Biofísica Molecular de Proteínas e Sistemas Modelo

Texto que sistematiza o trabalho científico do candidato para a obtenção do título de Livre Docência

Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho

Departamento de Física e Informática
Instituto de Física de São Carlos
Universidade de São Paulo

São Carlos
2008

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
Referências Bibliográficas	8
Capítulo 1. Diidrorotato desidrogenase	1.1
1.1 Introdução e Relevância	1.1
1.1.1 A enzima DHODH de <i>Escherichia coli</i>	1.6
1.2 Resultados – Marcação de spin sítio dirigida em EcDHODH	1.10
1.2.1 Dinâmica do marcador de spin por SDSL	1.11
1.2.2 SDSL – EcDHODH com resíduos nativos de cisteína preservados	1.14
1.2.3 EcDHODH com resíduos de cisteína nativos substituídos por resíduos de alanina ...	1.16
1.3 SDSL – Conclusões	1.21
1.4 Publicações geradas a partir deste trabalho	1.21
1.5 Referências Bibliográficas	1.22
Capítulo 2. Clorocatecol 1,2-Dioxigenase	2.1
2.1 Introdução e Relevância	2.1
2.2 Publicações geradas a partir deste trabalho	2.6
2.3 Referências Bibliográficas	2.6
Capítulo 3. Metaloproteínas	3.1
3.1 Introdução e Justificativa	3.1
3.1.1 Proteínas de Cobre envolvidas em Processos de Transferência Eletrônica	3.2
3.1.2 Glioxalase II	3.4
3.1.3 Hemoglobina Extracelular Gigante	3.5
3.2 Publicações geradas a partir desse trabalho	3.6
3.3 Referências Bibliográficas	3.7
Capítulo 4. Complexos Metálicos de Interesse Biológico	4.1
4.1 Introdução e Relevância	4.1
4.1.1 Sistemas modelo para interações moleculares	4.3
4.1.2 Caracterização de complexos de cobre com aplicações farmacológicas	4.4
4.2 Publicações geradas a partir desse trabalho	4.6
4.3 Referências Bibliográficas	4.7

Dedicatória

*“Dona da minha cabeça
Quero tanto lhe ver chegar
Quero saciar minha sede milhões de vezes, milhões de vezes
Na força dessa beleza é que eu sinto firmeza e paz
Por isso nunca desapareça
Nunca me esqueça, eu não te esqueço jamais
Eu digo e ela não acredita, ela é bonita demais”
(Dona da Minha Cabeça, Geraldo Azevedo e Fausto Nilo)*

À “dona da minha cabeça”, minha Preticulica, minha Tica.
Aos outros donos da minha cabeça, que me fazem perder a razão, meus cabeçudos: Pedro e
Rafaela. Só consigo achá-los lindos!

Agradecimentos

Não há como não começar agradecendo aos amigos que fazem o Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas. Em particular, ao Prof. Otaciro Nascimento pelo apoio incondicional em todas as etapas que me levaram até este momento. Às Profas. Ana Paula e Leila Beltramini pela colaboração nos trabalhos realizados e pela amizade. Aos mais novos colegas do grupo, Prof. Ricardo DeMarco e Nelma Bossolan. À Bel, Andressa e João, mais do que técnicos, super-técnicos! Ao recém-incorporado José Fernando, profissional diferenciado sempre disposto a contribuir. À Ester, pela organização competente de minha vida acadêmica, incluindo a atribulação do meu memorial.

Aos meus alunos: Sheila, Ernanni (Ceará), Ana Paula, Fernando, Daniel, Luis Guilherme (Militar) e Nathalya. Sem vocês perderíamos uma de nossas missões mais nobres.

Aos colegas do IFSC/USP, incluindo-se docentes e funcionários em todos os níveis. Em particular, aos colegas do Laboratório de Ensino, com os quais divido parte de minhas atividades. Aos Profs. Claudio Magon e Pedro Donoso, a convivência tem sido um prazer. Todos participaram direta ou indiretamente daquilo que aqui se apresenta.

Aos meus colaboradores, que me emprestaram suas mãos e suas idéias e confiaram no trabalho que podemos fazer.

À minha família de sangue: minha mãe Fátima, meu pai Antonio, meus irmãos Valéria e Felipe, meus sobrinhos (Davi e Gabriel). Deram-me tudo na vida!

À minha família adquirida: meu sogro Noé, minha sogra Bernadete, cunhadas, sobrinhos... De quem roubo o convívio familiar ao longo do ano. Não é fácil saciar a fome de um cearense!

Aos amigos de Colégio Militar de Fortaleza, desde 1984 sempre presentes!

Às agências de fomento, das quais tenho recebido apoio crucial para minha evolução como pesquisador.

INTRODUÇÃO

O século recém-encerrado foi, para muitos, o século das Ciências Físicas. Tivemos avanços significativos em diversos campos da Física tais como a invenção do laser, dos dispositivos semicondutores com toda a Física do Estado Sólido, as teorias sobre a estrutura da matéria, incluindo-se a Mecânica Quântica, a relatividade de Einstein, dentre outros. Sem sobra de dúvidas, avanços que alteraram completamente a visão do homem sobre muitos aspectos da Natureza que nos rodeia e da qual vivemos. Já em meados do século XX pudemos observar o início de um movimento irrefreável e que viria a dominar a maneira de se fazer pesquisa nos anos posteriores: a integração de áreas tidas, em princípio, como díspares. Aceito o risco em dizer que a determinação da estrutura tridimensional da molécula de ácido desoxiribonucleico (DNA) tenha sido o passo crucial de uma mudança que chegaria até mim. As implicações decorrentes desses estudos são tão abrangentes que certamente podem justificar qualquer gafe cronológica cometida neste momento. Além dos resultados impactantes *per se*, naquela oportunidade também apareceu para o mundo, de forma inicialmente restrita, uma nova maneira de se investigar processos biologicamente relevantes. Os esforços e as especialidades combinadas de Francis Crick (físico), James Watson (bioquímico) e Maurice Wilkins (físico), que aplicaram a técnica de difração de raios X em um problema intrinsecamente bioquímico, produziram um novo paradigma de como se atuar em Ciências. Alguns podem reclamar que não citei o trabalho de Perutz e Kendrew sobre a estrutura de proteínas globulares, mas o ano de 1962 foi profícuo em nos apresentar, pelo menos na forma de sua

coroação com um Prêmio Nobel, projetos em que visões interdisciplinares se combinaram para produzir resultados marcantes.

O Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina no ano de 1962 e o número de áreas afetadas após a descoberta da estrutura do DNA fazem-nos acreditar que realmente aqueles trabalhos são um marco do que eu mesmo costumo pensar como uma nova Biologia/Bioquímica. Permito-me provocar e ousar acreditar que o século XXI será o século desta nova Biologia, em que o conhecimento não estará estanque em um único círculo de disciplinas, mas sim será adquirido a partir da intersecção entre círculos de áreas diversas. Sendo assim, o Físico tradicional terá que caminhar na direção dos conhecimentos em bioquímica e química, o Biólogo tradicional terá que esquecer sua ojeriza comum por matemática e assim sucessivamente para as diferentes especialidades. Alguns exemplos mais recentes dessa combinação de sucesso são os métodos de imagem por Ressonância Magnética Nuclear e as diversas formas de microscopia. Nestes exemplos temos um sentido de interdisciplinaridade que vai da Física para a Biologia. Isto é, toma-se um arsenal de ferramentas experimentais e teóricas tradicionalmente associado a pesquisas na área de Física e aplica-se em problemas de interesse biológico. Hoje podemos vislumbrar o momento em que uma nova Física será necessária para compreensão mais completa dos eventos biológicos. Estaremos diante da situação em que novas formas de espectroscopia precisarão ser criadas, se é que já não o foram com o advento das técnicas de “single molecule”; modelos teóricos, por exemplo, em Mecânica Estatística, precisarão de novas propostas para tratar problemas como o enovelamento de proteínas. O sentido de interdisciplinaridade mencionado acima será, então, inverso com a Biologia sendo a inspiradora de novos conceitos físicos. Temos até um nome para este sentido invertido da flecha da interdisciplinaridade: Física Biológica.

É fácil, portanto, depreender que vivemos um período de grande efervescência no que tange ao uso de metodologias conjuntas de diferentes áreas. Algumas armadilhas, entretanto, têm que ser evitadas. Uma delas é a banalização da utilização de termos como “interdisciplinaridade”, “nano” e “bio”. Outra delas é acabarmos, nós mesmos e também os estudantes, com conhecimento apenas superficial de muitas coisas e pouco aprofundado para que se faça ciência de qualidade. Mesmo assim, acredito que esse seja um desafio que vale o risco.

Dentro deste contexto é que pretendo iniciar o presente texto que sistematiza meu trabalho científico. A Biofísica Molecular usufruiu sobremaneira da sobreposição de grandes áreas das Ciências alcançada nos últimos tempos. Talvez nenhum outro campo de pesquisa tenha se tornado tão interdisciplinar quanto aquele que engloba o estudo dos fenômenos da vida. Incontáveis são os problemas biologicamente relevantes e que se valeram de contribuições advindas não somente da Física, mas também da Química, da Matemática e das Ciências da Computação. Em termos de Física,

podemos colocar a utilização de técnicas de “visualização molecular” como um dos pilares de sustentação de muitas linhas de pesquisa. Infelizmente, o mundo microscópico das macromoléculas biológicas não nos é acessível por visualização direta. Por isso, menciono aquilo que denomino de “visualização molecular”. Ao fazer isto, me refiro não somente às técnicas de determinação estrutural, como a difração de raios X, RMN e microscopia, mas também aos métodos empregados para acompanharmos a dinâmica experimentada pelos sistemas de interesse. Neste ponto, as espectroscopias em geral desempenham um papel fundamental.

A utilização de radiação eletromagnética de várias frequências nos permite investigar processos biológicos/bioquímicos em diferentes escalas de tempo e monitorar, ao usarmos sondas distintas e típicas de cada técnica, regiões estruturalmente diversas nos referidos processos. Assim, sondas como a cadeia lateral de resíduos de triptofano para estudos por fluorescência, absorção ótica de grupos nativos ou de grupos prostéticos em estruturas protéicas, a própria ligação peptídica e sua atividade ótica relevante para experimentos de dicroísmo nuclear, a vibração de ligações químicas passíveis de uso por técnicas de infravermelho, dentre várias outras, constituem parte essencial e participam ativamente do cotidiano de pesquisadores atuantes em áreas interdisciplinares como a Biofísica Molecular.

Podemos incluir, ainda, na lista acima de técnicas experimentais aquelas que se utilizam da existência de um grau de liberdade extra nas partículas subatômicas e que está associado a um momento angular intrínseco (spin) de tais partículas. Uma das variações destas técnicas que lidam com o spin representa parcela significativa da metodologia encontrada nos trabalhos discutidos no presente texto e, por conseguinte, voltaremos nossa atenção para elas e para suas aplicações em Biofísica. Estas técnicas são conhecidas como Ressonâncias Magnéticas (RM) e englobam o uso tanto de spins eletrônicos quanto nucleares. No primeiro caso, temos a RME para a ressonância eletrônica e no segundo, a RMN. Estas por si só constituem áreas complexas de atuação e não é objetivo deste texto discorrer detalhadamente sobre cada uma delas. No entanto, uma breve revisão cronológica, mais uma vez passível de imprecisões em minha eleição dos fatos tomados como historicamente relevantes, é salutar e nos ajuda a colocar o uso desses métodos dentro do contexto mais abrangente da Biofísica Molecular.

Assim e por incrível que pareça, já que a disseminação da RMN para uso em campos diversos foi quase totalitária, a RME “nasceu” primeiro. Recentemente, Igor Silkin, curador do Museu Zavoisky (Kazan, Rússia) determinou a data exata (21 de Janeiro de 1944) em que o primeiro espectro de ressonância eletrônica apareceu na tela do osciloscópio (**Figura 1**). Foi medido pelo brilhante físico russo Evgenii Zavoisky utilizando amostra de um sal de cobre ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [1]. Por outro lado, os grupos de Edward Purcell e Felix Bloch, nos Estados Unidos, observaram a ressonância

magnética nuclear em algum momento na virada de 1945-1946. Este trabalho lhes rendeu o Prêmio Nobel em Física de 1952. Em 1947, os grupos de Kammerow (EUA) e Bleaney (Reino Unido) iniciaram linhas de pesquisa em RME de compostos de metais de transição.

Figura 1: Primeiro espectro de Ressonância Magnética Eletrônica. Medido em 21 de Janeiro de 1944 por Evgenii Zavoisky utilizando o sal de cobre $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

O desenvolvimento das duas formas mais gerais em que podemos dividir a ressonância magnética continuou ao longo dos anos seguintes, com um marco para as futuras aplicações em Biofísica/Bioquímica/Biologia Estrutural sendo introduzido por Ernst e Anderson em 1965 [2]. Neste trabalho, Ernst e Anderson estudaram as condições em que a Transformada de Fourier do sinal de “free induction decay” (FID) poderia dar informações de uma maneira mais eficiente do que o tradicional método de medida por varredura do campo magnético. Com isso, revolucionaram a maneira de se fazer RMN, principalmente abrindo novos horizontes de aplicações para a determinação da estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas. Ernst foi agraciado com o Prêmio Nobel em Química no ano de 1991 por sua contribuição ao desenvolvimento da metodologia de RMN de alta resolução. Outra grande revolução aconteceria em 1974 com os primeiros experimentos de imagens por RMN realizados pelo grupo de Paul Lauterbur (EUA) e que renderam a ele e a Sir Peter Mansfield (Reino Unido) o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina no ano de 2003.

Em relação à ressonância eletrônica, até meados da década de 50, RME era quase exclusivamente área de atuação de físicos, com aplicações rotineiras a uma variedade de problemas em química e biologia se estabelecendo gradualmente, impulsionadas pelo aparecimento de espectrômetros comerciais da empresa VARIAN por volta de 1955. O livro de Abragam e Bleaney “Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions” [3] foi certamente um marco no estabelecimento da RME como técnica de investigação em diversas áreas do conhecimento. No que

diz respeito a seu uso específico em problemas biológicos, contribuições significativas foram dadas por George Feher (EUA), que introduziu a técnica de ressonância dupla conhecida como ENDOR em 1956 [4], e Jack Freed (EUA), que realizou em 1986 os primeiros experimentos de ressonância eletrônica por Transformada de Fourier [5] de maneira análoga ao que havia sido feito em RMN muitos anos antes.

Nos últimos anos, a espectroscopia de RME tem vivido um novo momento de ressurgimento tanto através do aparecimento de novas metodologias em RME convencional, como a técnica de marcação de spin sítio dirigida (do inglês “site-directed spin labeling” – SDSL) [6-10], quanto pela sua extensão a regimes de muito altas frequências [11] e às técnicas resolvidas no tempo [12]. Revisões sobre as diferentes vertentes de RME podem ser encontradas nos trabalhos de Hubbell *et al.* [8,13], Freed *et al.* [14] e Schweiger *et al.* [15]. As aplicações de RME a estudos estruturais e funcionais de proteínas e suas interações com sistemas biomiméticos, moléculas modelo e seus complexos com metais de transição constituem as principais linhas de pesquisa a que tenho me dedicado e, portanto, são o foco central deste texto.

A técnica de RME em seu regime de onda contínua (CW) vem sendo aplicada a estudos estruturais, em particular de sistemas de interesse biológico, há muitos anos, sendo as contribuições daí provenientes bastante diversas. Vão desde a caracterização de sítios de ligação de metais em estruturas de proteínas, passando por estudos da estrutura e dinâmica de membranas biológicas e chegando ao estudo de processos reacionais e de transferência de elétrons. Grande parte de tais aplicações encontra-se descrita nos vários volumes da série Biological Magnetic Resonance, editada por L.J. Berliner (Plenum, New York), na qual os trabalhos relacionados servem para dar uma idéia da vasta contribuição de RME ao estudo de sistemas biológicos.

Uma das maneiras mais eficazes de aliar a técnica de RME e problemas de interesse biológico consiste no uso de sondas paramagnéticas conhecidas como marcadores de spin. Marcadores de spin têm sido usados freqüentemente na busca por informações estruturais e dinâmicas em macromoléculas [16], mas a falta de sítios paramagnéticos ou com afinidade por eles em muitos desses sistemas fez com que a sua aplicação fosse sempre limitada. Recentemente, novos métodos foram desenvolvidos para superar as três maiores dificuldades: sensibilidade, seletividade e versatilidade. Sensibilidade para se trabalhar com quantidades limitadas de amostra e seletividade para ligar marcadores a um sítio específico na cadeia polipeptídica. A introdução de cavidades ressonantes do tipo “loop-gap” foi essencial para resolver o problema da sensibilidade [17]. O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular (como as de mutação sítio dirigida) permitiu suplantar os problemas relacionados à seletividade e versatilidade. Além desses fatores, RME ainda possui resolução temporal compatível com aquela na qual normalmente ocorrem fenômenos como

mudanças conformacionais em estruturas de proteínas e a possibilidade da escolha de um marcador de spin que melhor se adéque ao problema em questão.

Obviamente, as aplicações independentes de marcadores de spin e de técnicas de biologia molecular em problemas de interesse biológico constituem metodologias muito bem estabelecidas, mas o início de seu emprego conjunto para investigações estruturais e dinâmicas de proteínas em geral, o que forma o alicerce de funcionamento da técnica de marcação de spin sítio dirigida (SDSL), se deu apenas no final da década de 80 [6], com sua utilização de forma mais generalizada e corriqueira em diversos laboratórios sendo conseguida no final dos anos 90. Desde então, com destaque para os últimos anos, problemas envolvendo tanto proteínas de membrana quanto proteínas solúveis se valeram de novas análises feitas à luz da espectroscopia de SDSL-RME como, por exemplo: mudanças estruturais na subunidade α da proteína G [18]; formação de fibras amilóides associadas a processos neurodegenerativos [19]; bases estruturais da transdução de energia [20]; determinação da estrutura de complexos protéicos [21]. Mais exemplos podem ser obtidos na recente revisão de Fanucci e Cafiso [22].

No Brasil, apesar da existência de vários grupos de excelência atuando tanto no uso de marcadores de spin e RME quanto de técnicas de biologia molecular em problemas biologicamente relevantes, uma busca nos bancos de dados disponíveis, como o Web of Science (<http://www.webofscience.com>), mostra que a metodologia de SDSL-RME ainda não se encontra estabelecida. Portanto, um de nossos temas centrais de trabalho ao longo desses primeiros anos no IFSC/USP se propõe a ser o passo primeiro nesse sentido, com um objetivo mais geral de voltar a infra-estrutura de RME e de técnicas de biologia molecular/bioquímica existentes no Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do IFSC, assim como a experiência adquirida pelo grupo na área de Biofísica Molecular, para temas passíveis de estudo por SDSL-RME. Na busca por candidatos para estes estudos acabamos por ter acesso, via colaborações com as Profas. Dras. Maria Cristina Nonato (FCFRP/USP) e Ana Paula Ulian (IFSC/USP), às proteínas: (1) diidroorotato desidrogenase (DHODH) de vários organismos e (2) clorocatecol 1,2-dioxigenase (CCD) de *Pseudomonas putida* (Pp 1,2-CCD), proteínas que podem se valer tanto da técnica de RME quanto de outras metodologias disponíveis em nosso grupo.

Outro objeto central de pesquisa científica em nosso grupo tem sido os estudos de centros metálicos em sistemas de interesse biológico. Estes projetos têm um caráter quase ortogonal em termos de abordagem necessária, mesmo que tal abordagem seja também feita primordialmente através da técnica de RME. No caso de centros metálicos, as medidas de RME envolvem experimentos, em geral, a temperaturas criogênicas e o sistema em si pode variar consideravelmente seu estado de spin. A interpretação dos resultados experimentais obtidos muda

consideravelmente. Apesar dessas dificuldades iniciais, acreditamos que a atuação também nestes tipos de problemas nos confere uma identidade dentro da área de Biofísica Molecular já que poucos são os grupos, mesmo num cenário internacional, que se dispõem a tratar problemas em Biofísica e RME de magnitude tão ampla. Acreditamos que os resultados oriundos da diversidade têm sido positivos e nos permitido dar uma contribuição diferenciada nessa área específica de pesquisa.

Assim sendo, em relação aos sistemas caracterizados pela presença de íons de metais de transição, temos trabalhado intensamente com algumas metaloproteínas. Estas englobam proteínas contendo íons cobre e que estão envolvidas no processo de transferência eletrônica e proteínas contendo íons ferro. Neste último caso, interessa-nos uma enzima da superfamília das metalo- β -lactamases envolvida no processo de detoxificação de compostos citotóxicos e ainda as tradicionais hemoproteínas, sistemas canônicos para estudo por técnicas de RME. Estes projetos nasceram de colaborações entre nosso grupo e os grupos do Prof. Dr. Alejandro Vila (Universidad Nacional de Rosario, Argentina) e dos Profs. Drs. Marcel Tabak e Hidetake Imasato (IQSC/USP).

Por fim, temos atuado de maneira constante em uma linha de pesquisa que visa a caracterização estrutural e funcional de complexos de íons de metais de transição, majoritariamente cobre, o que nos faz lembrar dos primórdios de RME e enfatiza a importância deste elemento químico em Biofísica. Esta linha de pesquisa, cujo início se remete à época de meu projeto de Mestrado, tem sido bastante ampliada de forma a incluir agora não somente os “antigos” complexos de cobre com dipeptídeos, nos quais acoplamentos entre centros paramagnéticos via interação de intercâmbio que possam favorecer caminhos de transferência de elétrons são investigados, mas também complexos de cobre, ferro e vanádio que possuem atividade citotóxica. Este projeto surgiu de uma colaboração científica por mim estabelecida com o grupo da Profa. Dra. Maria H. Torre (Universidade de La Republica, Uruguai). Da união entre o interesse da Profa. Torre em desenvolver novos complexos de Cu(II) como citotoxinas seletivas e nossa experiência no estudo das propriedades estruturais de compostos de metais de transição por RME, estabelecemos uma colaboração interessante e que tem o objetivo mais geral de investigar compostos metálicos que possuam atividade como agentes quimioterápicos.

Baseado no exposto acima, podemos afirmar que todos os projetos aqui apresentados têm como linha central métodos de Ressonância Magnética Eletrônica, sem nos privarmos da utilização e inserção gradual de outras técnicas experimentais disponíveis em nosso grupo, para o estudo de sistemas de interesse biológico, com o objetivo mais amplo de, em alguns casos, estabelecer e, em outros, solidificar essas metodologias na comunidade de Biofísica Molecular em nosso país, assim contribuindo para o aproveitamento dessas facilidades dentro das grandes áreas envolvidas em estudos estruturais e dinâmicos de macromoléculas biológicas. Objetivos específicos e resultados

alcançados até o momento estão descritos nos capítulos subseqüentes. Em várias situações, além de RME, outros métodos espectroscópicos disponíveis em nosso grupo também são empregados, de maneira a obtermos a descrição mais ampla possível do problema em questão. Para maior clareza da apresentação, os objetos de estudo estão descritos separadamente nos capítulos posteriores da seguinte maneira: capítulo I trata da enzima Diidroorotato desidrogenase; capítulo II trata da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase; capítulo III descreve nossas atividades no estudo de metaloproteínas e no capítulo IV são comentados os resultados oriundos dos estudos de complexos de cobre com aplicações farmacológicas.

Referências Bibliográficas

-
- [1] Zavoisky, E. "Paramagnetic absorption in some salts in perpendicular magnetic fields". *Zhurnal Eksperimentalnoi i Teoreticheskoi Fiziki*, 16, 603-606 (1946).
 - [2] Ernst, R. R.; Anderson, W. A. "Sensitivity Enhancement in Magnetic Resonance. II. Investigation of Intermediate Passage Conditions". *Reviews of Scientific Instruments*, 36, 1696-1706 (1965).
 - [3] Abragam, A.; Bleaney, B. *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*. Dover (1970).
 - [4] Feher, G. In: *Foundations of Modern EPR*, Eds G.R.Eaton, S.S.Eaton and K.M.Salikhov. p. 548. World Scientific (1997).
 - [5] Gorcester, J.; Freed, J. H. "Two-Dimensional Fourier-Transform Electron-Spin-Resonance Spectroscopy". *Journal of Chemical Physics*, 85, 5375-5377 (1986).
 - [6] Altenbach, C.; Flitsch, S. L.; Khorana, H. G.; Hubbell, W. L. "Structural studies on transmembrane proteins. 2. Spin labeling of Bacteriorhodopsin mutants at unique cysteines". *Biochemistry*, 28, 7806-7812 (1989).
 - [7] Hubbell, W. L.; Altenbach, C. "Investigation of structure and dynamics in membrane-proteins using site-directed spin labeling". *Current Opinion in Structural Biology*, 4, 566-573 (1994).
 - [8] Hubbell, W. L.; Gross, A.; Langen, R.; Lietzow, M. A. "Recent advances in site-directed spin labeling of proteins". *Current Opinion in Structural Biology*, 8, 649-656 (1998).
 - [9] Hubbell, W. L.; Mchaourab, H. S.; Altenbach, C.; Lietzow, M. A. "Watching proteins move using site-directed spin labeling". *Structure*, 4, 779-783 (1996).
 - [10] Mchaourab, H. S.; Lietzow, M. A.; Hideg, K.; Hubbell, W. L. "Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme, correlation with protein structure and dynamics". *Biochemistry*, 35, 7692-7704 (1996).
 - [11] Budil D. E.; Earle, K. A.; Lynch, W. B.; Freed, J. H. In: *Advanced EPR Applications in Biology and Biochemistry*, Ed. A. Hoff, Elsevier, Amsterdam, p. 307-340 (1989).
 - [12] Kevan, L.; Bowman, M. K. (Eds.). *Modern Pulsed and Continuous Wave ESR*, Wiley, New York, (1990).
 - [13] Hubbell, W. L.; Cafiso, D. S.; Altenbach, C. "Identifying conformational changes with site-directed spin labeling". *Nature Structural Biology*, 7, 735-739 (2000).
 - [14] Freed, J. H. "New technologies in electron spin resonance". *Annual Review of Physical Chemistry*, 51, 655-689 (2000).
 - [15] Schweiger, A.; Jeschke G. *Principles of pulse electron paramagnetic resonance*. Oxford University Press (2001).
 - [16] Berliner, L.J., Ed. *Spin Labeling Theory and Applications II*, Academic Press, New York (1979).

- [17] Froncisz, W.; Hyde, J. S. "The Loop-Gap Resonator: A New Microwave Lumped Circuit ESR Sample Structure". *Journal of Magnetic Resonance*, 47, 515-521 (1982).
- [18] Van Eps, N.; Oldham, W. M.; Hamm, H. E.; Hubbell, W. L. "Structural and dynamical changes in an alpha-subunit of a heterotrimeric G protein along the activation pathway". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 16194-16199 (2006).
- [19] Margittai, M.; Langen, R. "Spin labeling analysis of amyloids and other protein aggregates". *Methods in Enzymology*, 413, 122 (2006).
- [20] Dong, J. H.; Yang, G. Y.; Mchaourab, H. S. "Structural basis of energy transduction in the transport cycle of MsbA". *Science*, 308, 1023-1028 (2005).
- [21] Park, S. Y.; Borbat, P. P.; Gonzalez-Bonet, G.; Bhatnagar, J.; Pollard, A. M.; Freed, J. H.; Bilwes, A. M.; Crane, B. R. "Reconstruction of the chemotaxis receptor-kinase assembly". *Nature Structural & Molecular Biology*, 13, 400-407 (2006).
- [22] Fanucci, G. E.; Cafiso, D. S. "Recent advances and applications of site-directed spin labeling". *Current Opinion in Structural Biology*, 16, 644-653 (2006).

Capítulo 1. Diidrorotato desidrogenase

Neste primeiro capítulo, apresentamos as informações relevantes para entendimento do problema em que se insere a enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH). Além de uma introdução detalhada, acrescentamos também resultados obtidos até o momento, mas ainda não publicados, acerca do sucesso no estabelecimento da metodologia de marcação de spin sítio dirigida para estudarmos a dinâmica experimentada pela região da proteína que interage com sistemas biomiméticos. Acreditamos que estes resultados representam o início de uma etapa de uso rotineiro das técnicas de SDSL em nosso grupo e, por isso, a sua inclusão em um texto que busca sistematizar nossa atuação científica. Este projeto é fruto de uma colaboração com a Profa. Dra. Maria Cristina Nonato (FCFRP/USP), cujo grupo atua fortemente no estudo de DHOHDs de vários organismos.

1.1 Introdução e Relevância

A quarta enzima atuante na biosíntese *de novo* de UMP, o precursor de todos os nucleotídeos de pirimidina, é a enzima diidroorotato desidrogenase (EC. 1.3.3.1). Ela catalisa a oxidação do (S)-diidroorotato para orotato segundo um mecanismo enzimático do tipo *ping-pong* [1].

A enzima DHODH foi detectada pela primeira vez em 1953 por Lieberman e Kornberg em extratos da bactéria anaeróbica *Zymobacterium oroticum* (hoje denominada: *Clostridium oroticum*) [2]. Nos últimos 30 anos, entretanto, DHODH foi identificada como sendo o alvo farmacológico de

uma série de compostos químicos e naturais, tais como: *Arava* (*Leflunomide*), aprovado para o tratamento de artrites reumatóides em humanos, isoxazol, triazina, ácido cinchonínico e derivados de quinona [3-5]. Estes compostos interferem em reações descontroladas do sistema imune, auxiliam no combate de infecções parasitárias como malária e em terapias antivirais através da diminuição da concentração intracelular de nucleotídeos de pirimidina [6]. Com isso, o interesse em se conhecer esta enzima aumentou consideravelmente com uma série de estudos em desenvolvimento com o objetivo de identificar e analisar DHODHs dos mais variados organismos sob o ponto de vista funcional e estrutural.

No desempenho de suas funções biológicas, a DHODH utiliza a flavina mononucleotídeo (FMN, $C_{17}H_{21}N_4O_9P_1$) como cofator. Na primeira metade da reação enzimática, o FMN é reduzido enquanto o substrato diidroorotato é oxidado. Na segunda parte da reação, o FMN é reoxidado (FMNH₂ é convertido em FMN) através do auxílio de uma terceira molécula que atua como aceptor de elétrons (Figura 1-1) [7].

De acordo com a estrutura primária e localização celular, as enzimas DHODH de diferentes organismos podem ser divididas em duas classes (classes 1 e 2) [8]. As enzimas da classe 1, encontradas principalmente em bactérias Gram-positivas, podem ser subdivididas nas classes 1A, 1B e em uma nova classe (1S) encontrada recentemente em *Sulfolobus solfataricus* [9]. As DHODHs das classes 1A e 1B são citosólicas, enquanto que os membros da classe 2 encontradas em bactérias Gram-negativas e eucariotos, apresentam uma extensão na região N-terminal que permite a associação dessas enzimas com membranas [10,11]. A identidade seqüencial entre as enzimas da classe 1 e aquelas associadas a membranas é relativamente baixa (menor que 20%). Outra diferença entre as duas classes de enzimas diz respeito ao aceptor natural de elétrons utilizado na reoxidação do grupo flavina.

Até o presente momento, as estruturas cristalográficas de seis DHODHs foram determinadas: DHODH de *Lactococcus lactis* (LlDHODH) [12], *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH) [13], todas membros da classe 1 das DHODHs; DHODH humana (HsDHODH) [10], DHODH de rato (RDHODH) [14], DHODH de *Plasmodium falciparum* (PfDHODH) [15] e de *E. coli* (EcDHODH) [11], estas pertencentes à classe 2. Em termos gerais, as enzimas de ambas as classes, apresentam uma estrutura terciária similar, se enovelando em um motivo barril α/β , que consiste de uma região central formada por oito fitas beta paralelas rodeadas por oito α -hélices. No topo do barril, três fitas β antiparalelas formam uma espécie de “tampa” que cobre o sítio redox. O fundo do barril é formado um par de fitas β antiparalelas. As enzimas pertencentes à classe 2 das DHODHs, como por exemplo HsDHODH e EcDHODH, contêm na região N-terminal um motivo adicional composto de três hélices, responsável pela interação da enzima com a membrana, e que se encontra ausente na

estrutura de DHODHs da classe 1. Além disso, DHODHs da classe 2 apresentam um longo “loop” que conecta uma das α -hélices do N-terminal ao fundo do barril (Figura 1-2) [10,11].

Figura 1-1: Reação de óxido-redução catalisada pela enzima DHODH. O hidrogênio H^* é transferido para FMN como um híbrido, e o hidrogênio H' é perdido como um próton. No caso da enzima humana, ubiquinona (Q) é o agente oxidante.

A bactéria de fermentação do leite, *Lactococcus lactis*, é o único organismo conhecido que produz duas diferentes DHODHs funcionais, LIDHODHA e LIDHODHB [16]. Essas duas enzimas são excelentes representantes dos subgrupos 1A e 1B das diidroorotato desidrogenases da classe 1. As DHODHs de *L. lactis* vêm sendo estudadas como protótipos da classe 1 de DHODHs e suas estruturas foram determinadas tanto no estado nativo quanto em complexo com orotato [5,12,17]. Essas duas enzimas diferem em organização estrutural e no uso de aceptor de elétrons. A LIDHODHA é um homodímero, como a maioria das DHODHs pertencentes à classe 1, contém o grupo prostético FMN localizado no final C-terminal da folha β no topo do barril e utiliza fumarato como aceptor natural de elétrons [12,17]. Por outro lado, LIDHODHB é um heterotetrâmero composto por dois diferentes polipeptídeos codificados por dois genes diferentes co-transcritos, possui FMN, flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e Fe_2S_2 como centros redox e utiliza NAD^+ como aceptor de elétrons [18-20]. A cadeia polipeptídica de LIDHODHA e a maior subunidade de LIDHODHB possuem o mesmo número

de resíduos, entretanto, a identidade seqüencial entre as duas é de apenas 30 %. As estruturas cristalográficas das duas DHODHs de *L. lactis* revelam que o sítio de ligação da flavina se encontra na base do barril, com o anel aromático da molécula de orotato paralelo à molécula de FMN [12].

As DHODHs associadas a membranas (classe 2) são monoméricas e utilizam quinonas do sistema respiratório como seus aceptores de elétrons. Um aspecto interessante de DHODHs da classe 2 é que o domínio N-terminal das enzimas pertencentes a esta classe e que possuem estruturas cristalográficas conhecidas apresenta variações significativas no comprimento e orientação das hélices. Isso pode ser explicado pelo pequeno número de resíduos conservados em suas extensões N-terminal como mostrado na Figura 1-3. O alinhamento seqüencial revela que somente dez dos quarenta primeiros resíduos na seqüência da EcDHODH são conservados em HsDHODH e RDHODH. É provável que essas variações no N-terminal sejam a origem do comportamento diferenciado de inibidores testados em HsDHODH e RDHODH [21]. Isto possibilita o desenho de inibidores que sejam específicos para um dado organismo, como demonstrado por estudos da estrutura-atividade de DHODHs feitos por Coperland et al. [22].

Outro aspecto muito interessante nas diferenças existentes entre as DHODHs das duas classes, é que o resíduo no sítio ativo que media a oxidação específica do diidroorotato é uma cisteína nas enzimas da classe 1, enquanto que nas DHODHs da classe 2 é uma serina [8,23]. Além disso, resíduos circundantes à serina catalítica (como Ser 214, Pro216, Asp217 – resíduos numerados de acordo com HsDHODH) e que também têm um papel crucial para a atividade catalítica dessas enzimas são conservados nas duas classes de DHODHs (Figura 1-4).

Embora o interesse pelas DHODHs venha crescendo a cada ano, ainda não há na literatura trabalhos que revelem a natureza da interação entre as DHODHs da classe 2 com membranas. Esse fato provavelmente se deve à dificuldade em se trabalhar com proteínas possuidoras de regiões com alto caráter hidrofóbico, pois essas proteínas são na maioria dos casos muito instáveis e necessitam da presença constante de detergentes para evitar a formação de agregados. Grande parte dos detergentes utilizados na solubilização de proteínas de membrana impossibilita a utilização de determinadas técnicas espectroscópicas, tais como dicroísmo circular (CD) e absorção ótica, por serem opticamente ativos na faixa de comprimento de onda onde essas técnicas normalmente operam. Além disso, a dificuldade em se expressar proteínas de membrana na forma solúvel e em quantidades razoáveis para a realização de ensaios espectroscópicos e biológicos pode ser muito grande.

Figura 1-2: Estruturas tridimensionais de DHODHs pertencentes às classes 1 e 2. (A) LIDHODH e (B) HsDHODH. Ambas as proteínas enovelam-se um motivo do tipo barril α/β . LIDHODH é dimérica enquanto HsDHODH é monomérica. Além disso, a DHODH humana apresenta um domínio adicional composto por três hélices, domínio este responsável pela associação da enzima à membrana mitocondrial.

Figura 1-3: Alinhamento seqüencial entre DHODHs da classe 2 EcdHODH, HsDHODH e RDHODH. Os resíduos conservados em todas as enzimas são mostrados em vermelho, enquanto que os resíduos conservados apenas em duas das enzimas são mostrados em amarelo. O domínio N-terminal da EcdHODH está destacado por setas verdes.

No presente projeto nos concentramos na enzima DHODH de *E. coli*, procurando mostrar evidências diretas da ligação da EcdHODH (membro da classe 2) com sistemas modelo de membrana e discutimos as implicações desta interação sobre a função da proteína. Para isso, usamos Ressonância Magnética Eletrônica (RME), marcadores de spin, marcação de spin sítio dirigida (SDSL) e simulação espectral, com o intuito de monitorar mudanças induzidas pela EcdHODH na vizinhança de fosfolípidios marcados e incorporados aos sistemas de membrana modelo, bem como na

vizinhança do marcador de spin metanotiosulfonato (MTSL) em posições específicas da enzima. O uso de rotinas de simulação espectral específica nos permitiu caracterizar os espectros de RME em termos de mudanças na polaridade e mobilidade nas vizinhanças das moléculas de fosfolípidos marcados.

Figura 1-4: Comparação entre os sítios catalíticos de DHODHs das classes 1 e 2. (A) Alinhamento seqüencial entre a DHODH de *E. coli* (resíduos 172-186), DHODH de *L. lactis* (resíduos 127 a 141) e HsDHODH (resíduos 212 a 226). Os resíduos sublinhados formam um loop na DHODHA, conectando uma folha- β a uma α -hélice [23]. Vizinhanças do grupo FMN em (B) EcDHODH e (C) LhDHODHA [12]. O resíduo de cisteína catalítico na classe 1 é trocado por um de serina na classe 2 das DHODHs. (Figura adaptada de Björnberg et al. [11]).

1.1.1 A enzima DHODH de *Escherichia coli*

A enzima diidroorotato desidrogenase de *Escherichia coli* (EcDHODH) membro da classe 2 de DHODH é uma proteína monomérica, com massa molecular de 37 kDa, pI de 7,6 e dependente de FMN. Assim como todas as enzimas pertencentes à classe 2 de DHODHs, a EcDHODH também apresenta uma extensão N-terminal responsável pela interação da enzima com a membrana celular [24].

A estrutura tridimensional da EcDHODH, publicada em 2002 por Norager et al. [11], permitiu uma análise comparativa entre as diferentes classes de DHODHs o que contribuiu para a elucidação de várias das diferenças estruturais e funcionais observadas entre as duas classes. Embora a EcDHODH pertença a um organismo pouco patogênico e muito bem conhecido, o seu estudo torna-se muito interessante e importante devido ao fato de esta enzima ser expressa e purificada em sua forma “completa”, diferentemente da enzima humana que pôde ser estudada apenas em uma forma truncada (com parte do domínio N-terminal removido) [10]. O conhecimento da interação EcDHODH-membrana pode levar a comparações com outras DHODHs, o que ajudaria na busca por inibidores específicos.

A estrutura cristalográfica da EcDHODH revelou a existência de quatro moléculas na unidade assimétrica do cristal, sendo que duas delas estão associadas por dois eixos não cristalográficos e interagem entre si através dos seus domínios N-terminal. Tal interação pode explicar o porquê de a proteína se comportar como um dímero em solução, como observado por Björnberg et al. [23].

A estrutura secundária da EcDHODH é composta por 11 hélices α , 4 hélices 3_{10} e 13 fitas β . Similarmente à estrutura de outras DHODHs (LIDHODHA [12], HsDHODH [10]), enovela-se em um barril α/β , composto por 8 fitas beta paralelas rodeadas por 12 hélices, com moléculas de FMN e orotato situadas no topo do barril. As cinco fitas restantes formam duas folhas β antiparalelas, uma no topo do barril cobrindo a molécula de FMN e outra localizada no fundo do barril. Além disso, existe ainda o domínio do N-terminal estendido, composto por duas α -hélices e uma hélice 3_{10} , que se encontra interligado ao sítio catalítico do barril por um longo “loop”. Norager et al. [11] realizaram ensaios com uma versão truncada da EcDHODH (os resíduos 2 a 30 foram deletados) e concluíram que o N-terminal da EcDHODH é importante para: (1) interação com quinonas do sistema respiratório, (2) a alta hidrofobicidade da EcDHODH na presença de sal e (3) a interação da enzima com membranas celulares. Além disso, seus resultados revelam que a estrutura protéica é estabilizada por interações entre a primeira hélice do domínio N-terminal e as duas hélices do C-terminal localizadas no barril. Essas interações envolvem somente um lado da hélice do domínio N-terminal, deixando o outro lado disponível para interagir com a membrana bacteriana [11].

A Figura 1-5 mostra em destaque o domínio N-terminal da EcDHODH com os resíduos hidrofóbicos mostrados em azul, hidrofílicos carregados em vermelho e hidrofílicos não carregados em verde. A parte exposta ao solvente não possui um excesso de resíduos hidrofóbicos e que não há uma concentração de resíduos carregados orientados em direção ao barril. Essa distribuição de resíduos no N-terminal deve possibilitar a ligação da enzima à membrana, mas evidencia que ela não seja uma proteína integral [11].

Figura 1-5: Destaque do domínio N-terminal de EcDHODH. Uma visão frontal do N-terminal de EcDHODH, onde os resíduos hidrofóbicos estão destacados em azul e resíduos hidrofílicos carregados e não carregados estão coloridos em vermelho e verde, respectivamente. As cadeias laterais dos aminoácidos hidrofóbicos e carregados estão mostradas na figura. A figura foi preparada com o programa Pymol.

Embora EcDHODH e HsDHODH sejam ambas pertencentes à classe 2 das DHODHs, nenhum inibidor da enzima humana foi eficaz na inibição da EcDHODH. Essa diferença é atribuída à grande variação na seqüência de aminoácidos no domínio N-terminal das duas enzimas [25]. Além disso, há várias outras diferenças locais na estrutura dessas enzimas que podem explicar o porquê de os inibidores agirem de forma diferente nas duas enzimas. Dos nove resíduos envolvidos na ligação dos inibidores na HsDHODH, somente quatro são conservados em EcDHODH: His19, Arg102, Tyr318 e Pro326, sendo que só a His19 está localizada no N-terminal. Estas análises reforçam a idéia de que o conhecimento detalhado das estruturas de DHODH de diversos organismos permite o planejamento de inibidores que interfiram seletivamente na atividade de DHODH, retardando o crescimento e a proliferação de alguns organismos sem interferir no crescimento de outros (hospedeiros ou tecidos) [22].

A Figura 1-6 mostra como o grupo FMN e o produto da reação orotato são acomodados na molécula de EcDHODH. O anel de isoaloxasina do FMN é ligado na molécula de EcDHODH através de ligação de hidrogênio entre o grupo NH e a cadeia lateral da Thr86 e as cadeias laterais da Lys66 e Lys217 (Figura 1-6 A). A molécula de orotato é ligada ao sítio ativo via ligação de hidrogênio do seu grupo carboxílico com os grupos NH dos resíduos Gly114 e Phe115 e com as cadeias laterais da Lys66 e da Asn177. Sendo que as pontas hidrofílicas do anel (orotato) interagem com as cadeias laterais de Asn172, Asn111, Asn246, e Thr247 (Figura 1-6 B).

Recentemente, Shi *et al.* mostraram que o estado de oligomerização e o enovelamento correto da EcDHODH recombinante são altamente dependentes da adição de detergentes à solução protéica [26]. Essa observação já havia sido feita em 1999 por Björnberg *et al.*, cujos resultados revelaram que a proteína na ausência de detergente (Triton X-100 – neste caso) tende à formação de gigantescos agregados (da ordem de 530 kDa). Entretanto, na presença de Triton X-100 0,1% (v/v) a massa molecular observada foi de aproximadamente 70 kDa, indicando que a EcDHODH pode ainda formar um dímero em solução [8]. Essas observações devem estar relacionadas ao alto caráter hidrofóbico da região N-terminal da EcDHODH.

Em estudo anterior e publicado no artigo em anexo, mostramos pela primeira vez que a EcDHODH realmente interage com modelos de membrana biológica e que o efeito desta ligação é o de provocar o aparecimento de uma espécie de defeito estrutural no *core* hidrofóbico da vesícula. Realizamos a caracterização da estrutura dinâmica dos fosfolípidos localizados neste defeito e discutimos a sua relevância no que tange à atividade enzimática. A relevância desses resultados pode ser inferida pelo comentário de um dos *referees* do artigo: “This manuscript provides some long overdue evidence about how an important metabolic enzyme obtains a necessary co-factor”.

Dando continuidade ao projeto e com o intuito de investigarmos mudanças estruturais quando da interação EcDHODH com vesículas, mas desta feita a partir da perspectiva da estrutura protéica, descrevemos na próxima seção os resultados obtidos até o momento, e ainda não publicados, na produção de mutantes da enzima nos quais um resíduo de cisteína foi seletivamente posicionado ao longo da seqüência do N-terminal.

Figura 1-6: Ambiente dos grupos FMN e orotato na molécula de EcDHODH. Em (A) e (B), as ligações de hidrogênio formadas entre o FMN ou orotato e a proteína estão mostradas em linhas pontilhadas. (A) FMN ligado EcDHODH, (B) orotato ligado a EcDHODH e (C) FMN e orotato ligados ao sítio ativo. Figura adaptada de: (A) e (B) Norager et al., 2002 [11] e (C) Shi et al., 2004 [26].

1.2 Resultados – Marcação de spin sítio dirigida em EcDHODH

Com a finalidade de investigarmos a dinâmica experimentada pela extensão N-terminal da enzima EcDHODH através da técnica de SDSL foram introduzidas oito mutações (uma por vez) ao longo da cadeia N-terminal da EcDHODH, região supostamente responsável pelo contato da enzima com a membrana. As posições dos resíduos mutados ao longo dessa região estão mostradas em verde na Figura 1-7A e B, e destacadas em vermelho na seqüência de aminoácidos da EcDHODH (Figura 1-7C). As posições para a incorporação dos mutantes foram escolhidas para aminoácidos localizados em diferentes regiões do N-terminal nas quais, baseado na estrutura cristalográfica de

EcDHODH, observamos diferentes níveis de acessibilidade ao solvente, flexibilidade e características químicas. As mutações realizadas correspondem às posições da Tyr2, Phe5, Lys8, Phe11, His19, Phe21, Phe23 e Gln25. Apresentamos a seguir os resultados obtidos até o momento dos processos de clonagem, expressão, purificação e medidas de SDSL-RME.

Figura 1-7: Estrutura da enzima EcDHODH com destaque para os resíduos trocados por resíduos de cisteína no domínio N-terminal. (A) Os resíduos em amarelo e verde ilustram o domínio N-terminal, sendo que os resíduos em amarelo representam os aminoácidos mutados por cisteínas. (B) Mostra uma ampliação do domínio N-terminal (em verde e amarelo), onde os resíduos em amarelo representam os aminoácidos substituídos por cisteínas com suas respectivas cadeias laterais em destaque. (C) Seqüência de aminoácidos da EcDHODH, os aminoácidos em vermelho referem-se aos 8 resíduos mutados isoladamente para resíduos de cisteínas.

1.2.1 Dinâmica do marcador de spin por SDSL

A estratégia da SDSL envolve a introdução de um radical nitróxido em uma posição específica da proteína e uma mutação sítio dirigida é normalmente usada para esse fim, sendo um resíduo nativo trocado por um de cisteína, para a posterior reação do seu grupo sulfidrílico com um marcador de spin adequado. O reagente metanotiosulfonato tem sido o mais utilizado para fins de SDSL, embora outros tipos também já tenham sido empregados, Figura 1-8.

Figura 1-8 – Estrutura química do radical nitróxido. (a) Estrutura do radical **R1** resultante da ligação do marcador de spin metanotiosulfonato (MTSL) a um resíduo de cisteína livre. (b) Estrutura da cadeia lateral **R1** indicando os ângulos diédricos χ_1 a χ_5 . (c) Estrutura da cadeia lateral **R1** localizada em resíduo na superfície de hélice α . Esta conformação indica que rotações moleculares são feitas em torno dos ângulos diédricos χ_4 e χ_5 . As linhas pontilhadas indicam os eixos em torno dos quais essas rotações ocorrem. (Figura adaptada das referências 27 e 28).

Informações fundamentais a respeito do sistema de interesse podem ser obtidas por SDSL através da forma da linha espectral. O movimento da cadeia lateral contendo o radical nitróxido é refletido no espectro de RME através dessa forma de linha e é, basicamente, o resultado da superposição de três movimentos executados pela estrutura protéica. A esses três movimentos podemos associar três tempos de correlação característicos: (1) τ_R , o tempo de correlação rotacional da proteína inteira (“*tumbling*”); (2) τ_B , o tempo de correlação devido a isomerizações rotacionais em torno das ligações que conectam o nitróxido à cadeia principal da proteína e (3) τ_S , o tempo de correlação associado ao movimento local do segmento da cadeia principal onde está o nitróxido em relação à estrutura da média da proteína. Esses movimentos são pensados como sendo aproximadamente independentes para pequenas flutuações locais do segmento de cadeia principal. Os tempos de correlação τ_B e τ_S são aqueles que carregam as informações buscadas por SDSL, pois respondem pelo que podemos chamar de movimento interno da cadeia lateral.

O tempo de correlação rotacional da proteína como um todo τ_R é uma constante para as cadeias laterais de todos os resíduos na estrutura da proteína nativa. A contribuição desse movimento para o espectro de RME é pequena no caso de proteínas de massa molecular elevada ou pode ser reduzida, no caso de estruturas pequenas, através do artifício de se fazer as medidas de

RME em solvente contendo, por exemplo, 30% de sacarose (aumento da viscosidade do meio). Em ambos os casos, o “*tumbling*” da proteína se torna lento com τ_R maior do que τ_B e τ_S . Este é o limite ideal de trabalho já que interessa-nos não o movimento de “*tumbling*” da proteína inteira, mas sim flutuações locais de sua cadeia principal. Movimentos muito rápidos como os encontrados em situações opostas às descritas podem levar a uma promediação extensa dos tensores magnéticos, levando à perda da informação acerca da dinâmica local.

O tempo de correlação para isomerização das ligações, τ_B , deve depender tanto da estrutura do marcador de spin (tamanho da cadeia lateral), quanto das estruturas primária, secundária e terciária da proteína, ao passo que τ_S é determinado pela flexibilidade do segmento de cadeia principal em estudo.

Rotações da cadeia lateral **R1** acontecem em torno das ligações entre o grupo N-O e a cadeia principal (Figura 1-8B). Essas ligações formam ângulos arbitrários entre si, o que torna muito difícil o ajuste dos espectros experimentais aos modelos usualmente empregados em simulação espectral, já que estes envolvem, em geral, movimentos em torno de eixos mutuamente ortogonais. Sendo assim, devido à complexidade do problema estrutural, simulações espectrais detalhadas como aquelas apresentadas anteriormente no presente trabalho acabam se tornando inviáveis do ponto de vista prático. Uma descrição semiquantitativa acabou por tornar-se comum para análise dos espectros obtidos e que permite interpretar os dados experimentais em termos da relação mobilidade da cadeia lateral e estrutura protéica. O termo mobilidade é usado com um significado mais geral para incluir efeitos de ordenamento molecular e taxa de movimento. Assim, um estado de baixa mobilidade pode se dever tanto a uma situação de movimento de grande amplitude e baixa taxa de difusão quanto a um movimento restrito executado com alta frequência.

A descrição semiquantitativa envolve uma análise da dinâmica experimentada pela cadeia lateral **R1** nos sítios de interesse da proteína. Esta dinâmica se reflete na forma de linha do espectro de RME de uma maneira dependente da estrutura local experimentada pela sonda paramagnética. A relação entre estrutura local e dinâmica pode ser resumida pelos espectros típicos mostrados na Figura 1-9. Neste caso, os espectros se referem ao marcador MTSL em regiões de loop, de superfície de hélice, de contatos terciários e sítios enterrados na estrutura da lisozima T4 [29]. A classe englobando sítios em contatos terciários é a que possui maior grau de heterogeneidade no que diz respeito à forma de linha dos espectros e mobilidade da cadeia lateral porque tanto o grau de contatos estéricos quanto a mobilidade da cadeia principal mudam com a posição do sítio. Neste ponto, cabe definir o que entendemos por sítios em contatos terciários (ou sítios em interações terciárias) como sendo sítios nos quais, a substituição com a cadeia R1 cria conflitos estereoquímicos com átomos das cadeias laterais ou da cadeia principal de resíduos adjacentes na estrutura

tridimensional [29,30]. Portanto, sítios envolvidos em contatos terciários podem apresentar espectros que variam desde aqueles obtidos para sítios enterrados até espectros vistos para sítios em superfícies de hélices. A Figura 1-9 mostra, portanto, como medidas de RME podem distinguir a dinâmica de diferentes elementos de estrutura secundária.

Figura 1-9: Mudanças na forma de linha de RME em função da estrutura local onde se encontra o marcador de spin. Figura adaptada da referência 30.

1.2.2 SDSL – EcDHODH com resíduos nativos de cisteína preservados

Os espectros do marcador de spin MTSL em diferentes posições ao longo do domínio N-terminal da EcDHODH com os resíduos nativos de cisteína preservados estão mostrados na Figura 1-10A. Todos os espectros são compostos por mais de uma componente, o que pode ter origem em dois fatores: 1) duas conformações diferentes experimentadas pela cadeia lateral **R1** do marcador em uma determinada posição da cadeia polipeptídica ou 2) marcação de mais de um sítio, já que além do resíduo de cisteína introduzido por mutação sítio dirigida existem outros quatro resíduos de cisteína nativos disponíveis para ligação com o grupo sulfidríla do marcador MTSL (Figura 1-10B), sendo que pelo menos dois deles, Cys48 e Cys260, encontram-se em regiões da proteína que podem ser facilmente acessadas pelo marcador. Para averiguarmos a qual dos dois motivos se devia o espectro multicomponente obtido, procedemos com a marcação da enzima EcDHODH nativa (sem introdução de nenhuma mutação sítio dirigida), cujo espectro, mostrado na primeira linha da Figura 1-10A, e que corresponde ao espectro de linhas mais estreitas observado nos espectros dos mutantes, evidencia, portanto, que uma das componentes observadas nos espectros de cada mutante medido se deve realmente à marcação de algum dos resíduos nativos de cisteína. As conclusões alcançadas após esses experimentos e com base também nos resultados dos

seqüenciamentos dos mutantes são: a) os resíduos introduzidos por mutação sítio dirigida foram corretamente marcados, já que percebe-se claramente a existência de uma segunda componente em todos os espectros dos mutantes (setas na Figura 1-10) e que apresenta caráter mais imobilizado do que a componente espectral “nativa”, ou seja, logramos sucesso e realizamos os primeiros experimentos de marcação de spin sítio dirigida do Brasil, e b) constatamos que para prosseguirmos com nossos estudos teríamos que voltar à Biologia Molecular e proceder com nova clonagem, desta feita para retirada dos resíduos nativos de cisteína.

Figura 1-10: Espectros de RME do marcador MTSL incorporado à enzima EcDHODH. (A) Espectros de RME da enzima nativa e dos mutantes Y2R1, F5R1, K8R1, F11R1, H19R1 e F21R1. (B) Resíduos nativos de cisteína (Cys48, Cys70, Cys158 e Cys260) destacados em vermelho (esferas) na estrutura tridimensional da EcDHODH.

Ainda com os mutantes que conservavam as cisteínas nativas, decidimos realizar um experimento para verificarmos o papel do detergente no estado de oligomerização da proteína. Assim, retiramos o detergente do mutante F5R1 com o uso da resina calbiosorb, medimos seu espectro de RME e readicionamos o detergente para nova medida de RME. A remoção do detergente causa mudanças significativas no espectro, como pode ser observado na Figura 1-11 (linha vermelha), levando a uma imobilização maior de ambas as componentes espectrais

anteriormente observadas (Figura 1-10). Este é um indício de que o estado de oligomerização da EcDHODH deve ser mediado pelo domínio N-terminal como observado por Björnberg et al. [8]. Além disso, a readição do detergente à amostra não foi suficiente para desfazer o estado de agregação da enzima (Figura 1-11 - linha preta), deixando o espectro de RME inalterado.

Figura 1-11: Espectros de RME do mutante F5C de EcDHODH marcado com R1. Na ausência de Triton X-100 (linha vermelha) e após a readição de Triton X-100 (linha preta).

1.2.3 EcDHODH com resíduos de cisteína nativos substituídos por resíduos de alanina

Como os resultados de SDSL obtidos para a EcDHODH com os resíduos nativos de cisteína preservados não puderam ser totalmente conclusivos, optamos por preparar novos mutantes de EcDHODH onde os resíduos nativos de cisteína fossem substituídos por resíduos de alanina. A opção pelo resíduo alanina se fez devido ao fato desse aminoácido ser pouco reativo, além de possuir cadeia lateral curta, o que não deve perturbar significativamente a estabilidade da proteína do ponto de vista termodinâmico e conformacional (seu diagrama de Ramachandran pode ser assumido como representativo para qualquer outro aminoácido, à exceção da glicina e prolina).

Dos mutantes inicialmente utilizados, apenas quatro puderam ser purificados de forma conveniente após a remoção dos resíduos nativos de cisteína. Assim, um total de quatro posições da cadeia lateral R1 foram analisadas no presente trabalho: duas delas na região inicial da cadeia (Y2R1 e F5R1) e duas delas na segunda hélice da extensão N-terminal (H19R1 e F21R1). A Figura 1-12

apresenta os espectros de RME obtidos para o marcador MTSL nas posições dos resíduos nativos Y2, F5, H19 e F21, juntamente com a posição de cada resíduo na estrutura da EcDHODH.

Figura 1-12: Espectros de RME para os mutantes de EcDHODH sem os resíduos nativos de cisteína em vesículas mistas de DOPC/Triton X-100. Espectros do marcador MTSL ligado a cisteínas inseridas nas posições dos resíduos nativos Y2, F5, H19 e F21. Os espectros foram normalizados para áreas iguais.

Os espectros de RME mostrados na Figura 1-12 para os mutantes Y2R1 e F5R1 são típicos de espécies com alta mobilidade. O aumento de mobilidade observado provavelmente se deve a uma combinação de dois fatores: 1) uma redução dos impedimentos estereoquímicos das rotações em torno da ligação $C_{\alpha}-C_{\beta}$ (ângulo diédrico χ_1 – Figura 1-8) para regiões de loops ou de início/fim da cadeia polipeptídica (neste caso, os resíduos estão bem no começo da seqüência), onde existe pouco

ou nenhum contato terciário (v. definição de contato terciário na seção inicial sobre SDSL) da cadeia lateral com outras partes da estrutura e 2) grandes flutuações da cadeia principal (*backbone*). A forma de linha do espectro do mutante Y2R1 apresenta mobilidade maior quando comparada com a do mutante F5R1. Isto se deve ao fato do resíduo de cisteína na posição 2 estar bem no começo da cadeia, onde é experimentada maior liberdade de movimento. O mutante F5R1 tem espectro típico de um resíduo em loop ou na primeira volta de hélice [30] sem contatos. A Figura 1-12 está em bom acordo com os altos fatores de temperatura, em média 50 Å², obtidos para os resíduos nativos Y2 e F5 na estrutura cristalográfica da EcDHODH (código PDB: 1F76).

O espectro do mutante H19R1 (Figura 1-12) apresenta características de um sítio envolvido em contatos terciários, com duas componentes bem definidas, sendo uma majoritária e bastante imobilizada (setas vermelhas na Figura 1-12B) e outra com movimento rápido (setas azuis na Figura 1-12B). O aspecto que nos permite assinalar o espectro de H19R1 a um sítio em contatos terciários e não a um sítio enterrado (*buried*), é a presença dessa componente com pouca restrição de movimento. Em um sítio enterrado, a imobilização do marcador de spin é muito alta com baixa ou nenhuma acessibilidade ao solvente, o que não permite a existência de componentes de movimento rápido. Neste tipo de sítio, os espectros apresentam uma única componente que possui tempo de correlação dominado pela contribuição associada ao movimento de *tumbling* da proteína (τ_R).

Ainda na Figura 1-12, podemos ver que o mutante F21R1, que está localizado no meio da segunda hélice que compõe a extensão N-terminal da EcDHODH (Figura 1-12A), apresenta espectro característico de um sítio em contato terciário ou de um sítio em superfície de hélice, mas com duas componentes bem resolvidas, uma correspondente a uma população de menor (setas vermelhas na Figura 1-12B) e outra de maior mobilidade (setas azuis na Figura 1-12B), assim como observado para H19R1. A estrutura da EcDHODH mostra que o resíduo nativo F21 encontra-se em uma região de superfície de hélice (Figura 1-12A). Sendo assim, no caso de F21R1, a observação de duas componentes em seu espectro de SDSL-RME poderia ser tomado como algo de certo modo surpreendente, pois a julgar pela conformação observada para o resíduo nativo na estrutura da EcDHODH (Figura 1-12A), a cadeia lateral deveria experimentar movimento com nenhuma ou muito pouca restrição (sítio exposto em hélice).

Guo et al. [31] obtiveram espectros similares para os sítios expostos T115, N116, R119 e Q122 da lisozima T4. Com base na estrutura cristalográfica do mutante T115R1, Guo et al. racionalizaram detalhadamente as razões para o aparecimento de um espectro multicomponente para sítios que deveriam experimentar pouca ou nenhuma restrição de movimento.

Aminoácidos nativos podem assumir diferentes conformações (rotâmeros), isto é, suas cadeias laterais podem ser representadas por certo número de combinações dos ângulos torsionais

χ (Figura 1-8). Os valores preferenciais de χ_1 e χ_2 (rotâmeros) para cadeias laterais alifáticas não-ramificadas e que possuem um átomo δ estão mostrados na Figura 1-13 [32], juntamente com os rotâmeros para cisteína. Estruturas cristalográficas disponíveis para vários mutantes contendo a cadeia lateral R1 [31,33] mostram que esta cadeia lateral, assim como os aminoácidos naturais, também é rotamérica mesmo quando introduzida em sítios expostos e com baixa restrição estrutural.

Figura 1-13: Ângulos torsionais preferenciais para cadeias laterais nativas de cisteína e outras cadeias alifáticas e não-ramificadas. A nomenclatura adotada para os rotâmeros segue a convenção para ângulos diédricos definida no trabalho de Lovell et al. [32], pela qual nominalmente m (minus) = -60° , p (positive) = $+60^\circ$ e t (trans) = $\pm 180^\circ$. Na prática, os ângulos χ_1 e χ_2 podem diferir consideravelmente desses valores, mas a notação simplificada é mantida. Pares como mt referem-se aos valores de χ_1 e χ_2 , respectivamente. (Figura adaptada da referência 31).

No modelo estrutural mais aceito até o momento para a descrição da dinâmica da cadeia lateral R1 em sítios expostos de hélices, o átomo S_δ da ponte dissulfeto (Figura 1-8B) interage com átomos da cadeia principal de duas maneiras que originam os dois rotâmeros: atração putativa $S_\delta \cdots HC_\alpha$ [33,34] e interação do mesmo S_δ com o grupo C=O do resíduo e com o átomo de N do resíduo subsequente [35,36]. Essas interações limitam as rotações em torno dos ângulos χ_1 e χ_2 . Como a isomerização da ponte dissulfeto (ângulo χ_3 – Figura 1-8B) envolve uma barreira energética alta de cerca de 7 kcal/mol [37,38], rotações em torno de χ_3 também ficam restringidas. Assim, torções em torno de χ_4 e χ_5 (Figura 1-8C) devem dominar o movimento do radical nitróxido.

As interações com átomos da cadeia principal descritas acima são responsáveis pela estabilização dos dois rotâmeros com relação aos ângulos diédricos χ_1 e χ_2 . Porém, interações adicionais do anel do nitróxido são necessárias para modular de forma diferente o movimento do radical nos dois rotâmeros, assim dando origem a espectros de RME multicomponentes. Guo et al. [31] mostraram que uma contribuição que parece diferenciar os dois rotâmeros é a interação hidrofóbica do anel no rotâmero em que temos $S_\delta \cdots HC_\alpha$. Neste rotâmero, estudos de modelagem

para o sítio 115 da lisozima T4 sugerem que o anel do nitróxido se projeta na direção de um bolso hidrofóbico adjacente, ao passo que o segundo rotâmero estaria mais sujeito a interação com o resíduo i+4, originando, assim, dois modos diferenciados de movimentação do marcador de spin MTSL.

O modelo apresentado serve para explicar a existência de duas componentes espectrais em sítios como F21R1 (Figura 1-12B), que não pareceria experimentar restrições consideráveis de movimento que justificassem o aparecimento de duas componentes, sendo uma delas com mobilidade reduzida. Outro fator que deve contribuir para o aparecimento de duas componentes no caso de F21R1 de EcDHODH é a existência de um meio anisotrópico em que se insere a região do N-terminal constituído pelas moléculas anfipáticas de detergente e/ou fosfolípido.

O modelo acima, também conhecido como modelo χ_4/χ_5 , pode, ainda, ser estendido ao sítio H19R1. Neste último caso, o resíduo 19 está claramente envolvido em contatos terciários que levam a uma imobilização mais acentuada de um dos rotâmeros (Figura 1-12) do que aquela observada para F21R1. Além disso, a existência de uma conformação pouco imobilizada para o resíduo H19R1 sugere que a hélice em que tal resíduo se encontra não deva ser tão rígida quanto se poderia supor a partir da estrutura cristalográfica de EcDHODH. Os fatores de temperatura dos átomos do resíduo nativo H19 estão em torno de 20 Å², o que levaria a acreditar em baixa flexibilidade desse resíduo. No entanto, os espectros de SDSL-RME apontam claramente para uma mobilidade desse resíduo contrastante com aquela inferida da estrutura tridimensional da proteína. Com o resíduo H19R1 experimentando uma dinâmica menos restrita, como se depreende dos espectros acima, os dois rotâmeros distintos da cadeia lateral R1 poderiam se formar em uma região com volume livre disponível para difusão rotacional apenas médio.

Uma análise conjunta dos espectros dos quatro mutantes apresentados (Figura 1-12) e levando-se em conta modelos estruturais como o descrito acima, podemos perceber o grau de detalhes a que se pode chegar a partir de estudos sistemáticos de regiões diversas em proteínas como a EcDHODH. Assim, a dinâmica experimentada pela região do N-terminal parece ser, em linhas gerais, maior do que poderia se presumir com base exclusivamente nos fatores de temperatura oriundos da estrutura cristalográfica de EcDHODH. Esta diferença pode estar ligada ao fato de, na estrutura determinada para a proteína, existirem quatro moléculas na unidade assimétrica, com os contatos intermoleculares mediados exatamente pela região do N-terminal, levando, portanto, a uma restrição de flexibilidade para alguns resíduos que não seria observada quando da proteína em seu ambiente nativo. Os dados de SDSL-RME sugerem, então, maior mobilidade do domínio N-terminal, o que deve estar associado provavelmente com o seu papel durante o processo de

atividade enzimática, no qual se requer que tal região participe da ligação dos aceptores de elétrons envolvidos na segunda metade da reação de oxi-redução catalisada pela EcDHODH.

1.3 SDSL – Conclusões

Os espectros dos mutantes H19R1 e F21R1 apresentam duas componentes, sendo uma com característica de uma situação de dinâmica rápida e outra com movimento imobilizado. O resíduo nativo H19 está posicionado em uma região em que muitos contatos com átomos de resíduos vizinhos espacialmente podem participar de um processo de restrição de movimento, o que explica a componente mais imobilizada do espectro de SDSL-RME. Por outro lado, a origem da componente de dinâmica rápida em tal situação não pode ser entendida dentro desta análise, o que nos levou a propor que flutuações locais da cadeia principal permitam que a cadeia lateral R1 experimente uma conformação em que estaria mais livre dos contatos interatômicos com vizinhos, assim possibilitando a existência de um espectro de SDSL-RME atribuível a uma mobilidade maior do que aquela observada para a outra componente espectral. Por fim, o espectro do mutante F21R1, também com duas componentes, tem sua origem racionalizada em termos da existência de rotâmeros experimentados pela cadeia lateral R1 mesmo em uma situação de poucos ou nenhum contatos terciários observada a partir da estrutura cristalográfica de EcDHODH.

Os resultados conjuntos para estes quatro mutantes sugere que a região do N-terminal de EcDHODH possa experimentar uma mobilidade/flexibilidade considerável, diferentemente do que poderia se supor a partir da estrutura tridimensional da EcDHODH. Esta maior flexibilidade é, ainda, coerente com nossos resultados de RME utilizando derivados de fosfolipídios como marcadores de spin (v. artigo em anexo), e com o que se esperaria de uma região que deve experimentar uma situação dinâmica que permita a ligação das moléculas de aceptores de elétrons que participam do processo de catálise enzimática. Em relação ao nosso objetivo mais geral, acreditamos que podemos considerar que a técnica de SDSL está estabelecida em nosso grupo e que pode ser estendida não apenas a mais mutantes da EcDHODH (trabalho futuro), de forma a termos um estudo sistemático da região N-terminal, mas também a outras proteínas de interesse do grupo.

1.4 Publicações geradas a partir deste trabalho

- Couto, S. G.; Nonato, M. C.; Costa-Filho, A. J. "Defects in vesicle core induced by Escherichia coli DHODH". *Biophysical Journal*, v. 94, p. 1746-1753 (2008).

- Feliciano, P. R.; Cordeiro, A. T.; Costa-Filho, A. J.; Nonato, M. C. "Cloning, expression, purification, and characterization of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase". *Protein Expression and Purification*, v. 48, p. 98-103 (2006).

1.5 Referências Bibliográficas

- [1] Feliciano, P. R.; Cordeiro, A. T.; Costa-Filho, A. J.; Nonato, M. C. "Cloning, expression, purification, and characterization of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase". *Protein Expression and Purification*, 48, 98-103 (2006).
- [2] Lieberman, I.; Kornberg, A. "Enzymic synthesis and breakdown of a pyrimidine, orotic acid. I. Dihydroorotic dehydrogenase". *Biochimica et Biophysica Acta*, 12, 223-234 (1953).
- [3] Dimitrijevic, M.; Bartlett, R. R. "Leflunomide, a novel immunomodulating drug, inhibits homotypic adhesion of peripheral blood and synovial fluid mononuclear cells in rheumatoid arthritis". *Inflammation Research*, 45, 550-556 (1996).
- [4] Smolen J. S.; Kalden, J. R.; Scott, D. L.; Rozman, B.; Kvien, T. K.; Larsen, A.; Loew-Friedrich, I.; Oed, C.; Rosenburg, R. "Efficacy and safety of leflunomide compared with placebo and sulphasalazine in active rheumatoid arthritis: a double-blind, randomised, multicentre trial". *Lancet*, 353, 259-266 (1999).
- [5] Rowland, P.; Bjornberg, O.; Nielsen, F. S.; Jensen, K. F.; Larsen, S. "The crystal structure of *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function". *Protein Science*, 7, 1269-1279 (1998).
- [6] Knecht, W.; Henseling, J.; Löffler, M. "Kinetics of inhibition of human and rat dihydroorotate dehydrogenase by atovaquone, lawsone derivatives, brequinar sodium and polyporic acid". *Chemico-Biological Interactions*, 124, 61-76 (2000).
- [7] Baldwin, J.; Farajallah, A. M.; Malmquist, N. A.; Rathod, P. K.; Phillips, M. A. "Malarial dihydroorotate dehydrogenase: substrate and inhibitor specificity". *Journal of Biological Chemistry*, 277, 41827-41834 (2002).
- [8] Bjornberg, O.; Rowland, P.; Larsen, S.; Jensen, K. F. "Active site of dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis* investigated by chemical modification and mutagenesis". *Biochemistry*, 36, 16197-16205 (1997).
- [9] Sorensen, P. G.; Dandanell, G. "A new type of dihydroorotate dehydrogenase, type 1S, from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*". *Extremophiles*, 6, 245-251 (2002).
- [10] Liu, S. P.; Neidhardt, E. A.; Grossman, T. H.; Ocain, T.; Clardy, J. "Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiploriferative agents". *Structure with Folding & Design*, 8, 25-33 (2000).
- [11] Norager, S.; Jensen, K. F.; Bjornberg, O.; Larsen, S. "*E. coli* dihydroorotate dehydrogenase reveals structural and functional distinctions between different classes of dihydroorotate dehydrogenase", *Structure*, 10, 1211-1223 (2002).
- [12] Rowland, P.; Nielsen, F. S.; Jensen, K. F.; Larsen, S. "The crystal structure of the flavin containing enzyme dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis*". *Structure*, 5, 239-252 (1997).
- [13] Pinheiro, M. P.; Iulek, J.; Nonato, M. C. "Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase from Y strain". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369, 812-817 (2008).
- [14] Hansen, M.; Le Nours, J.; Johansson, E.; Antal, T.; Ullrich, A.; Löffler, M.; Larsen, S. "Inhibitor binding in a class 2 dihydroorotate dehydrogenase causes variations in the membrane-associated N-terminal domain". *Protein Science*, 13, 1031-1042 (2004).
- [15] Hurt, D. E.; Widom, J.; Clardy, J. "Structure of *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase with a bound inhibitor". *Acta Crystallographica*, D62, 312-323 (2006).
- [16] Andersen, P. S.; Jansen, P. J. G.; Hammer, K. "Two different dihydroorotate dehydrogenases in *Lactococcus lactis*". *Journal of Bacteriology*, 176, 3975-3982 (1994).
- [17] Norager, S.; Arent, S.; Bjornberg, O.; Ottosen, M.; Lo Leggio, L.; Jensen, K. F.; Larsen, S. "*Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A mutants reveal important facets of the enzymatic function". *Journal of Biological Chemistry*, 278, 28812-28822 (2003).

- [18] Andersen, P. S.; Martinussen, J.; Hammer, K. "Sequence analysis and identification of the pyrKDbF operon from *Lactococcus lactis* including a novel gene, pyrK, involved in pyrimidine biosynthesis". *Journal of Bacteriology*, 178, 5005–5012 (1996).
- [19] Nielsen, F. S.; Rowland, P.; Larsen, S.; Jensen, K. F. "Purification and characterization of dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis*, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the enzyme". *Protein Science*, 5, 852–856 (1996).
- [20] Nielsen, F. S.; Andersen, P. S.; Jensen, K. F. "The B form of dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis* consists of two different subunits, encoded by the pyrDb and pyrK genes, and contains FMN, FAD, and [FeS] redox centres". *Journal of Biological Chemistry*, 271, 29359–29365 (1996).
- [21] Knecht, W.; Löffler, M. "Species-related inhibition of human dihydroorotate dehydrogenase by immunosuppressive isoxazol and cinchoninic acid derivatives". *Biochemical Pharmacology*, 56, 1259–1264 (1998).
- [22] Copeland, R. A.; Marcinkeviciene, J.; Haque, T. S.; Kopcho, L. M.; Jiang, W. J.; Wang, K.; Ecret, L. D.; Sizemore, C.; Amsler, K. A.; Foster, L.; Tadesse, S.; Combs, A. P.; Stern, A. M.; Trainor, G. L.; Slee, A.; Roger, M. J.; Hobbs, F. "*Helicobacter pylori*-selective antibacterials based on inhibition of pyrimidine biosynthesis". *Journal of Biological Chemistry*, 275, 33373–33378 (2000).
- [23] Bjornberg, O.; Gruner, A. C.; Roepstorff, P.; Jensen, K. F. "The Activity of *Escherichia coli* dihydroorotate dehydrogenase is dependent on a conserved loop identified by sequence homology, mutagenesis, and limited proteolysis". *Biochemistry*, 38, 2899–2908 (1999).
- [24] Larsen, J. N.; Jensen, K. J. "Nucleotide sequence of the pyrD gene of *Escherichia coli* and characterization of the flavoprotein dihydroorotate dehydrogenase". *European Journal of Biochemistry*, 151, 59–65 (1985).
- [25] Rawls, J.; Knecht, W.; Diekert, K.; Lill, R.; Löffler, M. "Requirements for the mitochondrial import and localization of dihydroorotate dehydrogenase". *European Journal of Biochemistry*, 267, 2079–2087 (2000).
- [26] Shi, J.; Palfey, B. A.; Dertouzos, J.; Jensen, K. F.; Gafni, A.; Steel, D. "Multiple states of the Tyr318Leu mutant of dihydroorotate dehydrogenase revealed by single-molecule kinetics". *Journal of the American Chemical Society*, 126, 6914–6922 (2004).
- [27] Pistolesi, S.; Ferro, E.; Santucci, A.; Basosi, R.; Trabalzini, L.; Pogni, R. "Molecular motion of spin labeled side chains in the C-terminal domain of RGL2 protein: A SDSL-EPR and MD study". *Biophysical Chemistry*, 123, 49–57 (2006).
- [28] Fanucci, G. E.; Cafiso, D. S. "Recent advances and applications of site-directed spin labeling". *Current Opinion in Structural Biology*, 16, 644–653 (2006).
- [29] Mchaourab, H. S.; Lietzow, M. A.; Hideg, K.; Hubbell, W. L. "Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme. correlation with protein structure and dynamics". *Biochemistry*, 35, 7692–7704 (1996).
- [30] Mchaourab, H. S.; Kalai, T.; Hideg, K.; Hubbell, W. L. "Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme: effect of side chain structure". *Biochemistry*, 38, 2947–2955 (1999).
- [31] Guo, Z.; Cascio, D.; Hideg, K.; Kalai, T.; Hubbell, W. L. "Structural determinants of nitroxide motion in spin-labeled proteins: tertiary contact and solvent-inaccessible sites in helix G of T4 lysozyme". *Protein Science*, 16, 1069–1086 (2007).
- [32] Lovell, S. C.; Word, J. M.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. "The penultimate rotamer library". *Proteins-Structure Function and Genetics*, 40, 389–408 (2000).
- [33] Langen, R.; Oh, K. J.; Cascio, D.; Hubbell, W. L. "Crystal structures of spin labeled T4 lysozyme mutants: implications for the interpretation of EPR spectra in terms of structure". *Biochemistry*, 39, 8396–8405 (2000).
- [34] Van Wart, H. E.; Scheraga, H. A. "Stable conformations of aliphatic disulfides: Influence of 1,4 interactions involving sulfur atoms". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74, 13–17 (1977).
- [35] Rosenfield, R. E.; Parthasarathy, R.; Dunitz, J. D. "Directional preferences of nonbonded atomic contacts with divalent sulfur. 1. Electrophiles and nucleophiles". *Journal of the American Chemistry Society*, 99, 4860–4862 (1977).
- [36] Nagao, Y.; Hirata, T.; Goto, S.; Sano, S.; Kakehi, A.; Iizuka, K.; Shiro, M. "Intramolecular nonbonded S-O interaction recognized in (acylimino)thiadiazoline derivatives as angiotensin II receptor antagonists and related compounds". *Journal of the American Chemistry Society*, 120, 3104–3110 (1998).
- [37] Fraser, R. R.; Boussard, G.; Saunders, J. K.; Lambert, J. B.; Mixan, C. E. "Barriers to rotation about the sulfur-sulfur bond in acyclic disulfides". *Journal of the American Chemistry Society*, 93, 3822–3823 (1971).
- [38] Jiao, D.; Barfield, M.; Combariza, J. E.; Hruby, V. J. "Ab initio molecular orbital studies of the rotational barriers and the sulphur-33 and carbon-13 chemical shieldings for dimethyl disulfide". *Journal of the American Chemistry Society*, 114, 3639–3643 (1992).

Capítulo 2. Clorocatecol 1,2-Dioxigenase

Neste capítulo apresentamos o segundo problema em que estamos atuando nos últimos anos e que envolve a enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase. Esta enzima teve seu estudo em nosso grupo iniciado ainda durante meu doutoramento e evoluiu de forma a que os interesses iniciais, que incluíam basicamente uma caracterização do sítio de ferro presente na estrutura da proteína, fossem bastante expandidos para agora incluir investigação de sua interação com moléculas anfipáticas como descrito nas seções subseqüentes. Este trabalho envolve uma colaboração com a Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo (IFSC/USP), que trabalhou por muito tempo com a clonagem, expressão e purificação da enzima de interesse, da Profa. Dra. Maria Cristina Nonato (FCFRP/USP), que atua na determinação da estrutura cristalográfica da proteína, e, mais recentemente, do Prof. Dr. John Ladbury (University College London), cuja *expertise* em métodos de biocalorimetria trará possibilidades interessantes de uso destas técnicas no estudo da clorocatecol 1,2-dioxigenase.

2.1 Introdução e Relevância

A função biológica da enzima clorocatecol 1,2 dioxigenase (CCD) justifica o interesse pelo seu estudo: a clivagem de hidrocarbonetos sintéticos aromáticos. Estes compostos, utilizados pela indústria moderna, são liberados continuamente no meio ambiente, atuando como agentes poluentes de vários ecossistemas. A sua eliminação é realizada por populações microbianas naturais presentes no solo e na água [1], estando os genes responsáveis pela degradação total ou parcial dessas substâncias localizadas em plasmídeos bacterianos.

A degradação aeróbia de muitos compostos aromáticos não halogenados envolve suas ativações e sucessivas modificações de tal forma que sejam canalizados a poucos intermediários metabólicos dihidroxilados, como o catecol (1,2-hidroxibenzeno), gentisato ou protocatecoato (Figura 2-1), os quais são substratos para a clivagem dos anéis aromáticos [2]. Este “funil metabólico” é muito evidente no caso dos catecóis e seus derivados (Figura 2-2), sendo estes os metabólitos resultantes de virtualmente todos os substratos aromáticos catabolisados aerobicamente [3,4].

Figura 2-1 – Exemplos de intermediários metabólicos di-hidroxilados na degradação de compostos aromáticos.

Para os catecóis em geral, o segundo estágio do catabolismo, que corresponde à clivagem do anel aromático, ocorre pela ação de dioxigenases que rompem uma das ligações carbono-carbono do anel pela adição de oxigênio molecular, produzindo um ácido alifático insaturado. As reações que produzem Cl-catecóis a partir de seus respectivos precursores aromáticos podem, em certos casos, ser catalisadas por enzimas periféricas comuns, as quais podem ter uma especificidade ampla o suficiente para converter compostos Cl-substituídos, além de seus substratos normais não clorados [5].

Figura 2-2 – Compostos que podem ser canalizados a catecol. (modificado a partir de Harwood & Paraless [6])

A clivagem dos compostos aromáticos, como o 1,2-diidroxibenzeno (catecol), por uma dioxigenase, pode ocorrer por três vias [7]: (a) clivagem da ligação entre os átomos de carbono onde estão ligados os grupos hidroxilas (clivagem intradiol), (b) clivagem da ligação entre os carbonos das posições 2 e 3 (clivagem extradiol, proximal) e (c) clivagem da ligação entre os carbonos das posições 1 e 6 (clivagem extradiol, distal) (Figura 2-3).

Figura 2-3 – Esquema mostrando os três modos como pode ocorrer a fissão do anel aromático: a – clivagem intradiol, b – clivagem extradiol proximal, c – clivagem extradiol distal. *R* representa os vários radicais que podem ser ligados à molécula, tais como íon cloro.

As catecol dioxigenases são uma classe de enzimas bacterianas portadoras de um sítio não-heme de ferro e que catalizam a adição (via intradiol) de ambos os átomos da molécula de oxigênio ao catecol ou seus derivados, com subsequente clivagem do anel aromático, passo fundamental do metabolismo de compostos aromáticos [8].

Dentro da família das dioxigenases intradióis, há duas diferentes famílias estruturais: as enzimas catecol 1,2-dioxigenase (1,2-CTDs) e protococatecoato 3,4-dioxigenase (3,4-PCDs) que foram isoladas a partir de diferentes bactérias e estudadas extensivamente desde a sua descoberta nos anos 50 [9-11]. A primeira compreende proteínas compostas por duas subunidades homólogas [$\alpha\beta\text{Fe(III)}$], as quais são arranjadas em uma grande estrutura oligomérica. A 3,4-PCDs catalizam hidroxibenzoatos. Dados cristalográficos [12,13,14] juntamente com estudos espectroscópicos [15,16,17] das enzimas 3,4-PCDs mostraram que o íon ferro possui uma geometria bipiramidal trigonal coordenado por duas tirosinas, duas histidinas e um grupamento hidróxido (2Tyr, 2His, 1OH).

As 1,2-CTDs são enzimas que catalisam diversos substratos tais como catecol e seus derivados halogenados. Recentemente, as estruturas tridimensionais de três membros da família da catecol dioxigenase tornaram-se disponíveis: 1,2-CTD de *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 (Ac 1,2-CTD) [18], 4-clorocatecol 1,2-dioxigenase [19] e 3-clorocatecol 1,2-dioxigenase [20] de *Rhodococcus*

opacus 1CP (Rho 1,2-CCDs). Essas proteínas são homodímeros com um sítio ativo não-heme de ferro por monômero e no estado de oxidação Fe(III) tanto na enzima nativa quanto nos vários complexos enzima-substrato e enzima-intermediários, e como a 3,4-PCDs, o centro de ferro possui (2Tyr, 2His, 1OH) coordenados. Uma diferença notável na especificidade do substrato foi observada entre as enzimas 1,2-CTD e 1,2-CCD, pois as CCD's, que catalisam o clorocatecol, têm uma tolerância maior ao substrato que as CTD's, catalisando também catecol [21]. As características estruturais responsáveis por tal diversidade não estão ainda muito claras.

Todas as estruturas de catecol dioxigenases (Ac 1,2-CTD e Rho 1,2-CCDs) e mais a estrutura de outra dioxigenase intradiol, a hidroxiquinol 1,2-dioxigenase de *Nocardioideis simplex* 3E [22], apresentam um canal hidrofóbico conectando as subunidades, onde foram encontradas moléculas de fosfolipídios ligadas. Estudos espectroscópicos de RME realizados em nosso grupo (v. artigo em anexo) mostraram a existência desse canal hidrofóbico também na enzima objeto de estudo desta parte do projeto, a clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida* (Pp 1,2-CCD) [23]. Em todos os casos, as moléculas anfipáticas possuem a região da cabeça polar para fora em contato com o solvente e a cadeia carbônica direcionada para o interior do canal. A identificação correta do fosfolipídio não foi possível a partir dos dados cristalográficos já que não foi observada densidade eletrônica para a região da cabeça polar do fosfolipídio. No caso de nossos resultados por RME, o fosfolipídio dipalmitoil fosfatidilcolina marcado ao longo da cadeia carbônica foi utilizado [23]. A capacidade de ligação de moléculas anfipáticas foi a motivação para se estudar a possível ligação da catecol dioxigenase com membranas [18,23] e, é claro, o papel desta ligação no processo de catálise enzimática.

Figura 2-4 – Estrutura dimérica (αFe^{3+})₂ da dioxigenase Ac 1,2-CTD. Na figura, pode ser vista a localização dos domínios catalíticos e de ligação, bem como a entrada de acesso aos sítios ativos. (adaptada da referência 18).

Figura 2-5: Estrutura tridimensional da enzima 3-clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Rhodococcus opacus* 1CP em duas diferentes orientações [20]. O dímero é formado por duas subunidades iguais (vermelho e azul). Cada monômero é composto de um domínio catalítico composto de uma série de fitas- β enoveladas em um motivo β -sanduíche e um domínio helicoidal que participa da interface dimérica. O íon Fe^{3+} (em amarelo) está posicionado em uma região estruturalmente desordenada de cada monômero que compreende a região de ligação entre os motivos helicoidal e de fitas- β . Na interface dimérica é encontrada uma região hidrofóbica onde são descritas duas moléculas de fosfolípido (verde).

A pergunta que pode ser feita e para a qual nos propomos a fornecer resposta é: qual o papel desempenhado pelo túnel hidrofóbico, onde foi encontrada a molécula de fosfolípido, durante a atividade catalítica da enzima? As possíveis respostas a tal indagação englobam: (a) o túnel, de alguma forma, aumenta a concentração local de substrato, (b) o fosfolípido atua como um modulador da atividade enzimática [23] ou (c) ele regula a fluidez da bicamada lipídica, o que leva à hipótese da CCD estar ancorada à membrana da bactéria.

A primeira contribuição dada por nossos trabalhos mostrou, como mencionado acima, a existência do canal de ligação do fosfolípido na estrutura da Pp 1,2-CCD. Verificamos, ainda, que a presença de moléculas anfipáticas parece ter um papel de modulação da atividade enzimática, o que nos permite imaginar que tais moléculas tenham realmente um papel funcional. Além disso, uma caracterização do sítio de ferro mostrou que este sofre uma mudança em seu estado de oxidação durante o processo de catálise enzimática, fato este também que não havia sido reportado anteriormente na literatura.

É dispensável dizer que a presença de moléculas de fosfolípidos na estrutura da enzima abriu um grande variedade de novos problemas e para os quais as técnicas de marcação de spin sítio dirigida, RME e, mais recentemente, microcalorimetria formam conjunto bastante apropriado de métodos experimentais. Estes são os métodos que estão em uso atualmente em nosso grupo para continuarmos a investigar as questões propostas acima.

2.2 Publicações geradas a partir deste trabalho

- Citadini, A. P. S.; Pinto, A. P. A.; Araújo, A. P. U.; Nascimento, O. R.; Costa-Filho, A. J. “EPR studies of chlorocatechol 1,2-dioxygenase: evidences of iron reduction during catalysis and of the binding of amphipatic molecules”. *Biophysical Journal*, v. 88, p. 3502-3508 (2005).

2.3 Referências Bibliográficas

- [1] Neilson, J. W.; Josephson, K. L.; Pillai, S. D.; Pepper, I. L. “Polymerase Chain-Reaction and Gene Probe Detection of the 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degradation Plasmid PJP4”. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1271-1275 (1992).
- [2] Dagley, S. “Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in *Pseudomonas*”; in: Sokatch, J.R. (eds), *The Bacteria*, V.10. Academic Press, Inc., Orlando, 1986.
- [3] Stanier, R. Y.; Ornston, L. N. “Conversion of Catechol and Protocatechuate to Beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*”. *Journal of Biological Chemistry*, 241, 3776 (1966).
- [4] Schlömann, M. “Evolution of chlorocatechol catabolic pathways”. *Biodegradation* 5, 301-321 (1994).
- [5] Knackmuss, H. J.; Hellwig, M. “Utilization and Cooxidation of Chlorinated Phenols by *Pseudomonas*-SP B-13”. *Archives of Microbiology*, 117, 1-7 (1978).
- [6] Harwood, C. S.; Parales, R. E. “The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity”. *Annual Review of Microbiology*, 50, 553-590 (1996).
- [7] Nozaki, M.; Kotani, S.; Ono, K.; Senoh, S. “Metapyrocatechase. 3. Substrate Specificity and Mode of Ring Fission”. *Biochimica et Biophysica Acta*, 220, 213 (1970).
- [8] Hayaishi, O.; Nozaki, M. “Nature and Mechanisms of Oxygenases”. *Science*, 164, 389 (1969).
- [9] Nakazawa, T.; Nakazawa, A. *Methods in Enzymology* 17A, 518-522. Academic Press Inc., New York (1970).
- [10] Bull, C.; Ballou, D. P. “Purification and Properties of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase from *Pseudomonas putida* – A New Iron to Subunit Stoichiometry”. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 2673-2680 (1981).
- [11] Lipscomb, J. D.; Whittaker, J. W.; Arciero, D.; Orville, A. M.; Wolgel, S. A. In: *Microbial Metabolism and the Carbon Cycle*, S. R. Hagerdon, R. S. Hansen, D. A. Kunz (Eds.), Harwood Academic Publishers, New York, p. 259-281 (1987).
- [12] Ohlendorf, D. H.; Lipscomb, J. D.; Weber, P. C. “Structure and Assembly of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase”. *Nature*, 336, 403-405 (1988).
- [13] Ohlendorf, D. H.; Orville, A. M.; Lipscomb, J. D. “Structure of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* at 2.15 Å resolution”. *Journal of Molecular Biology*, 244, 586-608 (1994).
- [14] Vetting, M. W.; D'Argenio, D. A.; Ornston, L. N.; Ohlendorf, D. H. “Structure of *Acinetobacter* strain ADP1 protocatechuate 3,4-dioxygenase at 2.2 angstrom resolution: Implications for the mechanism of an intradiol dioxygenase”. *Biochemistry*, 39, 7943-7955 (2000).
- [15] Whittaker, J. W.; Lipscomb, J. D.; Kent, T. A.; Münck, E. “*Brevibacterium fuscum* protocatechuate 3,4-dioxygenase: Purification, crystallization, and characterization”. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 4466-4475 (1984).
- [16] True, A. E.; Orville, A. M.; Pearce, L. L.; Lipscomb, J. D.; Que, Jr, L. “An EXAFS study of the interaction of substrate with the ferric active site of protocatechuate 3,4-dioxygenase”. *Biochemistry*, 29, 10847-10854 (1990).
- [17] Orville, A. M.; Lipscomb, J. D. “Binding of isotopically labeled substrates, inhibitors, and cyanide by protocatechuate 3,4-dioxygenase”. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 8791-8801 (1989).
- [18] Vetting, M. W.; Ohlendorf, D. H. “The 1.8 Å crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker”. *Structure*, 8, 429-440 (2000).
- [19] Ferraroni M.; Solyanikova, I.P.; Kolomytseva, M. P.; Scozzafava, A.; Golovleva, L.; Briganti, F. “Crystal structure of 4-chlorocatechol 1,2-dioxygenase from the chlorophenol-utilizing Gram-positive *Rhodococcus opacus* 1CP”. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 27646-27655 (2004).
- [20] Ferraroni, M.; Kolomytseva, M. P.; Solyanikova, I. P.; Scozzafava, A.; Golovleva, L. A.; Briganti, F. “Crystal Structure of 3-Chlorocatechol 1,2-dioxygenase Key Enzyme of a New Modified Ortho-pathway from the Gram-

positive *Rhodococcus opacus* 1CP Grown on 2-chlorophenol". *Journal of Molecular Biology*, 360, 788-799 (2006).

[21] Broderick, J. B.; O'Halloran, T. V. "Overproduction, purification, and characterization of chlorocatechol dioxygenase, a non-heme iron dioxygenase with broad substrate tolerance". *Biochemistry*, 30, 7349-7358 (1991).

[22] Ferraroni, M.; Seifert, J.; Travkin, V.M.; Thiel, M.; Kaschabek, S.; Scozzafava, A.; Golovleva, L.; Schlömann, M.; Briganti, F. "Crystal Structure of the Hydroxyquinol 1,2-Dioxygenase from *Nocardioides simplex* 3E, a Key Enzyme Involved in Polychlorinated Aromatics Biodegradation". *Journal of Biological Chemistry*, 280, 21144-21154 (2005).

[23] Citadini, A. P. S.; Pinto, A. P. A.; Araújo, A. P. U.; Nascimento, O. R.; Costa-Filho, A. J. "EPR studies of chlorocatechol 1,2-dioxygenase: evidences of iron reduction during catalysis and of the binding of amphipatic molecules". *Biophysical Journal*, 88, 3502-3508 (2005).

Capítulo 3. Metaloproteínas

Neste capítulo, apresento o trabalho desenvolvido com metaloproteínas que foram estudadas por técnicas diversas. Os sistemas de interesse incluem: o fragmento solúvel da proteína citocromo *c* oxidase ba_3 de *T. thermophilus*, a enzima Glioxalase II e a hemoglobina gigante de *Glossoscolex paulistus*. Estes projetos têm como característica comum além do interesse por metaloproteínas, a nossa participação através do uso da Ressonância Magnética Eletrônica, o que nos permitiu atuar em uma área de pesquisa muito interessante do ponto de vista biofísico e para a qual a RME pode, indubitavelmente, dar contribuições únicas e bastante significativas no entendimento de cada problema específico. Os dois primeiros sistemas advêm de uma colaboração recente com o grupo do Prof. Dr. Alejandro Vila (Universidad Nacional de Rosario, Argentina) e o último de um trabalho iniciado em conjunto com o grupo do Prof. Dr. Hidetake Imasato (IQSC/USP) e, agora, continuado com o Prof. Dr. Marcel Tabak (IQSC/USP).

3.1 Introdução e Justificativa

Por mais de 30 anos, técnicas de Ressonância Magnética Eletrônica têm sido ferramentas importantes para a caracterização de centros metálicos em sítios ativos de metaloproteínas. Um objetivo na aplicação de RME para o estudo de centros paramagnéticos é a determinação mais completa possível dos valores dos diversos parâmetros magnéticos e acoplamentos presentes no

sistema. Estes, quando devidamente interpretados, fornecem uma gama de informações muito vasta a respeito da estrutura química, eletrônica e molecular do sistema em estudo. Para amostras policristalinas ou congeladas, o espectro de RME é formado pelo envelope de ressonâncias estreitas correspondentes às diversas orientações do centro paramagnético em relação ao campo magnético externo. As características de um espectro de RME desse tipo são determinadas por vários parâmetros, sendo a simetria e os valores das componentes dos tensores g e A , e as larguras de linhas aqueles mais importantes. Nesse contexto, nos propomos a investigar um conjunto de metaloproteínas cujas funções justificam o interesse pelo seu estudo.

3.1.1 Proteínas de Cobre envolvidas em Processos de Transferência Eletrônica

Oxidases contendo grupos heme de cobre são enzimas terminais de processos de transferência eletrônica que acontecem na cadeia respiratória de procariotos e eucariotos, na qual atuam como motores que acoplam a transferência eletrônica com o bombeamento de prótons pela membrana [1-3]. Citocromo *c* oxidases são os membros mais representativos dessa família de enzimas que catalisam a redução de oxigênio a água utilizando elétrons fornecidos por quatro moléculas de citocromo *c*. O consumo de prótons e a transferência próton/elétron pela membrana contribuem para o gradiente de prótons necessários para síntese de ATP. Para essa finalidade, citocromo *c* oxidase dispõe de um maquinário finamente regulado que transfere elétrons entre sítios de cobre e de ferro [4-6]. Transferências eletrônicas de longo alcance em proteínas acontecem a taxas surpreendentemente altas [7,8]. O conhecimento de como sítios redox naturais são projetados para manter a eficiência desses processos é um passo crítico para se explicar o mecanismo de oxidases.

A transferência de elétrons em citocromo oxidases é iniciada pela ligação de citocromo *c* reduzido à subunidade II da enzima, que se encontra exposta ao lado citosólico da membrana (Figura 3-1). Oceptor primário de elétrons é um centro binuclear de cobre contido na subunidade II, conhecido como Cu_A . Este centro existe naturalmente em dois estados: na forma reduzida, os átomos de cobre são íons cuprosos, ao passo que a forma oxidada é constituída por um par de valência mista com o elétron completamente delocalizado sobre os dois íons cobre, como pode se inferir do espectro de RME dessa forma que apresenta sete linhas hiperfinas associadas a um spin eletrônico $S=1/2$ interagindo com dois núcleos de spin $I=3/2$ [9,10]. Cu_A pode ser descrito como um núcleo quase planar formado pelos dois átomos de cobre e dois átomos de enxofre (Cu_2S_2) oriundos de resíduos de cisteína (Figura 3-2) [11,12]. Cada cobre do centro binuclear está, ainda, coordenado a um resíduo de histidina (His114 ou His157) e a um ligante axial. Um desses ligantes axiais é um

resíduo de metionina (Met160) e o outro uma glutamina (Gln151). A curta distância entre os íons cobre ($\sim 2,5$ Å) e o ângulo Cu-S-Cu (70°) são altamente conservados nos centros Cu_A , o que sugere que essa configuração é funcionalmente favorecida.

Figura 3-1: Desenho esquemático de uma aa_3 citocromo *c* oxidase.

Em citocromo *c* oxidases do tipo aa_3 , elétrons são transferidos do centro Cu_A para um heme *a* e, então, para outro centro binuclear heme a_3/Cu_B , onde acontece a redução do oxigênio (Figura 3-1) [5]. Na citocromo *c* oxidase do tipo ba_3 de *Thermus thermophilus*, um grupo heme do tipo *b* substitui o heme *a*. A transferência intramolecular $\text{Cu}_A \rightarrow \text{heme } a$ é extremamente rápida ($2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ em 19 Å), enquanto que a transferência $\text{Cu}_A \rightarrow \text{heme } a_3$ (em 22 Å) é 2-4 ordens de magnitude mais lenta [5]. A pequena diferença entre as distâncias envolvidas nos dois processos não explica a grande diferença entre as taxas de transferência entre o centro Cu_A e os dois grupos heme. As características direcionais e seletivas dessa transferência eletrônica tem sido atribuídas à estrutura eletrônica ímpar do centro Cu_A .

Figura 3-2: Estrutura do centro binuclear Cu_A . A numeração dos resíduos segue aquela da estrutura do centro Cu_A de *T. thermophilus*.

Centros Cu_A e sítios de cobre em proteínas azuis apresentam diferentes eficiências nos processos de transferência eletrônica [13], fato que tem sido atribuído tanto à estrutura rígida do centro Cu_A quanto ao caráter altamente delocalizado do elétron nesse centro. A interação entre os átomos de cobre e seus ligantes axiais parece desempenhar papel crucial na modulação do processo de transferência [14]. Ligantes axiais fracos devem comprimir o núcleo Cu_2S_2 com uma diminuição da distância Cu-Cu, resultando em maior delocalização eletrônica e, portanto, maior eficiência.

A caracterização espectroscópica dos sítios de cobre Cu_A na proteína nativa integral é atrapalhada pela presença dos grupos heme. Experimentos com o fragmento solúvel (que contém o sítio Cu_A) da oxidase de *P. denitrificans* não lograram sucesso devido à instabilidade dos mutantes [15]. Portanto, uma subunidade contendo o Cu_A e com alta estabilidade é necessária para se estudar o papel dos ligantes axiais no processo de transferência eletrônica. A subunidade Cu_A da ba_3 oxidase de *T. thermophilus* satisfaz essas condições [16]. Alguns resultados preliminares do grupo do Prof. Vila mostram que o centro Cu_A tolera mutações axiais e o efeito está restrito a um dos íons cobre [17].

Assim, uma caracterização detalhada da estrutura eletrônica do centro Cu_A no fragmento solúvel da proteína citocromo *c* oxidase ba_3 de *T. thermophilus*, aí incluindo-se o fragmento nativo e alguns mutantes é o objetivo geral do projeto de nosso colaborador Prof. Alejandro Vila. Resultados recentes mostram que a energia de um estado excitado termicamente acessível do centro Cu_A é modulada por interações fracas entre o cobre e seus ligantes [17]. Isto representa um novo mecanismo de regulação da transferência eletrônica, cuja investigação pode se valer de nossa participação com informações oriundas de medidas de RME do fragmento solúvel da ba_3 oxidase. Os objetivos específicos que temos contribuído dentro do projeto mais geral desenvolvido pelo grupo do Prof. Vila envolvem a obtenção de informações acerca dos fatores estruturais responsáveis pelo ajuste fino da distribuição eletrônica dos centros Cu_A contidos no fragmento solúvel da ba_3 oxidase de *T. thermophilus*. Espectros de RME do fragmento contendo o centro Cu_A nativo e de mutantes deste (mutações do ligante axial Met160) foram utilizados para identificar a presença de espécies de cobre de valência mista em cada uma das amostras.

3.1.2 Glioxalase II

Glioxalase II (GLX2) é uma metalo-tioesterase envolvida no processo de conversão de oxoaldeídos tóxicos aos correspondentes ácidos hidroxicarboxílicos usando glutatona como coenzima. Aldeídos como metilglioxal, resultante do metabolismo de carboidratos e lipídios, reagem espontaneamente com glutatona para formar tiohemiacetal. A enzima Glioxalase I (GLX1) catalisa a

isomerização deste tiohemiacetal produzindo derivados de S-(2-hidroxiacil)-glutathiona [18-20] GLX2 hidrolisa esses derivados para regenerar glutathiona, assim liberando hidroxiácidos não tóxicos [21]. Embora possa hidrolisar diferentes derivados de glutathiona, parece haver uma preferência da enzima GLX2 de vários organismos, incluindo humana, levedura e plantas, por S-D-lactoilglutathiona (SLG).

Glioxalase II pertence à superfamília das metalo- β -lactamases que se caracterizam por possuir um enovelamento $\alpha\beta/\beta\alpha$ e um motivo conservado capaz de ligar até dois íons metálicos em seu sítio ativo [21-25]. Neste contexto, GLX2, embora exiba a mesma esfera de coordenação metálico presente em outros membros da família, tem sido uma exceção no que diz respeito à especificidade do íon metálico, empregando diversos cofatores como Fe(II), Fe(III), Zn(II) e Mn(II) para formar a enzima ativa. Recentemente, a enzima GLX2 de *Salmonella typhimurium* (GloB) foi caracterizada e mostrou preferência por íons de ferro em seu sítio metálico.

Em um primeiro trabalho, realizamos uma caracterização bioquímica e biofísica da GLX2 de *Salmonella typhimurium* (GloB), incluindo a determinação da estrutura cristalográfica da enzima. Mostramos, ainda, que a enzima é ativa nas formas com ferro, zinco e manganês. Surpreendentemente, este comportamento se aproxima mais daquele observado em enzimas de eucariotos do que aquele apresentado pela GLX2 de *E. coli*. A tendência da GloB em ligar íons ferro também foi um resultado novo visto que outras enzimas da família de metalo- β -lactamases foram isoladas com zinco como cofator. Em um segundo trabalho, ainda não publicado, acompanhamos as alterações ocorridas no espectro de RME da GloB quando da adição de seu substrato glutathiona e do produto da reação. Com as informações obtidas esperamos poder obter novos *insights* sobre o mecanismo catalítico da enzima.

3.1.3 Hemoglobina Extracelular Gigante

Atuar em metaloproteínas através da aplicação da técnica de RME e não ter a oportunidade de se debruçar sobre problemas envolvendo hemoglobinas é quase como não ter sido devidamente iniciado em Biofísica Molecular. O estudo de hemoglobinas em situações diversas é um tema de pesquisa com produção constante de informações e quase insuperável neste sentido. Assim, foi uma grata satisfação quando tive a oportunidade de entrar nessa linha de pesquisa através da colaboração inicial com o Prof. Dr. Hidetake Imasato e, atualmente, com o Prof. Dr. Marcel Tabak.

O interesse deste projeto residiu no estudo de uma hemoglobina de massa molecular descomunal (3,1 MDa) [26,27]. Trata-se da hemoglobina (Hb) extracelular do anelídeo *Glossoscolex paulistus* cuja estrutura oligomérica envolve, segundo os dados mais aceitos, 144 cadeias do tipo

globina e 36 cadeias ditas estabilizadoras (*linkers*), dispostas em uma estrutura quaternária de bicamada hexagonal (modelo do bracelete) [28-30]. As subunidades estão arranjadas como doze dodecâmeros, cada um deles constituído por três tetrâmeros. O tetrâmero, por sua vez, é formado pelas cadeias monoméricas *a*, *b* e *c* ligadas por ligações de dissulfeto e três cadeias monoméricas *d* [31,32].

Apesar dos vários estudos estruturais e funcionais reportados sobre hemoglobinas gigantes, permanecem, ainda, aspectos pouco entendidos sobre a sua relação estrutura/atividade. Em particular, interessa a compreensão mais ampla das propriedades físico-químicas dos seus constituintes, já que essa hemoglobina extracelular quando em seu estado íntegro, apresenta estabilidade estrutural significativamente maior do que as hemoglobinas intracelulares. Dentro deste contexto, a investigação de mudanças conformacionais monitoradas a partir do centro metálico de ferro pode ser uma ferramenta bastante interessante. É sabido que os estados de organização da hemoglobina íntegra são dependentes tanto do estado de oxidação do centro de coordenação da porfirina existente na estrutura da Hb quanto de seus ligantes axiais [33-35].

Assim, alguns objetivos deste projeto e que resultaram nos artigos em anexo foram: o estudo da primeira esfera de coordenação do centro férrico contido no anel porfirínico da Hb gigante, caracterizando as mudanças de ligantes axiais em função da alteração do pH, tanto em meio ácido [36] quanto em meio alcalino [37], avaliar possíveis correlações entre as modificações na primeira esfera de coordenação do metal e alterações da conformação espacial da proteína, através de medidas de dicroísmo circular, conforme os valores de pH utilizados e, por fim, investigar o mecanismo envolvido na transição entre as diferentes espécies observadas quando o valor de pH é afastado da neutralidade. Esses objetivos iniciais foram expandidos de forma a termos uma continuidade do projeto em colaboração com o Prof. Marcel Tabak, como mencionado anteriormente, com o interesse agora voltado para o uso da técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para análise dos mecanismos de dissociação/desenovelamento da Hb de *Glossoscolex paulistus*.

3.2 Publicações geradas a partir desse trabalho

- Ledesma, G. N.; Murgida, D. H.; Ly, H. K.; Wackerbarth, H.; Ulstrup, J.; Costa-Filho, A. J.; Vila, A. J. "The Met Axial Ligand Determines the Redox Potential in CuA Sites". *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, p. 11884-11885 (2007).

- Campos-Bermudez, V.; Leite, N. R.; Krog, R.; Costa-Filho, A. J.; Soncini, F. C.; Oliva, G.; Vila, A. J. "Biochemical and Structural Characterization of Salmonella typhimurium glyoxalase II: New insights in metal selectivity". *Biochemistry*, v. 46, p. 11069-11079 (2007).
- Moreira, L. M.; Poli, A. L.; Lyon, J. P.; Saade, J.; Costa-Filho, A. J.; Imasato, H. "Ferric species of the giant extracellular hemoglobin of Glossoscolex paulistus as a function of pH: An EPR study on the irreversibility of the heme transitions". *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 150, p. 292-300 (2008).
- Moreira, L. M.; Poli, A. L.; Costa-Filho, A. J.; Imasato, H. "Ferric species equilibrium of the giant extracellular hemoglobin of Glossoscolex paulistus in alkaline medium: HALS hemichrome as a precursor of pentacoordinate species". *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 42, p. 103-110 (2008).
- Moreira, L. M.; Poli, A. L.; Costa-Filho, A. J.; Imasato, H. "Pentacoordinate and hexacoordinate ferric hemes in acid medium: EPR, UV-Vis and CD studies of the giant extracellular hemoglobin of Glossoscolex paulistus". *Biophysical Chemistry*, v. 124, p. 62-72 (2006).

3.3 Referências Bibliográficas

-
- [1] Babcock, G. T.; Wikstrom, M. "Oxygen Activation and the Conservation of Energy Cell in Respiration". *Nature*, 356, 301-309 (1992).
- [2] Saraste, M. "Structural Features of Cytochrome Oxidase". *Quarterly Reviews of Biophysics*, 23, 331-366 (1990).
- [3] Ferguson-Miller, S.; Babcock, G. T. "Heme/Copper Terminal Oxidases". *Chemical Reviews*, 96, 2889-2907 (1996).
- [4] Ramirez, B. E.; Malmström, B. G.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. "The Currents of Life: The Terminal Electron-Transfer Complex of Respiration". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92, 11949-11951 (1995).
- [5] Brzezinski, P. "Internal Electron-Transfer Reactions in Cytochrome c Oxidase". *Biochemistry*, 35, 5611-5615 (1996).
- [6] Medvedev, D. M.; Daizadeh, I.; Stuchebrukhov, A. A. "Electron Transfer Tunneling Pathways in Bovine Heart Cytochrome c Oxidase". *Journal of the American Chemical Society*, 122, 6571-6582 (2000).
- [7] Page, C. C.; Moser, C. C.; Chen, X.; Dutton, P. L. "Natural Engineering Principles of Electron Tunnelling in Biological Oxidation-Reduction". *Nature*, 402, 47-52 (1999).
- [8] Moser, C. C.; Keske, J. M.; Warncke, K.; Farid, R. S.; Dutton, P. L. "Nature of Biological Electron Transfer". *Nature*, 355, 796-802 (1992).
- [9] Kroneck, P. M. H.; Antholine, W. E.; Riester, J.; Zumft, W. G. "The Cupric Site in Nitrous Oxide Reductase Contains a Mixed-Valence [Cu(II),Cu(I)] Binuclear Center: a Multifrequency Electron Paramagnetic Resonance Investigation". *FEBS Letters*, 242, 70-74 (1988).
- [10] Kroneck, P. M.; Antholine, W. E.; Kastrau, D. H.; Buse, G.; Steffens, G. C.; Zumft, W. G. "Multifrequency EPR Evidence for a Bimetallic Center at the CuA Site in Cytochrome c Oxidase". *FEBS Letters*, 268, 274-276 (1990).

- [11] Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. "Structures of Metal Sites of Oxidized Bovine Heart Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å". *Science*, 269, 1071-1074 (1995).
- [12] Iwata, S.; Ostermeier, C.; Ludwig, B.; Michel, H. "Structure at 2.8 Å Resolution of Cytochrome c Oxidase From *Paracoccus Denitrificans*". *Nature*, 376, 660-669 (1995).
- [13] Farver, O.; Lu, Y.; Ang, M. C.; Pecht, I. "Enhanced Rate of Intramolecular Electron Transfer in an Engineered Purple CuA Azurin". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, 899-902 (1999).
- [14] Gamelin, D. R.; Randall, D. W.; Hay, M. T.; Houser, R. P.; Mulder, T. C.; Canters, G. W.; De Vries, S.; Tolman, W. B.; Solomon, E. I. "Spectroscopy of a Mixed-Valence CuA-Type Centers: Ligand Field Control of Ground-State Properties Related to Electron Transfer". *Journal of the American Chemical Society*, 120, 5246-5263 (1998).
- [15] Farrar, J. A.; Lappalainen, P.; Zumft, W. G.; Saraste, M.; Thomson, A. J. "Spectroscopic and Mutagenesis Studies on the CuA Centre From the Cytochrome-c Oxidase Complex of *Paracoccus Denitrificans*". *European Journal of Biochemistry*, 232, 294-303 (1995).
- [16] Wittung-Stafshede, P.; Malmstrom, B. G.; Sanders, D.; Fee, J. A.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. "Effect of Redox State on the Folding Free Energy of a Thermostable Electron-Transfer Metalloprotein: the CuA Domain of Cytochrome Oxidase From *Thermus Thermophilus*". *Biochemistry*, 37, 3172-3177 (1998).
- [17] Fernandez, C. O.; Cricco, J. A.; Slutter, C. E.; Richards, J. H.; Gray, H. B.; Vila, A. J. "Axial Ligand Modulation of the Electronic Structures of Binuclear Copper Sites: Analysis of Paramagnetic ¹H NMR Spectra of Met160Gln CuA". *Journal of the American Chemical Society*, 123, 11678-11685 (2001).
- [18] Clugston, S. L.; Barnard, J. F.; Kinach, R.; Miedema, D.; Ruman, R.; Daub, E.; Honek, J. F. "Overproduction and characterization of a dimeric non-zinc glyoxalase I from *Escherichia coli*: evidence for optimal activation by nickel ions". *Biochemistry*, 37, 8754-8763 (1998).
- [19] Sukdeo, N.; Clugston, S. L.; Daub, E.; Honek, J. F. "Distinct classes of glyoxalase I: metal specificity of the *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria meningitidis* enzymes". *Biochemical Journal*, 384, 111-117 (2004).
- [20] Creighton, D. J.; Hamilton, D. S. "Brief history of glyoxalase I and what we have learned about metal ion-dependent, enzyme-catalyzed isomerizations". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 387, 1-10 (2001).
- [21] Ferguson, G. P.; Totemeyer, S.; MacLean, M. J.; Booth, I. R. "Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival?". *Archives of Microbiology*, 170, 209-218 (1998).
- [22] Daiyasu, H.; Osaka, K.; Ishino, Y.; Toh, H. "Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the beta-lactamase fold". *FEBS Letters*, 503, 1-6 (2001).
- [23] Gomes, C. M.; Frazao, C.; Xavier, A. V.; LeGall, J.; Teixeira, M. "Functional control of the binuclear metal site in the metallo-beta-lactamase-like fold by subtle amino acid replacements". *Protein Science*, 11, 707-712 (2002).
- [24] Carfi, A.; Pares, S.; Duee, E.; Galleni, M.; Duez, C.; Frère, J. M.; Dideberg, O. "The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold". *EMBO Journal*, 14, 4914-4921 (1995).
- [25] Crowder, M. W.; Spencer, J.; Vila, A. J. "Metallo-beta-lactamases: Novel Weaponry for Antibiotic Resistance in Bacteria". *Acc. Chem. Res.*, 39, 721-728 (2006).
- [26] Costa, M. C. P.; Bonafé, C. F. S.; Meirelles, N. C.; Galembeck, F. "Sedimentation coefficient and minimum molecular-weight of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta)". *Brazilian Journal of Medical Research*, 21, 115-118 (1998).
- [27] Meirelles, N. C.; Oliveira, B.; Oliveira, A. R.; de Paula, E.; Marangoni, S.; Rennebeck, G. M. "Erythrocrucorin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae) dissociation at alkaline pH and its ligand properties as revealed by chemical, immunochemical and electron-microscopy". *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 88, 377-379 (1987).
- [28] Krebs, A.; Zipper, P.; Vinogradov, S. N. "Lack of size and shape alteration of oxygenated and deoxygenated *Lumbricus terrestris* hemoglobin?". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1297, 115-118 (1996).
- [29] Green, B. N.; Vinogradov, S. N. "An electrospray ionization mass spectrometric study of the subunit structure of the giant hemoglobin from the Leech *Nephelopsis obscura*". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15, 22-27 (2004).
- [30] Yamaki, M.; Kubota, K.; Matsubara, K.; Ebina, S.; Gotoh, T. "Carbohydrate gluing is a strategy for supramolecular clamping of submultiples in annelid extracellular multi-subunit hemoglobin". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 355, 119-123 (1998).

- [31] deHass, F.; Kuchumov, A.; Taveau, J. C.; Boisset, N.; Vinogradov, S. N.; Lamy, J. N. "Three-dimensional reconstruction of native and reassembled *Lumbricus terrestris* extracellular hemoglobin. Localization of the monomeric globin chains". *Biochemistry*, 36, 7330-7338 (1997).
- [32] Royer, W. E.; Knapp, J. E.; Strand, K.; Heaslet, H. A. "Cooperative hemoglobins: conserved fold, diverse quaternary assemblies and allosteric mechanisms". *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 297-304 (2001).
- [33] Riggs, A. F. "Self-association, cooperativity and supercooperativity of oxygen binding by hemoglobins". *Journal of Experimental Biology*, 201, 1073-1084 (1998).
- [34] Gelamo, E. L.; Itri, R.; Tabak, M. "Small angle X-ray scattering (SAXS) study of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* - Effect of pH, iron oxidation state, and interaction with anionic SDS surfactant". *Journal of Biological Chemistry*, 279, 33298-33305 (2004).
- [35] Agostinho, S. C. M.; Tinto, M. H.; Perussi, J. R.; Tabak, M.; Imasato, H. "Fluorescence studies of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* in met form obtained from Sephadex gel filtration". *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 118, 171-181 (1997).
- [36] Moreira, L. M.; Poli, A. L.; Costa-Filho, A. J.; Imasato, H. "Pentacoordinate and hexacoordinate ferric hemes in acid medium: EPR, UV-Vis and CD studies of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*". *Biophysical Chemistry*, 124, 62-72 (2006).
- [37] Moreira, L. M.; Poli, A. L.; Costa-Filho, A. J.; Imasato, H. "Ferric species equilibrium of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* in alkaline medium: HALS hemichrome as a precursor of pentacoordinate species". *International Journal of Biological Macromolecules*, 42, 103-110 (2008).

Capítulo 4. Complexos Metálicos de Interesse Biológico

Nossa linha de pesquisa com complexos metálicos de interesse biológico, em particular compostos envolvendo o íon Cu(II), é apresentada neste último capítulo. Aqui mostramos a relevância de estudarmos sistemas formados por moléculas de baixo peso molecular e que podem servir tanto de modelo para interações em macromoléculas e/ou apresentem aplicações em problemas de interesse biotecnológico. Os artigos apresentados são fruto de uma colaboração por mim iniciada no ano de 2002 com o grupo da Profa. Dra. María H. Torre (Universidade de La República, Uruguai) e que aglutinou a especialidade em química bioinorgânica da Profa. Torre com minha experiência em uma linha de pesquisa tradicional de nosso grupo, qual seja a caracterização de compostos metálicos. Cabe salientar que esta linha de pesquisa tradicional foi bastante ampliada justamente pelo início de minha colaboração com a Profa. Torre, agora incluindo outras técnicas e compostos com aplicações diversas.

4.1 Introdução e Relevância

Depois do ferro e do zinco, o cobre é o terceiro metal de transição mais abundante no organismo humano. Sua maior concentração se encontra no fígado seguido do cérebro, pulmões, rins e ovário [1]. O cobre está presente em sistemas e processos que envolvem a utilização do oxigênio em sistemas biológicos. Transporte de oxigênio e de elétrons são as atividades mais

comuns em metaloproteínas ou metaloenzimas que possuem sítios metálicos de cobre. Outros processos envolvem atividades do tipo: oxidase, que é a capacidade de transferência de elétrons de um substrato ao oxigênio; oxigenases, quebra do oxigênio O_2 e superóxido-dismutase, degradação do ânion superóxido O_2^- , uma espécie tóxica, em produtos não-tóxicos como a água ou oxigênio.

Organismos animais e vegetais apresentam uma gama de metaloproteínas ou metaloenzimas que desempenham papéis importantes no seu metabolismo biológico. Proteínas como lacases, ascorbato-oxidases (quebra da vitamina C), ceruloplastina, galacto-oxidases, amino-oxidases estão ligadas à atividade de oxidase; as eritrocupeínas, cerebrocupeínas, e hepatocrupeínas são metaloproteínas que estão relacionadas com a atividade de superóxido-dismutase. A hemocianina está ligada ao transporte de oxigênio em organismos como artrópodes e moluscos, enquanto que a tirosinase catalisa a incorporação do oxigênio O_2 a um substrato, sendo a responsável pelo pigmento marrom-escuro de certos vegetais como batatas, bananas e maçã, quando expostos ao ar rico em oxigênio.

A deficiência de cobre pode provocar anomalia no sistema ósseo, pois inibe a produção de enzimas amino-oxidase e lisil-oxidase envolvidas no entrelaçamento das fibras de colágeno. A falta de cobre afeta a estabilidade e quantidade de colágeno comprometendo o crescimento e a qualidade dos pêlos [1]. Doenças como encefalia espongiiforme (mal da vaca loca) e mal de Alzheimer estão diretamente ligadas a proteínas que possuem sítios de Cu(II) em sua estrutura [2-4]

Configurações distorcidas (tetraédrica, quadrado piramidal e quadrado planar) em torno do centro metálico representam de alguma forma a configuração estrutural mais comum em complexos de Cu(II). Estas geometrias facilitam, por exemplo, a rápida transferência de elétrons, já que não requerem mudanças estruturais significativas, ao se variar o estado de oxidação do metal durante a realização de processos observados em proteínas azuis [1,5].

Um dos objetivos da utilização da técnica de RME em sistemas biológicos, seus modelos e em compostos metálicos com interesse biológico é obtermos os parâmetros espectroscópicos e, assim, identificarmos espécies paramagnéticas para ajudar na caracterização estrutural e funcional de biomoléculas. Interessa-nos conhecer tanto as propriedades eletrônicas como as interações magnéticas entre os vizinhos dos complexos. Informação sobre a configuração eletrônica do íon metálico, o número e o tipo de ligantes que rodeiam o metal, a geometria do complexo formado, o grau de covalência metal-ligante e as alterações nestas propriedades produzidas quando o sistema de interesse realiza sua função específica, norteiam esse tipo de estudo.

4.1.1 Sistemas modelo para interações moleculares

Biomoléculas como proteínas possuem alto peso molecular, o que, muitas vezes, dificulta o seu estudo detalhado tanto pela carência de informações a respeito de sua estrutura quanto pela dificuldade de interpretação de espectros obtidos por técnicas experimentais diversas. Frente a esta dificuldade passa-se ao estudo de sistemas modelo apropriados. Este estudo tem por finalidade obter, a partir da análise de sistemas simples, uma imagem clara do funcionamento de situações similares existentes na natureza.

As funções biológicas de algumas proteínas estão ligadas a sua estrutura tridimensional e a seu grupo prostético. Naquelas onde o grupo prostético é um sítio metálico, a função biológica está diretamente ligada ao metal ou metais que compõem o sítio, com as principais reações catalisadas pela enzima ocorrendo nesta região. Modelar sistemas deste tipo pode trazer informações a respeito do análogo na natureza. Atenção especial tem sido dada ao estudo por RME do íon Cu(II) por desempenhar funções relevantes em vários sistemas como aqueles descritos anteriormente. Além disso, a facilidade na obtenção de espectros de RME do cobre em temperatura ambiente é outro atrativo para seu estudo por esta técnica [6].

Ligações não-covalentes intermoleculares desempenham um papel importante na estrutura e função de macromoléculas biológicas. Pontes de hidrogênio, empilhamento de anéis aromáticos e interações cátion- π têm sido descritas como as mais importantes interações [2,7,8]. Caracterizar estas interações pode ser muito difícil, pois, sendo de pequena magnitude, tem o seu efeito misturado às interações covalentes que possuem um caráter mais forte. Além de fornecer *links* estruturais, as ligações conectando íons ou moléculas com spins $\vec{S}_i$ e $\vec{S}_j$ pode originar caminhos para interações de troca $\mathcal{H}_{\text{ex}} = -J_{ij}\vec{S}_i \cdot \vec{S}_j$ entre os spins desemparelhados. A magnitude J_{ij} desta interação está relacionada à geometria e à estrutura eletrônica da ligação. Portanto, sua determinação traz informações que colaboram na caracterização da estrutura. As magnitudes de interações de troca em biomoléculas permitem, por exemplo, estimar a taxa de transferência eletrônica entre os sítios metálicos [9].

Este trabalho está colocado dentro de uma linha de pesquisa que tem como objetivo principal o estudo das propriedades eletrônicas e das interações magnéticas em sistemas modelo de moléculas de interesse biológico [10,11]. Com o uso da técnica de RME, podemos estudar monocristais de complexos metálicos de aminoácidos, obtendo informações estruturais adicionais aos dados cristalográficos e sobre a configuração eletrônica desses compostos. Analisando os espectros obtidos, podemos analisar os efeitos das interações magnéticas através do mecanismo de estreitamento da largura de linha por supertroca e, com isto, estimar essas interações.

O poder da técnica de RME está em tirar informações do sistema de spins, medindo-se o valor da constante de intercâmbio. Tal capacidade só é possível devido à seletividade do processo de estreitamento da largura de linha. Isto permite medir a magnitude das interações de intercâmbio que acoplam um centro paramagnético com seus vizinhos não-equivalentes mais próximos dispostos na rede cristalina. Esta informação é relacionada com o tipo de conexão que existe entre um íon e seus pares. Como estas interações são, em geral, da ordem de 0,0005-0,5K, seria necessária a realização de experimentos por outras técnicas em temperaturas dessa ordem para que essas interações fossem medidas diretamente. Utilizando a técnica de RME em diferentes frequências podemos ter acesso a informações sobre tais interações realizando medidas em sistemas monocristalinos à temperatura ambiente.

As magnitudes dos acoplamentos de intercâmbio dependem dos caminhos eletrônicos que conectam os sítios metálicos. Assim, podemos relacionar a estrutura química com as interações magnéticas existentes em nível molecular. Nosso grupo tem contribuído de maneira significativa para mapear caminhos químicos e as respectivas magnitudes de acoplamento entre os íons cobre em vários compostos de cobre com dipeptídeos, aminoácidos e outros ligantes. Caminhos químicos responsáveis pela transmissão de interação de troca e que já foram estudados em nosso grupo podem se manifestar de muitas formas tais como: pontes de hidrogênio [8,11], pontes carboxilato [12], “contatos curtos”, *stacking* de anéis aromáticos [7], dentre outros. No presente texto, demos atenção especial aos compostos Cu(II)Ala-Phe e Cu(II)Gly-Trp, onde investigamos detalhadamente o papel de ligações de hidrogênio e interações cátion- π , respectivamente. A determinação da magnitude desta última interação havia sido feita pela primeira vez por nós para o composto Cu(II)Trp-Gly [8] e foi novamente determinada neste último artigo.

4.1.2 Caracterização de complexos de cobre com aplicações farmacológicas

Atualmente se sabe que um grande número de metais tem papel fundamental nos organismos vivos [13]. A carência ou excesso desses metais pode produzir desordens metabólicas, enfermidades e outras disfunções. Assim, se considera que todas as formas de se manter uma concentração ótima desses componentes, quer seja suplementando quando existe carência, quer seja removendo especificamente os que estejam em excesso, pode ter relevância do ponto de vista farmacológico. Com este objetivo, tem sido procurado um novo enfoque da Farmacologia através da Química Bioinorgânica, o que tem levado a um aumento considerável do número de compostos que podem ser utilizados com fármacos [14-16].

Nesses trabalhos, tem-se procurado continuar a busca por compostos de coordenação que sirvam para suplementação de elementos essenciais, tanto em medicina humana quanto veterinária. Além disso, aumentou-se a quantidade de compostos de diversos metais com atividade farmacológica bem definida. Muitos deles, devido a suas propriedades e modo de atuação, são atualmente usados como fármacos, por exemplo nas chamadas crisoterapias (tratamentos com complexos de Au), quimioterapias (tratamentos com complexos de Pt), terapias antiulcerosas (com compostos de Bi, Al) e quelatoterapias (eliminação de excesso de um dado metal) [15,16]. Há, ainda, número de grande de compostos metálicos em fase de experimentação.

Nos casos mencionados acima, os complexos têm a atividade desejada, que não é observada no ligante sozinho. Isto leva a pensar que a importância do ponto de vista farmacológico não se deve à presença do metal ou do ligante, mas sim que depende da estrutura e/ou das propriedades químicas das espécies que se formam entre eles. Por esta razão, os estudos de compostos bioinorgânicos farmacologicamente ativos são necessários para se obter conhecimento estrutural e químico completo de cada complexo, para, assim, tentar-se entender os mecanismos de ação e, eventualmente, obter novos compostos com melhor atividade.

Dentre os metais disponíveis para esse tipo de investigações, se sabe de algum tempo que o cobre, um dos elementos traço essenciais para organismos vivos, tem atraído a atenção de numerosos grupos de pesquisa. Este papel de protagonista se deve a vários fatores. Por um lado, o cobre tem grande importância biológica em diversos processos metabólicos (como exposto na seção anterior). Por outro lado, é um elemento que apresenta grande versatilidade de coordenação, permitindo que forme muitos compostos com propriedades distintas. Pelo exposto justificam-se as tentativas de se sintetizar complexos de cobre que possam desempenhar atividades farmacológicas determinadas. É importante, como dito antes, se conhecer a estrutura e as propriedades físico-químicas, pois delas depende geralmente o tipo de atividade. Este conhecimento é imprescindível para se entender os mecanismos de ação em nível molecular e seguir na busca por compostos que apresentem, por exemplo, melhor absorção, mais especificidade e menor toxicidade.

É neste contexto que se insere nossa colaboração com o grupo da Profa. Dra. María Torre. A combinação de especialidades dos dois grupos tem se mostrado bastante proveitosa e produtiva ao longo dos últimos anos com vários trabalhos acerca de complexos diversos de cobre desenvolvidos e em andamento, dentre eles: (1) estudos de compostos de cobre com ligantes sem atividade farmacológica, mas cujo complexo possui atividade. Aqui se incluem os complexos de cobre-dipeptídeos, com destaque para Cu(II)Ala-Phe que demonstrou boa atividade antiproliferativa frente a cultivos celulares, interação com DNA e boa atividade superóxido-dismutase. (2) Estudos de compostos de coordenação com ligantes que apresentam atividade farmacológica, incluindo-se

complexos com drogas antiinflamatórias e quimioterápicas. Entre os sucessos obtidos se destacam os casos de sistemas de cobre com sulfonamidas e quinoxalinas, estes últimos agentes para tratamento seletivo de tumores hipóxicos [17]. Nesta colaboração, cabe-nos caracterizar a estrutura de vários complexos de Cu(II) tanto na forma cristalina (determinando magnitude de constantes de acoplamento entre íon na rede e fazendo a correlação magneto-estrutural), quanto das amostras em solução.

4.2 Publicações geradas a partir desse trabalho

- Urquiola, C.; Gambino, D.; Cabrera, M.; Lavaggi, M. L.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Cerain, A. L.; Monge, A.; Costa-Filho, A. J.; Torre, M. H. "New copper-based complexes with quinoxaline N1,N4-dioxide derivatives, potential antitumoral agents". *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 102, p. 119-126 (2008).
- Ellena, J.; Kremer, E.; Facchin, G.; Báran, E.; Nascimento, O. R.; Costa-Filho, A. J.; Torre, M. H. "A new dimeric copper(II) complex with sulfameter: Synthesis, structure and spectroscopic characterization". *Polyhedron*, v. 26, p. 3277-3285 (2007).
- Facchin, G.; Kremer, E.; Baran, E. J.; Castellano, E. E.; Piro, O. E.; Ellena, J.; Costa-Filho, A. J.; Torre, M. H. "Structural characterization of a series of new Cu-dipeptide complexes in solid state and in solution". *Polyhedron*, v. 25, p. 2597-2604 (2006).
- Vieira, E. D.; Casado, N. M. C.; Facchin, G.; Torre, M. H.; Costa-Filho, A. J.; Calvo, R. "Weak exchange interaction supported by a biologically relevant long chemical bridge in a Cu-peptide model compound". *Inorganic Chemistry*, v. 45, p. 2942-2947 (2006).
- Torre, M. H.; Gambino, D.; Araujo, J.; Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M. L.; Azqueta, A.; de Cerain, A. L.; Vega, A. M.; Abram, U.; Costa-Filho, A. J. "Novel Cu(II) quinoxaline N¹,N⁴-dioxide complexes as selective hypoxic cytotoxins". *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, p. 473-480 (2005).
- Costa-Filho, A. J.; Nascimento, O. R.; Calvo, R. "Electron paramagnetic resonance study of weak exchange interactions between metal ions in a model system: Cu(II)Gly-Trp". *Journal of Physical Chemistry B*, v. 108, p. 9549-9555 (2004).
- Facchin, G.; Torre, M. H.; Kremer, E.; Baran, E.; Mombrú, A.; Pardo, H.; Araújo, M. P.; Batista, A. A.; Costa-Filho, A. J. "Cu(II) complexation with His-Gly and His-Ala. X-ray structure of [Cu(his-gly)₂(H₂O)₂].6H₂O". *Inorganica Chimica Acta*, v. 355, p. 408-413 (2003).

4.3 Referências Bibliográficas

- [1] Baran, J. E. *Química Bioinorgânica* Cap. 8, Mc Graw-Hill, Madrid (1998).
- [2] Viles, J. H.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; Goodin, D. B.; Wright, P. E.; Dyson, H. J. "Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, 2042-2047 (1999).
- [3] Curtain, C. C.; Ali, F.; Volitakis, I.; Cherny, R. A.; Norton, R. S.; Beyreuther, K.; Barrow, C. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I.; Barnham, K. J. "Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits". *Journal Biological Chemistry*, 273, 20466-20473 (2001).
- [4] Legname, G.; Nelken, P.; Guan, Z.; Kanyo, Z.F.; DeArmond, S.J.; Prusiner, S.B. "Prion and doppel proteins bind to granule cells of the cerebellum". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 16285-16290 (2002).
- [5] Hathaway, B. J.; Tomlinson, A. A. "Copper(II) Ammonia Complexes". *Coordination Chemistry Review*, 5, 1 (1970).
- [6] Boas, J. F.; Pilbrow, J. R.; Smith, T. D. "ESR os Copper in Biological Systems". In: *Biological Magnetic Resonance*, Eds: L.J. Berliner e J. Reuben, Vol. 1, 277-333 (1978).
- [7] Dougherty, D. A. "Cation- π interactions in chemistry and biology: A new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp". *Science*, 271, 263 (1996).
- [8] Costa-Filho, A. J.; Nascimento, O. R.; Ghivelder, L.; Calvo, R. "Magnetic properties of carboxylate-bridged ferromagnetic copper(II) chains coupled by cation- π interactions". *Journal of Physical Chemistry B*, 105, 5039 (2001).
- [9] Calvo, R.; Abresch, E.; Bittl, W.; Feher, G.; Hofbauer, W.; Isaacson, R. A.; Lubitz, W.; Okamura, M. Y.; Paddock, M. L. "EPR study of the molecular and electronic structure of the semiquinone biradical Q(A)(-center dot) Q(B)(-center dot) in photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*". *Journal of the American Chemical Society*, 122, 7327-7341 (2000).
- [10] Calvo, R.; Mesa, M. A. "Electron Paramagnetic Resonance Study of Electronic and Magnetic Properties of Bis(DL-Alpha-Amino-Butyrato) Copper(II) - A Layered Magnetic System". *Physical Review B*, 28, 1244-1248 (1983).
- [11] Gennaro, A. M.; Levstein, P. R.; Steren, C. A.; Calvo, R. "Electron Paramagnetic Resonance of Layered Magnetic Metal Aminoacid Salts . 2. $\text{Cu}(\text{L-Met})_2$ ". *Chemical Physics*, 120, 449-459 (1988).
- [12] Colacio, E.; Domingues-Vera, J.M.; Kivekäs, R.; Moreno, J.M.; Romerosa, A.; Ruix, J. "Structure and Magnetic Properties of a Syn-anti Carboxylate Bridged Linear Trinuclear Copper(II) Complex with Ferromagnetic Exchange Interaction". *Inorganica Chimica Acta*, 212, 115-121 (1993).
- [13] Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. "Structural and functional aspects of metal sites in biology". *Chemical Reviews*, 96, 2239-2314 (1996).
- [14] Weder, J. E.; Dillon, C. T.; Hambley, T. W.; Kennedy, B. J.; Lay, P. A.; Biffin, J. R.; Regtop, H. L.; Davies, N. M. "Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized". *Coordination Chemistry Reviews*, 232, 95-126 (2002).
- [15] Farrel, N. P. *Uses of Inorganic Chemistry in Medicine*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1999).
- [16] Farrell, N. P. *Transition metal complexes as drugs and chemoterapeutic agents*, Kluwer Academic Publishers Group, The Netherlands, 1989.
- [17] Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M. L.; Azqueta, A.; de Cerain, A. L.; Monge, A. "Phenazine 5,10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins". *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 21-23 (2005).