerR(V25M-R)	
	GTGAAACGTCACCATTTC TTCGAAATACCC TTTGCGGCTAATCC	
A71G	PrimerF(A71G-F)	BglII
	ATCTTCAACCTTGGGGCGC AGATCT TTTAACCATAACTTCTAC	
	PrimerR(A71G-R)	
	GTAGAAGTTATGGTTAA AGATCT GCGCCCAAGGTTGAAGAT	
Q72G	PrimerF(Q72G-F)	SspI
	CCCATCTTCAACCTTGC GGCGGGAATAT TTAACCATAAC	
	PrimerR(Q72G-R)	
	GTTATGGTTAA AATAT TCCC CGCAAGG TTGAAGATGGG	
A145G	PrimerF(A145Q-F)	BclI
	GTATTCAAACGCAT GTATCA AGGTTGCCACTGACTGAAGCG	
	PrimerR(A145Q-R)	
	CGCTTCAGTCAGTGGGCAACCT TGATCA TGCGTTTGAAATAC	
A159G	PrimerF(A159G-F)	AatII
	CTCAAGCCGATTCTCGGCTGC GACGTC TGGGAGCATGCTTAC	
	PrimerR(A159G-R)	
	GTAAGCATGCTCC AGACGTC GCAGCCGAGAATCGGCTTGAG	
D170Q	PrimerF(D170Q-F)	MluI
	GTTTGGGAGC ACGCGT ACTATATTCAATACAAGAATGACCG	
	PrimerR(D170Q-R)	
	CGGTCATTCTTGATTGAATATAGT ACGCGT GCTCCCAAAC	

Após clonagem em vetor de expressão, os clones positivos puderam ser facilmente identificados por análise com enzima de restrição que cliva no sítio inserido pela mutagênese silenciosa.

Para verificar a fidelidade das sequências, os clones positivos foram submetidos ao sequenciamento automático de DNA com *primers T7 promoter e terminator* complementares ao vetor, utilizando o equipamento ABI 3130xl (Applied Biosystems™) do Laboratório de Biofísica Molecular (IFSC – USP) e em colaboração com o professor Flavio Henrique Silva (Departamento de Genética e Evolução - UFSCAR). Os cromatogramas gerados foram analisados

Os seis mutantes obtidos foram designados do gene da TbFeSODB2 foram subclonados no vetor de expressão pET28a(+) com cauda de seis histidinas (6x His-tag) e um sítio de clivagem para trombina. O gene da TrMnSOD foi subclonado no vetor de expressão pSMT3 com 6x His-tag e um sítio de clivagem para ULP1. Ambos foram introduzidos em na cepa de expressão *E. coli* BL21

(DE3) por choque térmico com cloreto de cálcio.

As bactérias foram plaqueadas em LB-ágar, incubadas a 37 °C e as colônias que cresceram foram propagadas novamente em LB, parte foi estocada e parte analisada em eletroforese

3.3 Ensaios de expressão das proteínas mutantes

A produção de proteína em pequena escala foi conduzida em frascos de 100 mL, nos quais a cepa *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen™) contendo o vetor com o gene do mutante de interesse foi propagada em 50 mL de meio LB ou M9 (tabela 3.3.1) contendo canamicina (50 µg/mL), sob agitação em shaker a 200 rpm, a 37 °C, até que a densidade celular lida em espectrofotômetro a 600 nm (A_{600}) atingisse absorvância de 0,6. Em seguida a cultura foi ambientada à temperatura na qual a indução seria realizada, sem que a A_{600} ultrapassasse 0,8. A indução foi feita com a adição de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo) à cultura para uma concentração final de 0,1 mM, a cultura foi propagada sob agitação em shaker a 200 rpm, a 37, 30, 25 ou 20 °C por 20 horas. Quando necessária, a suplementação do meio com 0,1 mM $MnCl_2$ ou $FeSO_4$, foi feita logo antes da indução.

Tabela 3.3.1 – Composição dos meios de cultura utilizados para propagação celular.

Meios de cultura	Lúria-Bertani	10% (p/v) triptona, 5% (p/v) extrato de levedura, 5% (p/v) NaCl, pH 7,5
	Lúria-Bertani sólido	10% (p/v) triptona, 5% (p/v) extrato de levedura, 5% (p/v) NaCl, 15% (p/v) ágar, pH 7,5
	Mínimo (M9)	42 mM Na_2HPO_4 , 22 mM KH_2PO_4 , 8,5 mM NaCl, 18,7 mM NH_4Cl , 1mM $MgSO_4$, 100 µM $CaCl_2$,

Com a finalidade de monitorar o processo de indução, alíquotas de 20 µL da cultura foram coletadas antes da adição do IPTG e após 2, 4 e 20 horas de indução. Para evitar que a propagação natural das células afetasse a avaliação do aumento da expressão celular da proteína alvo, cada alíquota foi diluída para que apresentasse a mesma D.O. da primeira coleta (anterior à adição de IPTG). A partir dessas diluições, 20 µL foram coletados e centrifugados a 1000 g por 5 minutos.

O sedimento celular de cada alíquota foi ressuspensionado em 20 μ L de tampão A₁ (tabela 3.3.2), fervido durante 5 minutos e aplicados em SDS-PAGE 15%. A eletroforese foi realizada em corrente de 50 mA e voltagem 100 V, utilizando uma diluição de 10 x do tampão A₂ (tabela 3.3.2) para a cuba. As amostras mais viscosas que não poderiam ser aplicadas no gel foram filtradas em microfibras de vidro (Whatman™, 1821-021) de acordo com o procedimento mostrado na figura 3.3.1.

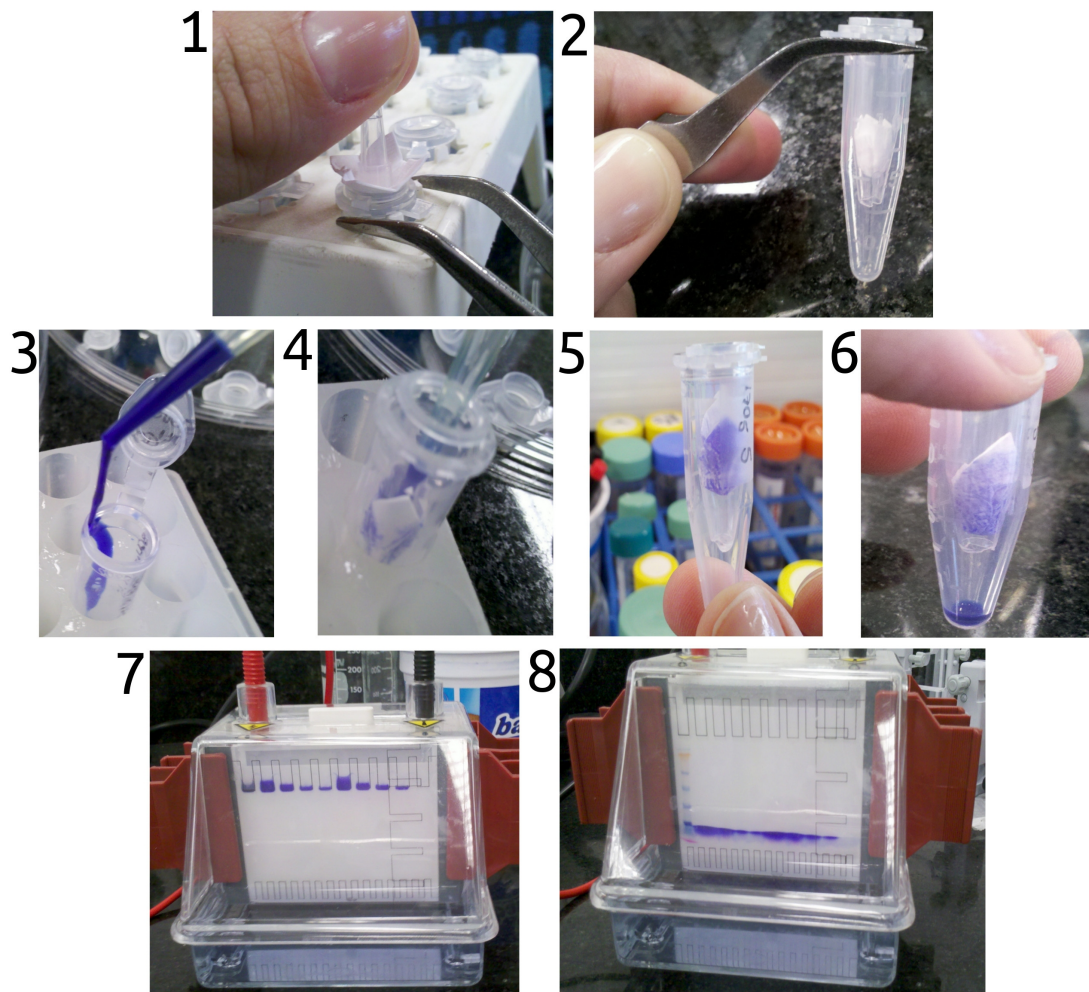


Figura 3.3.1 – Fotos das etapas de tratamento de amostras viscosas para serem aplicadas em SDS-PAGE. 1 e 2. Encaixe do disco de fibra de vidro em um tubo de polipropileno de 0,5 mL sem o fundo posicionado no interior de outro tubo de 1,5 mL, ambos sem a tampa; 3. Exemplo de amostra viscosa; 4 e 5. Adição da amostra ao tubo de 0,5 mL; 6. Amostra devidamente filtrada após centrifugação; 7. Amostras aplicadas no gel e; 8. Acompanhamento da migração eletroforética (sistema Amersham Biosciences).

A migração eletroforética foi monitorada até que o corante azul presente nas amostras saísse do gel. Posteriormente, este foi incubado em solução corante A₃ (tabela 3.3.2) por 2 horas, lavado com água e incubado por 30 minutos, ou até que revelasse nitidamente as bandas de proteínas, em solução descorante A₄ (tabela 3.3.2) e devidamente documentado.

Tabela 3.3.2 – Composição das soluções empregadas na eletroforese de proteínas.

Eletroforese de proteínas	A ₁	100 mM tris-HCl pH 6,8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% azul de bromofenol, 20% glicerol
	A ₂	125 mM tris-HCl, 960 mM glicina, 0,5% SDS
	A ₃	0,25% Comassie Brilliant Blue R-250, 50% metanol, 10% ácido acético
	A ₄	50% metanol, 10% ácido acético

3.4 Expressão e purificação dos mutantes

Os clones positivos e as melhores condições de expressão definidas na etapa anterior (item 3.3), foram selecionados para o aumento da escala de expressão. A produção de proteína em maior escala consistiu na propagação dos clones positivos em dois frascos de 2 L contendo 500 mL de meio LB ou M9 cada e 50 µg/mL canamicina, nas mesmas condições descritas anteriormente (item 3.3). A indução foi feita com a adição de 500 mL de meio com IPTG e suplementos aos 500 mL de cultura iniciais. Após 20 horas de indução, a cultura foi centrifugada em tubos de 1L a 4000 g por 30 minutos a 4 °C (centrífuga Thermo Scientific™ Sorvall™ RC 3BP Plus). O sedimento obtido foi pesado com a finalidade de verificar o rendimento da massa celular colhida, e ressuspenso com 15 mL tampão B₁ (tabela 3.4.1) gelado. Nesta etapa, as células foram centrifugadas novamente, 3600 g por 20 minutos a 4 °C em tubos de 50 mL, e armazenadas a -20 °C para que sejam submetidas ao protocolo de purificação de proteína em outro momento.

No protocolo de purificação utilizado, lisozima (1 mg/mL) e PMSF (1 mM) são adicionados à suspensão de células que é incubada em gelo por 30 minutos em seguida. Após esse período, as células foram rompidas em Sonic Dismembrator (Fisher Scientific™) usando 6 ciclos de 15 s lise e 15 s resfriamento alternados, ou French Press (Thermo Scientific™) usando 2 ciclos de 30 s a 2000 psi. O lisado obtido foi centrifugado a 13000 g por 40 minutos a 4 °C (centrífuga Sorvall™ RC 5C Plus). Para verificar a partição do produto de expressão entre a porção solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento celular), 20 µL do sobrenadante e do sedimento ressuspenso em 15 mL B₁, foram coletados e fervidos com 20 µL do tampão A₁ durante 5 minutos e analisados em SDS-PAGE

15% como descrito anteriormente (item 3.3).

Com a finalidade de retirar o agente quelante (EDTA) para que este não interfira na etapa da cromatografia por afinidade, o sobrenadante obtido após a centrifugação foi submetido à diálise em membrana com poros de 12 - 14 kDa (Spectra/Por[®]) contra tampão B₂ (tabela 3.4.1), em sala climatizada a 4 °C por 16 horas. Após a diálise da fração solúvel, esta foi filtrada em membrana de 45 µm e submetida à cromatografia de afinidade em cromatógrafo Äkta[®] (GE Healthcare[™]). Todas as soluções utilizadas nessa etapa foram previamente filtradas em membrana de 45 µm e deaeradas.

Uma vez que as proteínas recombinantes possuem uma cauda com 6 histidinas, estas podem ser capturadas em um sistema cromatográfico de afinidade, no qual a 6xHis liga-se aos átomos de níquel presentes na resina (Ni²⁺-agarose). Posteriormente a proteína pode ser eluída com a aplicação gradual de imidazol, um agente que compete com as histidinas pela ligação com níquel. Desta forma, a fração solúvel, dialisada e filtrada, foi aplicada com o auxílio de um *loop* de 50 mL em fluxo constante de 2 mL/min em coluna contendo 10 mL de resina Ni-NTA (QIAGEN[™]) previamente equilibrada com 10 VC (Volumes de Coluna) de tampão B₂ (tabela 3.4.1). As proteínas não ligadas ou fracamente ligadas à resina foram retiradas na primeira etapa de lavagem com 5 VC de tampão B₃ (tabela 3.4.1) e a proteína recombinante foi eluída com uma mistura linear de tampão B₃ com B₄ (tabela 3.4.1), gerando um gradiente de imidazol de 10 mM a 510 mM. A eluição da proteína foi monitorada espectrofotometricamente a 280 nm.

Tabela 3.4.1 – Composição dos sistemas tamponantes empregados na purificação das proteínas.

Tampões de purificação	B ₁	50mM tris-HCl pH 7,4, 200mM NaCl, 5mM EDTA
	B ₂	50mM tris-HCl pH 7,4, 200mM NaCl
	B ₃	50mM tris-HCl pH 7,4, 200mM NaCl, 10mM imidazol
	B ₄	50mM tris-HCl pH 7,4, 200mM NaCl, 500mM imidazol

Com a finalidade de retirar o imidazol do eluato, todas as proteínas foram concentradas até 200 µL em concentradores Centricom[®] com corte de 10 kDa (Millipore[™]), ressuspendidas em 20 mL tampão A₂ e concentradas novamente por 3 vezes, resultando em um fator de diluição do imidazol de mil vezes a cada etapa. Para a clivagem das caudas acessórias presentes nas proteínas recombinantes, estas foram incubadas por 16 horas em câmara ambientada a 4 °C em agitador rotatório com 5 U de trombina (GE Healthcare[™]) a cada 1mg de proteína fusionada para proteólise

da caudas 6xHis.

As proteínas foram concentradas novamente e submetidas à cromatografia de exclusão molecular (SEC, do inglês, *Size Exclusion Chromatography*), em coluna Superdex 75 10/300 GL® (GE Healthcare Lifesciences™). Finalmente, as frações obtidas por SEC foram concentradas novamente, fracionadas e estocadas a -80 °C com 20% glicerol ou mantidas a 4 °C para análises subsequentes.

As frações obtidas a partir dos processos cromatográficos e de clivagem das caudas foram analisadas em SDS-PAGE (15%). A quantificação do produto final identificado na análise do gel, proteína concentrada sem a cauda de histidina, foi feita em espectrofotômetro NanoDrop 1000® (Thermo Scientific™) a 280 nm, usando como referência o tampão da proteína. Para tanto, a ferramenta PROTPARAM disponível no servidor ExPASy (93), foi utilizada para calcular o coeficiente de extinção molar teórico em 280 nm de cada proteína.

3.5 Expressão e purificação da TrMnSOD

A expressão e purificação desta proteína foi realizada como descrito anteriormente nos itens 3.3 e 3.4. Por possuir cauda 6xHis-SUMO, após a purificação 0,6 mg/mL Ulp1p são adicionados à proteína fusionada para proteólise das cauda.

3.6 Substituição do metal por diálise

Com o intuito de trocar o metal ligado ao sítio ativo das SODs, três etapas de diálise extensiva foram realizadas (94). Na primeira etapa, o metal foi retirado dialisando-se a proteína purificada e concentrada em bolsa de diálise com poros de 10 kDa contra o tampão contendo EDTA em sala climatizada a 4 °C. Três diferentes sistemas tamponantes foram testados para comparar a eficiência de retirada do metal e a estabilidade da proteína (tampões B₁, C₁ ou C₂, descritos na tabela 3.6.1). Na segunda etapa, o excesso de EDTA é retirado por meio da diálise do conteúdo da bolsa em tampão sem o agente quelante (tampões B₂, C₃ ou C₄, descritos na tabela 3.6.1). Na terceira etapa, o metal de interesse foi reconstituído com 0,1 mM dos sais MnCl₂ ou FeSO₄ acrescentados aos tampões B₂, C₃ ou C₄. Quando o tampão acetato (C₃) foi usado, uma quarta etapa de diálise foi feita para trocar este tampão por Tris (B₂) ou PBS (C₄).

Tabela 3.6.1 – Composição dos sistemas tamponantes empregados na diálise para retirada e substituição do metal.

Tampões de diálise	C ₁	7,5 mM acetato de sódio pH 3,8, 5mM EDTA
	C ₂	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ , 5mM EDTA, pH 7,4
	C ₃	7,5 mM acetato de sódio pH 3,8
	C ₄	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4

Outra abordagem para produção das apo-enzimas empregou um protocolo de desnaturação com 3,5 M Guanidina HCl pH 3,5 contendo 10 mM EDTA (95).

3.7 Atividade de SOD

3.7.1 Atividade em gel

A atividade superóxido dismutásica medida em gel é um método amplamente utilizado para verificar qualitativamente a atividade de SOD (13,96). Neste a solução corante D₁ foi adicionada às proteínas que em seguida foram submetidas à eletroforese em condições não desnaturantes (10% PAGE) sob condições não desnaturantes utilizando tampão de cuba D₂ (tabela 3.7.1), em sala climatizada a 4 °C. Com a conclusão da migração eletroforética, os géis foram recuperados e incubados em solução corante D₃ por 20 minutos ao abrigo da luz. Após esse período, a solução corante foi descartada e a revelação foi feita expondo o gel à luz em transluminador.

Tabela 3.7.1 – Composição das soluções empregadas no método de análise de atividade superóxido dismutásica em gel.

Eletroforese de proteínas em condições não desnaturantes	D ₁	100 mM tris-HCl pH 6,8, 0,2% azul de bromofenol,
	D ₂	125 mM tris-HCl, 960 mM glicina
	D ₃	0,025% MTT, 0,01% riboflavina, 1% TEMED

Em, aproximadamente, 15 minutos o gel muda sua coloração, de amarelo para roxo,

representando a redução do MTT (sal brometo de 3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) nas regiões onde houve geração de radical livre, a reação pode ser interrompida mergulhando-se o gel em água. As bandas acromáticas representam a presença de superóxido dismutases que retiraram o radical superóxido evitando a redução do MTT prevenindo a formação da formazana de cor azulada.

3.7.2 Atividade por espectrofotometria

O princípio deste ensaio é o mesmo citado no item 3.6.1, também determina a atividade da SOD indiretamente. Este avalia a inibição da conversão de xantina a ácido úrico pela xantina oxidase (Figura 2) (97), reação produtora de íons superóxido que reagem com o sal de tetrazólio WST-1 (2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazólio), o qual produz uma formazana altamente solúvel que pode ser determinada colorimetricamente a 450 nm (98). Os reagentes usados foram providos pelo *SOD Determination kit* (Sigma-Aldrich - 19160) e o experimento foi feito de acordo com as instruções do fabricante. As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices™).

3.8 Estabilidade térmica por Fluorescência para TrMnSOD

Esta técnica que permite análise local da região em torno de resíduos de triptofano, através do monitoramento da emissão de fluorescência deste aminoácido em função da temperatura; permite também inferir a mudança conformacional da estrutura terciária da proteína no curso da desnaturação. Para tanto, as medidas foram realizadas em um espectrofluorímetro modelo ISS – K2 (ISS, IL, USA) do Laboratório de Biofísica Molecular (IFSC – USP). 5 µL de amostra contendo 2 mg/mL de proteína em tampão PBS (C₂ sem EDTA) foi adicionada a uma cubeta retangular de quartzo com caminho ótico de 0,5 cm e excitada em 295 nm. A emissão foi monitorada no intervalo de 310 nm a 450 nm em diferentes temperaturas (10, 18, 25, 30, 37, 45 e 65 °C).

3.9 Cristalografia de raios-X

3.9.1 Monodispersão das amostras

Visando identificar uma condição em que a proteína estivesse solúvel, homogênea e

monodispersa, empregou-se o uso da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, do inglês, *Dynamic Light Scattering*). Esta ferramenta permite avaliar a estabilidade da proteína frente a diferentes parâmetros, fazendo-se importante na triagem de solventes suscetíveis ou não a conduzir a formação de cristais (99). As amostras previamente centrifugadas, foram aplicadas em uma cubeta de quartzo de 12 μL com caminho óptico de 1,5 mm e as medidas foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano Series – Zetasizer μV (Malvern™).

3.9.2 Ensaio de cristalização

Para a obtenção de cristais dos mutantes para difração de raios-X e padronização das condições de cristalização da TbFeSODB2, foram realizados ensaios automatizados de cristalização com o equipamento *Honeybee 931* (*Genomic Solutions Inc.*) utilizando a técnica de difusão de vapor por gota depositada. As placas utilizadas continham 96 poços, cada um com 3 poços menores para deposição das gotas, desta forma três amostras foram submetidas simultaneamente a mesma condição. Cada gota consistiu de 0,9 μL da condição do poço e 0,9 μL de proteína a 8 mg/mL em tampão A₉. Os kits utilizados foram Classics, Classics II e PEGs II (QIAGEN) e INDEX HT (Hampton Research). As placas foram posteriormente armazenadas em sala climatizada a 18°C.

Com o intuito de padronizar as condições de obtenção dos cristais e estabelecer um protocolo de reprodutibilidade, diversas variações das condições iniciais foram testadas. Após a determinação das condições promissoras e são para obtenção de cristais a otimização destas foi feita empregando-se a técnica de difusão de vapor por gota suspensa com o ajuste das concentrações de sal, precipitante e pH dos tampões. As condições já descritas para a TbFeSODB2 (90) também foram repetidas para esta proteína e seus mutantes.

Quando necessário, algumas formações presentes (esferólitos) foram maceradas com a ferramenta *Crystal Crusher HR4-216* (Hampton Research) e utilizadas como sementes para a obtenção de novos cristais por meio da técnica de *Seeding* (100). Esta técnica permite o uso de núcleos formados para propagação de cristais nas condições originais (*Macro Seeding*) (100), ou em condições de cristalização diversas (*Micro Seeding*) (101). A primeira técnica foi utilizada em combinação com a de *Streak Seeding*, na qual as sementes são coletadas com a ferramenta *Seeding Tool HR8-133* (Hampton Research) e passadas em gotas de condições recém preparadas, com menor concentração de reagentes e proteína.

Os cristais obtidos foram transferidos para uma solução crioprotetora contendo as mesmas condições do poço e 20% PEG, em seguida foram congelados e armazenados em nitrogênio líquido.

3.9.3 Coleta das imagens de difração e processamento do dados

As imagens de difração foram coletadas na estação I24 do Diamond Light Source em Oxfordshire Inglaterra. Os dados pré-processados disponíveis na base de dados ISPyB (*Information System for Protein crystallography Beamline*) foram utilizados para as análises posteriores. Os programas empregados neste processamento foram MOSFLM (102) e SCALA (103). O conteúdo da unidade assimétrica foi estimado pelo Coeficiente de Matthews empregando-se o programa Matthews Coef (104,105). Todos os programas estão inclusos no pacote CCP4 (106).

3.9.4 Substituição molecular, refinamento e validação estrutural

Dentre os métodos para a resolução do problema das fases em cristalografia, a Substituição Molecular (MR, do inglês, *Molecular Replacement*) pode ser utilizada quando já existe um modelo tridimensional que seja sequencial e estruturalmente semelhante à proteína alvo do estudo. O programa Chainsaw (107) foi utilizado para preparar o modelo utilizando um alinhamento entre a sequência da proteína alvo e o modelo para editar o arquivo que possui as coordenadas atômicas da estrutura (arquivo PDB), removendo resíduos não alinhados ou parte da cadeia lateral (até C γ), facilitando a reconstrução estrutural posteriormente. A substituição molecular empregou arquivo PDB editado pelo Chainsaw e os dados experimentais como entrada para o programa Molrep (108).

Os programas Phenix (109) Refmac (110) e Coot (111) foram empregados no refinamento da estrutura. A validação foi feita por meio da avaliação dos parâmetros de R e R_{free} pelo programa MolProbity (112) e da estereoquímica pelo programa Procheck (113). Exceto o Phenix, todos os outros programas estão inclusos no pacote CCP4 (106). As imagens foram geradas pelos programas Pymol (114) e Chimera (115).

3.10 Ressonância Paramagnética Eletrônica

Com a finalidade de verificar o ambiente no qual se encontram os átomos de metal presentes nas proteínas-alvo, foi empregada a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR, do inglês, *Electron Paramagnetic Resonance*). A técnica é capaz de detectar apenas espécies com *spins* desemparelhados, sendo indicada para análise de alguns estados de oxidação de metais como ferro e manganês (116).

Cerca de 80 μ M de cada amostra foi congelada em hélio líquido em tubo de quartz de 4 mm e submetida a análise em EPR-CW (CW, do inglês, *Continuous Wave*) na qual apenas o campo

aplicado varia (50 a 400 mT) e a frequência é mantida constante. Os experimentos foram realizados em espectrômetro Bruker-ELEXSYS E580 equipado com cavidade retangular em modo CW com frequência de 9,5 GHz (banda X) e sistema criogênico Oxford ITC503. Idealmente os espectros foram obtidos a 10K, porém variações de temperatura foram inevitáveis em alguns experimentos, amplitude de modulação de 0,1 mT, potência de micro-onda 10 mW com atenuação de 13 dB e tempo de conversão de 20,48 ms.

Os espectros foram gerados empregando-se o programa Gnuplot (117) e o processamento dos dados para obtenção das relações entre diferentes populações em um mesmo espectro foi feita com o programa Octave (118).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Predição das mutações por Análise de Acoplamento Estatístico

O alinhamento final de 964 sequências, consistindo em um incremento de 462 sequências em relação à análise feita em 2008 (90), quando submetido às análises de acoplamento estatístico retornou resultado similar ao obtido anteriormente. Os mesmos grupos de aminoácidos correlacionados já descritos foram encontrados na presente análise que diferiu somente em relação ao maior número de sequências disponíveis para a construção do alinhamento.

O resultado desta análise permitiu a predição de seis resíduos correlacionados entre enzimas de ferro e manganês que encontram-se nas posições 25, 71, 72, 145, 159 e 170. Nestas posições, a frequência de alguns aminoácidos é maior dependendo da especificidade por metal da SOD, por exemplo, valina é mais frequente na posição 25 para FeSODs enquanto metionina é mais frequente para MnSODs nesta mesma posição. Os resíduos correlacionados para as 6 posições encontram-se listados na tabela 4.1.1.

Tabela 4.1.1 – Posições relevantes para resíduos estatisticamente acoplados para enzimas de ferro ou de manganês.

Posição	SOD	
	Fe	Mn
25	Valina (V)	Metionina (M)
71	Alanina (A)	Glicina (G)
72	Glutamina (Q)	Glicina (G)
145	Alanina (A)	Glutamina (Q)
159	Alanina (A)	Glicina (G)
170	Aspartato (D)	Glutamina (Q)

Esses resíduos foram mapeados em um alinhamento de sequências de aminoácidos contendo 18 SODs de ferro e 16 de manganês com estruturas disponíveis no PDB (Figuras 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3). O alinhamento permitiu verificar uma variação entre valina e leucina na posição 25 para FeSODs enquanto que MnSODs possuem predominantemente metionina na mesma posição, como mostra a figura 4.1.1.

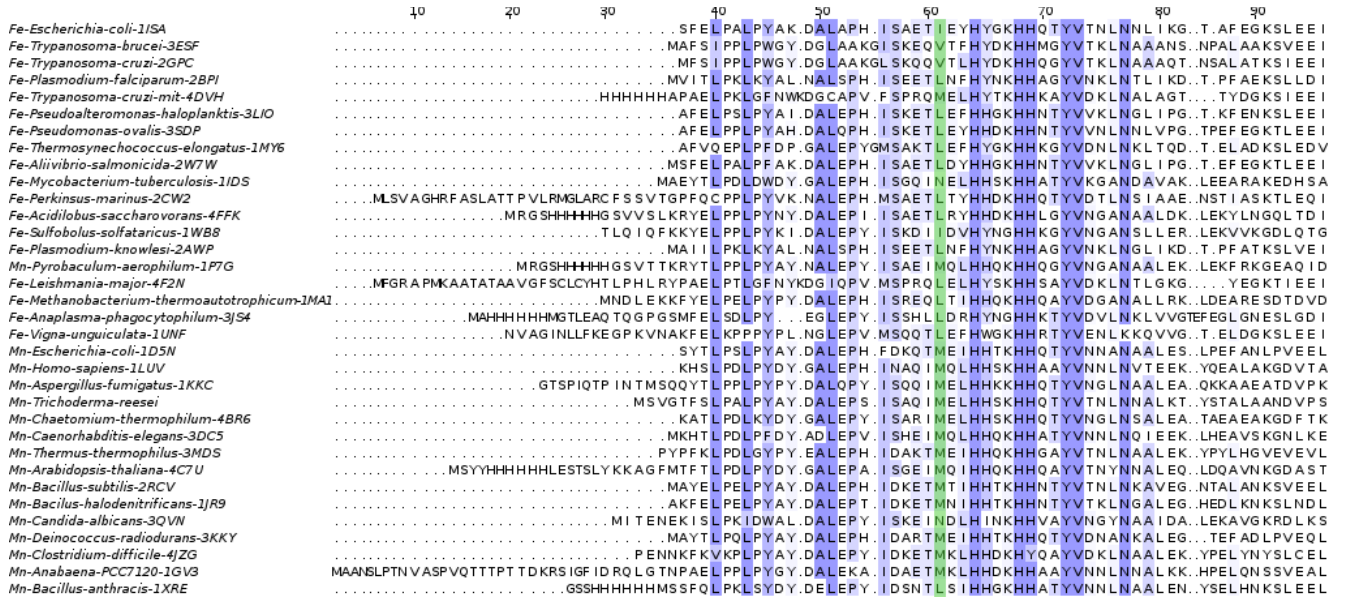


Figura 4.1.1 – Fragmento que compreende as posições de 1 a 96 do alinhamento de seqüências de aminoácidos entre 18 SODs de ferro (Fe) e 16 de manganês (Mn). Em cada uma das seqüências, o código PDB segue o nome do organismo. Os resíduos destacados em tons de azul representam o nível de conservação, gerado pelo modelo BLOSUM 62, sendo que a intensidade de cor é diretamente proporcional a este atributo. A posição 25 encontra-se destacada em verde.

As posições 71 e 72 destacadas em verde na figura 4.1.2, uma continuação do alinhamento apresentado na figura 4.1.1, apresentam maior conservação em ambas as enzimas de ferro ou manganês, possuindo predominantemente alanina no primeiro caso ou glicina no segundo caso.

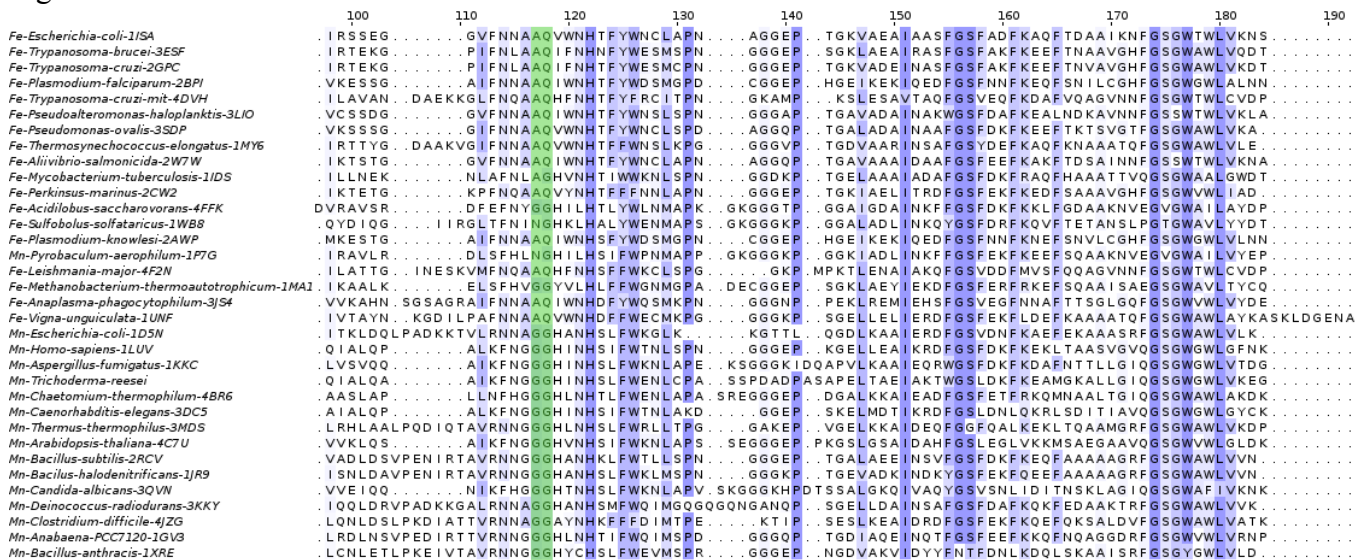


Figura 4.1.2 – Fragmento que compreende as posições de 97 a 192 do alinhamento de seqüências de aminoácidos entre 18 SODs de ferro (Fe) e 16 de manganês (Mn). Em cada uma das seqüências, o código PDB segue o nome do organismo. Os resíduos destacados em tons de azul representam o nível de conservação, gerado pelo modelo BLOSUM 62, sendo que a intensidade de cor é diretamente proporcional a este atributo. As posições 71 e 72 encontra-se destacadas em verde.

O mesmo padrão de conservação pode ser observado para as posições 145, 159 e 170 na figura 4.1.3, na qual encontra-se a porção final do alinhamento apresentado anteriormente nas figuras 4.1.1 e 4.1.2.

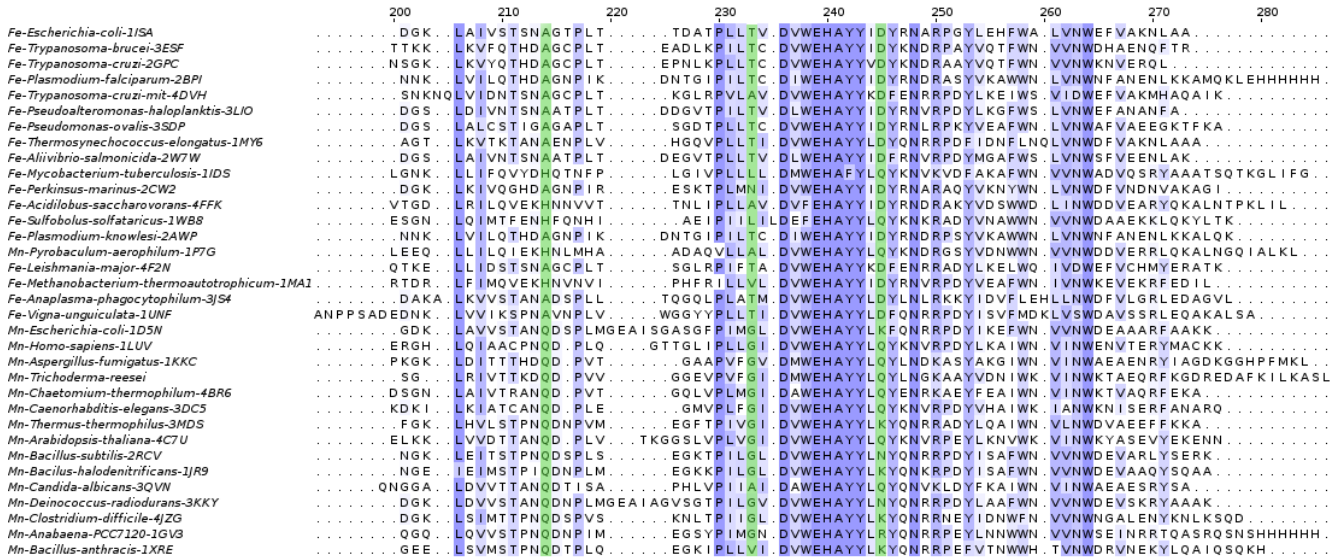


Figura 4.1.3 – Fragmento que compreende as posições de 193 a 286 do alinhamento de sequências de aminoácidos entre 18 SODs de ferro (Fe) e 16 de manganês (Mn). Em cada uma das sequências, o código PDB segue o nome do organismo. Os resíduos destacados em tons de azul representam o nível de conservação, gerado pelo modelo BLOSUM 62, sendo que a intensidade de cor é diretamente proporcional a este atributo. As posições 145, 159 e 170 encontra-se destacadas em verde.

O alinhamento representa, de forma resumida e com relevância estatística muito reduzida quando comparado à SCA, o intercâmbio de resíduos nas posições 25, 71, 72, 145, 159 e 170 entre enzimas de ferro ou manganês.

Ainda que cumpram a mesma função, resíduos podem ser encontrados em posições distintas devido à variações na sequência do gene da SOD em cada organismo, resultando em uma diferença de numeração. As posições dos resíduos que desempenham a mesma função, em quatro sequências de genes e na sequência consenso obtida no alinhamento mostrado anteriormente, são listadas nas tabelas 4.1.1 e 4.1.2 SODs de ferro e manganês, respectivamente. Esses resíduos são perfeitamente conservados, sendo quatro deles envolvidos na coordenação do metal no sítio ativo e os outros três na interface dimérica. A interação entre as cadeias do dímero ocorre por meio de duas pontes salinas (E^{159} e H^{160}) e duas ligações de hidrogênio (Y^{163} e H^{30}).

Tabela 4.1.1 – Resíduos presentes no sítio catalítico e na interface dimérica das FeSODs com suas numerações para quatro organismos e para o alinhamento das figuras 4.1.1 – 4.1.3.

FeSODs					
Origem da sequência	Alinhamento	<i>E. coli</i>	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>P. falciparum</i>
Código PDB	-	1ISA	3ESF	2GPC	2BPI
Resíduos do sítio catalítico	64	H ²⁶	H ²⁸	H ²⁷	H ²⁷
	122	H ⁷³	H ⁷⁶	H ⁷⁵	H ⁷⁴
	235	D ¹⁵⁶	D ¹⁶¹	D ¹⁶⁰	D ¹⁵⁸
	240	H ¹⁶⁰	H ¹⁶⁵	H ¹⁶⁴	H ¹⁶²
Resíduos da interface dimérica	68	H ³⁰	H ³²	H ³¹	H ³¹
	238	E ¹⁵⁹	E ¹⁶⁴	E ¹⁶³	E ¹⁶¹
	242	Y ¹⁶³	Y ¹⁶⁸	Y ¹⁶⁷	Y ¹⁶⁵

Tabela 4.1.2 – Resíduos presentes no sítio catalítico e na interface dimérica das MnSODs com suas numerações para quatro organismos e para o alinhamento das figuras 4.1.1 – 4.1.3.

MnSODs					
Origem da sequência	Alinhamento	<i>E. coli</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>T. reesei</i>
Código PDB	-	1D5N	1LUV	1KKC	Não possui
Resíduos do sítio catalítico	64	H ²⁶	H ²⁶	H ⁴⁰	H ³⁰
	122	H ⁸¹	H ⁷⁴	H ⁸⁸	H ⁷⁸
	235	D ¹⁶⁷	D ¹⁵⁹	D ¹⁷⁴	D ¹⁶³
	240	H ¹⁷¹	H ¹⁶³	H ¹⁷⁸	H ¹⁶⁷
Resíduos da interface dimérica	68	H ³⁰	H ³⁰	H ⁴⁴	H ³⁴
	238	E ¹⁷⁰	E ¹⁶²	E ¹⁷⁷	E ¹⁶⁶
	242	Y ¹⁷⁴	Y ¹⁶⁶	Y ¹⁸¹	Y ¹⁷⁰

A investigação estrutural dos resíduos presentes nessas posições na TbFeSODB2 e nos modelos de proteínas com trocas de aminoácidos, indica que eles fazem parte de uma segunda camada de resíduos ao redor do sítio catalítico. Não influenciam diretamente a atividade catalítica, mas modificam o ambiente local e poderiam modular a especificidade por metal (Figura 4.1.4). Cada modelo gerado possui apenas uma troca de resíduo, as mutações foram feitas manualmente na sequência de aminoácidos que e em seguida foram submetidas aos programas Modeller e I-Tasser (119) para geração dos modelos, utilizando como base a estrutura da TbFeSODB2 (código PDB: 3ESF).

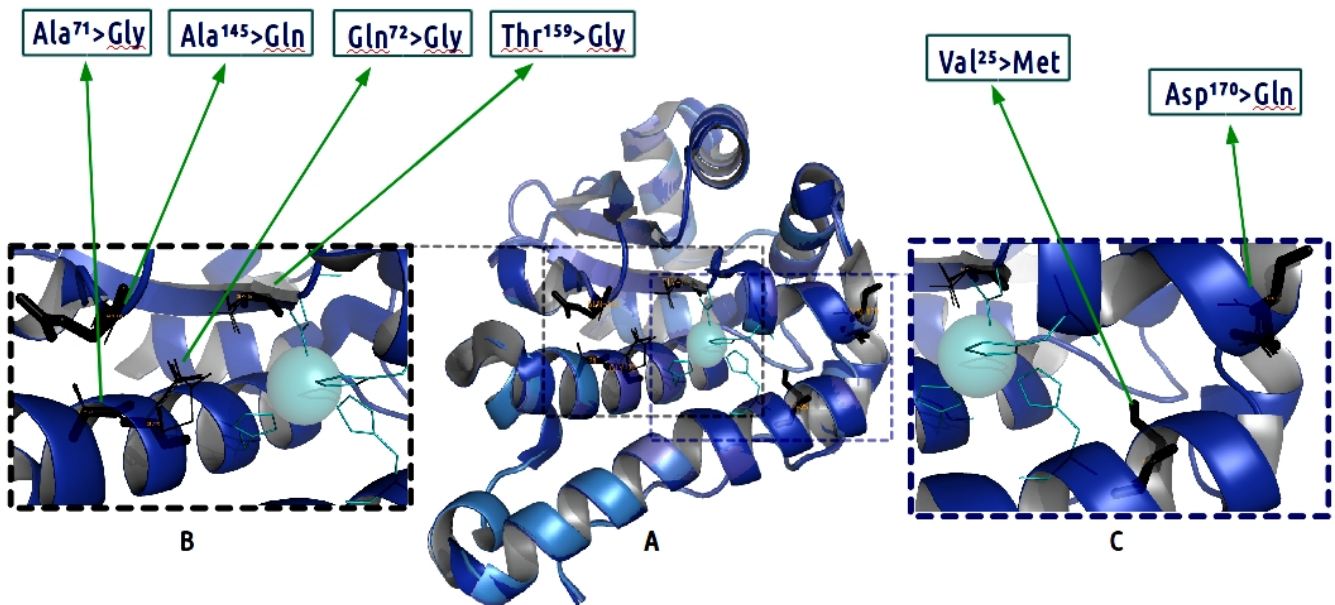


Figura 4.1.4 – Representação das posições 25, 71, 72, 145, 159 e 170 em um monômero da TbFeSODB2. (A) Resíduos originalmente encontrados na TbFeSODB2 e os mutantes pontuais dos 6 modelos gerados por homologia representados em traços mais finos, todos destacados em preto, o átomo de ferro é representado por uma esfera e os resíduos ligados a ele (H^{28} , H^{76} , D^{161} e H^{165}) encontram-se em azul claro. (B) Ênfase na região contendo as posições 71, 72, 145 e 159 com as mutações sugeridas. (C) Ênfase na região contendo as posições 25 e 170 e as mutações sugeridas. Figuras geradas com o programa Pymol (114).

4.2 Expressão e purificação da TbFeSODB2 e seus mutantes

Após a transformação dos genes em *E. coli* BL21, os clones positivos foram selecionados e estocados à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os diversos ensaios de expressão para otimização das condições envolveram principalmente modificações do método que aumentassem a solubilidade das proteínas expressas. Apesar da indução bem sucedida (figura 4.2.1 A), as condições de expressão iniciais não favoreciam a produção de proteínas solúveis. Quando expressas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou na ausência de metal, as proteínas eram encontradas na fração insolúvel do particionamento realizado por centrifugação (figura 4.2.1 B).

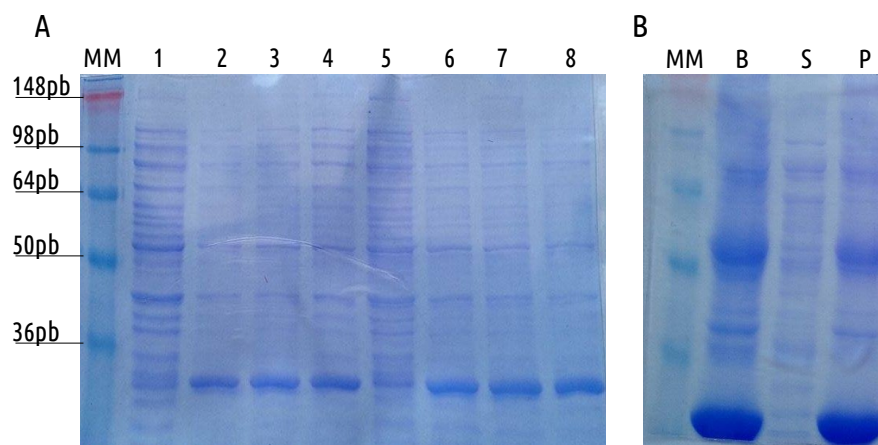


Figura 4.2.1 – Padrões de migração comuns à TbFeSODB2 e os mutantes em gel poliacrilamida SDS-PAGE 15%. O gel à esquerda (A) mostra o perfil da cultura de dois clones positivos antes da indução (1 e 5) e após 3, 6 e 20 horas da indução (2 e 6, 3 e 7, 4 e 8, respectivamente). O gel à direita (B) mostra a partição da proteína contida no extrato bruto (B) entre o sobrenadante (S) e o sedimento (P) após a centrifugação. MM representa o marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 LC5925 (Invitrogen).

Com a redução sistemática da temperatura, da concentração de IPTG e com a adição do metal, a expressão das enzimas foi gradativamente otimizada. As condições de expressão que retornaram melhores resultados foram envolveram a indução com 0,1 mM IPTG, 0,1 mM do sal de metal, a 20 °C por 20 horas a 200 rpm. Esta condição de expressão foi estabelecida em colaboração com o professor Vitor Marcelo Silveira Bueno Brandão de Oliveira e o aluno Marcelo Yudi Icimoto, ambos da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

O aumento da escala de produção das proteínas foi realizado nessas condições sob coordenação do professor Richard Charles Garratt no Instituto de Física de São Carlos (IFSC – USP). As condições de expressão estabelecidas anteriormente foram reproduzidas em maior escala para que a quantidade de proteína produzida fosse suficiente para os ensaios de cristalização e de Ressonância Paramagnética Eletrônica. Cada proteína foi expressa em 1000 mL de cultura, divididos em dois frascos de 2000 mL.

A sedimentação celular foi lisado, centrifugado e o sobrenadante submetido ao protocolo padronizado de purificação de proteínas. Após diálise para a retirada do EDTA presente no tampão utilizado, esse material foi submetido à cromatografia de afinidade, a qual era feita inicialmente de forma manual. Afim de monitorar de forma mais efetiva este processo, a etapa cromatográfica passou a ser realizada em cromatógrafo Äkta. Foram feitas duas injeções de 15 mL de amostra e uma lavagem subsequente a cada injeção, a figura 4.2.2 mostra a eluição de proteínas não ligadas à resina Ni²⁺-agarose que foram eliminadas a cada lavagem. A proteína de interesse foi eluída com

um gradiente de imidazol que resultou no padrão de eluição mostrado no gráfico da figura 4.2.3. Os mutantes apresentaram padrão de eluição similar ao da enzima nativa, no qual são eluídos majoritariamente entre 250 e 350 mM de imidazol.

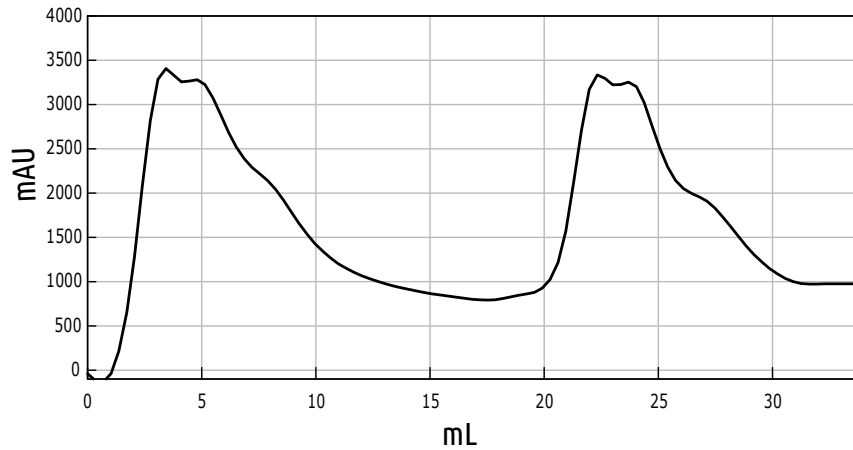


Figura 4.2.2 – Padrão de eluição gerado a partir das duas injeções de material lisado e as lavagens subsequentes.

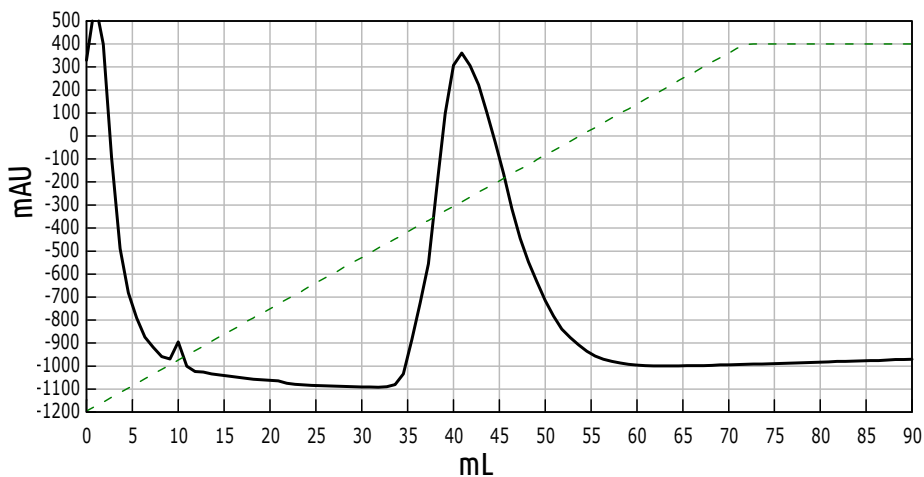


Figura 4.2.3 – Padrão de eluição gerado com o gradiente de imidazol, variando de 10 a 500 mM do reagente (reta tracejada em verde). A eluição dos mutantes se dá majoritariamente entre 250 e 350 mM de imidazol.

Após concentração e clivagem da cauda de histidina as proteínas foram submetidas à cromatografia de exclusão por tamanho, a qual resultou em um padrão de eluição similar entre os mutantes, como mostrado na figura 4.1.2.4.

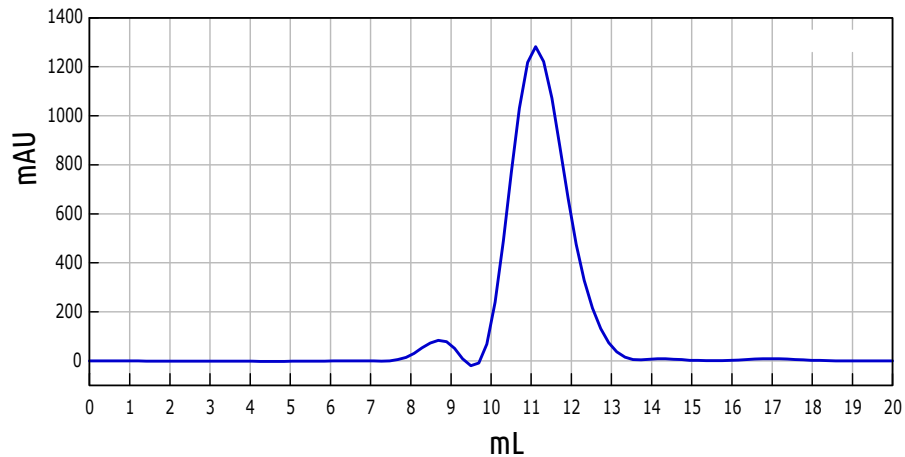


Figura 4.2.4 – Padrão de eluição gerado por cromatografia de exclusão por tamanho para a proteína nativa (TbFeSODB2) e seus mutantes.

Todas as etapas de purificação foram monitoradas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, no qual 20 μ L de amostra foram colocados em cada poço. A figura 4.2.5 mostra um gel de 15% poliacrilamida com o padrão de migração comum à TbFeSODB2 e os mutantes após a lise (B), sobrenadante recuperado após a centrifugação (S) e o sedimento (P), bem como a eluição das proteínas na etapa de purificação em 100, 250 e 500 mM de imidazol. A clivagem parcial e total com trombina é mostrada.

O padrão de migração da TbFeSODB2 e dos mutantes em gel de poliacrilamida SDS-PAGE após todas as etapas de purificação é apresentado na figura 4.2.6, no qual uma diluição de 1:20 da proteína concentrada foi aplicada em cada poço. É possível observar que o mesmo período de incubação usado para obtenção clivagem da cauda de histidina produziu produtos de clivagem parcial para os mutantes Q72G e A145G. Tais produtos foram eliminados em uma nova etapa de cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

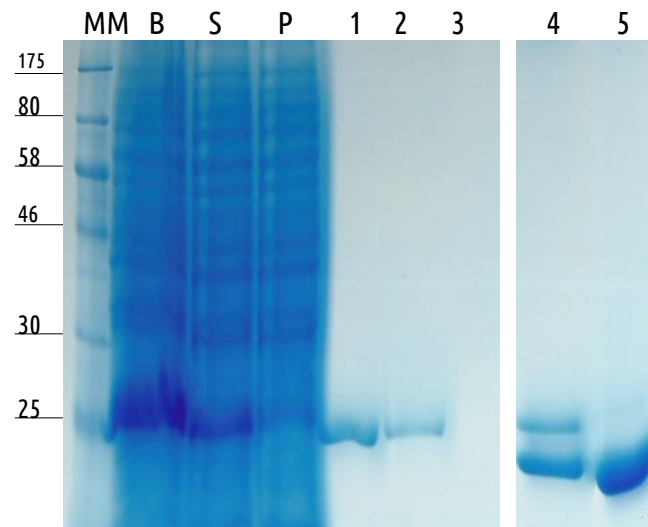


Figura 4.2.5 – Gel poliacrilamida SDS-PAGE 15% mostrando os padrões de migração comuns à TbFeSODB2 e os mutantes após a lise (B), sobrenadante recuperado após a centrifugação (S) e o sedimento (P). A eluição das proteínas em 250 (1), 350 (2) e 500 mM de imidazol (3). A clivagem parcial (4) e total (5) com trombina é mostrada. MM representa o marcador de massa molecular.

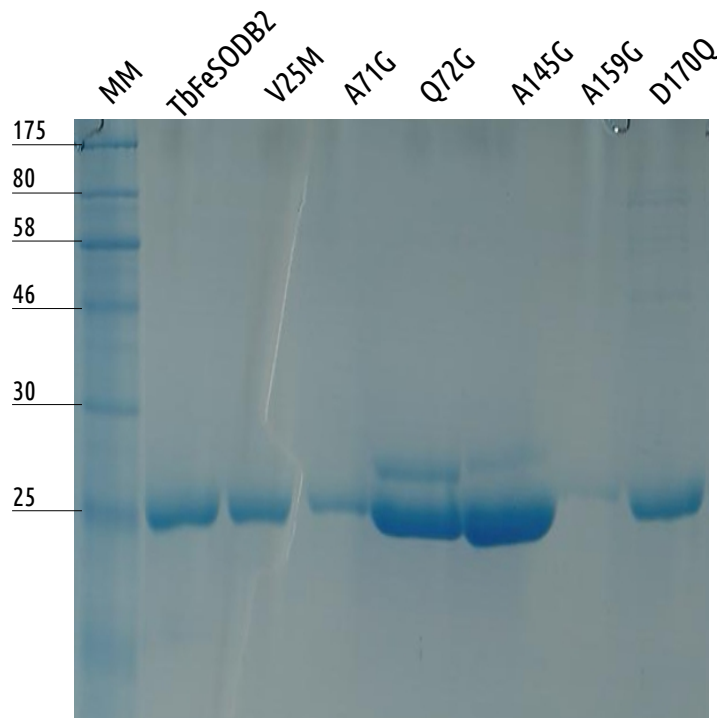


Figura 4.2.6 – Gel poliacrilamida SDS-PAGE 15% mostrando os padrões de migração da TbFeSODB2 selvagem e os mutantes (V25M, A71G, Q72G, A145G, A159G e D170Q), após a purificação, clivagem e cromatografia de exclusão por tamanho. MM representa o marcador de massa molecular.

O rendimento de cada cultura foi otimizado de forma que cada proteína resultou em um

rendimento suficiente para a realização das etapas posteriores de cristalização e ressonância. Todas as amostras foram quantificadas em Nanodrop, esse rendimento é mostrado na tabela 4.2.1.

Tabela 4.2.1 - Quantificação de proteínas produzidas em três condições, com ferro, manganês ou sem metal, após todas as etapas de purificação.

Proteína	Expressão com Ferro Quantificação(mg/mL)	Expressão com Manganês Quantificação(mg/mL)	Expressão sem Metal Quantificação(mg/mL)
TbFeSODB2	12,1	10,4	7
V25M	15,8	16,8	6,8
A71G	8	11,3	11,2
Q72G	7,4	11,5	7,6
A145G	10,2	13,4	10,4
A159G	10,1	13,7	9,4
D170Q	7,5	7,1	7,9

4.3 Expressão e purificação da TrMnSOD

Após a transformação do gene em *E. coli* BL21, os clones positivos foram selecionados e estocados à -80 °C. Os diversos ensaios de expressão para otimização das condições envolveram principalmente modificações do método que aumentassem a solubilidade das proteínas expressas. Apesar da indução bem sucedida (figura 4.3.1 A), as condições de expressão iniciais não favoreciam a produção de proteínas solúveis. Quando expressas a 37 °C ou na ausência de metal, as proteínas eram encontradas na fração insolúvel do particionamento realizado por centrifugação (figura 4.3.1 B).

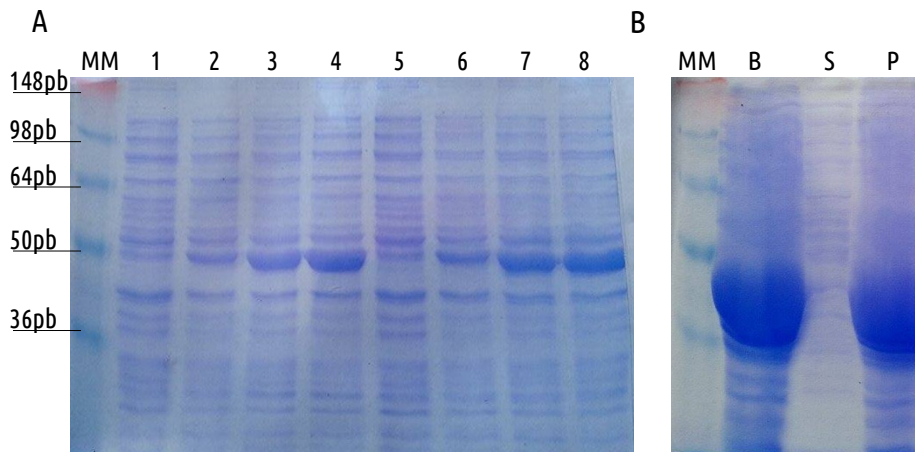


Figura 4.3.1 – Padrões de migração da TrMnSOD em gel poliacrilamida SDS-PAGE 15%. O gel à esquerda (A) mostra o perfil da cultura de dois clones positivos antes da indução (1 e 5) e após 3, 6 e 20 horas da indução (2 e 6, 3 e 7, 4 e 8, respectivamente). O gel à direita (B) mostra a partição da proteína contida no extrato bruto (B) entre o sobrenadante (S) e o sedimento (P) após a centrifugação. MM representa o marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 LC5925 (Invitrogen).

As etapas de purificação empregadas na obtenção da TbFeSODB2 e seus mutantes foram utilizadas na purificação da TrMnSOD. O padrão de eluição desta proteína em um gradiente de imidazol apresentou dois picos distintos e possivelmente estão relacionados à clivagem da cauda SUMO mesmo antes da adição de Ulp1p (Figura 4.1.3.2). Desta forma o padrão de eluição poderia mostrar dois picos referentes a dois tamanhos diferentes de TrMnSOD (com cauda e clivada).

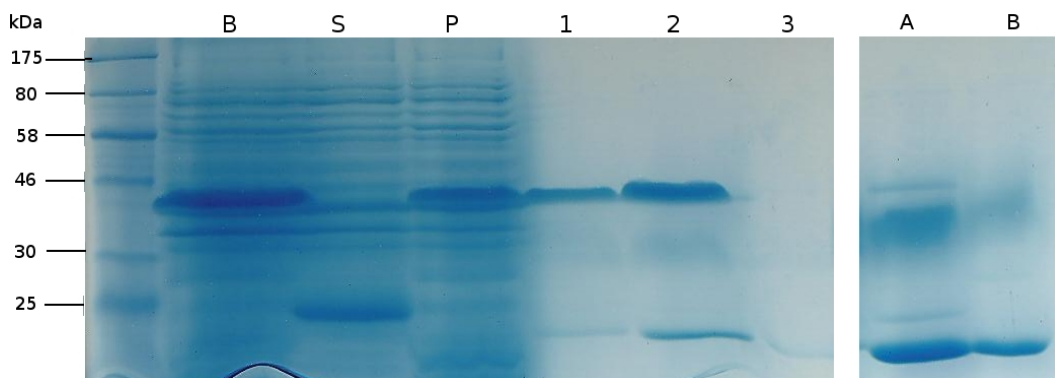


Figura 4.3.2 – Gel poliacrilamida SDS-PAGE 15% mostrando os padrão de migração da TrMnSOD após a lise (B), sobrenadante recuperado após a centrifugação (S) e o sedimento (P). A eluição das proteínas em 100 (1), 250 (2) e 500 mM de imidazol (3). A clivagem parcial (A) e total (B) com Ulp1p é mostrada.

4.4 Ensaios de atividade superóxido dismutásica

Todas as amostras foram submetidas aos ensaios de atividade, em gel e espectrofotométrico, com concentração de proteína e sistema tamponante iguais (50 µg de proteína em Tris-HCl pH 7,4).

Os dados obtidos por espectrofotometria empregaram o *SOD Determination kit* (Sigma-Aldrich – 19160) e o espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices™). A atividade superóxido dismutásica pode ser avaliada de acordo com a taxa de inibição da reação de produção de radicais superóxido. Dado que a relação entre a coloração gerada pela redução do sal de tetrazólio e a produção de radicais superóxido é linear, a taxa de inibição desta reação devido à captura dos radicais pela SOD pode ser calculada pela fórmula:

$$x = \frac{(S1-S3)-(SS-S2)}{S1-S3} \times 100$$

onde, x é a taxa de inibição (%), S1, S2, S3 e SS são o controle positivo, branco de amostra, controle negativo e amostra, respectivamente.

Utilizando o valor médio das triplicatas foi possível calcular a taxa de inibição da reação no ponto coletado aos 20 minutos de leitura (instruções do fabricante). A figura 4.4.1 mostra a taxa de inibição calculada para duas enzimas nativas, uma de ferro (TbFeSODB2) e outra de manganês (TrMnSOD), e para os mutantes da TbFeSODB2 expressos com ferro ou manganês. Todas as enzimas apresentaram maior atividade quando expressas na presença de manganês, inclusive a enzima nativa de ferro (TbFeSODB2). Destacam-se os valores obtidos para os mutantes A159G e D170Q que apresentaram atividade muito baixa quando expressos na presença de ferro e tem um aumento quando expresso na presença de manganês. Estudos anteriores mostraram que o resíduo presente da posição 159 teria a capacidade de modular a especificidade por metal mesmo estando a mais de 10Å a parte do sítio ativo (73). A mudança do resíduo na posição 159 pode deslocar a cadeia lateral do W¹²³ alterando o padrão de ligações de hidrogênio entre este e os resíduos Q⁷⁰ e Y³⁵.

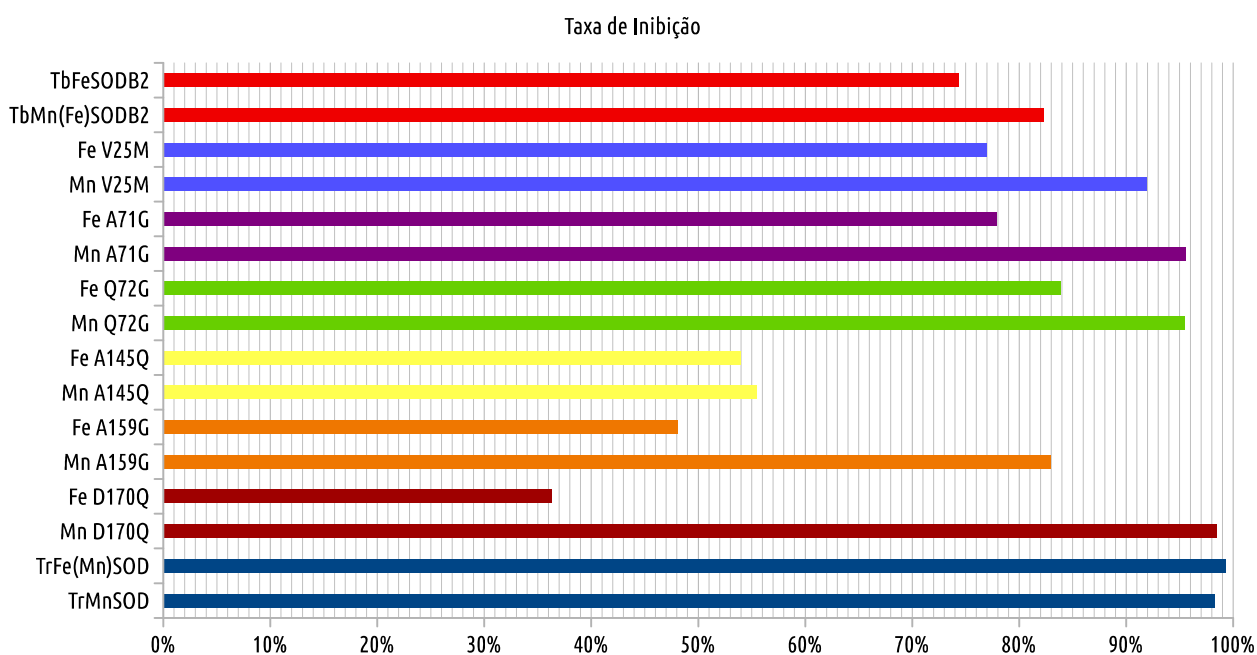


Figura 4.4.1 – Atividade das enzimas selvagens de ferro (TbFeSODB2) e manganês (TrMnSOD) e dos mutantes da TbFeSODB2. A taxa de inibição foi calculada a partir dos valores médios das triplicatas de cada amostra, coletados após 20 min.

O mutante A145G não apresenta variação importante entre os valores de inibição deste na presença de ferro ou manganês, porém ambos os valores encontram-se abaixo dos obtidos para as enzimas selvagens, sendo mais altos apenas em relação a FeD170Q ou FeA159G. O resíduo presente nesta posição tem participação na ligação com a molécula de água presente no sítio ativo, possivelmente a mutação deste resíduo apenas, sem que nenhum outro resíduo característico de enzimas de manganês pudesse dar suporte à catálise, prejudicou a atividade enzimática.

A partir da taxa de inibição também foi possível calcular a IC50, valor no qual a atividade atinge 50% de inibição da reação e que corresponde a 1 unidade de enzima. A tabela 4.4.1 lista a taxa de inibição para cada enzima e o valor de unidades correspondentes a 50 µg.

Tabela 4.4.1 – Taxas de inibição das enzimas nativas de ferro e manganês e para os mutantes da TbFeSODB2 expressos com ferro ou manganês

Proteína	Taxa de Inibição	U / 50 µg
TbFeSODB2	74%	1,48
TbMn(Fe)SODB2	82%	1,65
Fe V25M	77%	1,54
Mn V25M	92%	1,84
Fe A71G	78%	1,56
Mn A71G	96%	1,91
Fe Q72G	84%	1,68
Mn Q72G	95%	1,91
Fe A145G	54%	1,08
Mn A145G	55%	1,11
Fe A159G	48%	0,96
Mn A159G	83%	1,66
Fe D170Q	36%	0,73
Mn D170Q	98%	1,97
TrFe(Mn)SOD	99%	1,99
TrMnSOD	98%	1,96

Os ensaios de atividade em gel resultaram na presença de bandas acromáticas relacionadas à atividade de SOD. Amostras com duas populações de proteínas, algumas com ferro e outras com manganês, apresentaram duas bandas acromáticas. Esses géis com populações mistas, quando incubados com peróxido de hidrogênio 5 mM, após a eletroforese, apresentaram apenas uma banda que possivelmente trata-se de MnSODs, uma vez que FeSODs são inibidas na presença de peróxido de hidrogênio. A inibição da atividade das FeSODs está relacionada à decomposição do Trp¹⁵⁹, descrita para a enzima de *P. gingivalis* (120).

A atividade da enzima nativa de manganês (TrMnSOD) em gel é representada na figura 4.4.2.

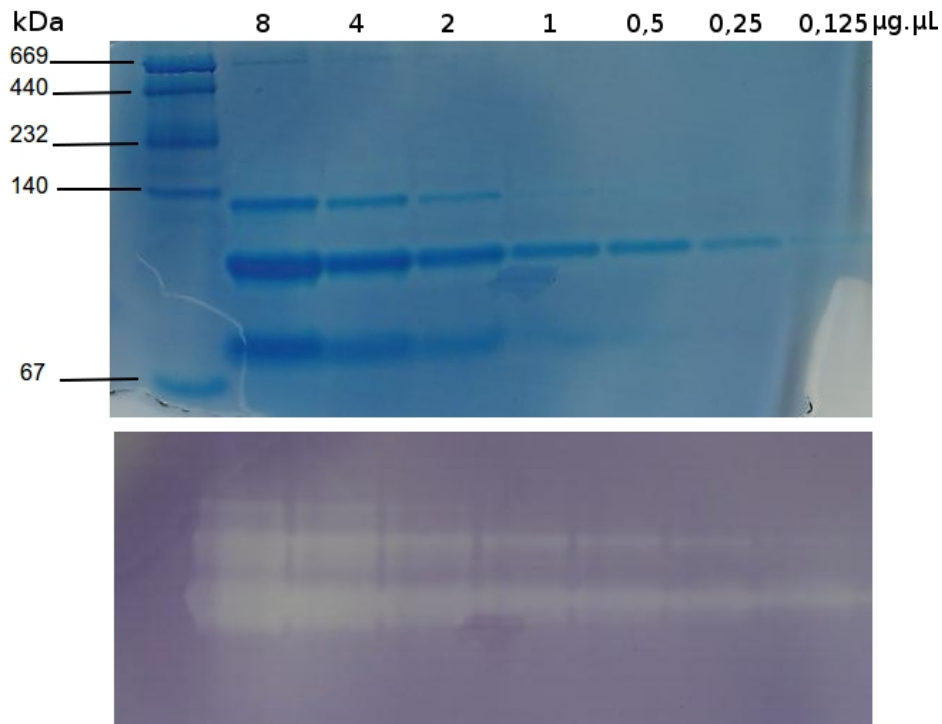


Figura 4.4.2 – Verificação de atividade superóxido dismutásica em gel de poliacrilamida 10% PAGE-nativo. Uma diluição seriada da TrMnSOD corado com Comassie Brilliant Blue (imagem superior) e para atividade com 0,025 MTT, 0,01 riboflavina e 1% TEMED (imagem inferior).

Os ensaios de atividade mostram que todas as proteínas, inclusive a enzima selvagem de ferro (TbFeSODB2), são mais ativas quando ligadas a manganês. Estudos eletroquímicos e simulações computacionais podem ser usadas futuramente para analisar o potencial redox das proteínas ligadas com cada metal para que os resultados de atividade mostrados fossem melhor explicados. Contudo, a existência de apenas FeSODs em *T. brucei* pode sugerir que esse organismo não possua acesso fácil à manganês ou que não necessite de uma atividade de SOD mais alta.

Quanto ao acesso do organismo ao metal, a incorporação deste depende da captação e da capacidade de processamento pelo organismo (transporte intracelular, armazenagem e emprego final). Uma vez que Tripanosomas expressam receptores muito similares aos da transferrina e da lactoferrina do hospedeiro, estes protozoários são capazes de interceptá-las, capturar o Fe^{+3} e o grupo heme contido nelas, interrompendo o transporte de ferro destinado à geração de novas células vermelhas (121). Logo que a transferrina é interceptada pelo *T. brucei*, o ferro é liberado devido ao baixo pH no endossoma e a apo transferrina é degradada em lisossomos por proteases como catepsinas L (122). A habilidade do parasita em capturar ferro afeta a homeostase deste metal no hospedeiro, o que caracteriza a infecção por diferentes tipos de anemias que variam de acordo com

as fases aguda e crônica da doença. O mecanismo de captação de ferro desenvolvido pelo protozoário pode ser tão eficiente que manteve apenas enzimas de ferro em seu repertório de SODs.

A captação e distribuição de ferro e manganês depende de transportadores específicos ou de outros transportadores de metais divalentes. Dentre os eles estão: Nramp H⁺-manganês, ABC manganês permeases, ATPases do tipo P, facilitadores da difusão de cátions (CDF, do inglês *Cation Diffusion Facilitators*) e transportadores de fosfato inorgânico com alta afinidade por complexos MnHPO₄ (123). Ortólogos a estes transportadores não foram encontrados em Tripanosomas até o momento, porém um ortólogo da mucolipina, proteína envolvida em canais iônicos de mamíferos, foi descrita para *T. brucei* (TbMLP1) e pode estar relacionada ao transporte de ferro do endossoma para o citoplasma (122).

Ainda que *T. brucei* possua acesso a manganês, a ligação deste metal nas SODs poderia ter efeitos indesejáveis para a célula. Estas enzimas não estão envolvidas apenas na defesa antioxidante, também regulam o estado redox celular (6). Este equilíbrio poderia ser prejudicado se as SODs se tornassem mais ativas (2), uma vez que com a reação de dismutação do radical superóxido a enzima gera peróxido de hidrogênio, uma molécula que pode causar dano celular, mas que também possui papel sinalizador como fator de transcrição (13). Desta forma, o sincronismo entre geração e retirada de H₂O₂ deve ser mantido para que a sinalização celular seja estabelecida quando necessário sem que haja dano celular. A ativação de uma das FeSODs glicosomais varia de acordo com o ciclo celular de *T. brucei*, uma delas é mais expressa em formas de rápida divisão (124), possivelmente é empregada tanto na retirada de radicais superóxido quanto para a produção de H₂O₂ como sinalizador nesta fase do ciclo de vida.

A compartimentalização das SODs apresentadas pelos organismos analisados sugere que algumas delas foram adquiridas juntamente com organelas como a mitocôndria (13), a partir de uma relação endossimbiótica na qual um organismo disponibiliza gradualmente seu repertório de proteínas para outro organismo. Neste cenário, a mitocôndria adquirida por *T. brucei* poderia não produzir MnSODs e estas proteínas não foram adquiridas.

4.5 Ensaios de cristalização

4.5.1 *TbFeSODB2* e seus variantes

De forma geral, os resultados obtidos nos experimentos de cristalização eram sempre precipitados ou *clusters* pequenos e mal formados. As figuras de 4.5.1.1 à 4.5.1.7 mostram condições de cristalização que apresentam essas formações bem como alguns cristais obtidos para a enzima selvagem. A obtenção de cristais em algumas das condições ocorreu muito recentemente e a identificação destes como sendo de sal ou de proteína ainda não pode ser feita.

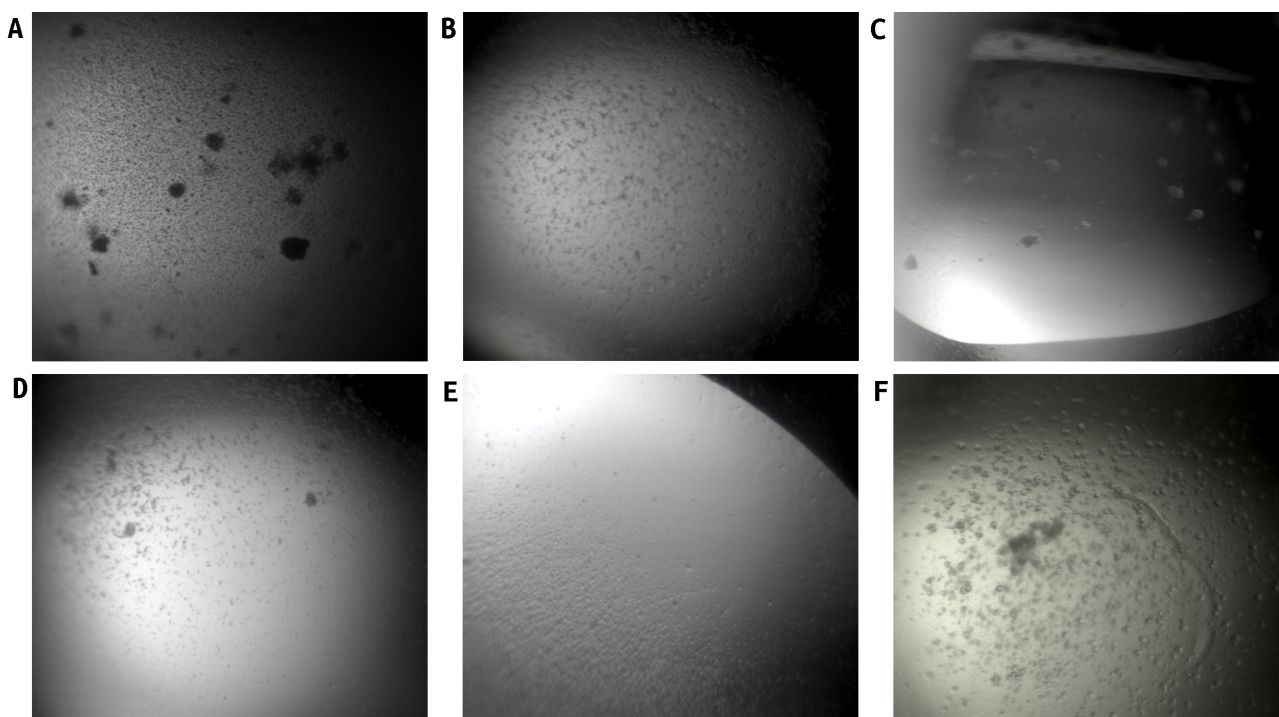


Figura 4.5.1.1 – Cristais obtidos para TbFeSODB2 na fase de ratreamento com os kits Classics II, PEGs II e Index HT nas condições A (0,1 M Bis-Tris pH 6,5, 25%, PEG 3350); B (0,2 M acetato de magnésio, T – 0,1 M cacodilato de sódio pH 6,5 , 30% MPD); C (0,2 M cloreto de magnésio hexadridatado, 1 M HEPES pH 7,5, 25% PEG 3350); D (0,2 M cloreto de magnésio, 0,1 M Tris pH 8,5, 16% PEG 4000); E (15% PEG 6000, 5% glicerol) e; F (0.01 M citrato de sódio, 16% (w/v) PEG 6000).

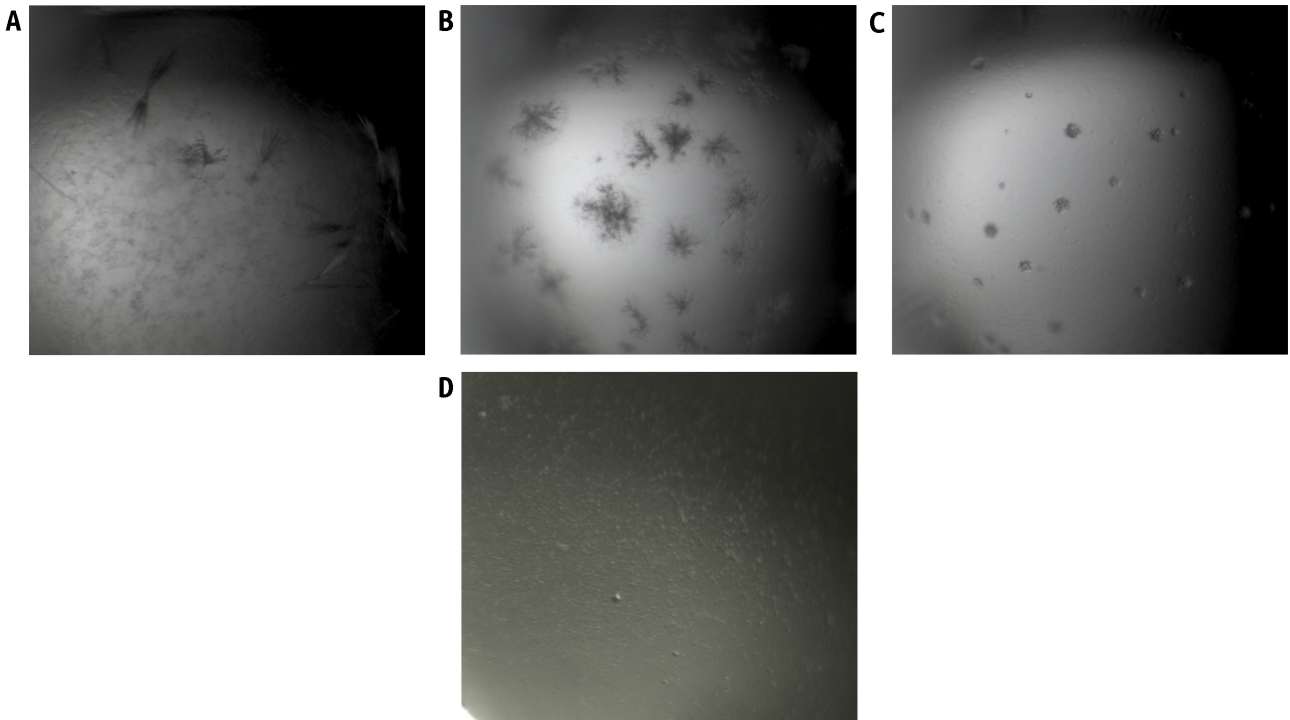


Figura 4.5.1.2 – Cristais obtidos para V25M na fase de rastreamento com os kits Classics e PEG II nas condições A (0,01 M sulfato de zinco, 0,1 M MES pH 6,5, 25% PEG 550 MME); B (1,0 M cloreto de lítio, 0,1 M acetato de sódio, 30% PEG 6000) e; C (0,1 M acetato de sódio, 25% PEG 4000, 8% Isopropanol).

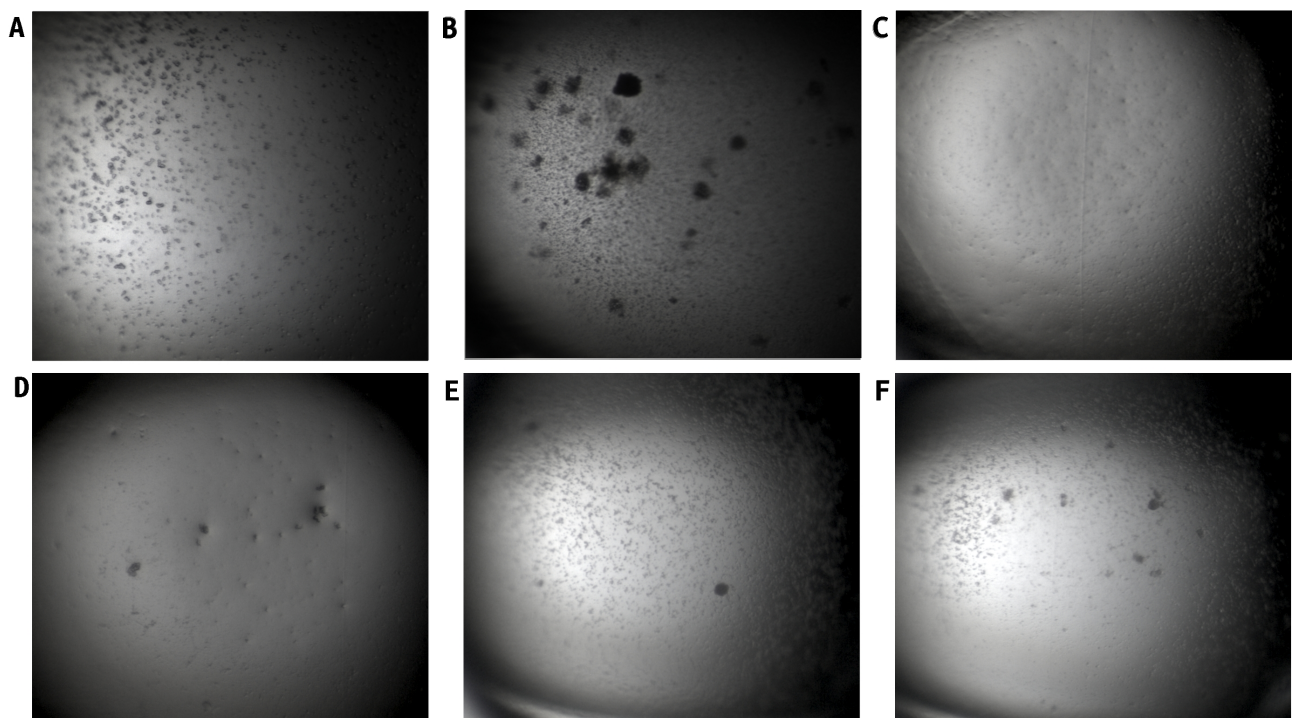


Figura 4.5.1.3 – Cristais obtidos para A71G na fase de rastreamento com os kits Classics II, Classics e PEG II nas condições A (1,8 M citrato de amônio pH 7,0); B (0,1 M bis-tris pH 6,5, 25% PEG 335); C (0,1 M HEPES sal sódio pH 7,5, 20% PEG 4000); D (0,1 M imidazol pH 6,5, 1,0 M acetato de sódio); E (0,2 M cloreto de magnésio, 0,1 M Tris pH 8,5, 16% PEG 4000) e; F (0,1 M HEPES pH 7,5, 10% PEG 8000, 10% etilenoglicol).

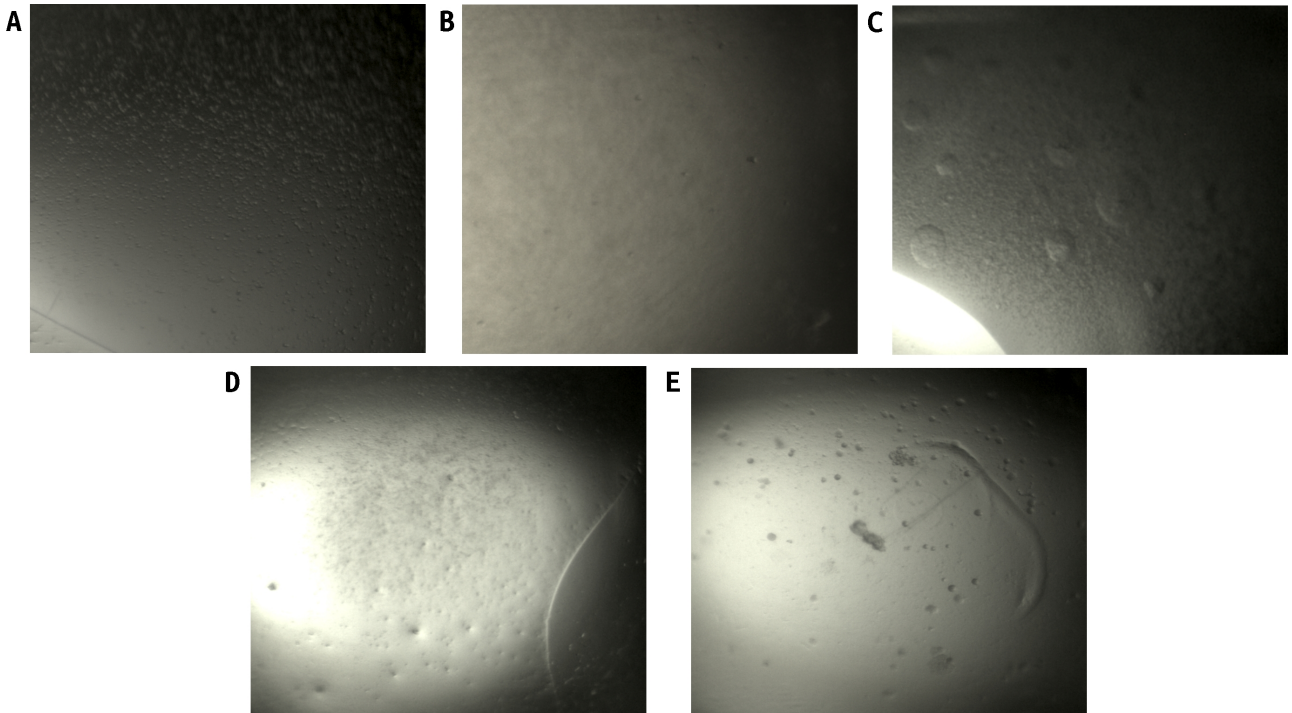


Figura 4.5.1.4 – Cristais obtidos para Q72G na fase de rastreamento com o kit PEG II nas condições A (0,1 M acetato de sódio, 0,1 M MES pH 6,5 , 30% PEG 2000 MME); B (0,1 M acetato de sódio, 0,1 M HEPES pH 7,5, 22% PEG 4000); C (0,2 M sulfato de lítio, 0,1 M Tris pH 8,5 , 25% PEG 5000 MME); D (0,1 M cloreto de potássio , 0,1 M Tris pH 8,5 , 3% PEG 6000) e; E (0,01 M citrato de sódio , 16% PEG 6000).

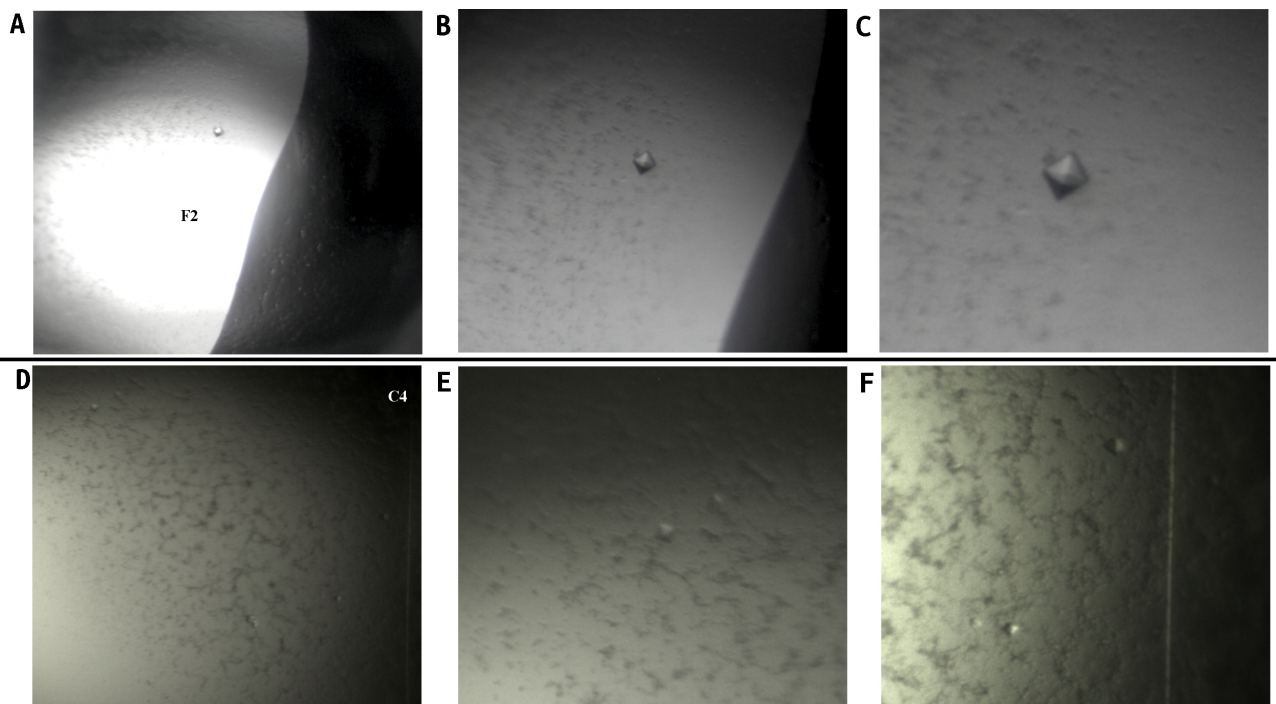


Figura 4.5.1.5 – Cristais obtidos para A145Q na fase de rastreamento com os kits Index HT (F2) e PEG II (C4) nas condições A (0,2M N-óxido de trimetilamina , 0,1M Tris pH 8,5 , 20% PEG MME 2000) e; B(0,2 M cloreto de magnésio , 0,1 M MES pH 6,5 , 10% PEG 4000).

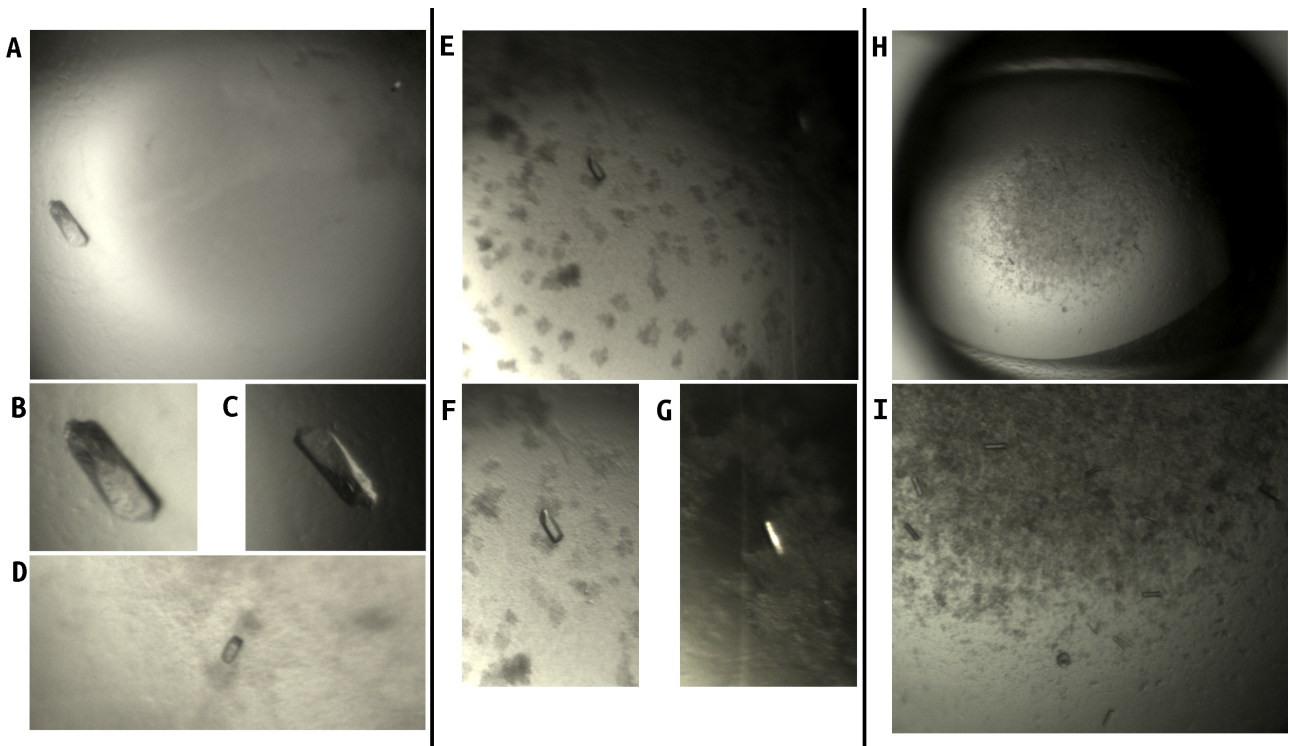


Figura 4.5.1.6 – Cristais obtidos para A159G na fase de rastreamento com o kit PEG II (C12, D4, H8) nas condições A (0,2 M cloreto de cálcio, 0,1 M Tris pH 8,5 , 20% PEG 4000); B (0,2 M cloreto de cálcio, 0,1 M Tris pH 8,5 , 25% PEG 4000) e; C (0,2 M acetato de cálcio , 0,1 M HEPES pH 7,5 , 10% PEG 8000).

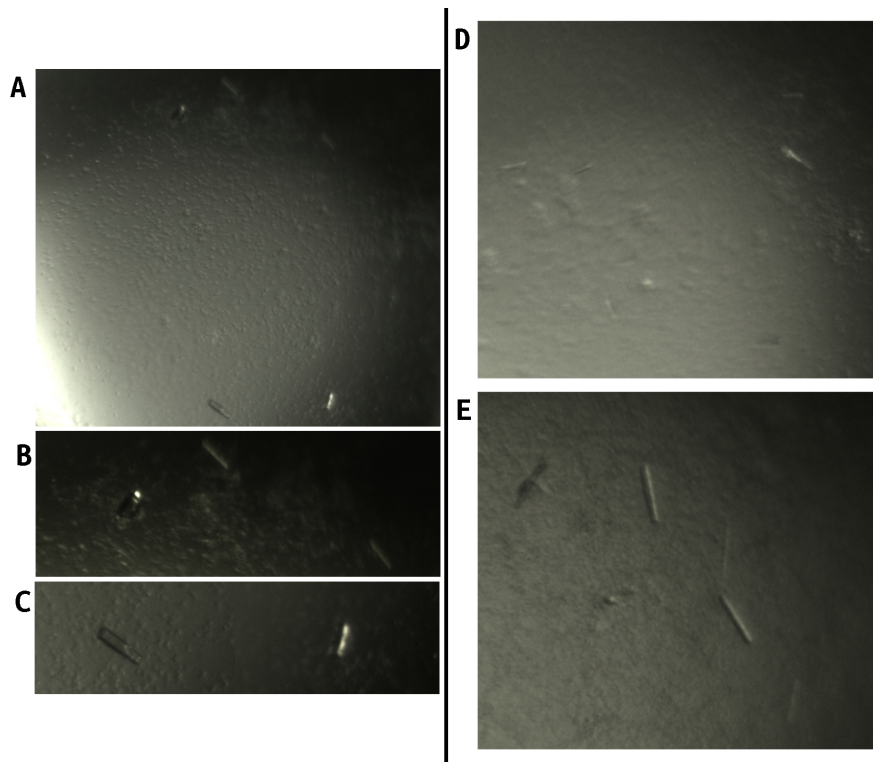


Figura 4.5.1.7 – Cristais obtidos para D170Q na fase de rastreamento com o kit PEG II (C12, D4 e D8) nas condições A (0,2 M cloreto de cálcio, 0,1 M Tris pH 8,5 , 20% PEG 4000); B (0,2 M cloreto de cálcio , 0,1 M Tris pH 8,5 , 25% PEG 4000) e; C (0,2 M cloreto de cálcio , 0,1 M HEPES pH 7,5 , 30% PEG 4000).

Até o momento nenhum cristal foi obtido com os ensaios de *seeding*, porém algumas variações das condições iniciais estão sendo realizadas.

4.5.2 Ensaios de cristalização da TrMnSOD

Cristais da TrMnSOD foram obtidos em diversas condições dos kits Classics II e PEGs II (QIAGEN), algumas foram utilizadas como base dos ensaios de otimização. Os cristais dispostos nas figuras 4.5.2.1 e 4.5.2.2 cresceram em três condições diferentes do kis Classics II e PEGs II, respectivamente. As soluções eram compostas por 0,2 M sulfato de amônio, 0,1 M Tris pH 8,5, 25% PEG 3350 (Figura 4.5.2.1 A); 0,2 M cloreto de sódio, 0,1 M bis-tris pH 5.5 , 25% PEG 3350 (Figura 4.5.2.1 B); 0,2 M cloreto de sódio, 0,1 M HEPES pH 7,5, 25% PEG 3350 (Figura 4.5.2.1 C); 0,1 M MES pH 6,5 , 30% PEG 4000 (Figura 4.5.2.2 A); 0,2 M sulfato de lítio, 0,1 M Tris pH 8,5, 30% PEG 4000 (Figura 4.5.2.2 B) e; 0,2 M sulfato de lítio, 0,1 M acetato de sódio, 0,1 M HEPES pH 7,5 , 25% PEG 4000 (Figura 4.5.2.2 C).



Figura 4.5.2.1 – Cristais obtidos para TrMnSOD na fase de rastreamento com o kit Classics II, nas condições A (0,2 M sulfato de amônio, 0,1 M Tris pH 8,5, 25% PEG 3350); B (0,2 M cloreto de sódio, 0,1 M bis-tris pH 5,5, 25% PEG 3350) e C (0,2 M cloreto de sódio, 0,1 M HEPES pH 7,5, 25% PEG 3350).



Figura 4.5.2.2 – Cristais obtidos para TrMnSOD na fase de rastreamento com o kit PEGs II, nas condições A (0,1 M MES pH 6,5, 30% PEG 4000); B (0,2 M sulfato de lítio, 0,1 M Tris pH 8,5 30% PEG 4000) e C (0,2 M sulfato de lítio, 0,1 M acetato de sódio, 0,1 M HEPES pH 7,5, 25% PEG 4000).

A otimização foi feita variando o pH e a concentração de precipitante, sendo esse PEG 3350 ou 4000 (de 20% a 34%). Três diferentes tampões foram usados, MES pH 6,0 e 7,5, HEPES 7,0 e 7,5 e Tris pH 8,0 e 8,5. Sendo que os cristais de maior interesse foram obtidos nas condições MES pH 6,0 e 30% PEG 3350 e, Tris pH 8,5 e 34% PEG 3350. A evolução do crescimento dos cristais é mostrada na figura 4.5.2.3.

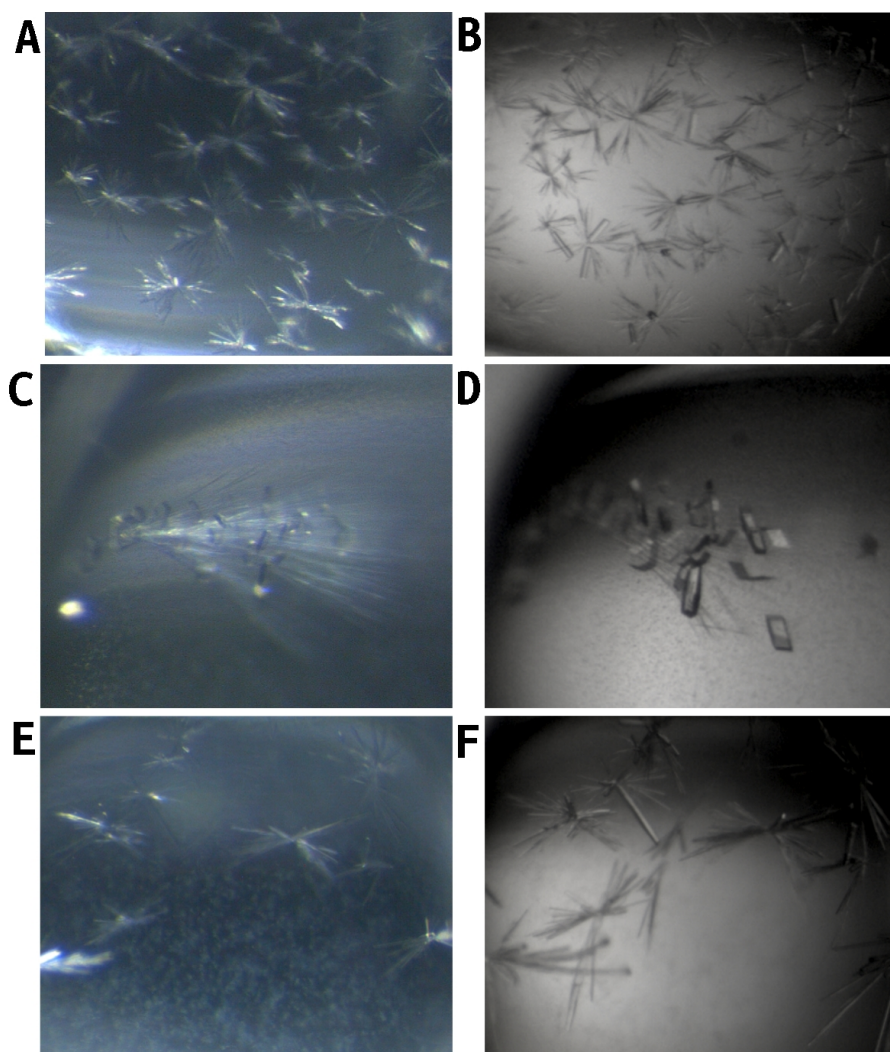


Figura 4.5.2.3 – Cristais obtidos para TrMnSODna fase de rastreamento com o kit PEGs II, nas condições: (A e B) 0,1 M MES pH 6,5, 30% PEG 4000; (C e D) 0,2 M sulfato de lítio, 0,1 M Tris pH 8,5 30% PEG 4000 e; (E e F) 0,2 M sulfato de lítio, 0,1 M Tris pH 8,5, 30% PEG 3000. A, C e E são fotos capturadas em 2013, enquanto B, D e F são fotos das mesmas condições capturadas em 2015.

4.6 Coleta de dados, processamento e substituição molecular

Não foi possível coletar dados dos mutantes da TbFeSODB2 em tempo hábil para a inclusão no presente trabalho, porém os cristais gerados estão sob análise.

Os cristais obtidos para a TrMnSOD na condição 0,1 M MES pH 6,5, 30% PEG 4000 foram difratados com sucesso na estação I24 do Diamond Light Source em Oxfordshire - Inglaterra, utilizando uma fonte de raios-x monocromática ($\lambda = 0,969 \text{ \AA}$) e um detector Pilatus3 6M, resultando na geração de 1000 imagens. Os dados pré-processados disponíveis na base de dados ISPyB (*Information System for Protein crystallography Beamline*) foram utilizados para as análises posteriores. Os programas empregados neste processamento foram MOSFLM (102) e SCALA (103), os parâmetros da coleta de dados encontram-se listados na tabela 4.6.1. A TrMnSOD foi cristalizada no grupo espacial C2 com 6 cadeias na unidade assimétrica (Figura 4.6.1) e 47% de solvente, sendo que estes conteúdos foram estimados pelo Coeficiente de Matthews empregando-se o programa Matthews Coef (104,105).

Tabela 4.6.1 – Dados obtidos a partir da coleta de dados e processamento das imagens de difração

Parâmetros de cela	Dimensões (Å)	a	121,55	Grupo espacial	C2
		b	74,35	Faixa de resolução (Å)	47,68 – 1,70
		c	146,11	Número de reflexões observadas/ únicas	140.339/137.216
	Ângulos (°)	α	90	Completeza (%)	97,8
		β	101,79	Multiplicidade	4,2
		γ	90	R_{sym} (%) I/sig(I)	13,30/4,4

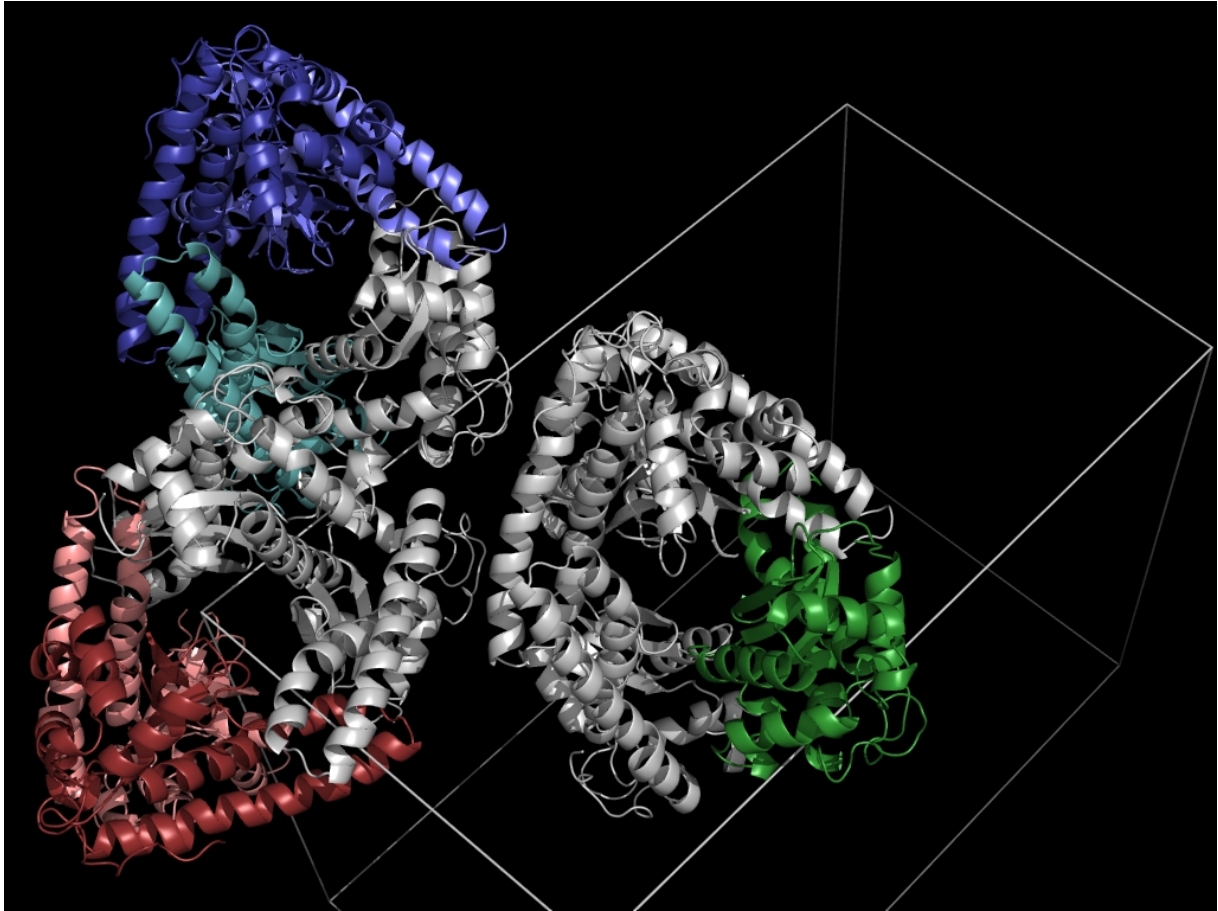


Figura 4.6.1 – Empacotamento da proteína TrMnSOD dentro da rede monoclínica. A unidade assimétrica representada em cinza é composta por seis cadeias que compõem $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ de tetrâmeros. Estas complementam as cadeias azuis ($\frac{1}{4}$), vermelhas ($\frac{1}{2}$) e verde ($\frac{3}{4}$), geradas por simetria. Figura gerada com o programa Pymol (114).

A TrMnSOD apresentou enovelamento característico de superóxido dismutase, estrutura quaternária homotetramérica e extensões de hélice para formação do tetrâmero. Por possuir grande similaridade sequencial com a superóxido dismutase de manganês de *Aspergillus fumigatus* (Figura 4.6.2), que possui estrutura depositada no PDB (código: 1KKC), foi submetida a substituição molecular utilizando os dados desta proteína como base.



Figura 4.6.2 – Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos da TrMnSOD e a MnSOD de *Aspergillus fumigatus* (1KKC), a qual foi usada para substituição molecular. As seqüências possuem 62% de identidade entre si.

Após a substituição molecular um modelo aproximado da estrutura foi obtido. Geralmente os fatores de estrutura calculados (F_{calc}) para este modelo discordam dos fatores de estrutura observados (F_{obs}) e o índice de acordo entre ambos os fatores é representado pelo parâmetro R_{factor} , definido por:

$$R_{factor} = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|} \times 100$$

Com a finalidade de aproximar F_{calc} de F_{obs} e chegar a uma estrutura tridimensional da proteína estudada que melhor represente os dados experimentais, a proteína foi refinada por meio de ajustes de parâmetros posicionais (troca, inserção ou remoção de resíduos) empregando os programas Refmac (110) e Phenix (125). O avanço das etapas de refinamento após cada ciclo foi monitorado pela inspeção visual e manipulação do modelo utilizando o programa Coot (111,126). Este processo resultou em estrutura de parâmetro R_{factor} igual a , os demais parâmetros encontram-se na tabela 4.6.2.

Tabela 4.6.2 – Dados estatísticos do refinamento do modelo da TrMnSOD

R-work	16,70%
R-free	18,9%
RMS distâncias (Å)	0,007
RMS ângulos (°)	1,09

A distribuição dos ângulos rotacionais Φ e Ψ analisado pelo diagrama de Ramachandran (Figura 4.1.7.3) apresenta valores bastante favoráveis. A estrutura possui em regiões favoráveis e não possui resíduos em regiões proibidas do diagrama como mostra a figura. Dos 1214 aminoácidos

analisados (200 resíduos por cadeia), 1214 encontram-se em regiões do diagrama nas quais os valores de Φ e Ψ são mais favoráveis, enquanto que apenas 40 resíduos enquadram-se em regiões menos favoráveis (permitidas) e nenhum em regiões proibidas.

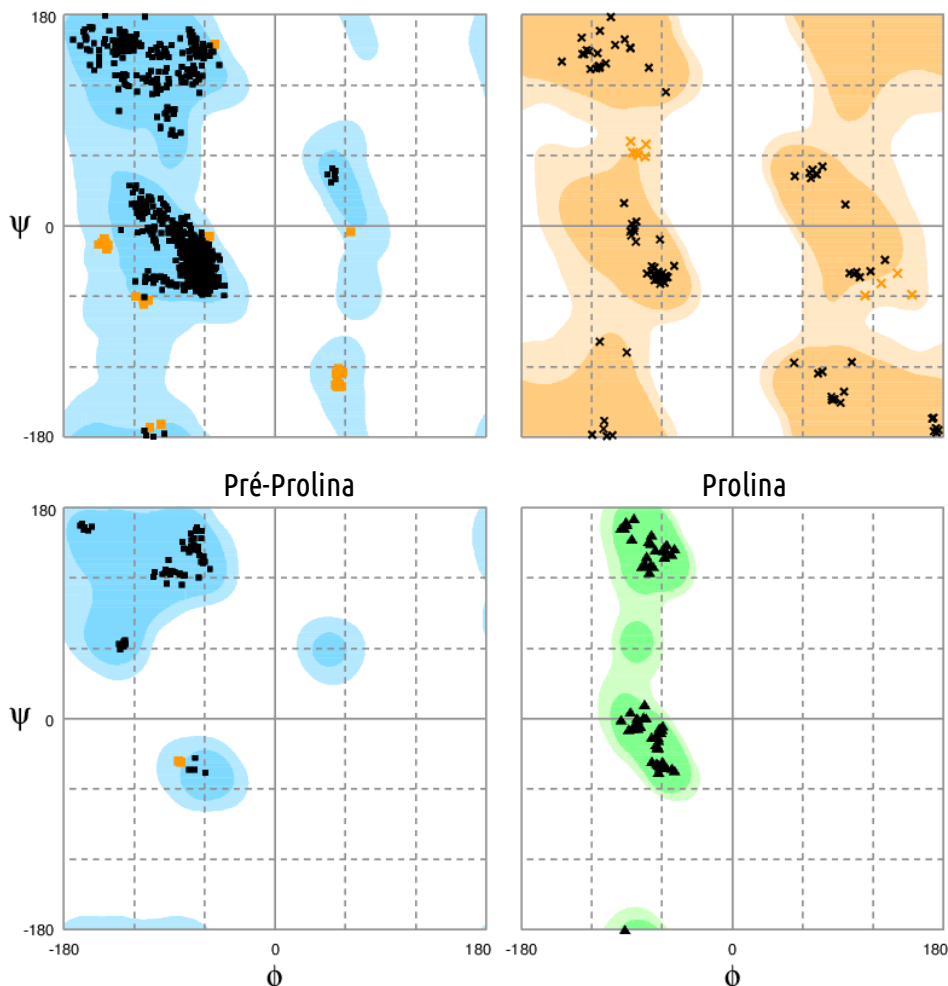


Figura 4.6.3 – Distribuição dos ângulos torcionais Φ e Ψ dos resíduos da estrutura refinada da TrMnSOD no diagrama de Ramachandran em quatro diferentes aspectos: geral, glicina, pré-prolina e prolina. A maior parte dos resíduos (96,8%) encontra-se em regiões favoráveis enquanto que 3,2% em regiões permitidas e nenhum em regiões proibidas. Análise gerada pelo programa Rampage (127), disponível no pacote CCP4.

4.6.1 Análise estrutural

O modelo final da TrMnSOD consiste em uma proteína de quatro cadeias com 211 resíduos cada ($\text{Ser}^2 - \text{Lys}^{211}$), o sítio ativo presente em cada cadeia conta com um átomo de manganês coordenado por quatro resíduos, H^{30} , H^{78} , D^{163} e H^{167} oriundos dos domínios C-terminal e N-terminal. Os dois domínios normalmente encontrados para Fe/MnSODs foram identificados na estrutura obtida. Em cada monômero o domínio N-terminal é composto por seis hélices: duas antiparalelas (α_1 e α_2), duas pequenas hélices (α_2' e α_2'') que conectam α_2 e α_3 , além de outras duas

hélices (α_3 e α_4). Já o domínio C-terminal possui enovelamento do tipo α/β e é composto por três fitas β antiparalelas (β_1 , β_2 e β_3) e pelas hélices α_5 , α_6 , α_7 , α_8 e α_9 (Figura 4.6.1.1).

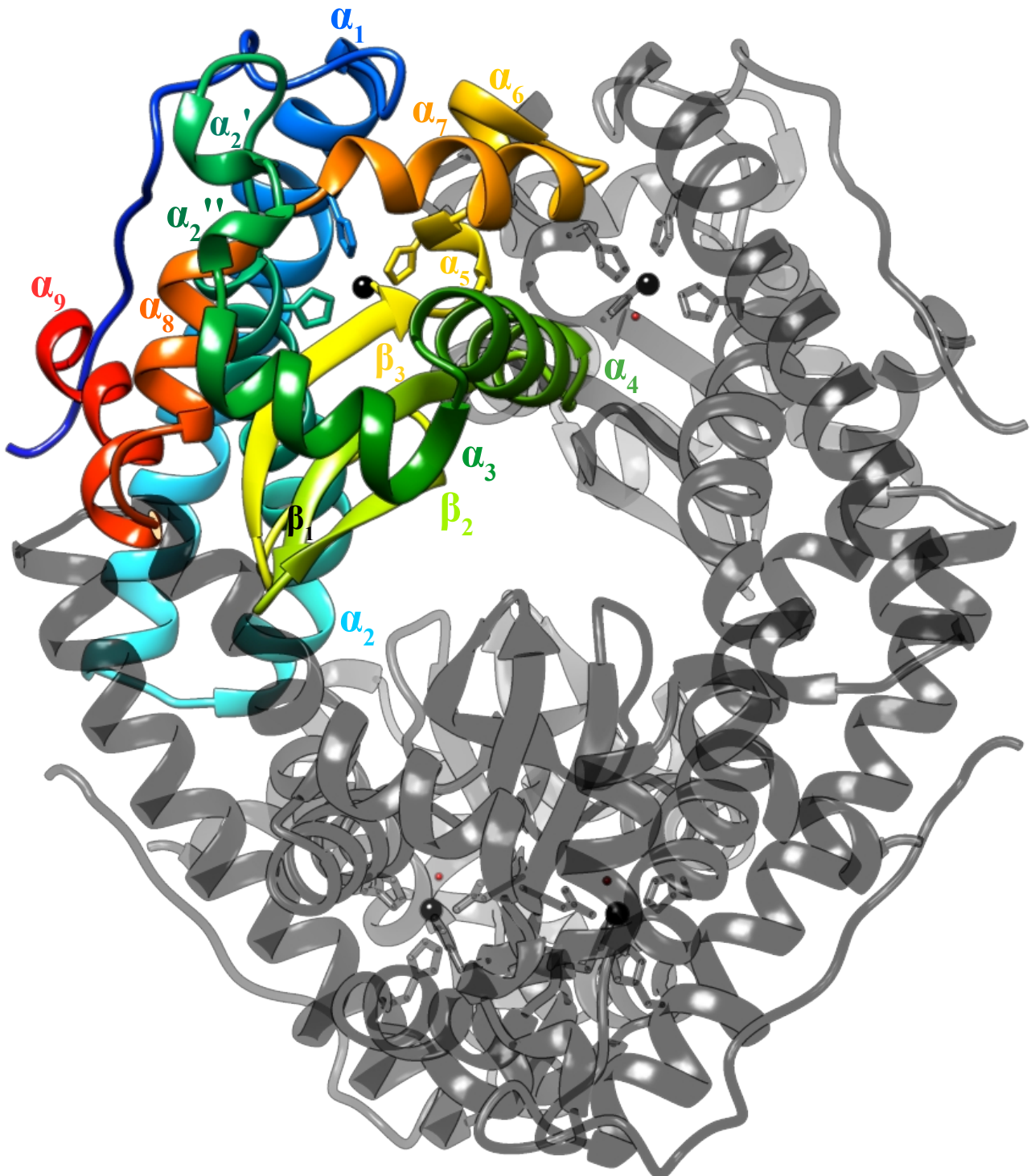


Figura 4.6.1.1 – Estrutura quaternária da TrMnSOD resolvida por substituição molecular com resolução de 1.7 Å. A enzima é composta por quatro cadeias idênticas, o sítio ativo presente em cada cadeia conta com um átomo de manganês (esfera em preto) coordenado por quatro resíduos (H^{30} , H^{78} , D^{163} e H^{167}) representados por bastões. O monômero destacado mostra a organização estrutural em onze hélices alfa (α_1 , α_2 , α_2' , α_2'' , α_3 , α_4 , α_5 , α_6 , α_7 , α_8 e α_9) e três folhas beta antiparalelas (β_1 , β_2 e β_3). Imagem elaborada com o programa Chimera (115).

Os resíduos presentes no sítio ativo são provenientes de diferentes segmentos da cadeia,

sendo que a hélice α_1 contribui para o sítio ativo com o resíduo H^{30} , a α_2 com H^{78} , a α_5 com H^{167} e a fita beta β_3 com D^{163} (Figura 4.6.1..2). As distâncias entre os átomos que coordenam o metal são: 2,3 Å (H^{167} NE2), 2,2 Å (H^{30} NE2), 2,2 Å (H^{78} NE2) e 2,1 Å (D^{163} OD2). A α_1 ainda possui um aneurisma de hélice que facilita o posicionamento da H^{30} no sítio ativo, esta alteração na estrutura da hélice é muito comum no enovelamento das Fe/Mn SODs (90).

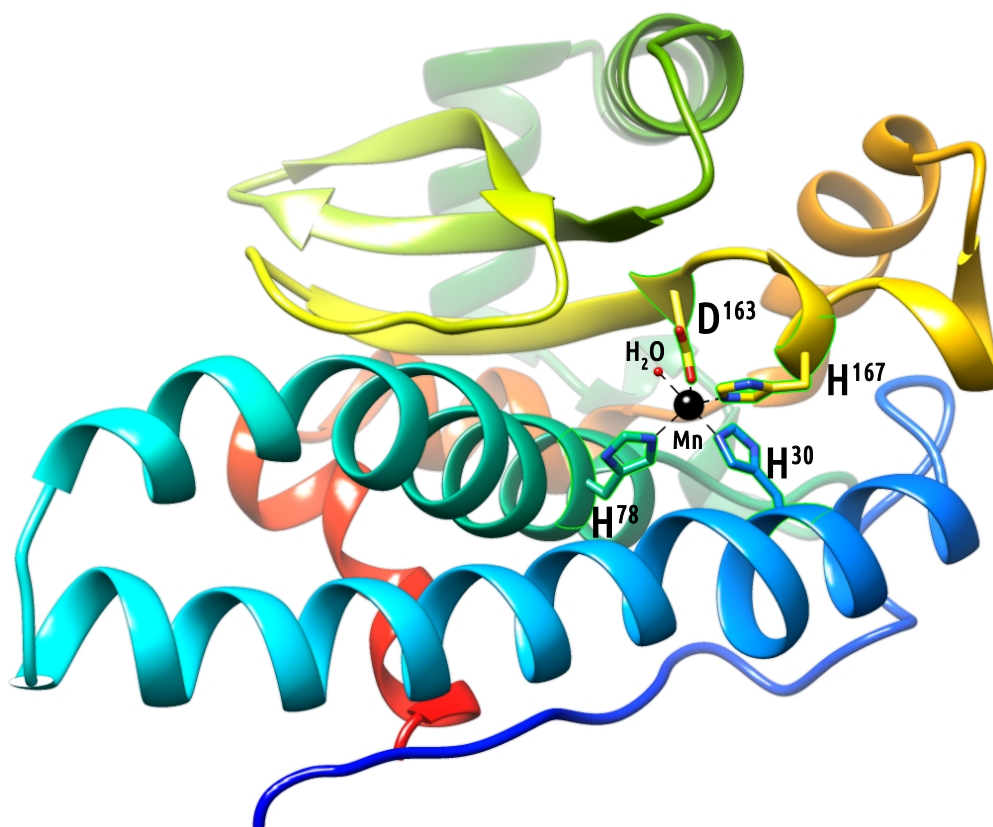


Figura 4..6.1.2 – Monômero da TrMnSOD com o sítio ativo em destaque. O sítio conta com um átomo de manganês (esfera em preto) coordenado por quatro resíduos (H^{30} , H^{78} , D^{163} e H^{167}) representados por bastões. A hélice α_1 contribui para o sítio ativo com o resíduo H^{30} , a α_2 com H^{78} , a α_5 com H^{167} e a fita beta β_3 com D^{163} . Imagem elaborada com o programa Chimera (115).

A organização da estrutura quaternária dos tetrâmeros de MnSODs tem como principais características a interface dimérica, uma extensão das hélices α_1 e α_2 e os resíduos que orientam essas hélices de modo a favorecer a interação do tetrâmero.

Resíduos muito conservados em ambas as FeSODs e MnSODs participam da interface dimérica (39), com exceção da posição 147 mais variável. A figura 4.1.8.3 mostra a interação entre pares de resíduos provenientes de duas cadeias que fazem parte de um tetrâmero (Figura 4.6.1.3 A). Na interface dimérica interagem, a partir de cadeias distintas, os pares Y^{170} com Y^{34} (2,7 Å) (Figura 4.6.1.3 B), E^{166} com H^{167} (2,7 Å ou 2,8 Å, dependendo das cadeias que fornecem os resíduos)

(Figura 4.6.1.3 C), S¹²⁹ interagindo com o mesmo resíduo proveniente da outra cadeia (2,6 Å) (Figura 4.6.1.3 D) e E¹⁴⁸ com K¹⁴⁷ (2,6 Å) (Figura 4.1.8.3 D).

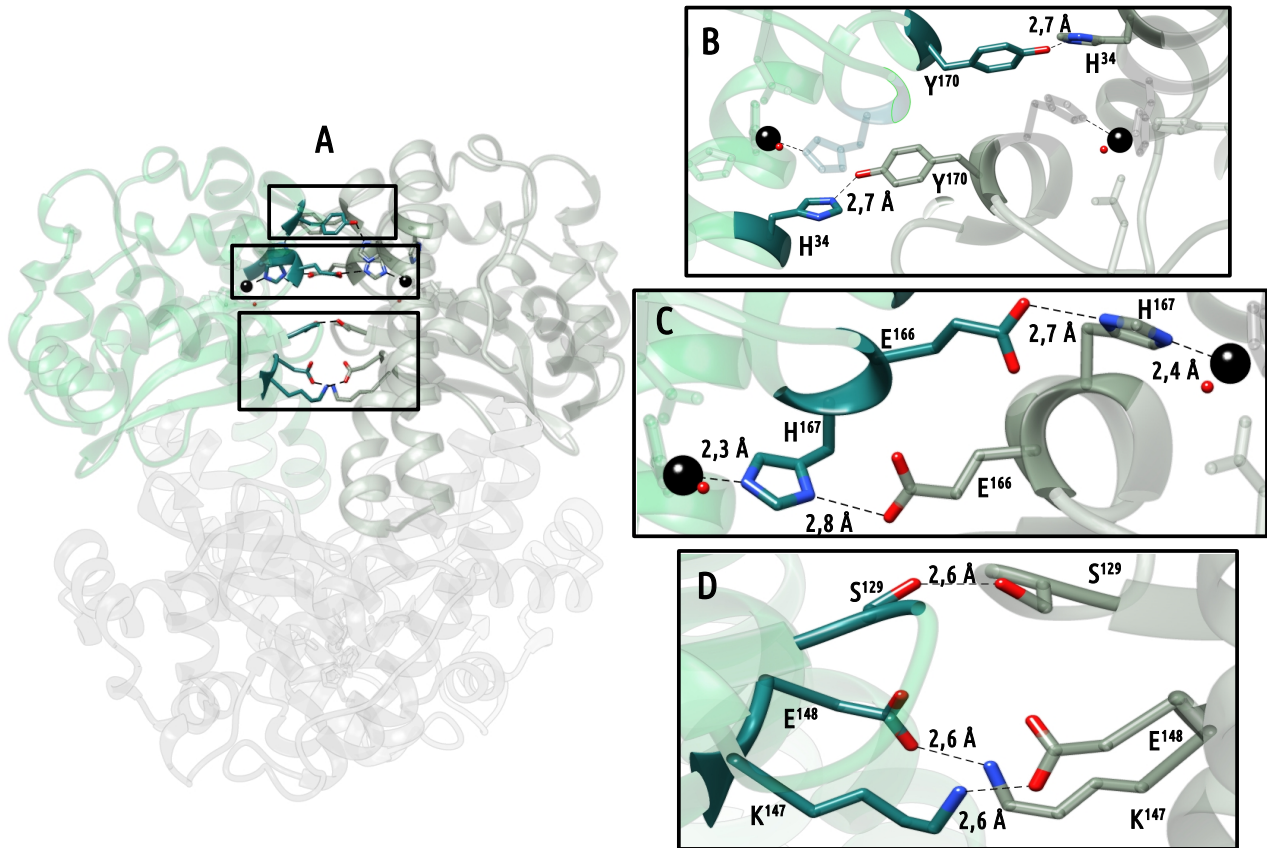


Figura 4.6.1.3 – Representação da interação entre resíduos de cadeias distintas na interface dimérica. (A) Forma tetramérica da TrMnSOD com duas cadeias que possuem interface dimérica destacadas em verde e prata. (B) Interação entre os resíduos Y¹⁷⁰ com Y³⁴ (2,7 Å). (C) Interação entre os resíduos E¹⁶⁶ com H¹⁶⁷ (2,7 Å ou 2,8 Å). (D) Interação entre os resíduos S¹²⁹ (2,6 Å) e E¹⁴⁸ com K¹⁴⁷ (2,6 Å). Imagem elaborada com o programa Chimera (115).

Segundo Wintjens e colaboradores (39), o contato entre as cadeias para formação do tetrâmero está vinculada aos resíduos nas posições I²⁶, Q¹⁷² e F⁷⁰, estes são encontrados na TrMnSOD (Figura 4.6.1.4) e fazem contato com outros resíduos também descritos pelo grupo de Wintjens. A interação entre os resíduos Y³⁸ e F⁷⁰ contribui para o posicionamento das hélices α_1 e α_2 favorecendo a formação do tetrâmero pelo contato destas hélices entre duas cadeias distintas.

Além disso, os resíduos T²⁶, N⁷⁰ e F¹²⁷ encontrados especificamente em dímeros (72) encontram-se substituídos por I, F e Q, respectivamente. A posição 56 onde normalmente é encontrado um glutamato, em tetrâmeros observa-se uma prolina. Sua influência é tão grande no estado de oligomerização que um glutamato na posição 56 é considerado anti-tetrâmero (90).

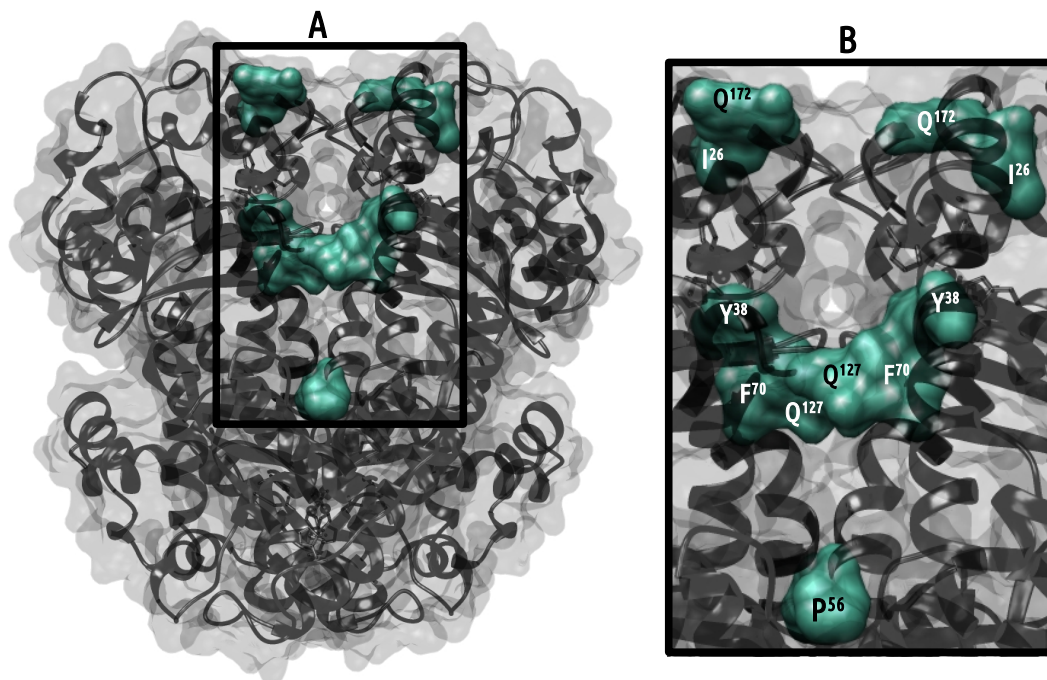


Figura 4.6.1.4 – Importantes interações de resíduos relacionadas à formação do tetrâmero contornada por sua superfície. (A) Forma tetramérica da TrMnSOD com as interações destacadas em superfícies de cor verde.

(B) Em destaque os resíduos que participam das interações: I²⁶ e Q¹⁷², Y³⁸, F⁷⁰ e Q¹²⁷, e P⁵⁸, todos são encontrados em ambas as cadeias. Imagem elaborada com o programa Chimera (115).

As interações presentes na interface dimérica e as responsáveis pela estabilização do tetrâmero também são responsáveis pela formação de um canal pelo qual o substrato ganha acesso ao sítio ativo. Esse canal é composto por 9 resíduos que fazem parte de uma das cadeias (Y¹⁶⁹, Y¹⁷⁰, N¹⁷⁵, K¹⁷⁷, A¹⁷⁸, L¹²⁴, G¹²⁵, Q¹²⁷ e G¹²⁸) e 5 resíduos da outra cadeia (H³⁴, H³⁵, Y³⁸, N⁴¹ e W¹⁶⁵) (Figura 4.6.1.5). A passagem do substrato é controlada pelos resíduos H³⁰ e Y³⁸, sendo que a cadeia lateral do último pode ser móvel e estar diretamente envolvida no controle da entrada do substrato (128).

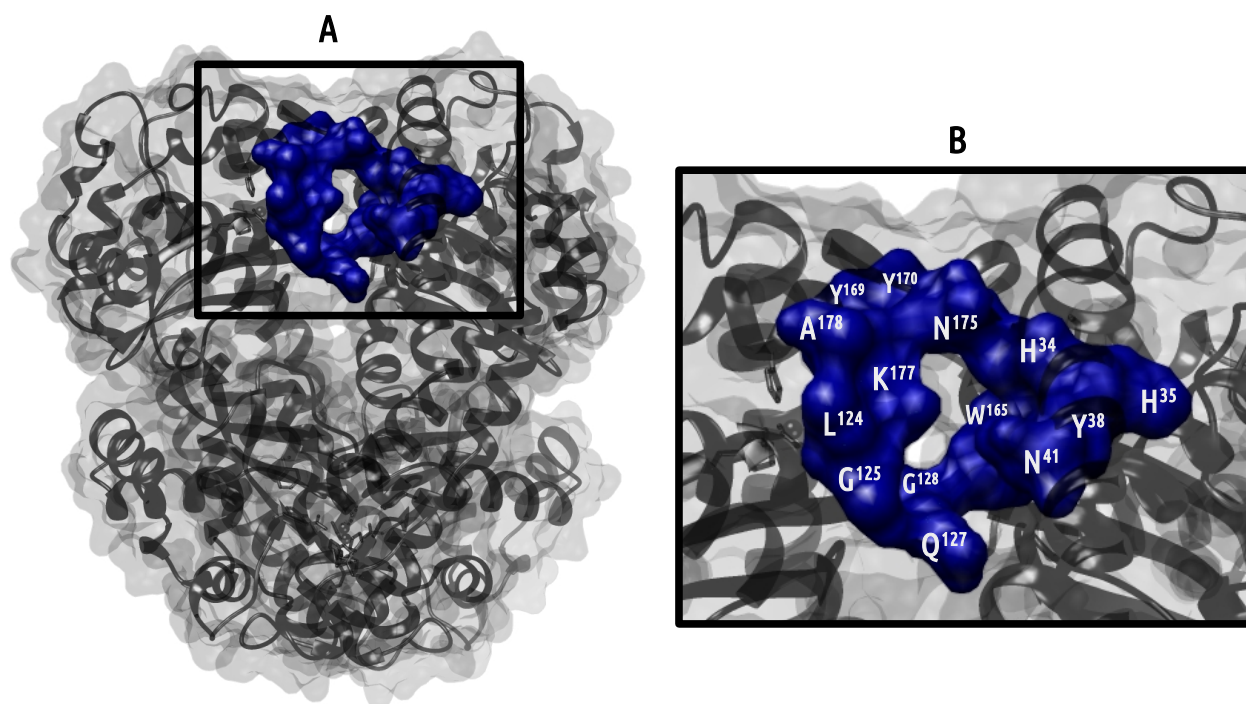


Figura 4.6.1.5 – Formação do canal de acesso ao substrato. (A) Forma tetramérica da TrMnSOD com os resíduos envolvidos na formação do canal em azul. (B) Em destaque os resíduos que participam da formação do canal: 9 resíduos que fazem parte de uma das cadeias (Y169, Y170, N175, K177, A178, L124, G125, Q127 e, G128) e 5 resíduos da outra cadeia (H34, H35, Y38, N41 e W165). Imagem elaborada com o programa Chimera (115).

4.6.2 Análise comparativa

Em relação à TbFeSODB2 (código PDB: 3ESF), a TrMnSOD e a MnSOD de *A. fumigatus* (código PDB: 1KKC) possui um prolongamento das hélices α_1 e α_2 . Esta é uma diferença marcante entre SODs diméricas e tetraméricas e possivelmente está relacionada às interações que formam o tetrâmero (72). A figura 4.6.2.1 mostra o alinhamento das estruturas da TrMnSOD, 1KKC e 3ESF que evidencia a extensão de hélices nas duas enzimas de manganês e também destaca a posição 56, mostrada anteriormente na figura 4.6.1.4, que quando em dímeros possui um glutamato (anti-tetrâmero) ou uma prolina.



Figura 4.6.2.1 – Sobreposição dos dímeros de duas MnSODs tetraméricas representadas pela cor cinza (1KKC e TrMnSOD) e da FeSOD dimérica de *Trypanosoma brucei* (3ESF) representada em laranja. Apesar de apresentarem enovelamentos semelhantes, tetrâmeros possuem uma extensão das hélices α_1 e α_2 . As prolínas presentes na TrMnSOD (P⁵⁹), na 1KKC (P⁶⁹) e o glutamato presente na 3ESF (E⁵⁶) encontram-se destacados em verde. Alinhamento de estruturas elaborado com o programa Chimera (115), empregando-se o algoritmo Needleman-Wunsch e a matriz Blosum-62.

Enquanto as hélices destas MnSODs possuem cerca de 5 resíduos a mais na α_1 do que a 3ESF (A²⁴ a A⁵⁴ para TrMnSOD e V⁵⁸ a N⁸⁴ para 1KKC), a α_2 possui 10 a mais (V⁵⁸ a N⁸⁴ para TrMnSOD e V⁶⁸ a N⁹⁴ para 1KKC). A 3ESF possui 25 resíduos na α_1 (K²² a S⁴⁶) e 17 resíduos na α_2 (P⁶⁵ a E⁸¹) e são conectadas por duas hélices menores designadas α_1' (P⁴⁸ a A⁵²) e α_1'' (V⁵⁵ a T⁶¹) (10). Essas alterações são acompanhadas de diferentes áreas superfície acessível ao solvente, sendo esta maior em tetrâmeros (72).

O trabalho envolvendo a análise de acoplamento estatístico para a TbFeSODB2 de Bachega e colaboradores (10), revelou um aglomerado de resíduos acoplados relacionados a interface dimérica (“cluster 1”), neste apenas um dos resíduos, P¹⁴⁸, encontra-se conservado na maioria das SODs presentes no alinhamento da figura 4.1.2, inclusive na TrMnSOD. Todos os outros resíduos, T²⁴, E⁵⁶, N⁶⁸ E F¹²¹ (numeração de *T. brucei*), são substituídos na TrMnSOD por outros característicos de MnSODs (I²⁶, P⁵⁶, F⁷⁰ e Q¹²⁷).

4.7 Estudo de estabilidade térmica da TrMnSOD por análise de fluorescência intrínseca

Os ensaios de monitoração da emissão de fluorescência intrínseca permitem a análise das regiões em torno de resíduos de triptofano presentes na proteína. Todas as condições testadas apresentaram perfil espectral similar, com emissão máxima em 330 nm, indicando que os triptofanos presentes na TrMnSOD encontram-se no interior da estrutura proteica, protegidos da interação com solvente (129). A supressão da fluorescência conforme o aumento da temperatura

A TrMnSOD possui sete triptofanos W⁸², W¹⁰⁹, W¹³¹, W¹³³, W¹⁶⁵, W¹⁸⁵, W¹⁹⁰ (Figura 4.7.1). Esses triptofanos estão localizados nas imediações do cofator metálico (W⁸², W¹³¹, W¹⁶⁵), próximos à interface dimérica (W¹³³ e W¹⁸⁵) ou contribuindo para o empacotamento hidrofóbico (W¹⁹⁰). São muito conservados entre Fe/Mn SODs e já foram descritos anteriormente para outros organismos (6). W¹³¹ e W¹⁸⁵ podem desempenhar papel estrutural por estabelecem interações do tipo cátion- π com os resíduos. W¹⁰⁹ está presente apenas em três organismos do alinhamento apresentado na figura 4.1.2 (*T. reesei*, *A. fumigatus* e *P. haloplanktis*), na posição 178 do alinhamento. A maioria dos organismos apresenta uma fenilalanina nesta posição e alguns uma tirosina.

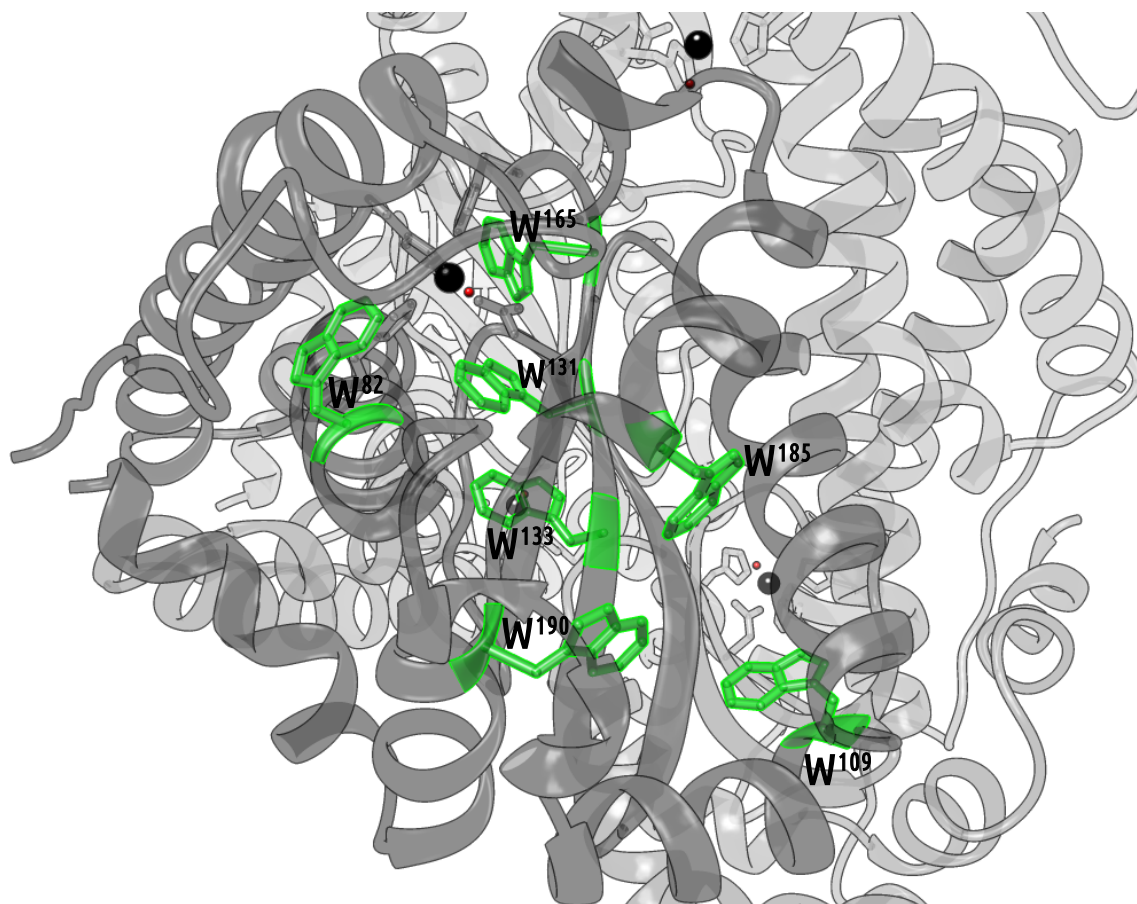


Figura 4.7.1 – TrMnSOD representada por dímero com os triptofanos de uma das cadeias destacados em verde (W⁸², W¹⁰⁹, W¹³¹, W¹³³, W¹⁶⁵, W¹⁸⁵, W¹⁹⁰). Imagem elaborada com o programa Chimera (115).

O grupamento indol do triptofano absorve em 280 e emite em um valor próximo a 340 nm. A emissão do indol é muito sensível a polaridade do solvente, podendo ser deslocada para menor comprimento de onda de emissão quando enterrado na proteína ou para maior comprimento de onda quando a proteína encontra-se desnaturada. O gráfico apresentado para a emissão de fluorescência da TrMnSOD em diferentes temperaturas (Figura 4.7.2) não mostrou deslocamento da emissão para maiores comprimentos de onda mesmo com o aumento da temperatura, indicando que não houve desnaturação da proteína sob nenhuma condição testada no experimento.

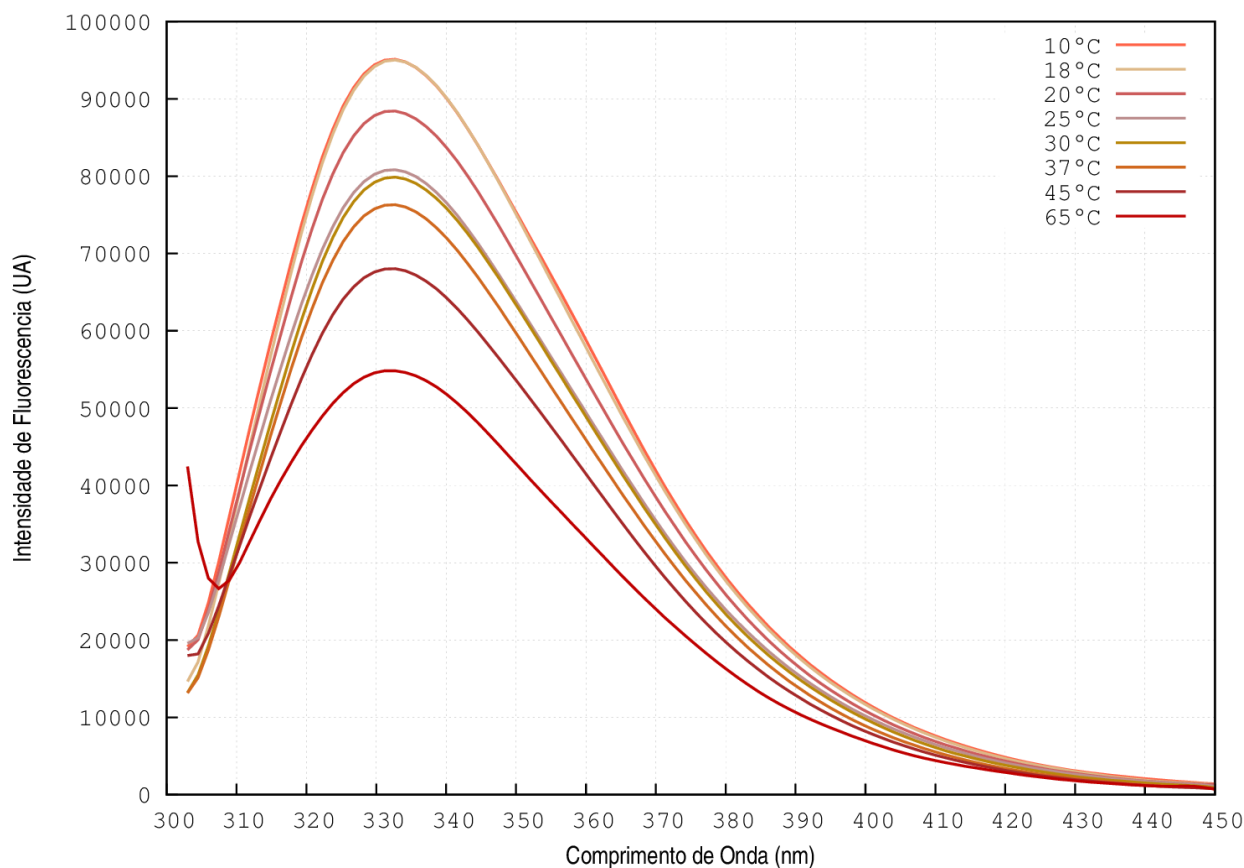


Figura 4.7.2 – Espectros de fluorescência da TrMnSOD resultantes do monitoramento da emissão de fluorescência no intervalo de 300 a 450 nm em diferentes temperaturas.

Algumas mudanças estruturais foram observadas em maiores temperaturas (80 – 90 °C) do que as analisadas por fluorescência no presente trabalho (7) e uma faixa mais ampla de análise se faz necessária.

A termoestabilidade de superóxido dismutases já foi descrita para enzimas de organismos termófilos como *A. pyrophilus* (130), *T. thermophilus* (49), *P. aerophilum* (131). A FeSOD tetramérica de (código pdb: 1COJ) é mais distante das outras Mn e FeSODs no estudo feito por Wintjens e colaboradores (72). A resistência a temperatura normalmente está relacionada com pequenas variações distribuídas pela estrutura (132), porém a presença de uma alanina na posição 12 da enzima de *A. pyrophilus* foi indicada como principal característica estrutural relacionada à resistência térmica e a mesma associação foi feita anteriormente para TrMnSOD (A¹⁴) (7).

4.8 Características dos centros metálicos por Ressonância Paramagnética Eletrônica

Geralmente a temperatura empregada em experimentos EPR-CW para a análise de metais de transição deve ser baixa para aumentar o tempo de relaxação, a fim de que este seja detectado pelo espectrômetro. Todas as amostras foram congeladas em hélio líquido imediatamente antes das medidas, dessa forma uma padronização da adição de glicerol às amostras foi necessária para crioproteção. Espectros de melhor resolução foram obtidos com a adição de 40% glicerol. Neste contexto, as variações dos espectros estão relacionadas ao processo de congelamento, no qual a cristalização da água modifica a distribuição das moléculas em solução, sendo capaz de alterar características como a concentração de proteína, força iônica e pH. Essas alterações são normalmente manifestadas em espectros de baixa resolução (116).

Os sinais obtidos nos espectros estão relacionados à interação dos *spins* desemparelhados presentes na amostra com o campo magnético aplicado (Efeito Zeeman), outros elétrons e núcleos. A fórmula abaixo foi utilizada para o cálculo do g_{factor} (Fator de Landé) (116):

$$h\nu = g\mu_b S$$

onde, h é a constante de Plank, ν é a frequência aplicada, μ_b o magneto de Bohr e S o campo aplicado. Ao adicionar a frequência utilizada nos experimentos (GHz) e o campo no qual o sinal foi detectado (mT) é possível calcular o valor g_{factor} :

$$g_{factor} = \frac{71,4484\nu}{S}$$

Os espectros obtidos a partir da análise dos centros metálicos da TbFeSODB2 e TrMnSOD por EPR-CW e os valores de g são mostrados na figura 4.8.1 Três sinais mais intensos na região de 150 mT com valores de g iguais a 4,95, 3,94 e 3,51 para TbFeSODB2 condizem com a presença de Fe^{+3} . Outros sinais em mais baixo campo, com valores de g iguais a 9,79 e 9,19 estão relacionados à presença de Fe – alto *spin*. O espectro desta enzima é muito similar a outros espectros de FeSODs já descritos na literatura (10, 66, 73, 133, 134). Para a análise da TrMnSOD, esta foi substituída com ferro (TrFe(Mn)SOD) e os espectros obtidos mostrou-se complexo, apresenta sinais de ferro em valores de g iguais a 4,94 e 4,34 referentes a Fe^{+3} .

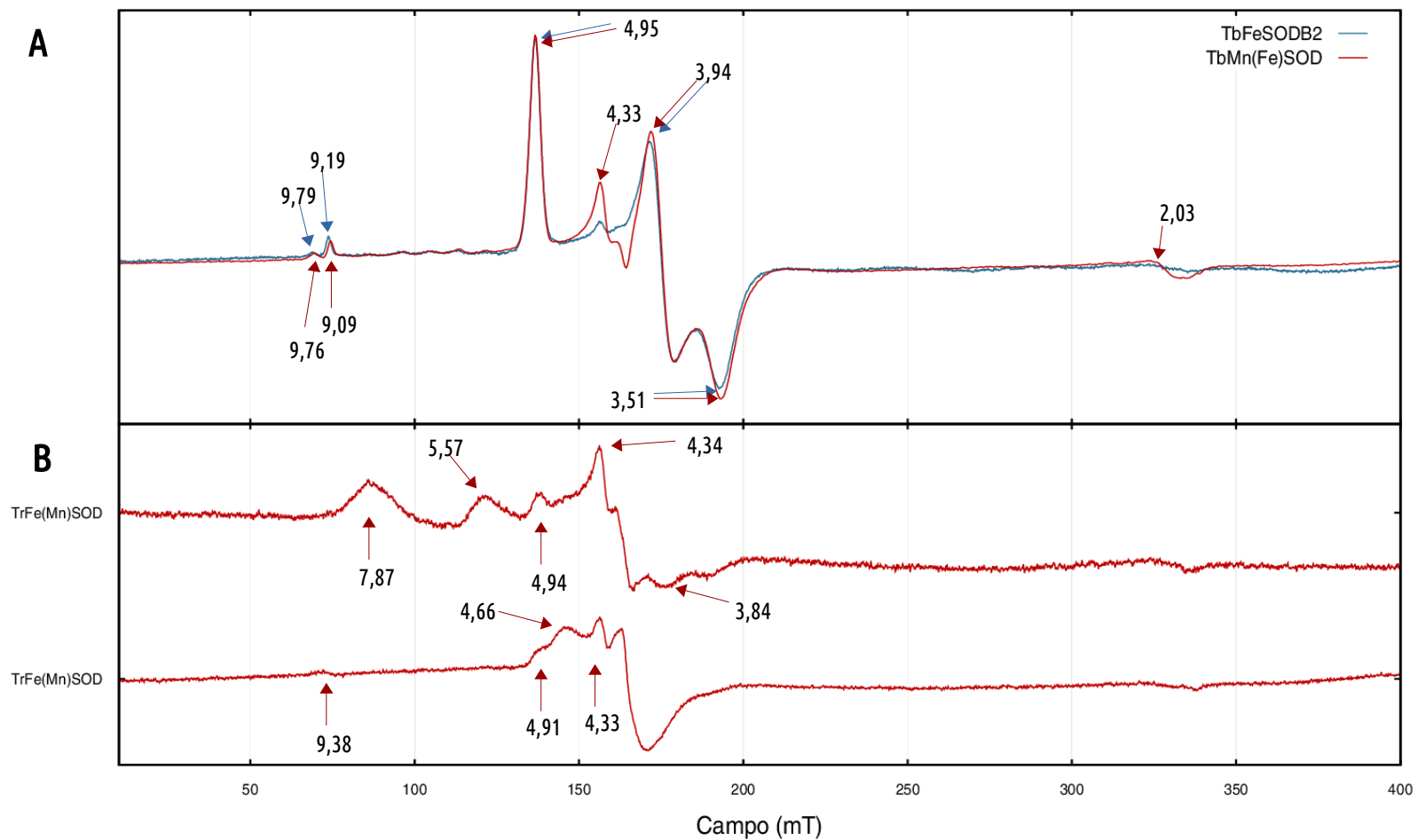


Figura 4.8.1 – Espectros de EPR-CW para a TbFeSODB2 e TrMnSOD. (A) Em vermelho encontram-se destacados os espectros das proteínas com uma mistura de Fe e Mn e em azul apenas Fe. (B) Espectros obtidos a TrMnSOD substituída com ferro (TrFe(Mn)SOD). Os valores de g para cada sinal são indicados por setas de cor igual ao do espectro ao qual se refere. Os parâmetros usados nas medidas foram: 1,0 G para amplitude de modulação, 40,96 ms para tempo de modulação, 10mW para potência de micro-ondas e campo de varredura de 4000G.

Devido à dificuldade de obter quantidade suficiente de proteína para as análises de EPR, tornou-se inviável a troca completa de metal por diálise extensiva, a qual resulta em baixo rendimento. Dessa forma, amostras expressas apenas com ferro ou uma mistura de metais foram possíveis de ser obtidas em quantidade suficiente. Os espectros obtidos para os mutantes da TbFeSODB2 expressos apenas com ferro ou com uma mistura de ferro e manganês são mostrados na figura 4.8.2.

A principal característica presente nos espectros de ferro dos mutantes é um aumento na intensidade do valor de g próximo a 4,33. Este sinal rômboico está relacionado à presença de ferro ligado inespecificamente, fora do sítio ativo e quando encontra-se elevado acaba por sobrepor os sinais característicos de ferro coordenado no sítio (66). Isso ocorre para os mutantes Q72G Fe/Mn, A145GFe, A159G Fe e D170Q Fe e D170Q Fe/Mn. Os sinais de ferro para 145 e 170 são muito similares aos obtidos para a FeSOD de *P. gingivalis*, uma superóxido dismutase cambialística (73). Os mutantes Q72G e A159G apresentaram sinais similares aos de FeSODs na presença de NaN_3 , na qual a azida se liga ao ferro no sítio ativo e modifica sua coordenação inibindo a atividade enzimática (134).

Os sinais de manganês (Mn^{2+}) presentes nos espectros são evidenciados por uma modificação na estrutura superfina próximo a valores de g igual a 6 (73,134), onde seis separações podem ser observadas nos valores de g 6,03 (Q72G), 6,46 (A145G), 6,04 (A159G) e 6,5 (D170Q). A figura 4.8.3 destaca a região entre 50 e 125 mT onde a modificação da estrutura superfina ao redor de g 6 foi observada para esses mutantes.

Apenas o mutante V25M apresentou mudança de estrutura superfina com seis separações em campo mais alto (g : 2,02). A TbFeSODB2 Fe/Mn e o mutante Q72G apresentam um sinal em g igual a 2,03.

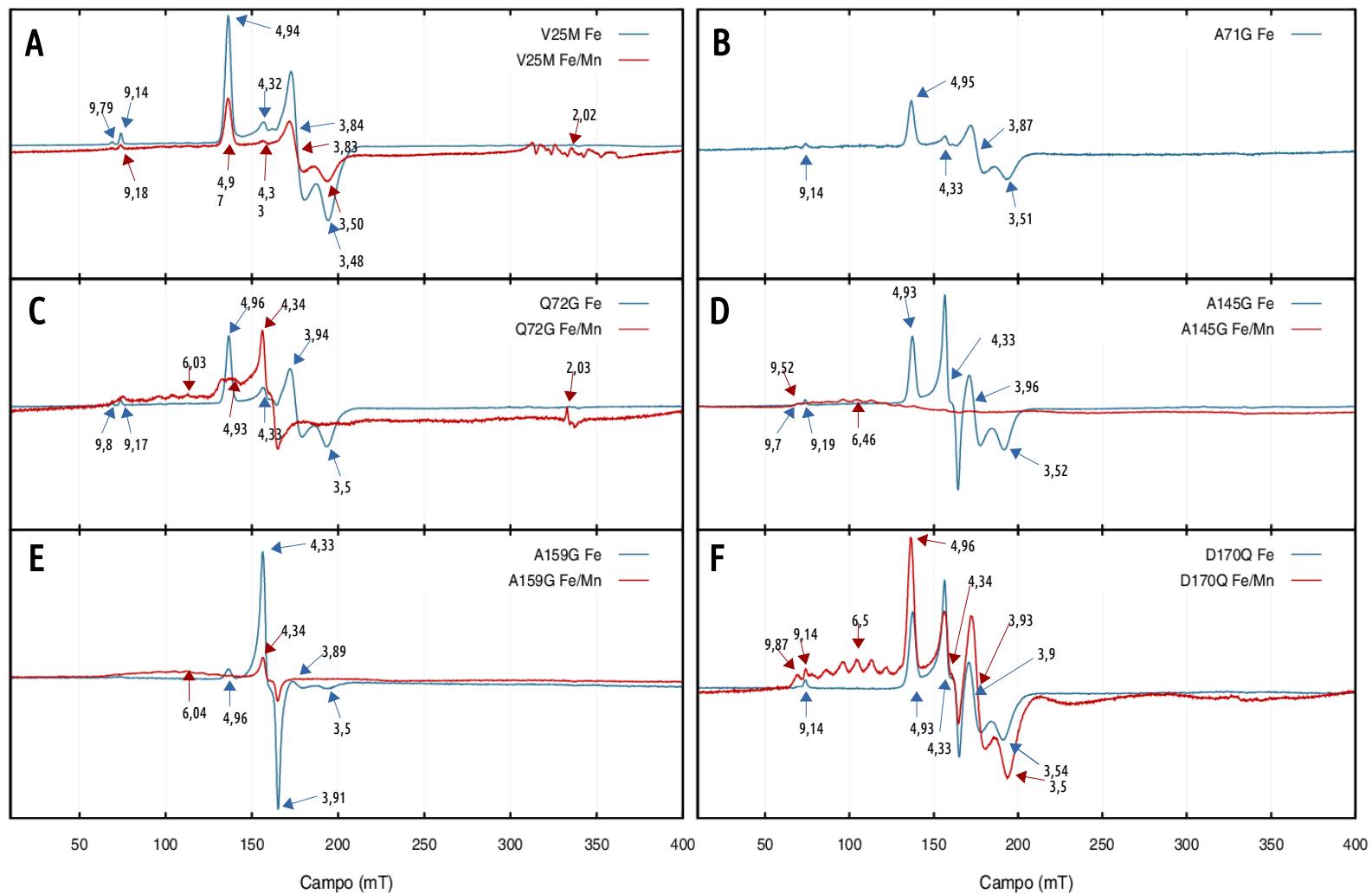


Figura 4.8.2 – Espectros de EPR-CW para os seis mutantes da TbFeSODB2: V25M (A), A71G (B), Q72G (C), A145G (D), A159G (E) e D170Q (F). Em vermelho encontram-se destacados os espectros das proteínas com uma mistura de Fe e Mn e em azul apenas Fe. Os valores de g para cada sinal são indicados por setas de igual ao do espectro ao qual se refere. Os parâmetros usados nas medidas foram: 1,0 G para amplitude de modulação, 40,96 ms para tempo de modulação, 10mW para potência de micro-ondas e campo de varredura de 4000G.

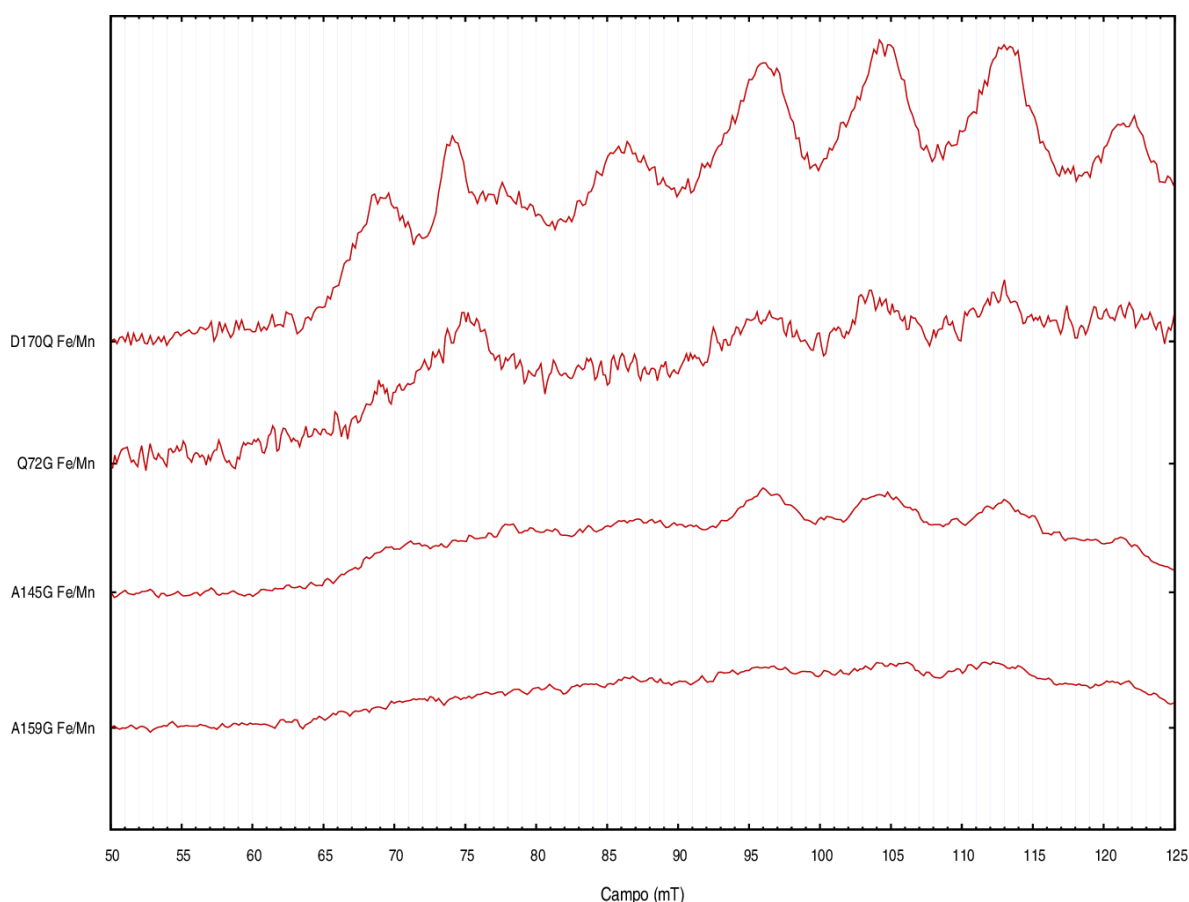


Figura 4.8.3 – Espectros de EPR-CW dos mutantes Q72G, A145G, A159G e D170Q apresentados na figura 4.8.2 no intervalo de 50 à 125 mT, onde uma mudança na estrutura superfina sugere a presença de manganês.

Como a obtenção de proteínas com apenas um dos metais não foi possível em alguns casos, uma mistura de populações de *spins* foi verificada em certos espectros. Nesses casos uma estimativa das populações pode ser feita a partir da integração dos espectros em duas etapas.

Uma vez que os espectros obtidos são a primeira derivada da curva de absorção da microonda em função do campo magnético aplicado, integrá-los resulta na obtenção desta curva de absorção, porém essa etapa é limitada pelo ajuste da linha de base. A segunda etapa de integração permite calcular a área sob a curva de absorção, sendo esta proporcional à quantidade de spins desemparelhados na amostra (135,136), torna-se possível comparar uma população de *spins* em relação a outra em um mesmo espectro.

Devido à má qualidade da linha de base dos espectros a curva para comparação das populações não pôde ser feita e a sobreposição apresentada pelos picos da curva de absorção não permite que maiores informações sejam extrapoladas (figura 4.8.4).

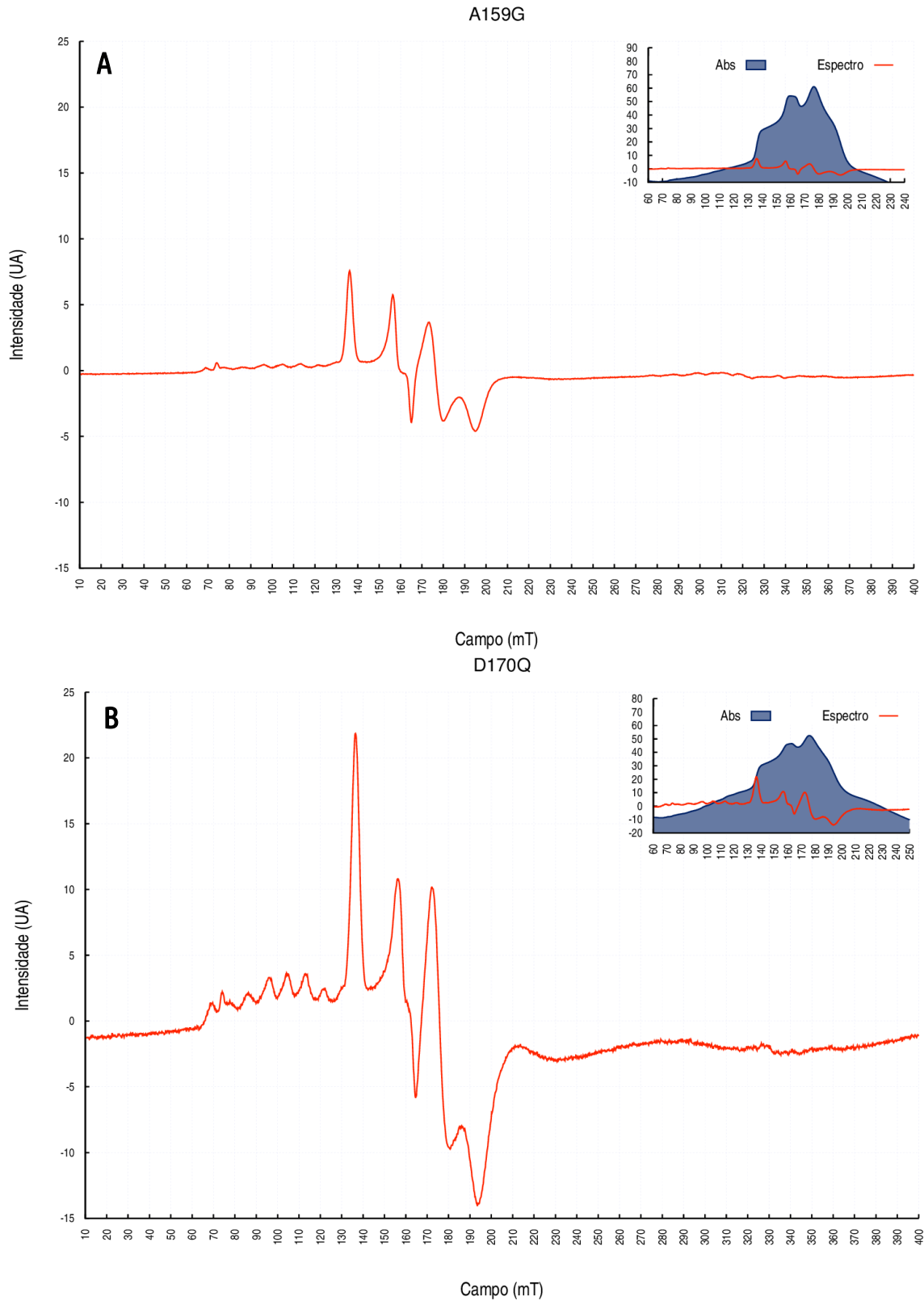


Figura 4.8.4 – Espectros com a presença de manganês e ferro com a curva de absorção resultante da integração do espectro inserida no canto superior direito de cada gráfico. (A) Espectro do mutante A159G e (B) espectro do mutante D170Q, ambos já mostrados na figura 4.8.2.

Em síntese, os espectros obtidos permitiram analisar o ambiente local dos átomos de manganês e ferro ligados às SODs mesmo em amostras com a presença de ambos os metais. A comparação entre as populações de spins presentes em cada amostra não foi possível, mas os gráficos da integração dos espectros (Figura 4.8.4) são capazes de mostrar uma sobreposição de picos que seria facilmente resolvida com o melhoramento da linha de base.

5 CONCLUSÃO

Foram produzidos com sucesso os mutantes da TbFeSODB2, cujas trocas de resíduos em posições específicas foram identificados previamente por Análise de Acoplamento Estatístico (SCA) como possíveis determinantes da especificidade por metal. Os genes dos mutantes foram expressos em sistema heterólogo para produção de proteínas, procedimento que foi capaz de gerar quantidade de proteína suficiente para as análises posteriores.

Uma limitação foi encontrada na etapa de troca do metal, na qual grande parte da proteína produzida foi perdida durante as etapas de diálise extensiva e outros protocolos, como o de desnaturação, não retornaram melhores resultados. Novas abordagens precisam ser estudadas para que maiores quantidades de enzima ligada a apenas um dos metais sejam obtidas, dessa forma as análises que demandam maior quantidade de proteína poderiam ser realizadas, não apenas os ensaios de atividade.

A dificuldade de cristalização da TbFeSODB2 já foi descrita anteriormente (90), sendo contornada apenas com o emprego da técnica de *seeding*. Apesar da técnica ter sido aplicado para a cristalização dos mutantes, nenhum resultado foi observado até o momento e os cristais obtidos recentemente pelo rastreamento de condições não puderam ser difratados em tempo hábil para inclusão no presente trabalho. Apesar desta dificuldade, algumas mudanças dos centros metálicos foram observadas por Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). Essas mudanças corroboram com os dados de atividade superóxido dismutásica: espectros de EPR que demonstraram sinais similares ao de SOD com ferro ligado à azida, normalmente inativas. Embora as amostras analisadas por EPR apresentassem uma mistura de populações de proteínas ligadas com ferro e manganês, os sinais de ambos os metais mostraram-se muito claros e o correto ajuste da linha de base dos espectros permitiria ainda comparar as populações de *spins* referentes às diferentes espécies metálicas.

A identificação dos determinantes estruturais responsáveis pelo ajuste fino da especificidade por metal das Mn/Fe SODs pode ser investigada futuramente com a produção de genes com combinações das mutações estudadas no presente trabalho. Desta forma, as contribuições conjuntas das trocas de resíduos nas posições preditas por análise de acoplamento estatístico podem ser analisadas.

Diversos aspectos podem ser abordados no estudo das superóxido dismutases presentes em *Trypanosoma brucei*. Os dados que apontam a existência de apenas FeSODs neste organismo

levantam questões como a aquisição e emprego de ferro e manganês pelo protozoário, seu complexo ciclo de vida e a relação com o hospedeiro. Adicionalmente, Trypanosomas são eucariotos ancestrais que divergiram logo após a aquisição da mitocôndria, neste contexto a evolução das defesas antioxidantes, eventos de endossimbiose que levaram à aquisição (ou não aquisição) de proteínas como MnSODs são interessantes questões evolutivas.

Considerando as mutações sugeridas para dirigir a especificidade de ferro para manganês, os mutantes pontuais gerados no presente trabalho podem ser considerados como a predição de formas mais atuais de SODs. O caminho inverso, dirigir a especificidade de manganês para ferro, pode ser interpretada como a reconstrução de enzimas ancestrais. De acordo com a variação da disponibilidade de metais da Terra em termos de eras geológicas, as primeiras enzimas com função de oxidorreductase, surgidas antes da grande oxidação do planeta, teriam empregado ferro para exercer sua atividade. O surgimento de enzimas que incorporam manganês acompanhou o aumento da disponibilidade desse metal conforme a concentração de oxigênio atmosférica crescia e gerava óxidos solúveis de manganês, mais disponíveis que os de ferro.

A obtenção da estrutura da TrMnSOD com boa resolução (1,7 Å) pode ter aplicação biotecnológica direta já que esta enzima apresenta importante estabilidade térmica e pode ser incluída em processos nos quais seja necessário o controle da geração de radical superóxido e/ou peróxido de hidrogênio em temperatura elevada. A estrutura resolvida apresenta enovelamento característico de SOD, tratando-se de um homotetrâmero com um sítio ativo em cada cadeia e um átomo de manganês em cada sítio.

REFERÊNCIAS*

1. McCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244(22):6049–55.
2. Lane N. *Oxygen: The Molecule that Made the World.* New York: Oxford University Press; 2002. 374 p.
3. Keele Jr BB, MacCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase from *Escherichia coli* B. A new manganese-containing enzyme. *J Biol Chem.* 1970;245(22):6176–81.
4. Yost Jr FJ, Fridovich I. An iron-containing Superoxide Dismutase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1973;248(14):4905–8.
5. Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide Dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem.* 1973;248(10):3582–92.
6. Dufernez F, Yernaux C, Gerbod D, Noël C, Chauvenet M, Wintjens R, et al. The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2006 Jan 15 [cited 2015 Jan 19];40(2):210–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413404>
7. Chambergo FS, Valencia EY, Ferreira-Júnior JR, Camilo CM, Campana PT. Conformational stability of recombinant manganese superoxide dismutase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Int J Biol Macromol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;50(1):19–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.09.015>
8. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(D1):222–30.
9. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):235–42.
10. Bachega JFR, Navarro MVAS, Bleicher L, Bortoleto-Bugs RK, Dive D, Hoffmann P, et al. Systematic structural studies of iron superoxide dismutases from human parasites and a statistical coupling analysis of metal binding specificity. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2009;77(1):26–37.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

11. Crichton RR. *Biological Inorganic Chemistry. A new Introduction to Molecular Structure and Function*. 2nd ed. New York: Elsevier; 2012. 472 p.
12. Miller A-F. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett* [Internet]. Federation of European Biochemical Societies; 2012 Mar 9 [cited 2015 Jan 8];586(5):585–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079668>
13. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2007. 851 p.
14. Glusker JP, Katz AK, Bock CW. Metal Ions in Biological Systems. *Rigaku J*. 1999;16(2):8–17.
15. Irving H, Williams RJP. The stability of transition-metal complexes. *Nature*. 1948;162:746–7.
16. Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, Holliday GL, Thornton JM. Metal ions in biological catalysis: From enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem*. 2008;13(8):1205–18.
17. Holm RH, Kennepohl P, Solomon EI. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chem Rev*. 1996;(96):2239–314.
18. Cotruvo Jr JA, Stubbe J. Metallation and mismetallation of iron and manganese proteins in vitro and in vivo: the class I ribonucleotide reductases as a case study. *Meallomics*. 2012;4(10):1020–36.
19. Kim JD, Senn S, Harel A, Jelen BI, Falkowski PG, B PTRS. Discovering the electronic circuit diagram of life : structural relationships among transition metal binding sites in oxidoreductases Discovering the electronic circuit diagram of life : structural relationships among transition metal binding sites in oxi. *Phil Trans R Soc B*. 2013;368(20120257).
20. Schulz G, Schirmer R. *Principles of Protein Structure*. 2nd ed. New York, EUA: Springer; 1979. 314 p.
21. Graham JB, Aguilar NM, Dudley R, Gans C. Implications of the late Palaeozoic oxygen pulse for physiology and evolution. *Nature*. 1995. p. 117–20.
22. Margulis L, Matthews C, Haselton A. *Environmental Evolution: Effects of the origin and evolution of life on planet Earth*. 2nd ed. Massachusetts: MIT Press; 2000. 338 p.

23. Ilbert M, Bonnefoy V. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;1827(2):161–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.10.001>
24. Williams RJP, Fraústo Da Silva JJR. Evolution was chemically constrained. *J Theor Biol.* 2003;220(3):323–43.
25. Anfinsen CB, Edsall JT, Richards FM, Eisenberg DS. *Advances in Protein Chemistry*. San Diego: Academic Press, Inc.; 1991.
26. International Union of Biochemistry and Molecular Biology [Internet]. [cited 2015 Mar 18]. Available from: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>
27. Foster AW, Osman D, Robinson NJ. Metal Preferences and Metallation. 2014;289(41):28095–103.
28. Chakrabarti P. Geometry of interaction of metal ions with histidine residues in protein structures. *Protein Eng.* 1990;4(1):57–63.
29. Schweitzer C, Schmidt R. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chem Rev.* 2003;103(5):1685–757.
30. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science.* 1954;119(1):623–6.
31. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. New York: W. H. Freeman; 2005.
32. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 1961;191:144–8.
33. Lane N. *Power, Sex, Suicide Mitochondria and the Meaning of Life*. New York: Oxford University Press; 2005. 368 p.
34. Banerjee R. *Redox Biochemistry*. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2008. 317 p.
35. Grivennikova VG, Vinogradov AD. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2006;1757:553–61.
36. Fridovich I. Mitochondria: Are they the seat of senescence? *Aging Cell.* 2004;3(November 2003):13–6.

37. Margulis L, Sagan D. *Microcosmos. Four Billion Years of Microbial Evolution*. Berkeley: University of California Press; 1986. 304 p.
38. Margulis L. *Symbiosis in cell evolution*. San Francisco, CA: W. H. Freeman; 1981. 419 p.
39. Wintjens R, Gilis D, Rooman M. Mn/Fe superoxide dismutase interaction fingerprints and prediction of oligomerization and metal cofactor from sequence. *Proteins*. 2008;70:1564–77.
40. Keele BB, Fridovich I. An Enzyme-Based Theory of Obligate Anaerobiosis: The Physiological Function of Superoxide Dismutase. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1971;68(5):1024–7.
41. Takao M, Yasui A, Oikawa A. Unique Characteristics of Superoxide Dismutase of a Strictly Anaerobic Archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J Biol Chem*. 1991;266(22):14151–4.
42. Abreu I a, Cabelli DE. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010 Feb [cited 2015 Jan 9];1804(2):263–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19914406>
43. Perry JJP, Shin DS, Getzoff ED, Tainer J a. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;1804(2):245–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.004>
44. Schoepp-cothenet B, Lis R Van, Philippot P, Magalon A, Russell MJ, Nitschke W. The ineluctable requirement for the trans-iron elements molybdenum and/or tungsten in the origin of life. *Nature*. 2012;2(263):1–5.
45. Parge HE, Hallewell R a, Tainer J a. Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu,Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(13):6109–13.
46. Deng HX, Hentati a, Tainer J a, Iqbal Z, Cayabyab a, Hung WY, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science*. 1993;261(5124):1047–51.
47. Mitchell JD, Borasio GD. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2007;369(9578):2031–41.
48. Smith MW, Doolittle RF. A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *J Mol Evol*. 1992;34(2):175–84.

49. Lah MS, Dixon MM, Patridge K a, Stallings WC, Fee J a, Ludwig ML. Structure-function in *Escherichia coli* iron superoxide dismutase: comparisons with the manganese enzyme from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry*. 1995;34(5):1646–60.
50. Luk E, Yang M, Jensen LT, Bourbonnais Y, Culotta VC. Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2005;280(24):22715–20.
51. Wuerges J, Lee J-W, Yim Y-I, Yim H-S, Kang S-O, Djinic Carugo K. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(23):8569–74.
52. Barondeau DP, Kassmann CJ, Bruns CK, Tainer J a., Getzoff ED. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry*. 2004;43(25):8038–47.
53. Buettner GR, Ng CF, Wang M, Schafer FQ. A New Paradigm: Manganese Superoxide Dismutase Influences the Production of H₂O₂ in Cells and Thereby Their Biological State. 2006;41:1338–50.
54. Liao YJ, Wen L, Shaw JF, Lin CT. A highly stable cambialistic-superoxide dismutase from *Antrodia camphorata*: Expression in yeast and enzyme properties. *J Biotechnol*. 2007;131(1):84–91.
55. HUANG J-K, WEN L, MA H, HUANG Z-X, LIN C-T. Biochemical Characterization of a Cambialistic Superoxide Dismutase Isozyme from Diatom *Thalassiosira weissflogii*: Cloning, Expression, and Enzyme Stability. *J Agric Food Chem*. 2005;53:6319–25.
56. *Biochem J*. A Cambialistic SOD in a Strictly Aerobic Hyperthermophilic Archaeon, *Aeropyrum pernix*. 1999;126:218–25.
57. Meier B, Barra D, Bossa F, Calabrese L, Rotilio G. Synthesis of either Fe- or Mn-superoxide dismutase with an apparently identical protein moiety by an anaerobic bacterium dependent on the metal supplied. *J Biol Chem*. 1982;257(23):13977–80.
58. Martin ME, Byers BR, Olson MOJ, Salin ML, Arceneaux JE, Tolbert C. A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. *J Biol Chem*. 1986;261(20):9361–7.
59. Hiraoka BY, Yamakura F, Sugio S, Nakayama K. A change of the metal-specific activity of a cambialistic superoxide dismutase from *Porphyromonas gingivalis* by a double mutation of Gln-70 to Gly and Ala-142 to Gln. *Biochem J*. 2000;345 Pt 2:345–50.

60. Tabares LC, Bittel C, Carrillo N, Bortolotti A, Cortez N. The Single Superoxide Dismutase of *Rhodobacter capsulatus* Is a Cambialistic, Manganese-Containing Enzyme. *J Bacteriol.* 2003;185(10):3223–7.
61. Lancaster VL, LoBrutto R, Selvaraj FM, Blankenship RE. A cambialistic superoxide dismutase in the thermophilic photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *J Bacteriol.* 2004;186(11):3408–14.
62. Muñoz IG, Moran JF, Becana M, Montoya G. The crystal structure of an eukaryotic iron superoxide dismutase suggests intersubunit cooperation during catalysis. *Protein Sci.* 2005;14(2):387–94.
63. Bull C, Fee JA. Steady-state kinetic studies of superoxide dismutases: properties of the iron containing protein from *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc.* 1985;107(11):3295–304.
64. Tabares LC, Gätjens J, Un S. Understanding the influence of the protein environment on the Mn(II) centers in Superoxide Dismutases using High-Field Electron Paramagnetic Resonance. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;1804(2):308–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.09.027>
65. Miller A. Fe superoxide dismutase. In: *Handbook of Metalloproteins*. Chichester: John Wiley & Sons, Inc.; 2001. p. 667–82.
66. Vance CK, Miller AF. Spectroscopic comparisons of the pH dependencies of Fe-substituted (Mn)superoxide dismutase and Fe-superoxide dismutase. *Biochemistry.* 1998;37(16):5518–27.
67. Grove L, Brunold T. Second-sphere tuning of the metal ion reduction potentials in iron and manganese superoxide dismutases. *Comm Inorg Chem.* 2008;29:134–68.
68. Atzenhofer W, Regelsberger G, Jacob U, Peschek G a., Furtmüller PG, Huber R, et al. The 2.0 Å resolution structure of the catalytic portion of a cyanobacterial membrane-bound manganese superoxide dismutase. *J Mol Biol.* 2002;321(3):479–89.
69. Boucher IW, Kallioma AK, Levdikov VM, Blagova E V., Fogg MJ, Brannigan J a., et al. Structures of two superoxide dismutases from *Bacillus anthracis* reveal a novel active centre. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2005;61(7):621–4.
70. Lockless SW, Ranganathan R. Steve W. Lockless and Rama Ranganathan. *Science* (80-). 1999;286:295–9.
71. Evolutionarily conserved networks of residues mediate allosteric communication in proteins.

72. Wintjens R, Noël C, May ACW, Gerbod D, Dufernez F, Capron M, et al. Specificity and Phenetic Relationships of Iron- and Manganese-containing Superoxide Dismutases on the Basis of Structure and Sequence Comparisons. *J Biol Chem*. 2004;279(10):9248–54.
73. Yamakura F, Sugio S, Hiraoka BY, Ohmori D, Yokota T. Pronounced conversion of the metal-specific activity of superoxide dismutase from *Porphyromonas gingivalis* by the mutation of a single amino acid (Gly155Thr) located apart from the active site. *Biochemistry*. 2003;42(36):10790–9.
74. Halabi N, Rivoire O, Leibler S, Ranganathan R. Protein Sectors: Evolutionary Units of Three-Dimensional Structure. *Cell* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;138(4):774–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.038>
75. Russ WP, Lowery DM, Mishra P, Yaffe MB, Ranganathan R. Natural-like function in artificial WW domains. *Nat Lett*. 2005;437(22):579–83.
76. Hampl V, Hug L, Leigh JW, Dacks JB, Lang BF, Simpson AGB, et al. Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups”. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(10):3859–64.
77. Manta B, Fleitas L, Comini M. Iron Metabolism in Pathogenic Trypanosomes. In: Arora S, editor. *Iron Metabolism*. San Diego: InTech; 2012. 194 p.
78. Simarro PP, Cecchi G, Franco JR, Paone M, Diarra A, Priotto G, et al. Monitoring the Progress towards the Elimination of Gambiense Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(6):1–14.
79. Menna-Barreto RFS, De Castro SL. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: The pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *Biomed Res Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014:1–14.
80. Turrens JF, McCord JM. The iron-containing superoxide dismutases of Trypanosomatidae. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(2):193–5.
81. Asojo O a., Schott EJ, Vasta GR, Silva AM. Structures of PmSOD1 and PmSOD2, two superoxide dismutases from the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2006;62(October):1072–5.
82. Tomás AM, Castro H. Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. *Antioxid Redox Signal*. 2012;19(7):696–707.

83. Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Upadhyay RS, Druzhinina I, Tuohy MG. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Polonia: Elsevier; 2014. 549 p.
84. Mukherjee PK, Sigh, U.S., Horwitz B.A., Schmoll, M., Mukherjee, M. UC of, Way N. *Trichoderma: Biology and Applications*. Wallingford, Oxfordshire; 2013. 296 p.
85. Reese E. History of the cellulase program at the US Army Natick Development Center. *Biotechnol Bioeng*. 1976;Symp. 6:9–20.
86. Schuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of Trichoderma. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;87:787–99.
87. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. v. 3.
88. Bleicher L, Lemke N, Garratt RC. Using amino acid correlation and community detection algorithms to identify functional determinants in protein families. *PLoS One*. 2011;6(12):1–11.
89. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM a, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 2009;25(9):1189–91.
90. Bachega JFR. Estrutura cristalográfica da enzima superóxido dismutase de *Trypanosoma brucei* e análise da especificidade do metal incorporado por acoplamento estatístico. [Dissertação (Mestrado em Física Biomolecular)]. Universidade de São Paulo; 2008.
91. Higuchi R. Recombinant PCR. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, CA: Academic Press, Inc.; 1990. p. 177–83.
92. Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc*. 2007;2(4):924–32.
93. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: *The Proteomics Protocols Handbook*. 2005. p. 571–607.
94. Packer L. *Methods in Enzymology*. Volume 349 - Superoxide Dismutase. Packer L, editor. San Diego, CA, USA: Elsevier Science; 2002.
95. Whittaker MM, Lerch TF, Kirillova O, Chapman MS, Whittaker JW. Subunit dissociation

and metal binding by *Escherichia coli* apo-manganese superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*. Elsevier Inc.; 2011;505(2):213–25.

96. Manchenko GP. *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*. 2nd ed. Florida, USA: CRC Press LLC; 2003. 570 p.
97. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988;34(3):497–500.
98. Peskin A V, Winterbourn CC. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin Chim Acta*. 2000;293(1-2):157–66.
99. Doublet S. How to Use Dynamic Light Scattering to Improve the Likelihood of Growing Macromolecular Crystals. *METHODS Mol Biol*. 2007;363(September 2015):323.
100. Bergfors T. Seeds to crystals. *J Struct Biol*. 2003;142(1):66–76.
101. D'Arcy A, Bergfors T, Cowan-Jacob SW, Marsh M. Microseed matrix screening for optimization in protein crystallization: what have we learned? *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun* [Internet]. International Union of Crystallography; 2014;F70(9):1117–26. Available from: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S2053230X14015507>
102. Leslie AGW. The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2006;62:48–57.
103. Evans P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2006;62:72–82.
104. Kantardjieff K a, Rupp B. Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci*. 2003;12(9):1865–71.
105. Matthews BW. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*. 1968;33(2):491–7.
106. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. International Union of Crystallography; 2011;67(4):235–42.
107. Stein N. CHAINSAW: A program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. *J Appl Crystallogr*. International Union of Crystallography; 2008;41(3):641–3.

108. Vagin a., Teplyakov a. An approach to multi-copy search in molecular replacement. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. International Union of Crystallography; 2000;56(12):1622–4.
109. Adams PD, Afonine P V, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* [Internet]. 2010 Feb [cited 2014 Jul 10];66(Pt 2):213–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2815670&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
110. Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, et al. *REFMAC* 5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* [Internet]. 2011;67(4):355–67. Available from: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444911001314>
111. Emsley P, Cowtan K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. International Union of Crystallography; 2004;60(12 I):2126–32.
112. Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy D a., Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. International Union of Crystallography; 2010;66(1):12–21.
113. Laskowski R a., MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr*. International Union of Crystallography; 1993;26(2):283–91.
114. DeLano WL. *The PyMOL Molecular Graphics System*. DeLano Scientific. San Carlos, CA, USA: DeLano Scientific; 2002.
115. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13):1605–12.
116. Brustolon M. *Electron Paramagnetic Resonance. A practitioner's toolkit*. Brustolon M, Giamello E, editors. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2009. 539 p.
117. Janert PK. *Gnuplot in Action. Understanding data with Graphs*. 2nd ed. Greenwich: Manning Publications; 2009. 396 p.
118. Salazar JR. *Essential Matlab and Octave*. Florida, USA: CRC Press LLC; 2014. 288 p.

119. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* [Internet]. 2010;5(4):725–38. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2010.5>
120. Yamakura F, Rardin RL, Petsko G a, Ringe D, Hiraoka BY, Nakayama K, et al. Inactivation and destruction of conserved Trp159 of Fe-superoxide dismutase from *Porphyromonas gingivalis* by hydrogen peroxide. *Eur J Biochem* [Internet]. 1998;253(1):49–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9578460>
121. Stijlemans B, Vankrunkelsven A, Brys L, Magez S, De Baetselier P. Role of iron homeostasis in trypanosomiasis-associated anemia. *Immunobiology* [Internet]. 2008;213(9-10):823–35. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171298508000934>
122. Taylor MC, McLatchie AP, Kelly JM. Evidence that transport of iron from the lysosome to the cytosol in African trypanosomes is mediated by a mucolipin orthologue. *Mol Microbiol* [Internet]. 2013;89(3):420–32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3828870&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
123. Costa LG, Aschner M. Manganese in Health and Disease [Internet]. Costa LG, Aschner M, editors. *Uma ética para quantos?* Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry; 2015. 632 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003161>
124. Kabiri M, Steverding D. Identification of a developmentally regulated iron superoxide dismutase of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* [Internet]. 2001;360(Pt 1):173–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=122215&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
125. Adams PD, Afonine P V., Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2010;66(2):213–21.
126. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* [Internet]. International Union of Crystallography; 2010;66(Pt 4):486–501. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2852313&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
127. Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, de Bakker PIW, Word JM, Prisant MG, et al. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins*. 2003;50(3):437–50.
128. Allison SA, Bacquet RJ MJ. Simulation of the diffusion- controlled reaction between superoxide and superoxide dismutase. *Biopolymers*. 1988;27(2):251–69.

129. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Baltimore: Springer; 2006. 954 p.
130. Edwards R a., Whittaker MM, Whittaker JW, Baker EN, Jameson GB. Outer sphere mutations perturb metal reactivity in manganese superoxide dismutase. *Biochemistry*. 2001;40:15–27.
131. Lee S, Sawaya MR, Eisenberg D. Structure of superoxide dismutase from *Pyrobaculum aerophilum* presents a challenging case in molecular replacement with multiple molecules, pseudo-symmetry and twinning. *Acta Crystallogr*. 2003;D59:2191–9.
132. Scandurra R, Consalvi V, Chiaraluce R, Politi L, Engel PC. Protein thermostability in extremophiles. *Biochimie* [Internet]. 1998;80(11):933–41. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908400888902>
133. Gratepanche S, Ménage S, Touati D, Wintjens R, Delplace P, Fontecave M, et al. Biochemical and electron paramagnetic resonance study of the iron superoxide dismutase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;120(2):237–46.
134. Whittaker MM, Whittaker JW. Thermally triggered metal binding by recombinant *Thermus thermophilus* manganese superoxide dismutase, expressed as the apo-enzyme. *J Biol Chem* [Internet]. 1999;274(49):34751–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10574944>
135. Jonas M, Marseglia E. The case for the use of integrated spectrum deconvolution in ESR dating—a numerically generated example. *Radiat Meas* [Internet]. 1997;27(2):359–63. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350448796001102> \n <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350448796001102/pdf?md5=06eb89aa998066f72aaf8c317604eed&pid=1-s2.0-S1350448796001102-main.pdf>
136. Eaton GR, Eaton SS, Barr DP, Weber RT. Quantitative EPR: A practitioners guide. San Diego: Springer; 2010. 185 p.