UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

DANILO BILCHES MEDINAS

Atividade Peroxidásica da Enzima Superóxido Dismutase 1 Humana:

Produção do Radical Carbonato, Dimerização Covalente da Enzima e Implicações para a Esclerose Lateral Amiotrófica.

São Paulo

Data do depósito na SPG
27/01/2010

DANILO BILCHES MEDINAS

Atividade Peroxidásica da Enzima Superóxido Dismutase 1 Humana:

Produção do Radical Carbonato, Dimerização Covalente da Enzima e Implicações para a Esclerose Lateral Amiotrófica.

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

Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra. Ohara Augusto

São Paulo

2010

Danilo Bilches Medinas

Atividade peroxidásica da enzima superóxido dismutase 1 humana: produção do radical carbonato, dimerização covalente da enzima e implicações para Esclerose Lateral Amiotrófica.

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Aos meus pais, Dalilo e Silvia, pelos ensinamentos que sempre irão nortear minha vida pessoal e profissional.

À Sandra, pelo amor e cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Ohara Augusto, pelo exemplo de profissionalismo, discussões científicas, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Joseph S. Beckman, pelos plasmídeos para expressão da hSod1 em bactéria.

Aos professores, Paolo Di Mascio, Luis Eduardo Soares Netto, Fabio Cesar Gozzo, Etelvino José Henriques Bechara, Shaker Chuck Farah, Alícia Juliana Kowaltowski, Marisa H. G. Medeiros, Maria Terêsa M. de Miranda, Sayuri Miyamoto e Antônia Tavares do Amaral, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e para meu amadurecimento científico.

À Sandra, pelas discussões científicas, incentivo e companheirismo que fizeram este trabalho muito melhor.

Aos colegas de laboratório, Berê, Edlaine, Rita, Leonora, Daniel Trindade, Daniel Rettori, Renata, Giselle, Toledo, Raphael, Ana Paula, Natália, Luciana, Alberto, Janaína pela boa convivência e apoio nestes anos.

Aos técnicos e colegas de outros laboratórios, Osmar, Fernanda, Isaura, Camile, Cleber, Leandro, Bruno, Gisele Monteiro, Marilene, Gustavo, Luiz Fernando, Amadeu, Camila, Alexandre, Graziella, Erich, Fabio, Joana e Júlio, pela ajuda em vários experimentos e empréstimo de materiais.

Aos amigos, Adriano, Lívea, Lizandra e Denise pelos conselhos, torcida e momentos alegres.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

“Só existem dois dias no ano em que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã. Portanto, hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e, principalmente, viver”

Dalai Lama

RESUMO

Medinas, D.B. **Atividade peroxidásica da enzima superóxido dismutase 1 humana: produção do radical carbonato, dimerização covalente da enzima e implicações para Esclerose Lateral Amiotrófica.** 2010. 95p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa que afeta os neurônios motores levando a atrofia muscular e morte por insuficiência respiratória. Esta patologia se manifesta de forma esporádica ou familiar, que são indistinguíveis clinicamente. Mutações na enzima antioxidante superóxido dismutase 1 (hSod1) respondem por aproximadamente 20% dos casos familiares de ELA. Além disso, o caráter autossômico dominante destas mutações revela que a hSod1 adquire propriedades tóxicas aos neurônios motores. Atualmente, duas hipóteses não mutuamente excludentes existem para explicar o caráter tóxico das mutantes da hSod1 relacionadas à ELA. A primeira refere-se à produção de oxidantes pela atividade peroxidásica exacerbada das mutantes contribuindo para o estresse oxidativo observado em ELA. A segunda refere-se à agregação de proteínas como ocorre em outras doenças neurodegenerativas. Digno de nota, o radical carbonato produzido na atividade peroxidásica da hSod1 causa a formação de um dímero covalente da proteína análogo a uma espécie de hSod1 frequentemente detectada em modelos experimentais e pacientes da doença e associada à propriedade tóxica das mutantes. Desta forma, o presente trabalho buscou esclarecer o mecanismo de produção do radical carbonato pela hSod1, bem como caracterizar o dímero covalente da proteína para posterior estudo de sua formação em um modelo de ELA em ratos que superexpressam a mutante G93A da hSod1. Os estudos cinéticos da variação do pH sobre os efeitos de bicarbonato/CO_2, nitrito e formato na atividade peroxidásica da hSod1, medidos pelo consumo de peróxido de hidrogênio e produção de radical, permitiram excluir o mecanismo de Fenton para explicar o ciclo peroxidativo da enzima em tampão bicarbonato em favor de outros intermediários reativos. Já, os experimentos de ^{13}C RMN, modelagem molecular e cinética de fluxo interrompido com mistura assimétrica demonstraram que o

ânion peroxomonocarbonato constitui o precursor do radical carbonato produzido pela hSod1. A caracterização do dímero covalente da hSod1 por proteólise com tripsina seguida de análise por HPLC/UV-vis e HPLC/ESI-MS identificou um peptídeo característico do dímero covalente da hSod1. A digestão enzimática em $H_2{}^{18}O$ demonstrou de forma inequívoca a natureza dímerica deste peptídeo pela marcação da extremidade C-terminal. Ainda, o sequenciamento do peptídeo dimérico por MS/MS revelou a estrutura primária ESNGPVKV**W**(ESNGPVKV**W**GSIK)GSIK, na qual as cadeias polipeptídicas estão ligadas através de um aduto de ditriptofano composto por resíduos Trp^{32} da proteína. Por fim, este peptídeo dimérico pode ser empregado como marcador bioquímico específico para o estudo do dímero covalente da hSod1 *in vivo*. A análise do extrato de proteínas das medulas dos ratos modelo de ELA identificou quinze candidatos a dímero covalente da hSod1 por Western-blot, sendo que dois deles foram excluídos por espectrometria de massa, pois tiveram o resíduo Trp^{32} identificado. O peptídeo ESNGPVKV**W**(ESNGPVKV**W**GSIK)GSIK não foi observado, porém as treze espécies restantes permanecem candidatas e deverão ser reexaminadas em trabalhos que darão sequência a esta tese de doutorado. Em suma, o peroxomonocarbonato constitui o intermediário na produção do radical carbonato pela hSod1 e o peptídeo ESNGPVKV**W**(ESNGPVKV**W**GSIK)GSIK uma ferramenta importante no estudo da agregação covalente da hSod1 em ELA.

Palavras-chave: esclerose lateral amiotrófica, superóxido dismutase 1, atividade peroxidásica, radical carbonato, ditriptofano.

ABSTRACT

Medinas, D.B. **Peroxidase activity of human superoxide dismutase 1: production of the carbonate radical, covalent dimerization of the enzyme, and implications to Amyotrophic Lateral Sclerosis.** 2010. 95p. PhD Thesis. Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease of motors neurons that causes muscle atrophy, weakness, and death by respiratory failure. This pathology occurs in both sporadic and familiar forms that are clinically indistinguishable. Mutations in the antioxidant enzyme superoxide dismutase 1 (hSod1) respond to about 20% of the familiar cases of ALS. Besides, the autosomal dominant nature of these hSod1-associated ALS suggests that the mutants gain toxic properties to motor neurons. Currently, two hypotheses exist to explain the toxicity of hSod1 mutants but they do not exclude each other. The first one is related to the production of oxidants by the increased peroxidase activity of the ALS-linked mutants that could contribute to the oxidative stress reported in ALS. The second refers to protein aggregation as proposed in other neurodegenerative diseases. Noteworthy, the carbonate radical produced during hSod1 peroxidase activity leads to the formation of a covalent dimer of the protein similar to a hSod1 species often detected in experimental models and patients of the disease and implicated in the toxic properties of hSod1 mutants. Thus, the present work aimed to determine the mechanism of carbonate radical production by hSod1 and to characterize the covalent dimer of the protein *in vitro* followed by the study of covalent aggregates of hSod1 in a rat model of ALS that overexpresses the G93A mutant of the protein. The kinetic studies of the effect of bicarbonate/CO_2, nitrite and formate in the peroxidase activity of hSod1 at various pH, measured by hydrogen peroxide consumption and radical production, permitted to exclude the Fenton mechanism to explain the enzyme peroxidative cycle in bicarbonate buffer in favor of other reactive intermediates. Furthermore, ^{13}C NMR, molecular docking and stopped-flow experiments with asymmetric mixing demonstrated that the anion peroxomonocarbonate is the precursor of the carbonate radical

produced by hSod1. The characterization of hSod1 covalent dimer by proteolysis with trypsin followed by HPLC/UV-vis and HPLC/ESI-MS analysis identified a peptide characteristic of the covalent dimer of the protein. The enzymatic digestion in $H_2{}^{18}O$ irrefutably demonstrated the dimeric nature of this peptide because of the C-terminal labeling with oxygen-18 isotopes. In addition, sequencing of the dimeric peptide by MS/MS determined the primary structure ESNGPVKV**W**(ESNGPVKV**W**GSIK)GSIK, in which the polipeptide chains are crosslinked through a ditryptophan adduct formed by a covalent bond between the Trp^{32} residues of each subunit. So, this dimeric peptide can be employed as a biochemical marker for studying the hSod1 covalent dimer *in vivo*. The analysis of protein extracts from the spinal cord of the rat model of ALS by Western-blot identified fifteen candidates to hSod1 covalent dimer, but two of them were excluded by mass spectrometry analysis that identified unmodified Trp^{32} residues. Moreover, neither the dimeric peptide nor the Trp^{32} residue were observed in the remaining species. Therefore, these thirteen candidates must be reexamined in subsequent studies. In conclusion, the anion peroxomonocarbonate is the key intermediate in the production of the carbonate radical by hSod1 and the dimeric peptide constitutes a specific tool to study hSod1 covalent aggregation in ALS.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, superoxide dismutase 1, peroxidase activity, carbonate radical, ditryptophan.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ERO	espécies reativas de oxigênio
ERN	espécies reativas de nitrogênio
Sod1	superóxido dismutase 1[1]
CCS	chaperona de cobre para a Sod1 (do inglês, "copper chaperone for Sod1")
ELA	esclerose lateral amiotrófica
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
DTPA	ácido dietilenotriaminopentaacético
DTT	ditiotreitol
DHR	dihidrorodamina
DMPO	5,5'-dimetil-1-pirrolina N-óxido
EPR	sigla em inglês para ressonância paramagnética eletrônica
RMN	ressonância magnética nuclear

[1] As letras "h", "b" e "r", colocadas antes de Sod1, denotam proteína humana, bovina e de rato, respectivamente.

INDÍCE

1 **Introdução** ---------- 14

1.1 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em biologia ---------- 14

1.2 Espécies reativas derivadas do tampão bicarbonato ---------- 17

1.3 Superóxido dismutase 1 ---------- 18

1.4 Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) ---------- 20

2 **Objetivos** ---------- 25

3 **Materiais e Métodos** ---------- 26

3.1 Materiais ---------- 26

3.2 Purificação da hSod1 de eritrócitos humanos ---------- 27

3.3 Expressão da hSod1 recombinante em bactérias ---------- 28

3.4 Purificação da hSod1 recombinante ---------- 29

3.5 Dosagem de proteínas ---------- 30

3.6 Preparação da Apo-Sod1 e da Zn,ZnSod1 ---------- 30

3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida ---------- 30

3.8 Determinação do teor de metais da Sod1 ---------- 31

3.9 Atividade superóxido dismutase da Sod1 ---------- 31

3.10 Atividade peroxidásica da Sod1 ---------- 32

3.11 Consumo de peróxido de hidrogênio ---------- 32

3.12 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (^{13}C RMN) ---------- 33

3.13 Espectroscopia de dicroísmo circular ---------- 34

3.14 Modelagem Molecular ---------- 34

3.15 Estudo cinético por fluxo interrompido ---------- 35

3.16 Cálculos e simulações cinéticas ---------- 36

3.17 Genotipagem dos ratos transgênicos modelo de ELA ---------- 36

3.18 Sintomas de esclerose lateral amiotrófica e eutanásia de animais ---------- 37

3.19 Preparação de extrato de proteínas das medulas e enriquecimento das proteínas de peso molecular na faixa de 40 a 60 kDa imunoreativas ao anticorpo contra a hSod1 ---------- 38

3.20 Eletroforese bidimensional ---------- 39

3.21 Preparação e purificação do dímero covalente da hSod1 ---------- 40

3.22 Digestão da hSod1 com tripsina e análise dos peptídeos por HPLC/UV-vis e HPLC/ESI-MS ---------- 41

3.23 Digestão *in gel* de proteínas com tripsina ---------- 42

3.24 Análise dos hidrolisados da hSod1 por UPLC/Q-Tof-MS/MS e identificação da proteína por ferramentas de proteômica ---------- 43

4 **Resultados** ---------- 44

4.1 Expressão e purificação da superóxido dismutase 1 humana recombinante ---------- 44

4.2 Conteúdo de metais, atividade superóxido dismutase e atividade peroxidásica dependente de bicarbonato da hSod1 recombinante ---------- 47

4.3 Mecanismo de produção do radical carbonato pela atividade peroxidásica da hSod1 -------- 49

4.4 Consumo de peróxido de hidrogênio e oxidação de nitrito, formato e bicarbonato/dióxido de carbono pela hSod1 ---------- 51

4.5 Interação do peroxomonocarbonato com a Sod1 ---------- 56

4.6 Reação do peroxomonocarbonato com a hSod1 ---------- 60

4.7 Simulação cinética da atividade peroxidásica da hSod1 ---------- 62

4.8 Análise das formas de hSod1 presentes nas medulas de ratos transgênicos modelo de ELA que superexpressam a proteína mutante G93A ---------- 63

4.9 Obtenção e purificação do dímero covalente da hSod1 produzido durante a atividade peroxidásica da enzima ---------- 68

4.10 Análise dos peptídeos trípticos da hSod1 por HPLC/UV-vis e HPLC/ESI-MS ---------- 69

4.11 Marcação do C-terminal dos peptídeos trípticos da hSod1 pela digestão da proteína em meio de água marcada com o isótopo de oxigênio-18 ($H_2{}^{18}O$) ---------- 71

4.12 Análise do peptídeo tríptico dimérico por Q-Tof-MS/MS para determinação de sua sequência ---------- 73

4.13 Enriquecimento e análise por espectrometria de massa das proteínas de peso molecular na faixa de 40 a 60 kDa imunoreativas ao anticorpo contra a hSod1 ---------- 76

5 **Discussão** ---------- 81

5.1 Mecanismo de produção do radical carbonato pela atividade peroxidásica da Sod1 -------- 81

5.2 Caracterização do dímero covalente da hSod1 produzido durante a atividade peroxidásica da enzima ---------- 83

5.3 Enriquecimento e análise por espectrometria de massa das proteínas de peso molecular na faixa de 40 a 60 kDa imunoreativas ao anticorpo contra a hSod1 ---------- 85

6 **Conclusões** ---------- 87

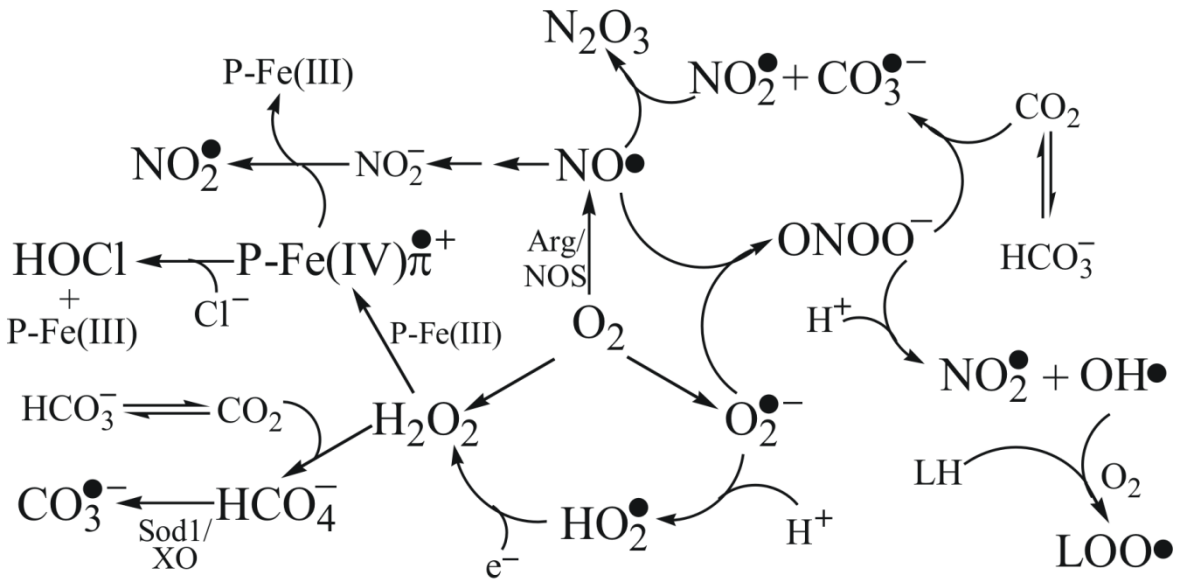
7 **Referências** ---------- 88

Súmula Currícular ---------- 96

1 Introdução

1.1 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em biologia

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) constitui uma característica intrínseca ao metabolismo aeróbico e pode ser deletéria aos organismos devido à oxidação de biomoléculas tais como o ácido desoxirribonucléico (ADN), proteínas e lipídeos levando, por exemplo, a mutações genéticas, disfunção e agregação de proteínas e comprometimento de membranas biológicas, respectivamente (Halliwell & Gutteridge, 2007). Como sugere sua pluralidade, o termo ERO não constitui uma espécie única, mas sim várias espécies com diferente reatividade química frente às biomoléculas e difusão no meio biológico (Esquema 1). Portanto, a compreensão do efeito biológico da produção de ERO deve levar em consideração as características peculiares de cada espécie envolvida (Winterbourn, 2008).



Esquema 1. Natureza e reações de espécies reativas de oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN) e derivadas do tampão bicarbonato implicadas em patofisiologia. As equações não foram balanceadas e algumas etapas e intermediários foram omitidos para clareza da visualização. Sod1, XO, P-Fe(III) significam superóxido dismutase 1, xantina oxidase e heme-peroxidases, respectivamente.

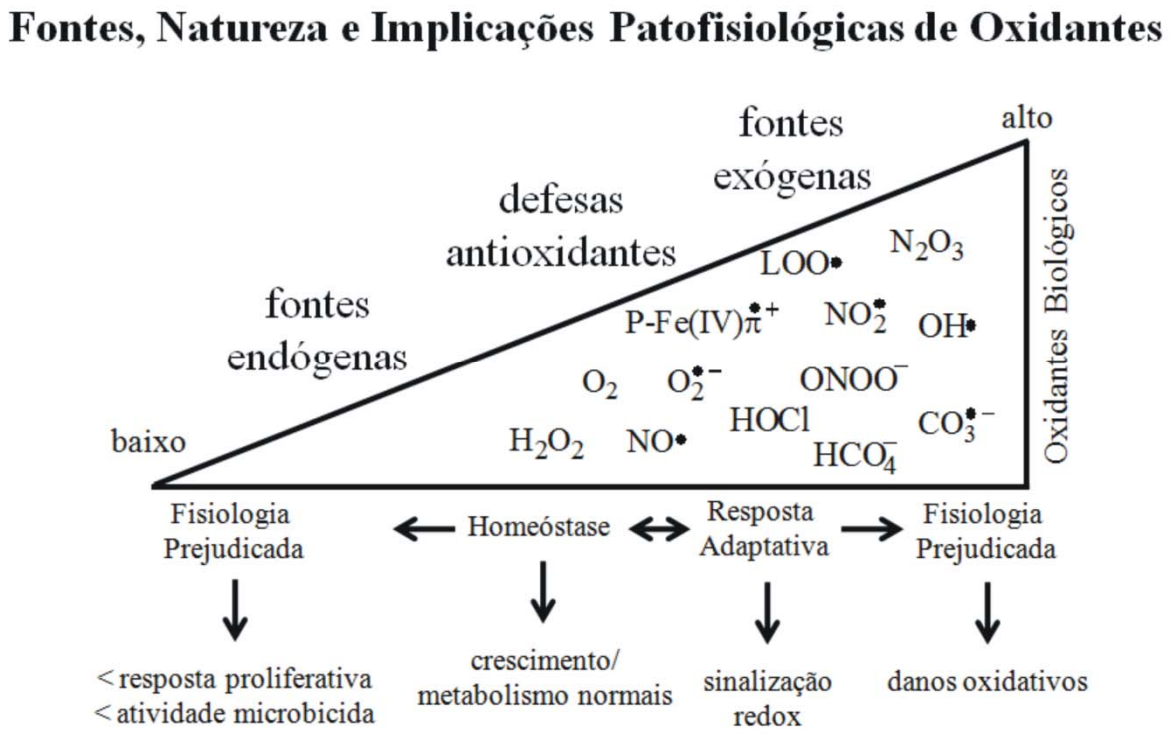
Em função da toxicidade associada às ERO, houve uma pressão evolutiva para prevenir a produção destas espécies reativas durante o metabolismo energético tais como a montagem

do complexo IV da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, que catalisa a redução do oxigênio à água num processo envolvendo a transferência de quatro elétrons sem a liberação de intermediários reativos (Halliwell & Gutteridge, 2007). Ainda, os metais de transição que constituem cofatores essenciais para proteínas também podem catalisar a produção de ERO, estando sujeitos a rígida regulação por proteínas específicas responsáveis por seu transporte e armazenamento, como a ferritina e ceruloplasmina para ferro e cobre, respectivamente (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Todavia, a inevitabilidade da produção de ERO levou a evolução de um complexo sistema antioxidante composto por enzimas específicas e de compostos de baixo peso molecular e também de sistemas de reparo de biomoléculas. O intrincado balanço entre a produção de ERO e sua eliminação pelo sistema antioxidante garante a homeóstase. Já, a situação em que ocorre produção excessiva de ERO ou deficiência de antioxidantes pode causar injúria a células e tecidos e denomina-se estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2007). De fato, inúmeras doenças estão associadas ao estresse oxidativo, tais como diabetes, aterosclerose e doenças neurodegenerativas, embora a relação de causa e consequência para tais não esteja bem definida (Brownlee, 2001; Victor *et al.*, 2009; Farooqui & Farooqui, 2009).

A visão clássica de ERO em biologia se traduz no conceito de estresse oxidativo e seu caráter patológico. Atualmente, esta idéia se encontra ultrapassada porque tem sido demonstrado que ERO também desempenham papéis fisiológicos (Janssen-Heininger *et al.*, 2008) (Esquema 2). Historicamente, a descoberta da produção do óxido nítrico em mamíferos fundamentou a concepção de sinalização redox (Stamler, 1994). O óxido nítrico *per se* constitui um radical livre pouco reativo e capaz de se difundir por membranas biológicas (Lancaster, 1997). Estas características permitiram sua seleção como mediador na sinalização

celular quando produzido de forma constitutiva pelas enzimas óxido nítrico sintase endotelial e neuronal (eNOS e nNOS, do inglês) em concentrações na faixa de nanomolar (nM).



Esquema 2. Os múltiplos papéis desempenhados por oxidantes em biologia de acordo com sua natureza química.

Não obstante, o óxido nítrico também compõe a linha de defesa inata do sistema imune sendo produzido de forma induzível pela enzima óxido nítrico induzível (iNOS, do inglês) em concentrações na faixa de micromolar (µM) (Bredt, 1999). Nestas circunstâncias, o óxido nítrico pode reagir com espécies reativas de oxigênio produzidas concomitantemente pela enzima NADPH oxidase gerando oxidantes potentes, determinados espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Esquema 1) (Augusto *et al.*, 2002). Desta maneira, a produção de ERO e ERN em altas concentrações constitui um mecanismo citotóxico capaz de combater patógenos invasores, em linha com o papel clássico de espécies oxidantes.

Assim como o óxido nítrico pode atuar como agente citotóxico ou participar na sinalização celular, o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio, espécies classificadas como ERO, além de poderem dar origem a espécies altamente oxidantes e deletérias aos

organismos em situações de estresse oxidativo, também podem ser produzidos de maneira controlada em diversos tecidos e compartimentos celulares via NADPH oxidase e contribuir na manutenção da homeóstase (Lambeth, 2004). Por exemplo, o ânion superóxido parece desempenhar papel importante na formação da memória devido ao seu efeito na plasticidade sináptica de neurônios do hipocampo (Kishida *et al.*, 2006; Kishida & Klann, 2007). Portanto, as ditas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ERO e ERN, desempenham múltiplas funções patofisiológicas e compõe um quadro biológico mais complexo do que anteriormente pensado (Esquema 2).

1.2 Espécies reativas derivadas do tampão bicarbonato

Apesar da proposta da produção do radical carbonato durante a oxidação de acetaldeído pela enzima xantina oxidase na década de 1970 (Hodgson & Fridovich, 1976), a participação do tampão bicarbonato na bioquímica de oxidantes foi pouco explorada até a década de 1990 (Nakano & Sugioka, 1977; Michelson & Durosay, 1977; Berlett *et al.*, 1990).

Atualmente, diversas linhas de evidência suportam o envolvimento de espécies reativas derivadas do tampão bicarbonato em oxidações biológicas (Medinas *et al.*, 2007). Alguns trabalhos descreveram o efeito protetor de isoenzimas da anidrase carbônica em condições de estresse oxidativo (Götz *et al.*, 1999; Räisänen *et al.*, 1999; Zimmerman *et al.*, 2004). Contudo, foi a demonstração direta da produção do radical carbonato na reação entre peroxinitrito e dióxido de carbono que consolidou o papel do tampão bicarbonato em condições patológicas (Bonini *et al.*, 1999) e forneceu subsídios para a demonstração da produção enzimática deste oxidante pela Sod1 e xantina oxidase (Zhang *et al.*, 2000; Bonini *et al.*, 2004) (Esquema 1). Ainda, o ânion peroxomonocarbonato, espécie que existe em equilíbrio com o peróxido de hidrogênio em presença de bicarbonato, surgiu como importante oxidante por mecanismo de dois elétrons e provável precursor do radical carbonato nos

sistemas enzimáticos mencionados (Richardson *et al.*, 2000 e 2003; Trindade *et al.*, 2006; Augusto *et al.*, 2002; Elam *et al.*, 2003) (Esquema 1).

Desta forma, a inclusão das espécies reativas derivadas do tampão bicarbonato no contexto de oxidantes biológicos torna-se essencial para a plena compreensão de condições patológicas associadas ao estresse oxidativo (Medinas *et al.*, 2007).

1.3 Superóxido dismutase 1

Em 1969, McCord & Fridovich descobriram a capacidade da eritrocuproína de catalisar o desproporcionamento do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Equações 1 e 2) (McCord & Fridovich, 1969).

$$\text{SodCu(II)} + O_2^{\bullet -} \longrightarrow \text{SodCu(I)} + O_2 \quad \text{(Eq.1)}$$

$$\text{SodCu(I)} + O_2^{\bullet -} + 2\,H^+ \longrightarrow \text{SodCu(II)} + H_2O_2 \quad \text{(Eq.2)}$$

Até então, a eritrocuproína, extraída de eritrócitos, bem como suas correlatas provenientes de outros tecidos, eram consideradas simplesmente proteínas para o armazenamento de cobre. A partir do trabalho de McCord e Fridovich, a atividade enzimática da superóxido dismutase1 (também conhecida como superóxido dismutase de cobre e zinco) foi determinada em diferentes tecidos bem como outras enzimas antioxidantes foram descobertas, constituindo a base para a concepção da área de radicais livres e oxidantes em biologia (Fridovich, 1999).

A superóxido dismutase 1 (Sod1) é composta por duas subunidades idênticas de 16 kDa formando um homodímero através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Valentine *et al.*, 2005). Além disso, cada subunidade da Sod1 contém um íon de cobre, um de zinco e uma ligação dissulfeto intramolecular (Figura 1). O íon de zinco e a ligação dissulfeto desempenham um importante papel estrutural na manutenção da conformação de alças da proteína que compreendem o canal iônico do sítio ativo e também da interface entre

as subunidades. O íon de cobre constitui o elemento catalítico responsável pelas reações de oxidorredução de desproporcionamento do radical superóxido (Equações 1 e 2). Ainda, as reações de desproporcionamento catalisadas pela Sod1 são muito eficientes, pois possuem constantes de velocidade de segunda ordem ~ 10^9 $M^{-1}s^{-1}$, isto é, próximas do limite de difusão das espécies (Valentine *et al.*, 2005; Halliwell & Gutteridge, 2007).

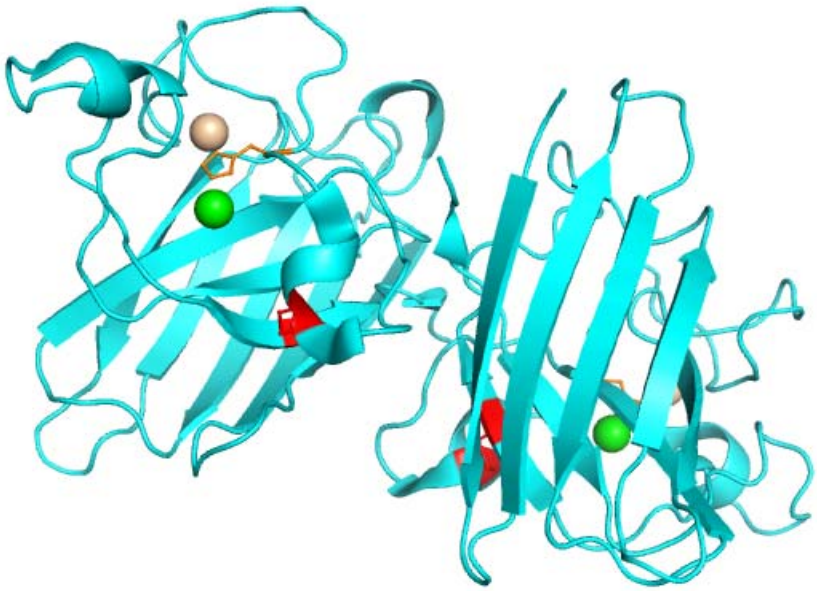


Figura 1. Estrutura cristalina da superoxido dismutase 1 humana (Strange *et al.*, 2006). Os íons de cobre e zinco estão representados em verde e cinza, respectivamente. A ligação dissulfeto entre os resíduos Cys^{57} e Cys^{146} está representada em vermelho e o resíduo His^{63}, que coordena tanto o íon de cobre como o de zinco, em laranja.

O processamento pós-traducional da Sod1 envolve diversas etapas. A inserção do íon de cobre e a formação da ligação dissulfeto são assistidas pela chaperona de cobre para a Sod1 (CCS, do inglês) (Culotta *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2000; Furukawa *et al.*, 2004). Contudo, a inserção do íon de zinco deve ocorrer previamente ao processamento pela CCS, mas esta etapa primordial permanece desconhecida (Furukawa & O'Halloran, 2006). Após seu processamento pós-traducional, isto é, inserção dos íons de zinco e cobre e formação da ligação dissulfeto, a Sod1 apresenta elevada estabilidade estrutural, sendo resistente a ataque proteolítico, aquecimento (T_m = 95°C) e agentes desnaturantes como uréia, cloreto de guanidina (Gua-HCl) e dodecilsulfato de sódio (SDS) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A Sod1 se distribui predominantemente no citoplasma, mas também se encontra no núcleo, peroxissomo e espaço entre membranas da mitocôndria (Valentine *et al.*, 2005). Em vista do seu complexo processamento pós-traducional e de sua ampla distribuição intracelular, não surpreende o fato de parte da Sod1 apresentar-se imatura, ou seja, desprovida dos cofatores metálicos e da ligação dissulfeto (Petrovic *et al.*, 1996). De fato, sabe-se que a Sod1 é importada para o espaço entre membranas da mitocôndria na sua forma imatura enquanto seu papel neste compartimento permanece desconhecido (Field *et al.*, 2003; Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001; Sturtz *et al.*, 2001; Iñarrea *et al.*, 2005). Por fim, além de apresentar alta eficiência catalítica, a Sod1 também é uma proteína muito abundante, perfazendo aproximadamente 0,5% da proteína total em alguns tecidos, como a substância cinza do cérebro (Halliwell & Gutteridge, 2007).

1.4 Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa que acomete os neurônios motores do córtex, tronco cerebral e medula espinhal. Tipicamente, a ELA tem início na idade adulta e acarreta fraqueza, atrofia e contratura muscular, culminando com paralisia e morte por insuficiência respiratória dentro de 3 a 5 anos. Em geral, a ELA não compromete a capacidade cognitiva dos pacientes devido à perda seletiva dos neurônios motores (Bruijn *et al.*, 2004; Valentine *et al.*, 2005).

Com uma incidência de 1 a 2,5/100.000, a ELA é a doença mais comum envolvendo a degeneração de neurônios motores (Logroscino *et al.*, 2005), enquanto suas causas são desconhecidas. Infelizmente, ainda não existem cura nem terapias efetivas para conter os sintomas. A ELA ocorre tanto na forma esporádica, responsável por 90 a 95% dos casos, quanto familiar. Dentre os casos familiares, aproximadamente 20% estão relacionados a mutações no gene *sod1* que codifica a enzima antioxidante superóxido dismutase 1 (Sod1)

descrita acima (Rosen *et al.*, 1993; Valentine *et al.*, 2005). Em sua maioria, tais mutações levam a simples substituições de resíduos de aminoácidos que podem ocorrer em todas as regiões estruturais da proteína, podendo ainda causar inserções, deleções e truncamentos. Até o presente momento, mais de 100 mutações relacionadas à ELA foram identificadas (a lista atualizada pode ser encontrada no site www.alsod.org).

Apesar de muitas mutações levarem a redução ou perda de atividade enzimática da hSod1, o caráter autossômico dominante da ELA nestes casos sugere um ganho de propriedade tóxica das proteínas mutantes como possível causa da doença (Andersen, 2006). Ainda, a ausência de degeneração dos neurônios motores em camundongos com deleção para o gene *sod1* associada ao fato de camundongos transgênicos expressando mutantes da hSod1 sofrerem degeneração dos neurônios motores e desenvolvimento de sintomas típicos de ELA corrobora a toxicidade das mutantes da hSod1 relacionadas à doença (Reaume *et al.*,1996; Gurney *et al.*, 1994). Contudo, a natureza tóxica das mutantes da hSod1, bem como a razão para a morte seletiva dos neurônios motores em ELA, permanece em questão.

Digno de nota, a degeneração dos neurônios motores em ELA também depende da disfunção de astrócitos e da microglia, células do sistema nervoso responsáveis pelo fornecimento de nutrientes e reciclagem de neurotransmissores dos neurônios e pela defesa contra invasores, respectivamente (Ilieva *et al.*, 2009). De acordo com esta perspectiva, diversos eventos citotóxicos parecem contribuir para o quadro patogênico de ELA, como deficiência de fatores de crescimento, excitotoxicidade por glutamato, agregação de proteínas, defeito do transporte no axônio, inibição do proteassomo, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (Cozzolino *et al.*, 2008; Rothstein, 2009). Ainda, alguns destes fatores estão diretamente relacionados aos mecanismos moleculares propostos para explicar a toxicidade das mutantes da hSod1 e devem constituir o cerne do processo neurodegenerativo. As duas hipóteses associadas à toxicidade das mutantes da hSod1 em ELA não são mutuamente

excludentes e conciliam diferentes mecanismos citotóxicos que compõe o quadro patogênico da doença.

A primeira possibilidade está intimamente ligada à capacidade catalítica da enzima. Enquanto sua atividade enzimática em condições fisiológicas está atada à manutenção da homeóstase celular pela eliminação do radical superóxido, em condições de estresse oxidativo a hSod1 pode catalisar a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Basicamente, além de superóxido dismutase, a hSod1 pode também atuar como peroxinitrito sintase, tiol oxidase e peroxidase (Beckman *et al.*, 2001; Winternbourn *et al.*, 2002; Wiedau-Pazos *et al.*, 1996). De fato, as evidências do envolvimento do estresse oxidativo na patologia de ELA são contundentes, destacando-se a presença de produtos de oxidação a biomoléculas tais como 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) no DNA (Ferrante *et al.*, 1997), 4-hidroxi-2-trans-nonenal (HNE) em lipídeos (Zarkovic, 2003), 3-nitrotirosina e carbonilas em proteínas (Beal *et al.*, 1997; Shaw *et al.*, 1995), além de níveis diminuídos de glutationa reduzida (GSH) (Lanius *et al.*, 1993).

A segunda hipótese considera o enovelamento inadequado da hSod1 levando ao acúmulo de hSod1 imatura potencialmente citotóxica e susceptível à agregação. Conforme discutido anteriormente, o processamento pós-traducional da hSod1 envolve a chaperona do cobre para a Sod1 (CCS, do inglês) nas etapas de inserção do íon de cobre e formação da ligação dissulfeto (Culotta *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2000; Furukawa *et al.*, 2004). Não obstante, a ação da chaperona CCS sobre a hSod1 depende da inserção prévia do íon de zinco na enzima seguida do reconhecimento molecular das proteínas através da formação de um heterodímero CCS-Sod1 análogo ao homodímero da própria Sod1 (Furukawa & O'Halloran, 2006). Neste contexto, alguns estudos demonstraram *in vitro* que algumas mutantes da hSod1 possuem menor afinidade pelo íon de zinco (Crow *et al.*, 1997), fato que pode comprometer seu enovelamento *in vivo*.

Embora os agregados protéicos sejam uma característica marcante em ELA (Cleveland & Liu, 2000), a agregação da hSod1 *per se* não parece ser a causa primária de sua neurotoxicidade (Johnston *et al.*, 2000). Assim, a compreensão do papel de inclusões protéicas contendo hSod1 na patologia de ELA necessita de esclarecimento tanto em relação à natureza das proteínas envolvidas no processo quanto aos mecanismos moleculares de agregação.

Chou *et al.* descreveram que aglomerados de neurofilamentos contendo tanto a hSod1 quanto a enzima óxido nítrico sintase apresentaram marcação positiva para 3-nitrotirosina (Chou *et al.*, 1996). Já, Andrus *et al.* observaram carbonilas protéicas elevadas na mutante G93A da hSod1 expressa em modelo de camundongo (Andrus *et al.*, 1998). De fato, danos oxidativos podem participar do processo de agregação protéica seja pela formação de ligações covalentes entre cadeias polipeptídicas ("crosslinking", do inglês) ou pela ruptura da estrutura terciária de proteínas, ocasionando a exposição de resíduos hidrofóbicos e interações proteína-proteína inespecíficas. Em vista disso, os agregados protéicos observados em ELA podem ser resultado das atividades oxidantes exacerbadas das enzimas mutantes (Roe *et al.*, 2002) que acarretariam modificações oxidativas em diferentes proteínas, dentre as quais, a própria hSod1.

Em cultura de células, a toxicidade da mutante G93A da hSod1 foi associada à oxidação do único resíduo de triptofano da proteína (Taylor *et al.*, 2007). *In vitro*, Zhang *et al.* mostraram que a oxidação do resíduo de triptofano da hSod1 pelo radical carbonato produzido durante sua atividade peroxidásica leva à formação de um dímero covalente da proteína resistente a redutores de ligação dissulfeto (Zhang *et al.*, 2003). Digno de nota, Gruzman *et al.* relataram a detecção de um possível dímero covalente da hSod1 resistente a redutores de ligação dissulfeto em pacientes esporádicos e familiares de ELA, mas não em pacientes de

outras doenças neurodegenerativas, e sugerem que esta espécie possa responder por sua toxicidade aos neurônios motores (Gruzman *et al.*, 2007).

2 Objetivos

Em virtude do potencial papel da atividade peroxídásica da hSod1 na patologia de esclerose lateral amiotrófica (ELA), o presente trabalho possui três objetivos correlacionados que contribuirão para o entendimento dos eventos moleculares possivelmente implicados no ganho de função tóxica das respectivas mutantes.

O primeiro objetivo foi esclarecer o mecanismo de produção do radical carbonato pela atividade peroxidásica da hSod1, haja vista a relevância desta espécie no ciclo peroxidativo da enzima em condições fisiológicas, isto é, na presença do tampão bicarbonato. O segundo objetivo foi caracterizar o dímero covalente da hSod1 proveniente do ataque do radical carbonato no resíduo Trp^{32} durante a atividade peroxidásica da enzima *in vitro* e definir um marcador bioquímico para investigar a participação deste dímero covalente na agregação da hSod1 em ELA. O terceiro objetivo foi verificar a formação do dímero covalente da hSod1 nas medulas dos ratos transgênicos modelo de ELA que superexpressam a mutante G93A da proteína.

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Meio de cultura Luria Broth (meio LB), isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), endonuclease (Benzonase), desoxirribonuclease (DNase), proteinase K, citocromo *c*, catalase, peroxidase de raiz forte (HRP), xantina oxidase, xantina, 4-(2-Piridilazo)resorcinol (PAR), óxido de deutério (D_2O, 99,9%), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), ditiotreitol (DTT), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), ácido (N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]) (HEPES), bicarbonato de sódio, nitrito de sódio, 5,5'-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO), peróxido de hidrogênio, 4-hidroxi-2,2,6,6-tetra-metil-piperidiniloxila (Tempol), dihidrorodamina (DHR), bis-acrilamida, fenilmetanosulfonilflúor (PMSF), Coomassie brilliant blue e resina Chelex-100 foram obtidos da Sigma. Acetona, ácido acético, clorofórmio, etanol, metanol, éter dietílico, formaldeído 37%, ácido fórmico, ácido clorídrico 37%, dihidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato de potássio, pirofosfato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de cobre, cloreto de zinco, sulfato de amônio, acetato de sódio, iodoacetato de sódio, tiossulfato de sódio, carbonato de sódio, deoxicolato de sódio, orto-dianisidina, glicerol, ágar, ácido nitriloacético (NTA), albumina sérica bovina (BSA) foram obtidos da Merck. Água marcada com o isótopo de oxigênio 18 ($H_2{}^{18}O$ 97%), bicarbonato de sódio e formato de sódio marcados com o isótopo de carbono 13 ($NaH^{13}CO_3$, 99% e $NaH^{13}CO_2$, 98%) foram obtidos da ISOTEC. Taq polimerase, oligonucleotídeos de ácido desoxirribonucléico, glicina e guanidina foram obtidos da Invitrogen. Acrilamida e dodecilssulfato de sódio (SDS) foram obtidos da Gibco BRL. Azul de bromofenol e tetrametiletilenodiamina (TEMED) foram obtidos da Acros. Reagente de Bradford e marcador de peso molecular Kaleidoscope foram obtidos da Bio-Rad. Coquetel de inibidores de proteases e superóxido dismutase 1 (Sod1) bovina foram obtidos da Roche.

Tripsina grau sequenciamento foi obtida da Promega. Lisozima de clara de ovo, nonidet (NP-40), ampicilina e cloramfenicol foram obtidos da USB. Ácido bórico foi obtido da Reagen. Perssulfato de amônio e 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato (CHAPS) foram obtidos da Pharmacia Biotech. Colunas de cromatografia de troca aniônica Q-Sepharose e MonoQ, de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose e de afinidade por níquel HisTrap Crude foram obtidas da Amersham Biosciences. Coluna de fase reversa C18 para HPLC foram obtidas da Phenomenex e da Waters. Dióxido de carbono foi obtido da Oxilumen. Membrana de diálise com corte de peso molecular de 6-8 kDa foi obtida da Spectrum. Dispositivo de ultrafiltração com corte de peso molecular de 5 e 8 kDa foi obtido da Millipore. A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada num sistema de purificação Milli-Q da Millipore. O modelo de ELA em ratos transgênicos que superexpressam a mutante G93A da Sod1 humana (8-16 vezes) foi adquirido da Taconic e utilizado em acordo com os protocolos aprovados pela Comissão de Ética do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.2 Purificação da hSod1 de eritrócitos humanos

A enzima hSod1 foi purificada de eritrócitos humanos de acordo com procedimento descrito por McCord & Fridovich (McCord & Fridovich, 1969). Brevemente, 1 l de glóbulos vermelhos foram lisados pela adição de 1 l de água deionizada. A seguir, a hemoglobina foi precipitada pela adição de 800 ml de mistura etanol/clorofórmio (500 ml/300 ml) sob agitação a 4°C. À suspensão altamente viscosa foram adicionados 300 ml de água, tornando a mistura menos densa. O precipitado foi então removido por centrifugação a 3000g e ao sobrenadante foram adicionados 600 g de hidrogenofosfato de potássio à temperatura ambiente, resultando na separação de duas fases. A fase menos densa (etanólica) foi coletada e resfriada em banho de gelo/sal. Sob agitação, foram adicionados 600 ml de acetona gelada, causando a formação

de um precipitado esponjoso, o qual foi recolhido e seco sob vácuo. O precipitado azulado foi solubilizado em água deionizada e dialisado contra tampão 5 mM fosfato, pH 8,0.

A amostra de hSod1 de eritrócitos foi então submetida à cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose. A eluição da proteína foi feita aplicando-se um gradiente de tampão fosfato de 5-200 mM, pH 8,0. A hSod1 foi eluída num patamar de 45-50 mM. As frações contendo a hSod1 foram coletadas e sulfato de amônio sólido foi adicionado na amostra até a concentração final de 2,7 M. Em seguida, a amostra foi aplicada numa coluna de interação hidrofóbica equilibrada com tampão 5 mM fosfato, pH 8,0 contendo 2,5 M de sulfato de amônio. A eluição da proteína foi feita aplicando-se um gradiente linear de 2,5 a 0 M de sulfato de amônio. Finalmente, a proteína foi extensivamente lavada e concentrada por ultrafiltração em tampão 10 mM pirofosfato, pH 7,4 tratado com Chelex-100.

3.3 Expressão da hSod1 recombinante em bactérias

A expressão dos plasmídios pET-3d que codificam as enzimas hSod1 nativa ou mutante G93A (gentilmente cedidos pelo Dr. J.S.Beckman, Oregon State University) foi feita em *Escherichia coli* da linhagem BL21(DE3)pLysS (Leinweber *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2004). As bactérias foram transformadas por eletroporação e selecionadas por incubação a 37°C durante a noite em ágar/LB contendo 100 μg/ml de ampicilina e 34 μg/ml de cloramfenicol. Uma colônia da placa foi selecionada e cultivada em meio LB a 37°C. A expressão foi induzida na fase logarítmica de crescimento da cultura (D.O. 0,6-1,0) pela adição de 0,5 mM isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e 0,5 mM de cloreto de cobre. Após 6 horas de expressão a 25°C, a cultura foi centrifugada a 3000g e o pellet guardado a -20°C.

3.4 Purificação da hSod1 recombinante

O pellet correspondente a 1 litro de cultivo foi ressuspendido em 30 ml de tampão 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 contendo 10 mM de NaCl, 2 mM de $MgCl_2$ e 1 mM de PMSF e submetido a três ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento. A seguir, o homogenato foi tratado com 1 mg/ml de lisozima à temperatura ambiente. Após 1h da adição de lisozima, foram adicionadas 10 U/ml de Benzonase (endonuclease capaz de digerir DNA e RNA), seguido de incubação por mais 30 min à temperatura ambiente para redução da viscosidade. O homogenato foi então centrifugado a 18000g. Ao sobrenadante foi adicionado 0,5 mM de cloreto de cobre e cloreto de zinco, seguido de incubação durante a noite a 4°C. O extrato de aspecto azulado foi então submetido a uma etapa de precipitação térmica por 30 minutos a 65°C. O precipitado foi removido por centrifugação a 18000g e o sobrenadante submetido a fracionamento salino com sulfato de amônio. Primeiramente, sulfato de amônio foi adicionado para 50% de saturação, seguido de incubação por 2 h à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 18000g e sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante para 60% de saturação, seguido de incubação por mais 2 h à temperatura ambiente. A suspensão foi então novamente centrifugada a 18000g. Por fim, sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante para 100% de saturação causando a precipitação da hSod1 recombinante. A suspensão foi centrifugada a 18000g e o pellet azulado foi dissolvido em 4 ml de tampão 5 mM fosfato, pH 8,0. A solução contendo a enzima hSod1 recombinante foi então extensivamente dialisada contra tampão 5 mM fosfato, pH 8,0 e submetida às mesmas etapas cromatográficas que a proteína de eritrócitos. Finalmente, a proteína foi extensivamente lavada e concentrada por ultrafiltração em tampão 10 mM pirofosfato, pH 7,4 tratado com Chelex-100.

3.5 Dosagem de proteínas

A concentração de proteína total dos extratos bem como das enzimas purificadas foi determinada pelo ensaio colorimétrico de Bradford a 595 nm (Bradford, 1976). A curva de calibração foi feita empregando-se BSA ou Sod1 bovina como padrão, numa concentração de 0 a 4 μg/ml das proteínas.

3.6 Preparação da Apo-Sod1 e da Zn,ZnSod1

A apo-Sod1 foi preparada por extensiva diálise da Sod1 contra tampão 50 mM acetato, pH 3,8 contendo 30 mM EDTA, seguida de extensiva diálise contra tampão 50 mM acetato, pH 3,8 contendo 100 mM NaCl para remover o EDTA (Valentine *et al.*, 1979). Finalmente, o tampão foi removido por diálise contra água grau Milli-Q tratada com a resina Chelex-100 para eliminar traços de metais de transição. Este procedimento resultou na remoção de 98% do conteúdo de metais da proteína. A forma derivada Zn,ZnSod1 foi obtida pela adição cuidadosa de uma quantidade estequiométrica de cloreto de zinco. Após 48 h de incubação, a proteína foi extensivamente lavada e concentrada por ultrafiltração em água Milli-Q tratada com Chelex-100.

3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Tipicamente, as amostras foram diluídas em tampão de amostra (62 mM Tris-HCl, pH 6,8 contendo 10% glicerol, 2% SDS, 100 mM DTT e 0,01% azul de bromofenol), fervidas por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (5% gel de empacotamento; 15% gel de resolução) a 150 V por 2 horas. Os extratos de proteínas analisados em condições não redutoras foram preparados com adição de 100 mM de iodoacetato no tampão de lise e o redutor (DTT) foi omitido do tampão de amostra. Em seguida, os géis foram corados com Comassie brilliant blue, pelo método da prata ou

transferidos para membrana de nitrocelulose para marcação de Western-blot. Análises de densitometria de bandas foram feitas no programa ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/).

3.8 Determinação do teor de metais da Sod1

O teor de metais da Sod1 foi determinado empregando-se o ensaio quelante do 4-(2-Piridilazo)resorcinol (PAR) a 500 nm (Crow *et al.*, 1997). Este método consiste na complexação de cobre e zinco pelo quelante PAR em meio desnaturante constituído de tampão 100 mM borato e 6 M cloreto de guanidina em pH 7,8, produzindo um aumento de absorbância a 500 nm em virtude dos complexos formados. Os coeficientes de extinção para os complexos de cobre e zinco (Cu-PAR e Zn-PAR_2) foram determinados previamente às análises através de curvas de calibração feitas com soluções padrão para absorção atômica. As concentrações de cobre e zinco são determinadas pela diminuição de absorbância a 500 nm causada pela adição em sequência de dois outros quelantes, ácido nitriloacético (NTA) e ácido etilenodiaminotetraacético EDTA, que complexam zinco e cobre, respectivamente.

3.9 Atividade superóxido dismutase da Sod1

A atividade superóxido dismutase foi mensurada pelo método do citocromo *c*, o qual consiste na inibição da redução do citocromo *c* pelo superóxido gerado no sistema enzimático xantina/xantina oxidase em pH 7,8 e 25°C (McCord & Fridovich, 1969). A quantidade de xantina oxidase empregada foi aquela capaz de produzir uma velocidade de redução do citocromo *c* a 550 nm de 0,025 U.A./min. Uma unidade Sod é definida com base na quantidade de enzima necessária para causar a inibição de 50% da velocidade de redução do citocromo *c* num ensaio de 3 ml.

3.10 Atividade peroxidásica da Sod1

A atividade peroxidásica da hSod1 foi estudada em tampão 10 mM pirofosfato contendo 100 μM de DTPA nos pH 6,4, 7,4, 8,4 e 10,4. A concentração de bicarbonato, nitrito e formato empregada foi de 10 mM, enquanto que a de peróxido de hidrogênio foi variável conforme descrito nas legendas das figuras. A oxidação da dihidrorodamina (DHR) foi utilizada para acompanhar o processo na presença de bicarbonato e nitrito. A rodamina foi monitorada num espectrofotômetro de duplo feixe (Shimadzu UV-1650PC) ou num espectrofotômetro de fluxo interrompido (Applied Photophysics SX-18MV) com controle de temperatura e quantificada pelo seu coeficiente de extinção molar a 500 nm (ε_{500} = 78800 $M^{-1}cm^{-1}$) (Wrona *et al.*, 2005). O método de captação de spin utilizando 5,5'-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO) foi empregado para o estudo da atividade na presença de bicarbonato e formato. A detecção de radicais aduto foi feita à temperatura ambiente num espectrômetro de ressonância paramagnética eletrônica (Bruker EMX). Basicamente, as incubações foram transferidas para uma cela chata e os espectros adquiridos ao longo do tempo. A quantificação dos sinais foi feita pela integração dupla dos sinais simulados e cálculos baseados numa curva padrão de 4-hidroxi-2,2,6,6-tetra-metil-piperidiniloxila (Tempol). Demais condições experimentais estão descritas nas legendas das figuras.

3.11 Consumo de peróxido de hidrogênio

O consumo de peróxido de hidrogênio pela atividade peroxidásica da hSod1 foi determinado enzimaticamente pelo método da o-dianisidina (Liochev & Fridovich, 2002). Brevemente, alíquotas das incubações foram retiradas em diferentes intervalos de tempo e adicionadas a um tampão de amostragem consistindo de 50 mM fosfato, 0,3 mM o-dianisidina, 40 μg/ml HRP em pH 7,4. O peróxido de hidrogênio remanescente na incubação

foi determinado espectrofotometricamente a 460 nm empregando-se soluções padrões de peróxido de hidrogênio (ε_{240} = 43,6 $M^{-1}s^{-1}$) para calibração (Claiborn, 1985).

3.12 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (^{13}C RMN)

As soluções de $NaH^{13}CO_3$ (99% ^{13}C da ISOTEC) foram preparadas com adição de D_2O (99,9%) para um enriquecimento final de 10% na incubação. As soluções de proteínas foram preparadas em água Milli-Q tratada com Chelex-100. O complexo $Zn(His)_2$ foi obtido pela mistura de um equivalente de cloreto de zinco com dois equivalentes de L-histidina em água Milli-Q tratada com Chelex-100 (Pretsch *et al.*, 2000). O pH foi ajustado para 7,4 com ácido clorídrico. Após adição de peróxido de hidrogênio, a mistura foi transferida para um tubo de RMN provido de um tubo padrão (NE-5-CIC Wilmad) contendo solução padrão de $NaH^{13}CO_2$ (98% ^{13}C da ISOTEC) e os espectros de ^{13}C RMN registrados ao longo do tempo. As concentrações finais estão descritas nas legendas das figuras. Os valores de deslocamento químico (δ, ppm) e de integrais foram baseados naqueles determinados para o padrão de $NaH^{13}CO_2$ (Trindade *et al.*, 2006). O equipamento utilizado foi um espectrômetro Bruker DRX 500 com transformada de Fourier (operando em 125,757 MHz para ^{13}C NMR) equipado com uma sonda dupla de 5 mm. A sequência de pulso zgig30 foi empregada e os dados foram visualizados com o programa Xwinnmr 3.5. Os parâmetros de aquisição foram: comprimento do pulso, 10,70 μs; tempo de aquisição, 1,00 s; atraso de relaxação, 10 s (tempo total de reciclo, 11,00 s); largura espectral, 32679,74 Hz; temperatura, (25,0 ± 0,3)°C. A multiplicação do decaimento de indução livre pelo alargamento de linha exponencial (LB = 2,0 Hz) foi aplicada previamente às medidas de transformada de Fourier. Cada espectro corresponde ao acúmulo de oito aquisições.

3.13 Espectroscopia de dicroísmo circular

A hZn,ZnSod1, na concentração de 500 μM, foi incubada com 25 mM de bicarbonato e 100 μM DTPA na ausência e presença de 600 mM de peróxido de hidrogênio em pH 7,4, por 30 min a 25°C. A proteína foi então diluída para 20 μM em tampão 10 mM pirofosfato, pH 7,4 para aquisição do espectro de dicroísmo circular. Os espectros da proteína na região do UV distante (190-260 nm) foram adquiridos num espectropolarímetro Jobin Yvon CD6 (Longjumeau, France) utilizando uma cubeta de quartzo de 0,2 mm de caminho óptico. Por fim, foi feita a deconvolução dos espectros de dicroísmo circular para o cálculo da composição da estrutura secundária da proteína utilizando o programa k2D (Andrade *et al.*, 1993).

3.14 Modelagem Molecular

As estruturas do peroxomonocarbonato e do bicarbonato foram obtidas de dados cristalográficos (Adam & Mehta, 1998; Allen, 2002), salvas no formato Protein Data Bank (PDB) e então convertidas para o formato MOL2 com a manutenção das coordenadas 3D originais usando o programa CORINA 3,20 (Erlager, Alemanha). A estrutura em alta resolução da hSod1 foi obtida do PDB (PDB ID 2c9v) (Strange *et al.*, 2006). As ligações de coordenação aos íons metálicos foram apagadas de acordo com o procedimento de modelagem molecular pelo programa GOLD 3,2 (Verdonk *et al.*, 2003). As moléculas de água e os íons de sódio e sulfato também foram removidos. Previamente à modelagem, a estrutura da proteína também foi convertida para o formato MOL2 (DeLano, 2002). O peroxomonocarbonato e o bicarbonato foram modelados no sítio ativo da hSod1 usando a função Chemscore implementada no programa GOLD 3,2 pelo emprego dos parâmetros padrões para eficiência de busca de 200% (Verdonk *et al.*, 2003). Dez corridas de modelagem foram feitas para cada complexo proteína-ânion. Soluções diferindo por um desvio quadrático

médio (em inglês, rmsd) ≤ a 0,75 Å foram agrupadas e a menor energia de modelagem entre os membros de cada grupo foi tomada como representativa do grupo. Este protocolo de modelagem molecular foi validado pela remodelagem do bicarbonato no seu sítio original de ligação ao íon de zinco da anidrase carbônica (PDB ID 1hcb), a qual resultou num desvio quadrático médio de 1,12 Å. A representação gráfica foi gerada utilizando o programa PyMOL 0,99 (DeLano, 2002).

3.15 Estudo cinético por fluxo interrompido

A oxidação da dihidrorodamina (DHR) pela atividade peroxidásica da hSod1 também foi investigada num espectrofotômetro de fluxo interrompido com mistura assimétrica para monitorar a formação inicial de rodamina em diferentes condições de mistura dos reagentes. Para tal, foram empregadas seringas de 2,5 ml e 0,1 ml no módulo de manipulação de amostra permitindo uma mistura de 25 vol:1 vol. Na seringa de 2,5 ml foi colocada a solução de enzima contendo 3,12 μM de hSod1, 100 μM de DTPA e 100 μM de DHR em tampão 10 mM pirofosfato, pH 8,4 e 25°C. Na seringa de 0,1 ml foi colocada a solução de 130 mM de peróxido de hidrogênio em 10 mM pirofosfato, pH 8,4 e 25°C. O bicarbonato foi adicionado ora na seringa contendo a enzima (controle) ora na seringa contendo o peróxido de hidrogênio, na concentração de 10,4 mM e 260 mM, respectivamente. Antes de carregar a seringa de 0,1 ml, a mistura de peróxido de hidrogênio com bicarbonato foi equilibrada por 10 min, produzindo aproximadamente 9 mM de peroxomonocarbonato (Trindade *et al.*, 2006). Depois da mistura, espera-se uma concentração de 300 μM de peroxomonocarbonato no início da incubação ao passo que a concentração de peroxomonocarbonato na mistura controle (quando o bicarbonato foi adicionado na solução da enzima) atinge apenas 15 μM após o equilíbrio. Devido ao pequeno volume de solução de peróxido de hidrogênio injetada em cada

mistura e ao decaimento do peroxomonocarbonato pela difusão e contato com a solução da enzima, a tubulação contendo o peroxomonocarbonato foi lavada antes de cada aquisição.

3.16 Cálculos e simulações cinéticas

A constante de segunda ordem hipotética para a reação entre o peroxomonocarbonato e a Cu(I),ZnSod1 foi calculada a partir dos dados do experimento de fluxo interrompido sob condição de estado estacionário. Assim, a velocidade de formação da rodamina durante o primeiro minuto da mistura controle foi determinada e substituída na equação abaixo porque a oxidação da DHR pelo radical carbonato é rápida demais para ser o passo limitante da reação (Wrona *et al.*, 2005).

$$v = k[HCO_4^-][Cu(I),ZnSod1] \quad \text{(Eq. 3)}$$

A concentração da Cu(I),ZnSod1 foi considerada igual a concentração total da hSod1 porque as condições experimentais empregadas (5 mM H_2O_2 e pH 8,4) favorecem a manutenção da enzima reduzida no estado estacionário. A concentração do peroxomonocarbonato foi calculada com base na sua constante de equilíbrio com peróxido de hidrogênio e bicarbonato e nas concentrações destes, ou seja, 15 µM (Trindade *et al.*, 2006). A simulação cinética da atividade peroxidásica da hSod1 considerou as reações apresentadas na Tabela 3 e foi feita no programa Gepasi 3,30 (gepasi.dbs.aber.ac.uk/softw.html/) (Mendes, 1997).

3.17 Genotipagem dos ratos transgênicos modelo de ELA

Um pequeno pedaço da cauda dos animais foi coletado pelo biotério da FCF-IQ/USP. À amostra de tecido foram adicionados 300 µl de tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 contendo 50 mM EDTA e 0,5% SDS, seguido pela incubação a 65°C por 15 min. Então, foram adicionados mais 200 µl do mesmo tampão contendo 1,25 mg/ml de proteinase k, seguido da

digestão da amostra a 55°C durante a noite sob agitação. Após a digestão, a amostra foi centrifugada a 16000 g por 5 min e 5 µl do sobrenadante diluído com 95 µl de água autoclavada. A amostra diluída foi então aquecida a 95°C por 15 min. Em seguida, a amostra foi submetida à reação em cadeia da polimerase ("PCR", em inglês) para amplificação do gene da Sod1 humana. Os oligonucleotídeos iniciadores específicos ("primers", em inglês) foram: sod-f CAA TGT GAC TGC TGA CAA AG e sod-r GTG CGG CCA ATG ATG CAA T. O ciclo de PCR utilizado foi: 95°C por 5 min (1x), 95°C por 1 min, 60°C por 1min e 72°C por 2 min (35x) e 72°C por 5 min (1x). A reação de PCR consistiu em 2 µl da amostra em 48 µl de mistura para PCR (1x tampão de PCR, 200 µM desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 1,5 mM cloreto de magnésio, 400 nM oligonucleotídeos, 40 mU/µl Taq polimerase). Por fim, os produtos de reação do PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose para a identificação dos animais transgênicos.

3.18 Sintomas de esclerose lateral amiotrófica e eutanásia de animais

O aparecimento de sintomas típicos de ELA nos ratos transgênicos que superexpressam a mutante G93A da hSod1 foi constatado pelo teste do plano inclinado. Brevemente, a capacidade dos animais em se manterem agarrados aos sulcos de uma rampa com angulação pré-definida foi avaliada. Ainda, os animais foram pesados semanalmente e tiveram seu caminhar observado, pois o início dos sintomas está correlacionado tanto à perda de peso quanto à dificuldade de locomoção. Para a eutanásia, os animais foram anestesiados com uma dose intraperitoneal de 90 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina e submetidos ao teste da pinça para verificar a ausência de reflexos e sentidos. Então, foi feita a incisão torácica seguida da perfusão cardíaca com solução salina 0,9%. A medula, o fígado e o baço foram coletados imediatamente após a perfusão e congelados em nitrogênio líquido.

3.19 Preparação de extrato de proteínas das medulas e enriquecimento das proteínas de peso molecular na faixa de 40 a 60 kDa imunoreativas ao anticorpo contra a hSod1

O extrato de proteínas das medulas foi preparado em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 contendo 1 mM de DTPA, 150 mM de NaCl, 5 mM de $MgCl_2$, 2 mM de triptofano, 0,5% de deoxicolato de sódio (m/V), 1% do detergente não-iônico nonidet (NP-40), 1 mM PMSF e coquetel de inibidores de protease (Roche) através da homogeneização por lâminas. Após a homogeneização do tecido, foram adicionados ao extrato 500 µg de desoxirribonuclease (DNase) por grama de tecido, seguido da incubação por 1h a 4°C para a redução da viscosidade. Em seguida, foram adicionados cloreto de guanidina (Gua-HCl) sólido e solução concentrada de ditiotreitol para a concentração final de 6 M e 30 mM, respectivamente. O extrato foi então incubado por 4h a 4°C para a desnaturação das proteínas e redução de ligações dissulfeto. A etapa seguinte constituiu na adição de solução concentrada de iodoacetato de sódio para a concentração final de 300 mM do agente alquilante. Após 4h de incubação a 4°C e ao abrigo da luz, o extrato foi centrifugado a 16000 g, por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e dialisado contra tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 contendo 150 mM de NaCl e 2 mM de triptofano (uma troca após 3h, fator de diluição de 50 vezes). Após a diálise, o extrato foi novamente centrifugado a 16000 g, por 1h a 4°C e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,8 µm.

O sobrenadante clarificado foi analisado por eletroforese bidimensional (descrita no próximo item) ou submetido à cromatografia de afinidade por níquel utilizando a coluna HisTrap Crude (Amersham Bioscience). A hSod1 desnaturada/reduzida/alquilada interagiu com a coluna equilibrada com tampão 10 mM fosfato, pH 7,4 contendo 150 mM NaCl e 2 mM triptofano e foi eluída pela aplicação de um gradiente de imidazol como um único pico cromatográfico conforme determinado por Western-blot. As frações contendo proteínas de peso molecular na faixa de 40 a 60 kDa imunoreativas ao anticorpo contra a hSod1 foram

misturadas, lavadas e concentradas por ultrafiltração em tampão 10 mM fosfato, pH 8,0 contendo 8 M uréia e 2 mM triptofano. A amostra foi então submetida à cromatografia de troca aniônica utilizando a coluna MonoQ (Amersham Bioscience). A hSod1 interagiu com a coluna equilibrada com tampão 10 mM fosfato, pH 8,0 contendo 2 M uréia e 2 mM triptofano e foi eluída por um gradiente de NaCl como vários picos cromatográficos identificados por Western-blot. As frações contendo proteínas de peso molecular na faixa de 40 a 60 kDa imunoreativas ao anticorpo contra a hSod1 foram misturadas, lavadas e concentradas por ultrafiltração em tampão 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 contendo 8 M uréia e 2 mM triptofano. Em seguida, as proteínas foram submetidas novamente ao tratamento redutor pela adição de 30 mM de ditiotreitol (4h, 4°C) e ao tratamento alquilante pela adição de 300 mM de iodoacetato de sódio (4h, 4°C e ao abrigo da luz). Por fim, a amostra foi novamente lavada e concentrada por ultrafiltração em tampão 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 contendo 8 M uréia e 2 mM triptofano e submetida à eletroforese bidimensional descrita abaixo.

3.20 Eletroforese bidimensional

A separação das proteínas por diferença em ponto isoelétrico foi feita em tiras de gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado (GE Healthcare). Brevemente, a amostra de proteínas foi diluída em tampão constituído de anfólitos (0,5%) para a faixa de pH da etapa de focalização (GE Healthcare) acrescido de 7 M uréia, 2 M tiouréia, 2% do detergente CHAPS e 0,002% de azul de bromofenol. Em seguida, uma tira de gel de poliacrilamida desidratada foi colocada sobre a amostra que por capilaridade cobriu toda a superfície do gel. O gel de poliacrilamida foi então hidratado com a amostra por 12 a 20 horas num recipiente selado para evitar o ressecamento do gel. A corrida de focalização foi feita no equipamento Ettan IPGphor 3 IEF utilizando o programa padrão para o tipo de tira empregada (GE Healthcare). Após a corrida de focalização, as tiras foram guardadas a -80°C até a segunda dimensão da

eletroforese. Antes da separação por peso molecular, as tiras foram descongeladas e equilibradas em tampão 75 mM Tris-HCl, pH 8,8 contendo 6 M uréia, 2% SDS, 29,3% (v/v) glicerol e 0,002% de azul de bromofenol. Após a etapa de equilíbrio, as tiras foram colocadas sobre o gel de poliacrilamida e o sistema selado com gel de agarose. Por fim, a eletroforese da segunda dimensão foi feita em duas etapas. Na primeira etapa foram aplicados 15 mA por tira para a amostra sair da tira de gel da focalização e entrar no gel de poliacrilamida da segunda dimensão e, na segunda, foram aplicados 45 mA por tira para a separação das proteínas por peso molecular.

3.21 Preparação e purificação do dímero covalente da hSod1

Em tampão 200 mM bicarbonato de sódio, pH 7,4 (equilibrado com 50% CO_2 balanceado com ar) contendo 100 µM DTPA, 10 µM de hSod1 foram incubados com 1 mM de peróxido de hidrogênio sob agitação magnética por 2h à temperatura ambiente para a dimerização covalente da hSod1. A enzima também foi incubada sem a adição de peróxido de hidrogênio para controle das análises. Após incubação, a proteína foi concentrada por ultrafiltração e seca sob vácuo. Em seguida, a proteína foi submetida a um tratamento desnaturante e redutor em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 contendo 10 mM DTPA e 30 mM DTT sob tensão reduzida de oxigênio por 4h a 37°C. Então, adicionou-se 150 mM de iodoacetato de sódio e incubou-se por mais 3h a 37°C ao abrigo da luz para a alquilação de sulfidrilas livres. Depois da etapa de alquilação, a proteína foi lavada e concentrada por ultrafiltração em tampão 50 mM HEPES, pH 7,0 contendo 100 mM NaCl.

Finalmente, a amostra foi submetida à cromatografia de gel filtração (TOSOHAAS TSK-Gel, G-3000 SWXL, 300 x 7,8 mm, partícula 5 µm) resultando em dois picos principais correspondendo ao dímero covalente e ao monômero oxidado da hSod1. As frações contendo

o dímero covalente e monômero oxidado foram coletadas, lavadas e concentradas por ultrafiltração em tampão 50 mM bicarbonato de amônio, pH 7,8.

3.22 Digestão da hSod1 com tripsina e análise dos peptídeos por HPLC/UV-vis e HPLC/ESI-MS

A digestão da hSod1 foi efetuada em tampão 50 mM bicarbonato de amônio, pH 7,8 contendo 2 mM cloreto de cálcio por 20h a 37°C. A relação enzima/substrato empregada foi de 50 µg/µg para a hSod1 controle (monômero nativo), hSod1 monômero (monômero oxidado) e dímero covalente da hSod1. Para a digestão em $H_2{}^{18}O$, a amostra de proteína foi dividida em duas alíquotas de 50 µg cada, seca sob vácuo e solubilizada em 50 µl de H_2O ou 50 µl de $H_2{}^{18}O$. Então, 1 µl de solução 2,65 M de bicarbonato de amônio, 1 µl de solução 106 mM de cloreto de cálcio e 1 µl de solução estoque de tripsina (1 µg/µl) foram adicionados às amostras de proteína. O enriquecimento final do meio de $H_2{}^{18}O$ foi de 91% após a adição das soluções de bicarbonato de amônio, cloreto de cálcio e tripsina. As condições da proteólise foram as mesmas das descritas acima.

Os hidrolisados de hSod1 foram submetidos à cromatografia de fase reversa em uma coluna C18 µBondapack Waters (300 x 3,9 mm, partícula 10 µm) empregando um gradiente binário utilizando como eluente A, 0,1% ácido trifluoroacético, e como eluente B, 0,1% ácido trifluoroacético em 90% acetonitrila. O gradiente empregado consistiu de 0% de B por 15 min, 0 a 26% de B por 52 min, 26% de B por 10 min, 26 a 40% de B por 28 min, 40 a 80% de B por 10 min, 80% de B por 5 min, 80 a 0% de B por 5 min e 0% de B por 5 min, num fluxo de 1 ml/min. Os hidrolisados foram analisados por espectrofotometria no UV-vis utilizando um detector tipo arranjo de diodos (SPD-M20A, Shimadzu, Tóquio, Japão) e por espectrometria de massa utilizando um espectrômetro triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) com fonte de ionização “electrospray” no modo positivo. As

condições de análise foram: voltagem do cone de amostra, 20, 50 e 90 V; voltagem do cone extrator, 5 V; voltagem do capilar, 4,5 kV; temperatura da fonte, 100°C e temperatura de dessolvatação, 200°C.

3.23 Digestão *in gel* de proteínas com tripsina

As regiões do gel de poliacrilamida correspondentes às espécies de hSod1 separadas por eletroforese bidimensional foram cortadas e colocadas em tubos separados. Cada pedaço de gel foi então cortado em pedaços menores para aumentar a superfície de contato com as soluções. Primeiramente, os géis corados com prata (Shevchenko *et al.*, 1996) foram tratados com uma solução descorante (recém-preparada) para marcação com prata constituída de 15 mM de ferricianeto de potássio e 50 mM de tiossulfato de sódio (Gharahdaghi *et al.*, 1999). Após o desaparecimento da coloração marrom, os pedaços de gel foram lavados quatro vezes com água. Em seguida, os géis foram submetidos a dois ciclos de incubação com 100 mM de bicarbonato de amônio e desidratação com acetonitrila e então secos sob vácuo. Os tubos foram colocados em gelo e foi feita adição de tampão de digestão (50 mM bicarbonato de amônio, pH 8,0 contendo 2 mM de cloreto de cálcio e 12,5 ng/µl de tripsina grau sequenciamento) para rehidratação dos pedaços de gel. Após 45 min de rehidratação, adicionou-se mais tampão 50 mM bicarbonato de amônio, pH 8,0 para cobrir os géis e incubou-se por 16 h a 37°C para a digestão enzimática.

Os tubos foram centrifugados por 1 min a 16000 g e o sobrenadante recolhido num novo tubo. Em seguida, foi feita a extração dos peptídeos da malha do gel de acrilamida pela adição de 5% de ácido trifluoroacético em 50% de acetonitrila e incubação por 30 min sob agitação. Após a centrifugação dos géis por 1 min a 16000 g, o sobrenadante foi recolhido e misturado ao sobrenadante prévio. Esta etapa de extração foi repetida mais duas vezes e então a solução de peptídeos foi seca sob vácuo.

3.24 Análise dos hidrolisados da hSod1 por UPLC/Q-Tof-MS/MS e identificação da proteína por ferramentas de proteômica

O sistema cromatográfico nanoAcquity de UPLC foi acoplado a um espectrômetro de massa Synapt HDMS (Waters, Millford). Os produtos de digestão com tripsina foram submetidos à dessalinização na coluna C18 Waters Symmetry (20 mm x 180 µm, partícula 5 µm) seguido pela cromatografia de fase reversa na coluna C18 Waters BEH130 (100 mm x 100 µm, partícula 1,7 µm) empregando um gradiente binário utilizando 0,1% de ácido fórmico como eluente A e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila como eluente B. O gradiente empregado consistiu de 3 a 30% de B por 20 min, 30 a 70% de B por 20 min, 70% de B por 10 min, 70 a 3% de B por 1 min e 3% de B por 9 min, num fluxo de 1 µl/min. Tipicamente, as condições de operação do espectrômetro de massa dos experimentos no modo de análise dependente de dados foram: voltagem do cone, 40 V; voltagem do capilar, 3,0 kV, temperatura da fonte, 100°C; energia de colisão, 6 e 4 eV no Trap e Transfer, respectivamente, no modo MS. A energia de colisão foi escolhida em função da carga do íon precursor e da razão m/z. O instrumento foi calibrado externamente utilizando oligômeros de ácido fosfórico sobre uma faixa de m/z de 100 a 3000.

Os dados de MS/MS obtidos para os peptídeos trípticos foram convertidos para o formato de arquivo .pkl e utilizados na identificação das proteínas presentes na amostra pela busca no banco de dados de estrutura primária de proteínas de mamíferos a partir da plataforma MASCOT. A validade da identificação foi atestada por sua significância estatística ($p<0,01$).

4 Resultados

4.1 Expressão e purificação da superóxido dismutase 1 humana recombinante

A superóxido dismutase 1 humana (hSod1) recombinante foi expressa em *Escherichia coli* pela indução com IPTG. Após 6 horas da indução da expressão com IPTG, a hSod1 recombinante correspondeu a aproximadamente 40% da proteína total da bactéria (Figura 2).

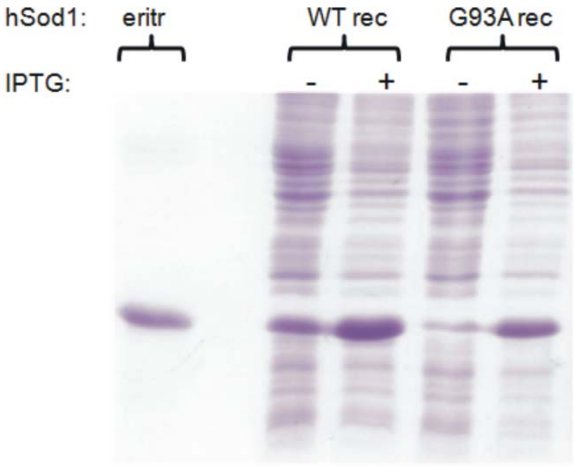


Figura 2. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante da expressão da hSod1 recombinate nativa (WT rec) e mutante G93A (G93A rec) em *E. coli*. A primeira amostra corresponde a hSod1 purificada de eritrócitos (hSod1 eritr) e as seguintes aos extratos totais de proteínas da bactéria obtidos dos cultivos controle e induzido, isto é, sem e com adição de IPTG, respectivamente.

A adição de cloreto de zinco e cloreto de cobre ao extrato de proteínas da *Escherichia coli* foi fundamental para a obtenção da hSod1 cataliticamente ativa uma vez que a bactéria não possui a chaperona de cobre da Sod1 envolvida no processamento pós-traducional da proteína em eucariotos (Furukawa & O'Halloran, 2006). Mesmo assim, a hSod1 nativa cataliticamente ativa foi obtida com altos rendimentos após sua purificação. Entretanto, o rendimento da purificação da mutante G93A da hSod1 foi de 5 a 10% daquele da proteína nativa.

Digno de nota, a bactéria foi capaz de formar a ligação dissulfeto intrasubunidade da hSod1 nativa, mas não das mutantes G93A, A4V e L38V relacionadas à ELA (Figura 3). Esta propriedade da bactéria formar a ligação dissulfeto na hSod1 ainda não foi descrita na

literatura e deve estar relacionada ao maior rendimento da purificação da proteína nativa. De fato, a ausência da ligação dissulfeto deve dificultar a inserção dos metais *in vitro*, já que ela desempenha papel importante na geometria do sítio ativo. Além disso, a análise da fração insolúvel do extrato de proteínas da bactéria revela que a hSod1 contendo a ligação dissulfeto reduzida possui propensão à agregar-se (Figura 3), contribuindo para o menor rendimento da purificação da mutante G93A.

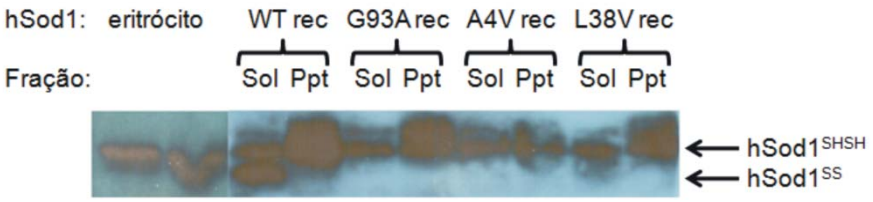


Figura 3. Análise por Western-blot para a hSod1 da eletroforese em gel de poliacrilamida não-redutor dos extratos de proteínas dos cultivos induzidos de *E. coli* expressando a proteína nativa (WT rec) e mutantes (G93A rec, A4V rec e L38V rec). A primeira amostra corresponde a hSod1 purificada de eritrócitos com e sem a adição de β-mercaptoetanol na preparação da amostra para a eletroforese, respectivamente. As seguintes são as frações solúveis (Sol) e precipitadas (Ppt) dos extratos de proteínas da bactéria contendo hSod1 nativa e mutantes conforme indicado.

O procedimento da purificação foi elaborado para selecionar a hSod1 (nativa e mutante G93A) corretamente enovelada e cataliticamente ativa, comumente referida como hSod1 madura. Após a inserção dos metais no sítio ativo e da formação da ligação dissulfeto intrasubunidade, a hSod1 apresenta uma temperatura de desenovelamento de 95°C. Desta forma, a hSod1 madura permanece solúvel durante a etapa de precipitação térmica do extrato de proteínas da *Escherichia coli* a 65°C. Todavia, a cromatografia de troca aniônica apresentou diferentes picos contendo a hSod1 recombinante. Paralelamente, a purificação da hSod1 de eritrócitos humanos resultou num único pico da proteína na cromatografia de troca aniônica. Assim, o pico referente à hSod1 de eritrócitos na cromatografia da hSod1 recombinante foi selecionado para o refinamento da purificação. A cromatografia de interação hidrofóbica resultou num pico de hSod1 correspondendo à proteína pura. A pureza das proteínas foi verificada pela observação de uma única banda por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (Figura 4).

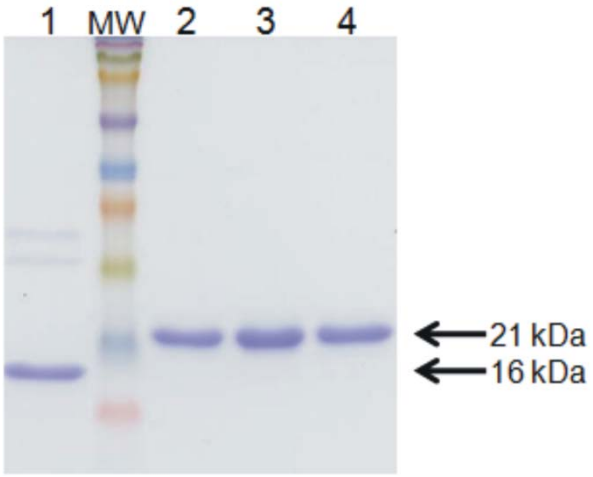


Figura 4. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturantes da purificação da hSod1 recombinante. A primeira amostra (1) corresponde à Sod1 bovina purificada de eritrócitos (comercial) e as seguintes, a hSod1 de eritrócitos (2) e recombinantes nativa e mutante G93A (3 e 4, respectivamente). MW: marcador de peso molecular.

Para clareza das discussões adiantes, vale ressaltar que a hSod1 desnaturada e reduzida possui mobilidade eletroforética de 21 kDa embora sua subunidade tenha massa de 16 kDa (Figura 5).

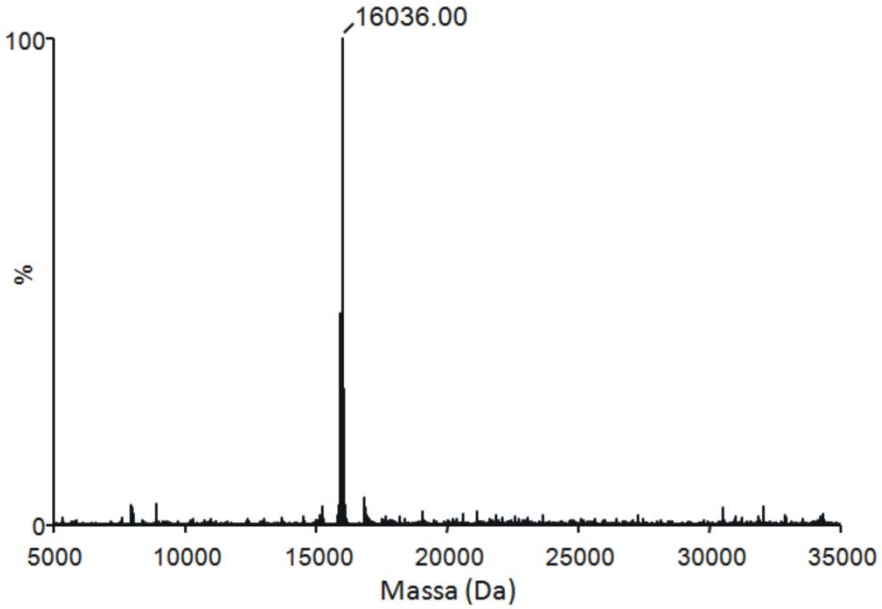


Figura 5. Análise da hSod1 nativa por espectrometria de massa (UPLC/Q-Tof-MS) após tratamento da proteína em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 contendo 6 M cloreto de guanidina (Gua-HCl), 10 mM DTPA, 30 mM DTT por 4 horas a 37°C para remoção dos íons de cobre e zinco e redução da ligação dissulfeto, seguido da adição de 150 mM iodoacetato de sódio e incubação por 3 horas a 37°C ao abrigo da luz para alquilação dos resíduos de cisteína.

4.2 Conteúdo de metais, atividade superóxido dismutase e atividade peroxidásica dependente de bicarbonato da hSod1 recombinante

A análise do conteúdo de metais da hSod1 recombinante demonstrou que tanto a proteína nativa quanto a mutante G93A incorporaram íons de zinco e cobre na proporção de 1:1. Ainda, o conteúdo de metais das proteínas recombinantes ficou próximo do obtido para a Sod1 de eritrócitos humanos e para a Sod1 de eritrócitos bovinos (Tabela 1).

Tabela 1. Conteúdo de metais e atividade específica da Sod1

Enzima	Cobre e zinco por monômero	Atividade específica (un/mg de proteína)[a]
Sod1 bovina eritrócitos	0,89 ± 0,05 e 0,86 ± 0,05	(5,0 ± 1,6) x 10^3
Sod1 humana eritrócitos	0,77 ± 0,03 e 0,78 ± 0,03	(3,9 ± 0,6) x 10^3
Sod1 humana recombinante	0,65 ± 0,02 e 0,69 ± 0,06	(4,2 ± 1,0) x 10^3
Sod1 humana recombinante (mutante G93A)	0,83 ± 0,05 e 0,78 ± 0,05	(3,9 ± 0,3) x 10^3

[a] mg de proteína normalizada pelo conteúdo de cobre.

A atividade superóxido dismutase das enzimas recombinantes expressa como atividade específica (isto é, por mg de proteína contendo cobre) apresentou-se similar às atividades das enzimas de eritrócitos humanos e bovinos demonstrando a qualidade e pureza das preparações (Tabela 1). Além disso, a banda de absorção da proteína na região do visível com máximo em 680 nm confirmou a coordenação apropriada do zinco e do cobre no sítio ativo da enzima (Figura 6).

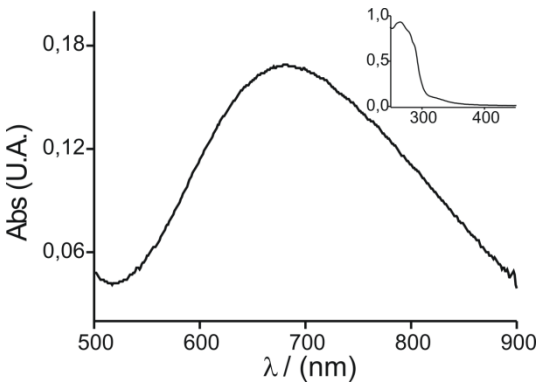


Figura 6. Banda de absorção da hSod1 nativa recombinante na região do visível. Inserto: banda de absorção do resíduo de triptofano na região do ultravioleta.

A atividade peroxidásica dependente de bicarbonato da Sod1 foi implicada no ganho de função tóxica das mutantes da hSod1 em ELA (Wiedau-Pazos *et al.*, 1996). Embora alguns estudos *in vitro* utilizando enzimas recombinantes purificadas de diferentes sistemas de expressão tenham gerado resultados conflitantes (Wiedau-Pazos *et al.*, 1996; Yim *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1998), estudos *in vivo* demonstraram que algumas mutantes da hSod1 possuem atividade peroxidásica maior que a hSod1 nativa (Roe *et al.*, 2002). A comparação da atividade peroxidásica da hSod1 nativa e mutante G93A obtidas neste estudo não revelou nenhuma diferença significativa e levou à conclusão de que a mutação *per se* não afeta a atividade peroxidásica dependente de bicarbonato (Figura 7).

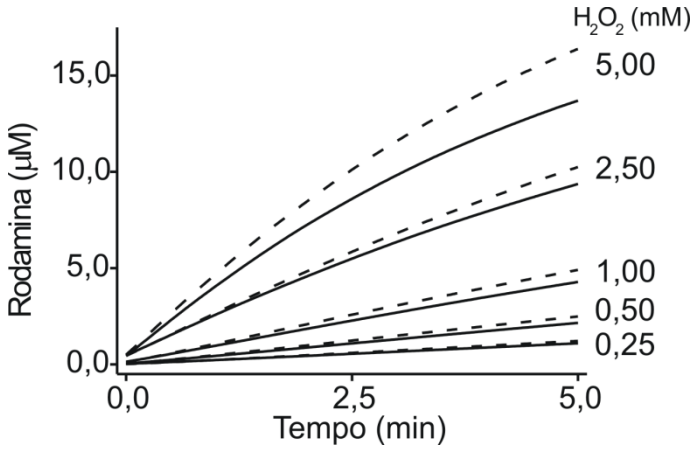


Figura 7. Oxidação da DHR pela atividade peroxidásica da hSod1 na presença de bicarbonato. As linhas cheias correspondem à oxidação da DHR pela hSod1 nativa enquanto que as linhas pontilhadas pela mutante G93A. As incubações foram feitas em tampão 10 mM pirofosfato de sódio, pH 7,4 contendo 10 mM de bicarbonato de sódio, 100 µM de DTPA, 1 µM de hSod1, 100 µM de DHR e diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio conforme indicado, a 37°C.

Não obstante, a mutação poderia afetar o processamento pós-traducional da hSod1 e levar ao acúmulo de espécies mal enoveladas *in vivo* que possuíssem atividade peroxidásica exacerbada (Furukawa & O'Halloran, 2006; Goto *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000), mas estas possibilidades ainda necessitam ser demonstradas.

Ainda, de suma importância para a compreensão do papel da atividade peroxidásica dependente de bicarbonato da hSod1 em ELA foi a descoberta da produção do radical carbonato no "turnover" da enzima (Zhang *et al.*, 2000). Todavia, o mecanismo de produção

do radical carbonato pela hSod1, bem como os intermediários reativos envolvidos, permanece em debate na literatura e foi investigado neste trabalho (Medinas *et al.*, 2007).

4.3 Mecanismo de produção do radical carbonato pela atividade peroxidásica da hSod1

A Sod1 consome peróxido de hidrogênio através de um ciclo catalítico que eventualmente leva à inativação da enzima. Contudo, substratos aniônicos pequenos que entrem com facilidade no sítio ativo protegem a Sod1 da inativação (Hodgson & Fridovich, 1975). Assim, Hodgson e Fridovich propuseram o seguinte ciclo peroxidásico para explicar as oxidações promovidas pela Sod1 (Equações 4-7).

$$\text{SodCu(II)} + H_2O_2 \rightleftharpoons \text{SodCu(I)} + O_2^{\bullet -} + 2\,H^+ \quad \text{(Eq.4)}$$

$$\text{SodCu(I)} + H_2O_2 \longrightarrow \text{SodCu(II)}(OH^{\bullet}) + OH^- \quad \text{(Eq.5)}$$

$$\text{SodCu(II)}(OH^{\bullet}) + \text{SodHis} \longrightarrow \text{SodCu(II)} + \text{SodHis}^{\bullet +} + OH^- \quad \text{(Eq.6)}$$

$$\text{SodCu(II)}(OH^{\bullet}) + X^- \longrightarrow \text{SodCu(II)} + X^{\bullet} + OH^- \quad \text{(Eq.7)}$$

O intermediário oxidante formado na segunda etapa do ciclo, SodCu(II)($OH^{\bullet}$), corresponde ao radical hidroxila formalmente ligado ao íon de cobre do sítio ativo e fora responsabilizado pela oxidação dos resíduos de histidina adjacentes levando à inativação da enzima e pela oxidação de substratos que têm acesso ao sítio ativo.

Na década de 1990, o interesse na atividade peroxidásica da hSod1 por suas potenciais implicações para ELA levou à descoberta do efeito do tampão bicarbonato nas oxidações promovidas pela enzima (Sankarapandi & Zweier, 1999). Sankarapandi e Zweier observaram que as oxidações catalisadas pela Sod1 são muito mais eficientes em tampão bicarbonato que em outros tampões no pH fisiológico e propuseram que o ânion bicarbonato facilita a reação

entre o peróxido de hidrogênio e a enzima reduzida, isto é, favorece a etapa representada pela Equação 5.

Concomitantemente, o trabalho de nosso laboratório em colaboração com o grupo uruguaio de Rafael Radi demonstrou que o efeito do tampão bicarbonato em oxidações pelo peroxinitrito ocorre pela formação do radical carbonato (Equação 8) (Bonini *et al.*, 1999).

$$ONOO^- + CO_2 \longrightarrow 0.35\ NO_2^\bullet + 0.35\ CO_3^{\bullet -} + 0.65\ NO_3^- + 0.65\ CO_2 \quad \text{(Eq. 8)}$$

Subsequentemente, Zhang *et al.* relataram que o tampão bicarbonato estimula oxidações pela Sod1 através da produção do radical carbonato e incluíram a Equação 9 no ciclo peroxidásico de Hodgson e Fridovich (Zhang *et al.*, 2000). Segundo esta proposta, o poder oxidante da atividade peroxidásica é exportado do sítio ativo da enzima para o meio através da oxidação do ânion bicarbonato ao ânion radical carbonato difusível pelo intermediário SodCu(II)($OH^\bullet$), tornando a atividade peroxidásica da Sod1 mais eficiente. De fato, o radical carbonato produzido no sítio ativo da enzima pode se difundir para o meio aquoso e oxidar alvos que não tenham acesso ao cobre catalítico, como proteínas (Bonini *et al.*, 2004).

$$\text{SodCu(II)}(OH^\bullet) + HCO_3^- \longrightarrow \text{SodCu(II)} + CO_3^{\bullet -} + H_2O \quad \text{(Eq.9)}$$

Contrariamente, Elam *et al.* propuseram um mecanismo alternativo envolvendo o ânion peroxomonocarbonato para explicar o efeito do bicarbonato nas oxidações mediadas pela Sod1 (Equações 10 e 11) (Elam *et al.*, 2003). Já, Liochev e Fridovich forneceram evidências fortes para a participação do dióxido de carbono (CO_2) no mecanismo peroxidativo da Sod1 e, analogamente a Zhang *et al.*, sugeriram sua oxidação a radical carbonato pelo intermediário SodCu(II)($OH^\bullet$) (Equações 12 e 13) (Liochev & Fridovich, 2004).

$$\text{SodCu(I)}(HCO_3^-) + H_2O_2 \longrightarrow \text{SodCu(I)}(HCO_4^-) + H_2O \quad \text{(Eq.10)}$$

$$\text{SodCu(I)}(HCO_4^-) \longrightarrow \text{SodCu(II)}(CO_3^{\bullet -}) + OH^- \quad \text{(Eq.11)}$$

$$SodCu(II)(OH^{\bullet}) + CO_2 \longrightarrow SodCu(II) + CO_2^{+} + OH^{-} \quad (Eq.12)$$

$$CO_2^{+} + OH^{-} \longrightarrow CO_3^{\bullet -} + H^{+} \quad (Eq.13)$$

Claramente, o grande número de trabalhos dedicados a esta discussão, assim como a diversidade de propostas para compreender a atividade peroxidásica da Sod1, reflete a complexidade das oxidações mediadas pelo tampão bicarbonato.

4.4 Consumo de peróxido de hidrogênio e oxidação de nitrito, formato e bicarbonato/dióxido de carbono pela hSod1

A atividade peroxidásica da Sod1 é favorecida com o aumento do pH porque o peróxido de hidrogênio desprotonado (pKa = 11,4) constitui o substrato efetivo da enzima (Fuchs & Borders, 1983; Cabelli *et al.*, 1989). Ainda, nitrito e formato são substratos para a atividade peroxidásica da Sod1 (Equação 7) e protegem a enzima contra a inativação (Jewett *et al.*, 2000; Hodgson & Fridovich, 1975). Desta forma, iniciamos os estudos mecanísticos pela comparação sistemática do efeito de nitrito, formato e bicarbonato (em equilíbrio com dióxido de carbono, pKa = 6,4 e carbonato, pKa = 10,3) sobre a atividade peroxidásica da hSod1 numa ampla faixa de pH que se estendeu de 6,4 a 10,4. Digno de nota, a atividade superóxido dismutase da enzima não sofre alteração na faixa de pH empregada (Ellerby *et al.*, 1996) e os ensaios enzimáticos foram feitos em tampão pirofosfato devido a sua ampla capacidade tamponante.

Os resultados de consumo de peróxido de hidrogênio demonstraram que bicarbonato atua de forma bem distinta de nitrito e formato no “turnover” da atividade peroxidásica da hSod1. Em pH 7,4, bicarbonato (em equilíbrio com dióxido de carbono) acelerou o consumo de peróxido de hidrogênio cerca de seis vezes, enquanto nitrito e formato não exerceram qualquer influência (Figura 8A). Entretanto, nitrito e formato aumentaram o consumo de peróxido de hidrogênio em pH 10,4, ao passo que bicarbonato (em equilíbrio com carbonato)

não produziu nenhum aumento (Figura 8B). Em todas as condições experimentais as curvas de consumo de peróxido de hidrogênio atingiram um platô devido à inativação da enzima. Conforme esperado, o consumo de peróxido de hidrogênio e a inativação da enzima ocorreram de forma mais acentuada em pH 10,4 do que em pH 7,4. Já, o efeito distinto de nitrito e formato em relação ao do bicarbonato no consumo de peróxido de hidrogênio pela hSod1 indicaram que o ciclo peroxidativo da enzima em tampão bicarbonato pode ocorrer por um mecanismo distinto do proposto por Hodgson e Fridovich (Equações 4-7, 9, 12 e 13).

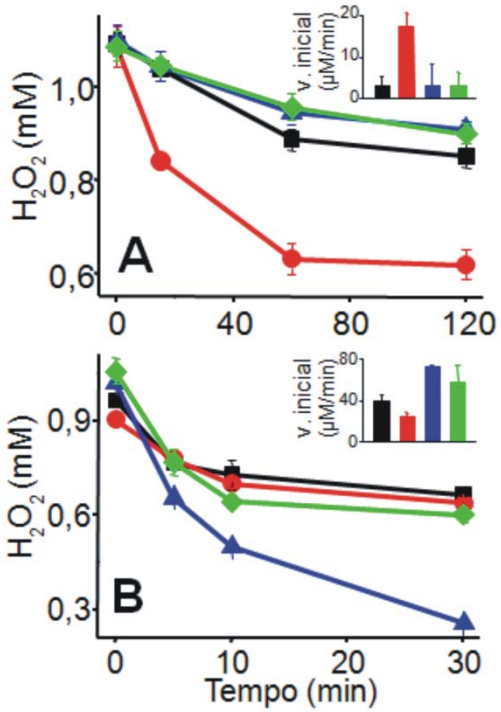


Figura 8. Consumo de peróxido de hidrogênio pela hSod1 na ausência e presença de nitrito, formato ou bicarbonato no pH 7,4 (A) e 10,4 (B). A curva preta corresponde ao consumo de peróxido de hidrogênio apenas pela hSod1, enquanto que as curvas coloridas indicam o consumo na presença de nitrito (azul), formato (verde) e bicarbonato (vermelha). As incubações foram feitas em tampão 10 mM pirofosfato, pH 7,4 ou 10,4, contendo 100 µM DTPA, 15 µM hSod1, 1 mM peróxido de hidrogênio e 10 mM nitrito, formato ou bicarbonato, quando presentes, a 37°C. Os insertos mostram a velocidade inicial de consumo de peróxido de hidrogênio calculada para cada curva experimental.

Para explorar em maior detalhe a ocorrência de mecanismos distintos da atividade peroxidásica da Sod1, foi investigada a oxidação do bicarbonato (em equilíbrio com dióxido de carbono e carbonato), do nitrito e do formato na faixa de pH que se estendeu de 6,4 a 10,4. Em virtude da sensibilidade das metodologias empregadas para monitorar a oxidação destas

espécies, foram empregadas concentrações menores da enzima (cinco a quinze vezes menores).

Bicarbonato e nitrito são oxidados a radical carbonato e dióxido de nitrogênio pela atividade peroxidásica da Sod1 e os fluxos destes radicais podem ser mensurados pela oxidação de dihidrorodamina (DHR) a rodamina (ε_{500nm} = 78800 $M^{-1}cm^{-1}$) (Zhang *et al.*2000; Bonini *et al.*, 2004; Wrona *et al.*, 2005). De acordo com o consumo de peróxido de hidrogênio, o bicarbonato promoveu um aumento da oxidação da DHR em pH 6,4 (18 vezes), 7,4 (9 vezes) e 8,4 (4,2 vezes), mas não em pH 10,4. Por outro lado, o efeito do nitrito foi discreto em pH 6,4 (não detectável), pH 7,4 (1,3 vezes) e pH 8,4 (1,8 vezes), mas pronunciado em pH 10,4 (3,5 vezes) (Figura 9).

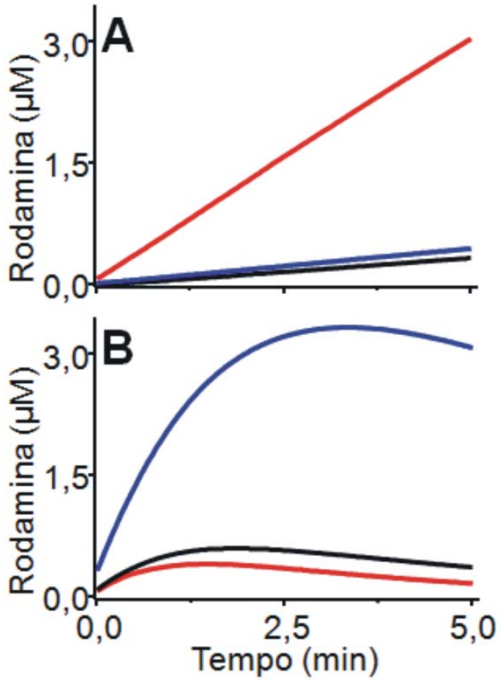


Figura 9. Oxidação da DHR pela hSod1 na ausência e presença de nitrito ou bicarbonato no pH 7,4 (A) e 10,4 (B). A curva preta corresponde à oxidação de DHR apenas pela hSod1/peróxido de hidrogênio, enquanto que as curvas coloridas indicam a oxidação na presença de nitrito (azul) e bicarbonato (vermelha). As incubações foram feitas em tampão 10 mM pirofosfato, pH 7,4 ou 10,4, contendo 100 µM DTPA, 100 µM DHR, 1 µM hSod1, 1 mM peróxido de hidrogênio e 10 mM nitrito ou bicarbonato, quando presentes, a 37°C.

A oxidação do formato produz o ânion radical dióxido de carbono que pode ser monitorado e distinguido do ânion radical carbonato pelo método de captação de spin com

DMPO. O DMPO reage com o ânion radical dióxido de carbono ($k = 7,5 \times 10^8\ M^{-1}\ s^{-1}$) (Faraggi *et al.*, 1984) e com o ânion radical carbonato ($k = 1,5 \times 10^6\ M^{-1}\ s^{-1}$) (Alvarez *et al.*, 2007) para produzir os adutos radicais DMPO/$^{\bullet}CO_2^-$ ($a_N = 15.8$ G; $a_H = 19.1$ G) e DMPO/$^{\bullet}OH$ ($a_N = 14.9$ G; $a_H = 14.9$ G), que foram detectados e quantificados por EPR.

Na ausência de bicarbonato e formato houve a formação de quantidades irrisórias de DMPO/$^{\bullet}OH$ devido à oxidação direta do captador de spin pela enzima. Da mesma forma, observou-se a oxidação basal de DHR na ausência de bicarbonato e nitrito (Figuras 9 e 10). Na presença de bicarbonato, houve considerável produção de DMPO/$^{\bullet}OH$, ou seja, de radical carbonato, nos pH 6,4, 7,4, e 8,4, mas não em 10,4. Em contrapartida, na presença de formato houve significativa produção de DMPO/$^{\bullet}CO_2^-$ apenas no pH 10,4 (Figuras 10 e 11).

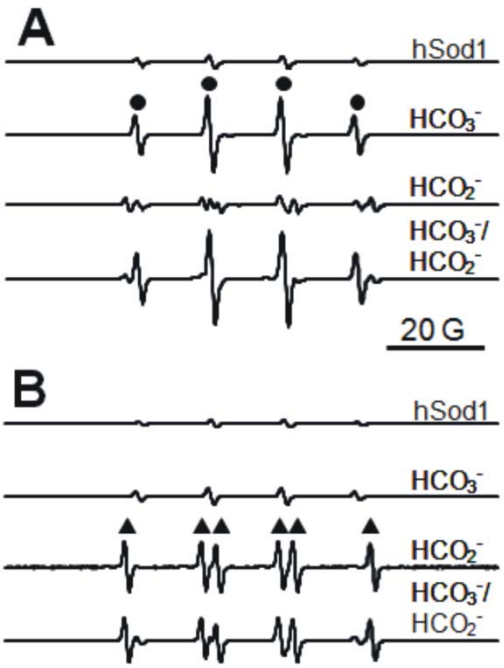


Figura 10. Espectros de EPR representativos dos adutos radicais produzidos durante a atividade peroxidásica da hSod1 na ausência ou presença de bicarbonato, formato ou ambos no pH 8,4 (A) e 10,4 (B). Cada espectro foi obtido após 20 min de incubação. Em dois deles, os sinais correspondentes aos espectros dos adutos radicais DMPO/$^{\bullet}OH$ (●) e DMPO/$^{\bullet}CO_2^-$ (▲) foram marcados para facilitar a comparação. As incubações foram feitas em tampão 10 mM pirofosfato, pH 8,4 ou 10,4, contendo 100 µM DTPA, 100 mM DMPO, 3 µM hSod1, 1 mM peróxido de hidrogênio e 10 mM bicarbonato e/ou formato, quando presentes, a 25°C. Os parâmetros do instrumento foram: potência, 20 mW; amplitude de modulação, 1,0 G; constante de tempo, 163,84 ms; velocidade de varredura, 0,6 G/s; e ganho, $2,0 \times 10^4$.

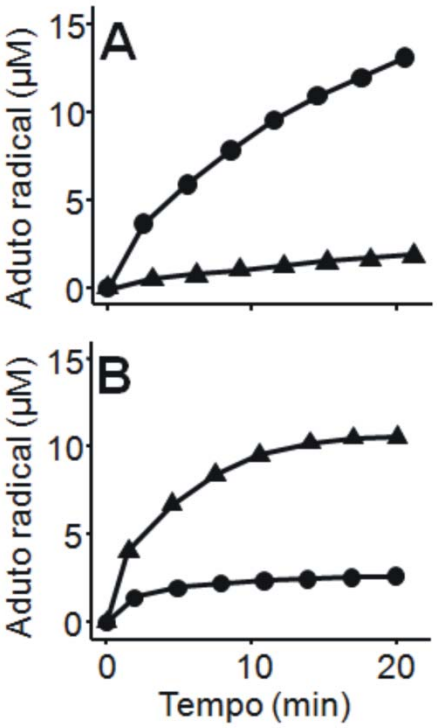


Figura 11. Cinética de produção dos adutos radicais DMPO/$^{\bullet}$OH (●) e DMPO/$^{\bullet}CO_2^-$ (▲) durante a atividade peroxidásica da hSod1 na presença de bicarbonato ou formato, respectivamente, no pH 8,4 (A) e 10,4 (B). As condições de incubação e os parâmetros do instrumento são os mesmos descritos na Figura 10.

Estes resultados, em conjunto com os de consumo de peróxido de hidrogênio e oxidação da DHR, confirmaram a proposta de Liochev e Fridovich de que o dióxido de carbono desempenha papel crucial no efeito do tampão bicarbonato sobre a atividade peroxidásica da Sod1 (Liochev & Fridovich, 2004). Além disso, também demonstraram que tanto nitrito quanto formato são de fato oxidados pela espécie SodCu(II)(OH$^{\bullet}$), aumentando o consumo de peróxido de hidrogênio e produzindo dióxido de nitrogênio e ânion radical dióxido de carbono, respectivamente. Digno de nota, o experimento de captação de spin na presença de bicarbonato e formato em pH 8,4, no qual a concentração de dióxido de carbono em equilíbrio com bicarbonato foi de 100 µM frente a 10 mM de formato, produziu quase exclusivamente o aduto radical DMPO/$^{\bullet}$OH, demonstrando que não existe competição entre dióxido de carbono e formato pelo oxidante SodCu(II)(OH$^{\bullet}$) (Figura 10).

Assim, a comparação sistemática das influências de bicarbonato, nitrito e formato no "turnover" da enzima em função do pH indicou que o radical carbonato não é produzido pela oxidação do dióxido de carbono pelo intermediário SodCu(II)($OH^{\bullet}$) conforme proposto por Liochev e Fridovich (Equações 12 e 13) (Liochev & Fridovich, 2004).

Ao invés disso, o peroxomonocarbonato em equilíbrio com o peróxido de hidrogênio em tampão bicarbonato poderia ser o precursor do radical carbonato produzido durante a atividade peroxidásica da Sod1 (Equações 14 e 15).

$$HCO_3^- + H_2O_2 \rightleftharpoons HCO_4^- + H_2O \quad (K = 0{,}31\ M^{-1}) \quad \text{(Eq.14)}$$

$$CO_2 + H_2O^- \longrightarrow HCO_4^- \quad \text{(Eq.15)}$$

De fato, esta hipótese foi levantada por Elam *et al.* (Equações 10 e 11) mas foi severamente refutada (ou ignorada) em artigos posteriores sobre a atividade peroxidásica da Sod1 (Medinas *et al.*, 2007). No nosso entendimento, isto decorreu da falta de evidências claras em favor do papel do peroxomonocarbonato no trabalho de Elam *et al.* bem como da limitada compreensão sobre a formação e reatividade desta espécie. Por exemplo, a Equação 14 apenas reflete o equilíbrio entre peroxomonocarbonato e peróxido de hidrogênio em tampão bicarbonato, ao passo que a reação responsável pelo estabelecimento deste equilíbrio deve ocorrer entre o dióxido de carbono e o peróxido de hidrogênio desprotonado (Equação 15), isto é, as duas espécies efetivamente envolvidas na atividade peroxidásica da Sod1. Desta forma, investigamos a participação do peroxomonocarbonato no mecanismo de produção do radical carbonato pela Sod1.

4.5 Interação do peroxomonocarbonato com a Sod1

Conforme descrito anteriormente, o peroxomonocarbonato existe em equilíbrio com o peróxido de hidrogênio em tampão bicarbonato (Equação 14). Assim, procurou-se examinar possíveis interações moleculares do peroxomonocarbonato com a Sod1 que fornecessem

subsídios para a compreensão de seu envolvimento na produção do radical carbonato pela enzima.

Para tal, foi utilizada a técnica de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (^{13}C RMN) que permitiu a detecção e quantificação do peroxomonocarbonato e bicarbonato em equilíbrio no pH 7,4. Além disso, o estudo foi efetuado com as proteínas humana e bovina nas quais o íon de cobre foi substituído por zinco. A forma Zn,ZnSod1 conserva a geometria do sítio ativo mas não possui atividade enzimática porque o íon de zinco não catalisa reações de oxirredução. Assim, foi possível evitar o consumo de peróxido de hidrogênio e peroxomonocarbonato bem como a destruição da proteína por radicais livres. O procedimento envolveu a incubação de ^{13}C-bicarbonato com altas concentrações de peróxido de hidrogênio para se atingir concentrações de peroxomonocarbonato próximas a da Sod1 (Trindade *et al.*, 2006). A análise da proteína por dicroísmo circular não mostrou mudanças significativas em sua estrutura secundária pela incubação com o peróxido de hidrogênio (Figura 12). Segundo a deconvolução dos espectros, a hZn,ZnSod1 é composta por 8% de α-hélice, 46% de folha-β e 46% de alças, enquanto que a composição após o tratamento com o peróxido de hidrogênio foi de 8% de α-hélice, 45% de folha-β e 47% de alças.

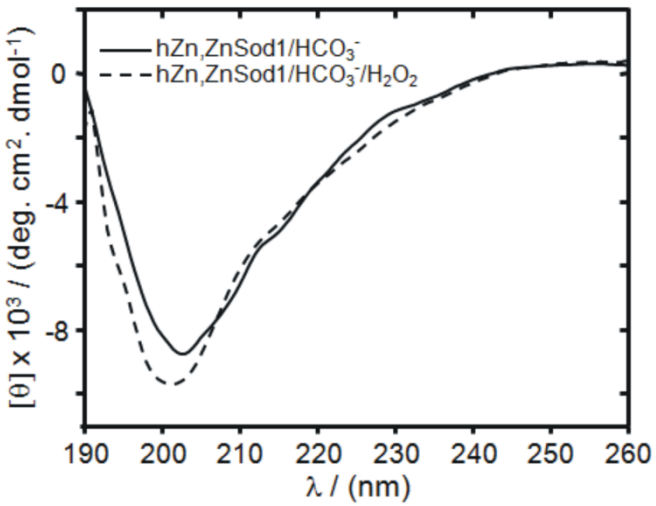


Figura 12. Espectros de dicroísmo circular da hZn,ZnSod1 incubada com 25 mM bicarbonato na ausência (linha cheia) e presença (linha pontilhada) de 600 mM peróxido de hidrogênio conforme descrito em Materiais de Métodos.

A comparação dos espectros de ^{13}C RMN na ausência e presença da Zn,ZnSod1 revelou interações da proteína com bicarbonato e peroxomonocarbonato devido ao alargamento dos picos de ressonância destas espécies (Figura 13).

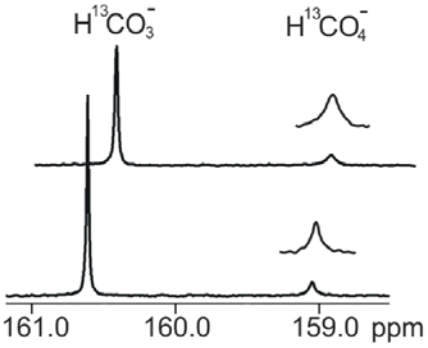


Figura 13. Espectros de RMN de carbono-13 da incubação de ^{13}C-bicarbonato com peróxido de hidrogênio na ausência e presença de hZn,ZnSod1. As incubações consistem de 25 mM ^{13}C-bicarbonato, 100 µM DTPA, 600 mM peróxido de hidrogênio na ausência (espectro de baixo) e presença (espectro de cima) de 500 µM de hZn,ZnSod1 no pH 7,4. O espectro de cima foi deslocado para a direita e o pico do peroxomonocarbonato de ambos os espectros ampliados para melhor visualização. Os espectros foram adquiridos 25 min após o início da incubação conforme descrito em Materiais e Métodos.

Para melhor compreender o efeito da Zn,ZnSod1, as concentrações de bicarbonato e peroxomonocarbonato em equilíbrio foram determinadas e as constantes de equilíbrio para cada condição experimental calculadas (Trindade *et al.*, 2006). Ainda, o alargamento dos picos de ressonância do bicarbonato e peroxomonocarbonato foram mensurados e expressos como a largura de banda a meia altura do pico. Estes dados foram organizados na Tabela 2 e mostraram um aumento de aproximadamente 30% no valor da constante de equilíbrio bem como um maior alargamento do pico do peroxomonocarbonato em comparação ao do bicarbonato tanto na presença da Sod1 humana quanto bovina. A adição do complexo zinco-histidina ($ZnHis_2$) não teve influência na largura do pico das espécies e nem na constante de equilíbrio, indicando que o peroxomonocarbonato e o bicarbonato interagem com resíduos da proteína. De fato, experimentos similares de ^{31}P RMN demonstraram a ligação de fosfato ao resíduo conservado de arginina localizado no canal iônico do sítio ativo da enzima (Valentine e deFreitas, 1986; deFreitas *et al.*, 1987). Este resíduo de arginina é essencial a atividade

superóxido dismutase e poderia assistir à formação do peroxomonocarbonato e a sua redução ao radical carbonato (Equação 11).

Tabela 2. Efeito da Zn,ZnSod1 nos picos de ^{13}C RMN do bicarbonato e peroxomonocarbonato e nos valores da constante de equilíbrio destas espécies[a]

Incubação	Largura de banda a meia altura do pico (Hz)			K (M^{-1})[b]
	$H^{13}CO_2^-$	$H^{13}CO_3^-$	$H^{13}CO_4^-$	
$H^{13}CO_3^-$-$^{13}CO_2/H_2O_2$	3,0	2,6	7,4	0,27 ± 0,02
+ hZn,ZnSod1	3,0	3,2	9,5	0,35 ± 0,02
+ bZn,ZnSod1	2,9	3,4	11,4	0,34 ± 0,02
+ $ZnHis_2$	3,0	2,4	7,6	0,28 ± 0,02

[a] Os espectros de ^{13}C RMN foram obtidos 25 min após o início da incubação entre 25 mM ^{13}C-bicarbonato e 600 mM peróxido de hidrogênio, contendo 100 µM DTPA e na ausência ou presença de 500 µM Zn,ZnSod1 ou 500 µM $ZnHis_2$, em pH 7,4 e 25°C.
[b] As constantes de equilíbrio foram determinadas conforme descrito em Trindade *et al.*, 2006.

Para testar esta hipótese, foi feita a modelagem molecular do peroxomonocarbonato e do bicarbonato no sítio ativo da hSod1 a partir de dados cristalográficos disponíveis para as espécies aniônicas e também para a proteína. A modelagem mostrou que o grupo carboxilato do peroxomonocarbonato forma duas ligações de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo conservado de arginina (Arg^{143}), ao passo que o bicarbonato estabelece apenas uma ligação de hidrogênio (Figura 14).

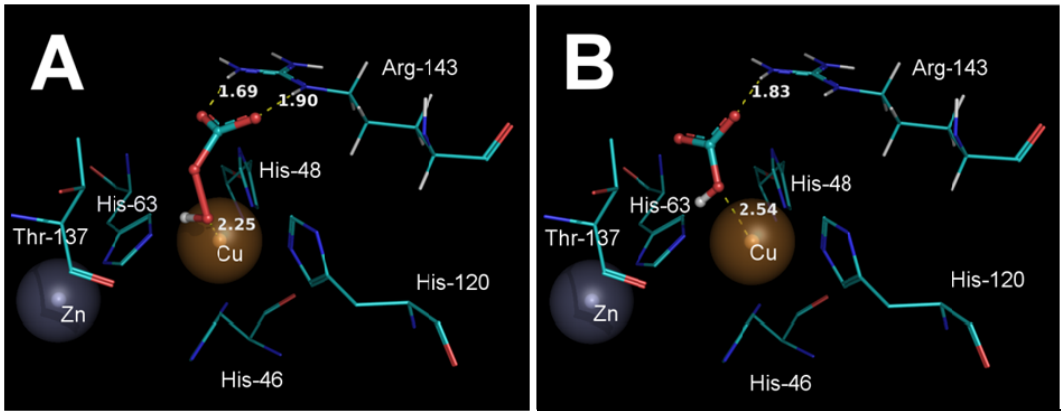


Figura 14. Modelagem molecular do peroxomonocarbonato (A) e bicarbonato (B) no sítio ativo da hSod1. Detalhes da modelagem e representação gráfica estão descritos em Materiais e Métodos. Os elementos estão representados pelas seguintes cores: cobre, dourado; zinco, cinza; carbono, azul claro; oxigênio, vermelho; nitrogênio, azul; hidrogênio, branco.

Este resultado condiz com os de ^{13}C RMN que evidenciaram maior interação entre peroxomonocarbonato e a Sod1 do que bicarbonato e a Sod1, haja vista a diferença de alargamento do pico de ressonância das duas espécies (Figura 13 e Tabela 2). Além disso, o pareamento entre o grupo guanidínio do resíduo de arginina com o grupo carboxilato do peroxomonocarbonato orientou o grupo peroxo frente ao íon de cobre catalítico, o que provavelmente deve facilitar a redução do peroxomonocarbonato ao radical carbonato difusível.

4.6 Reação do peroxomonocarbonato com a hSod1

Para demonstrar que o peroxomonocarbonato pode ser reduzido ao radical carbonato pela Sod1 foi empregada cinética de fluxo interrompido com mistura assimétrica para comparação da velocidade de produção do radical carbonato em diferentes concentrações iniciais de peroxomonocarbonato (0 e 300 μM). As condições experimentais empregadas (5 mM peróxido de hidrogênio e pH 8,4) foram escolhidas para manter a enzima reduzida no estado estacionário.

Na mistura de 25 volumes de hSod1/bicarbonato-dióxido de carbono/DHR com 1 volume de peróxido de hidrogênio se obteve uma produção linear de radical carbonato sem nenhuma fase de indução (Figura 15, linha sólida inferior). Em contrapartida, a mistura de 25 volumes de hSod1/DHR com 1 volume de peróxido de hidrogênio equilibrado com bicarbonato-dióxido de carbono ocasionou uma rápida produção inicial de radical carbonato que logo se igualou à produção da mistura controle (Figura 15, linha sólida superior). Esta rápida produção de radical carbonato se deveu às altas concentrações de peroxomonocarbonato na solução de peróxido de hidrogênio pré-equilibrado com bicarbonato-dióxido de carbono (~ 9 mM). Imediatamente após a mistura, a concentração esperada de peroxomonocarbonato na incubação foi de 300 μM, ou seja, bem maior do que a

concentração de 15 μM atingida após o estabelecimento do equilíbrio na incubação. De fato, logo que o peroxomonocarbonato voltou a sua concentração de equilíbrio as velocidades de produção de radical carbonato em ambas as incubações se tornaram iguais (Figura 15, linhas sólidas). Indubitavelmente, este resultado demonstrou que a Sod1 pode reduzir o peroxomonocarbonato ao radical carbonato difusível.

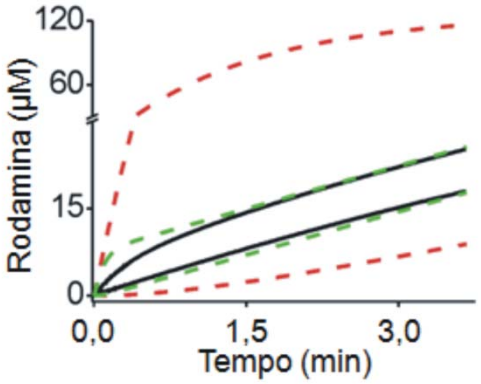


Figura 15. Cinética de fluxo interrompido (linhas sólidas) e simulações (linha pontilhadas) da oxidação da DHR pela hSod1 na presença de bicarbonato pré-incubado com a enzima (linhas inferiores) ou com o peróxido de hidrogênio (linhas superiores). Neste caso, a mistura assimétrica permitiu uma alta concentração inicial de peroxomonocarbonato (~300 μM) conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram feitos a 25°C e as concentrações finais em ambas as misturas foram de 3 μM hSod1, 100 μM DTPA, 100 μM DHR, 10 mM bicarbonato e 5 mM peróxido de hidrogênio em tampão 10 mM pirofosfato, pH 8,4. Tanto a solução da enzima quanto a de peróxido de hidrogênio foram feitas em tampão 10 mM pirofosfato, pH 8,4 para evitar variação de pH devido à mistura. As simulações cinéticas mostradas em linhas pontilhadas vermelhas foram obtidas a partir das reações e constantes de velocidade experimentais da Tabela 3. As simulações cinéticas das linhas pontilhadas verdes são obtidas quando as constantes de velocidade k_{14} e k_{-14} são multiplicadas por um fator de 19.

Assim, os dados de ^{13}C RMN, de modelagem molecular e de cinética corroboram que o peroxomonocarbonato seja o precursor do radical carbonato na atividade peroxidásica da Sod1. Contudo, tantos os dados de ^{13}C RMN quanto os de cinética indicaram que a enzima pode influenciar o equilíbrio do peroxomonocarbonato, sugerindo que a espécie precursora do radical carbonato possa ser formada no sítio ativo da enzima previamente a sua redução. Desta maneira, esta possibilidade foi avaliada por simulação cinética dos dados de fluxo interrompido.

4.7 Simulação cinética da atividade peroxidásica da hSod1

Para realizar a simulação cinética dos dados do fluxo interrompido foi calculada uma constante de segunda ordem hipotética para a reação entre peroxomonocarbonato e Cu(I),ZnSod1. O cálculo desta constante foi baseado no período em que a enzima se encontrava em estado estacionário, pois as concentrações de peroxomonocarboanto e de enzima reduzida eram conhecidas (ver Materiais e Métodos). Assim, o valor de 2 x 10^3 $M^{-1}s^{-1}$ em conjunto com outras constantes conhecidas na literatura foram empregados para simular os dados cinéticos da Figura 15 (Tabela 3).

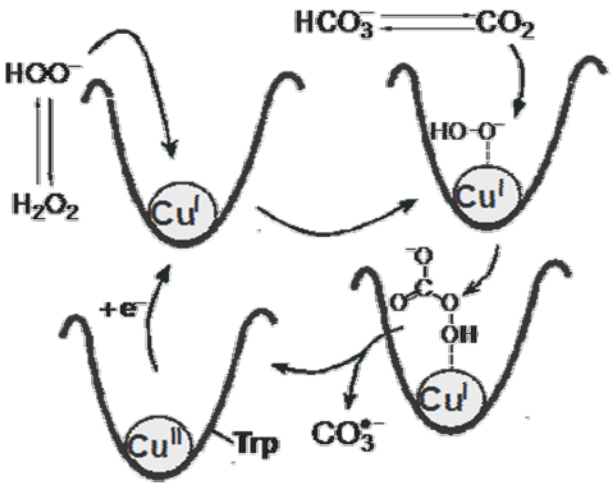
Tabela 3. Reações e constantes de velocidade empregadas na simulação da atividade peroxidásica da hSod1 na presença de bicarbonato em pH 8,4 e 25°C[a]

Reação[b]	Constantes de velocidade	Observações
$SodCu(II) + H_2O_2 \leftrightarrows SodCu(I) + O_2^{\bullet-} + 2\ H^+$ (Eq.4)	$k_4 = 500\ M^{-1}s^{-1}$ $k_{-4} = 2 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$	Valor de k_4 para pH 8,4[c]
$SodCu(II) + O_2^{\bullet-} \rightarrow SodCu(I) + O_2$ (Eq.1)	$k_1 = 2 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$	
$HCO_3^- + H_2O_2 \leftrightarrows HCO_4^-$ (Eq.14)	$k_{14} = 3{,}1 \times 10^{-3}\ M^{-1}s^{-1}$ $k_{-14} = 9{,}9 \times 10^{-3}\ s^{-1}$	k_{14} e k_{-14} obtidos em pH 7,2[d]
$SodCu(I) + HCO_4^- \rightarrow SodCu(II) + CO_3^{\bullet-} + OH^-$ (Eq.16)	$k_{16} = 2{,}0 \times 10^3\ M^{-1}s^{-1}$	Este trabalho[e]

[a] Os dados experimentais (linhas cheias) e simulações (linhas pontilhadas) estão apresentados na Figura 15.
[b] As reações estão numeradas conforme as equações que aparecem no texto.
[c] Valor de k_4 determinado em pH 7,4 por Liochev & Fridovich, 2002.
[d] Valores determinados por Trindade *et al.*, 2006.
[e] O valor hipotético de k_{16} foi estimado dos dados da Figura 15 conforme descrito em Materiais e Métodos.

Claramente, as reações e constantes utilizadas não simularam os dados experimentais (Figura 15, linhas pontilhadas vermelhas e linhas sólidas pretas). O esperado pela simulação seria um efeito muito mais proeminente da elevada concentração inicial de peroxomonocarbonato e também um período de indução pronunciado na mistura controle. De acordo com a influência da Sod1 no equilíbrio do peroxomonocarbonato, os resultados experimentais puderam ser simulados quando as constantes de formação (k_{14}) e decaimento (k_{-14}) do peroxomonocarbonato foram multiplicadas por um fator de 19 (Figura 15, linhas pontilhadas verdes).

Por conseguinte, a produção do radical carbonato durante a atividade peroxidásica da Sod1 não depende da difusão do peroxomonocarbonato do meio aquoso para o sítio ativo da enzima, mas sim da formação do peroxomonocarbonato assistida pela arginina do canal iônico previamente a sua redução. Desta forma, propusemos o seguinte esquema para o ciclo da atividade peroxidásica da Sod1 em tampão bicarbonato (Esquema 3).



Esquema 3. Mecanismo de produção do radical carbonato pela atividade peroxidásica da Sod1 envolvendo a redução do intermediário peroxomonocarbonato formado no sítio ativo da enzima.

4.8 Análise das formas de hSod1 presentes nas medulas de ratos transgênicos modelo de ELA que superexpressam a proteína mutante G93A

A superexpressão das mutantes da hSod1 relacionadas à ELA acarreta a degeneração de neurônios motores em roedores e constitui uma ferramenta importante para o estudo da patologia nos níveis celular e molecular (Howland *et al.*, 2002). Além disso, apesar de estudos bioquímicos e biofisícos das mutantes da hSod1 terem contribuído muito para a identificar diferenças importantes entre a hSod1 nativa e as mutantes da ELA, nenhuma característica comum a todas as mutantes foi descrita para explicar o ganho de função tóxica da hSod1 em ELA (Shaw & Valentine, 2007). Ainda, a compreensão da toxicidade da hSod1 nos neurônios motores deve considerar sua distribuição intracelular, interações com outras proteínas e modificações pós-traducionais que levem à disfunção celular (Rothstein, 2009) e não apenas

aspectos moleculares *per se*. Desta maneira, o estudo das formas de hSod1 extraídas de tecidos afetados de modelos de ELA constitui uma abordagem mais promissora para a identificação das espécies tóxicas da proteína.

De grande relevância para o estudo da ELA, Gruzman *et al.* descreveram uma espécie imunoreativa para o anticorpo contra a hSod1 em pacientes esporádicos e familiares da doença que migra como um dímero covalente da proteína apesar do tratamento da amostra com redutor de ligação dissulfeto (Gruzman *et al.*, 2007). Ainda, Shaw e Valentine recapitularam a detecção por Western-blot de um suposto dímero covalente de hSod1 em humanos, roedores e células em cultura e enfatizaram que esta espécie pode ser uma característica comum das mutantes da hSod1 implicadas em ELA devido sua detecção em preparações de diferentes tipos de mutantes (Shaw & Valentine, 2007).

No que tange à atividade peroxidásica da hSod1, Zhang *et al.* demonstraram *in vitro* que o radical carbonato difusível produzido no "turnover" da enzima pode atacar o resíduo de triptofano 32 (Trp^{32}) culminando com a formação de um dímero covalente da proteína que resiste a redutores de ligação dissulfeto (Zhang *et al.*, 2003).

Em função do potencial papel tóxico da atividade peroxidásica da hSod1 em ELA (Wiedau-Pazos *et al.*, 1996), investigou-se a relação entre o dímero covalente da hSod1 observado *in vitro* e o suposto dímero covalente da hSod1 proveniente das medulas dos ratos transgênicos que superexpressam a mutante G93A da enzima.

A primeira questão abordada diz respeito à migração destas espécies na eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e redutoras. Digno de nota, alguns trabalhos sugerem a detecção de um dímero covalente de hSod1 *in vivo* mas reportam uma migração eletroforética de 32 kDa (Turner *et al.*, 2003; Gruzman *et al.*, 2007). Este seria o caso não fosse a migração eletroforética anormal da hSod1, cuja subunidade migra em 21 kDa nestas condições experimentais (Figura 4). De acordo, o dímero covalente da hSod1

produzido durante a sua atividade peroxidásica *in vitro* migra em 42 kDa. Ainda, a análise do extrato de proteínas das medulas dos ratos transgênicos que superexpressam a hSod1 na mesma corrida de eletroforese revelou que a migração do suposto dímero covalente deste modelo experimental de ELA corresponde à migração do dímero covalente obtido *in vitro* (Figura 16). Desta maneira, parece plausível que o suposto dímero covalente encontrado *in vivo* equivalha ao dímero da hSod1 produzido a partir da oxidação do Trp^{32} da proteína.

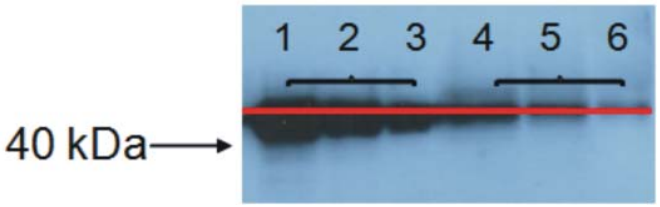


Figura 16. Análise por Western-blot para a hSod1 da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante de extratos de proteínas das medulas dos ratos transgênicos modelo de ELA. As amostras 1 a 3 correspondem a 10, 5 e 2 ng do dímero covalente da hSod1 formado *in vitro*. As amostra 4 a 6 correspondem a 50, 25 e 10 µg de proteína total de medulas dos ratos com sintomas típicos de ELA. As condições de preparação dos extratos de proteínas das medulas estão descritas em Materiais e Métodos.

Além disso, a quantificação da proteína por densitometria de banda indicou que o suposto dímero corresponde a aproximadamente 0,5–1% do total da hSod1 expressa nas medulas dos ratos transgênicos. Não obstante, a alta expressão de hSod1 necessária para desencadear a degeneração dos neurônios motores em roedores indica que a espécie neurotóxica da proteína seja mesmo pouco abundante, como o suposto dímero covalente. Para verificar se existe alguma correlação entre o suposto dímero da hSod1 e o desenvolvimento de ELA, comparou-se a expressão da hSod1 nos ratos transgênicos pré-sintomáticos e sintomáticos (Figura 17).

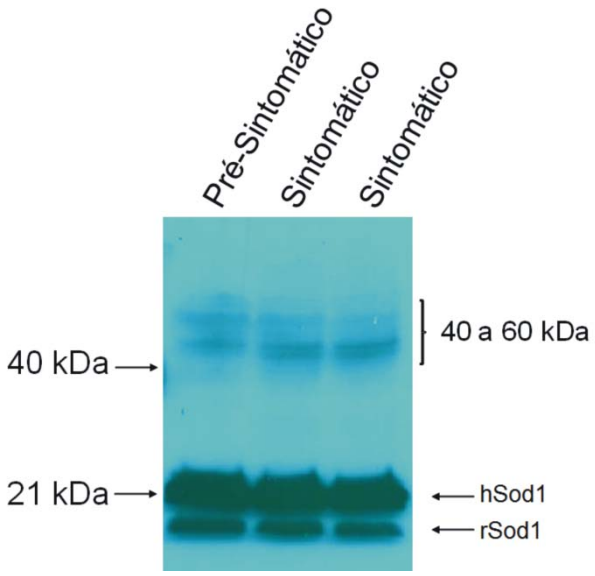


Figura 17. Análise por Western-blot para a hSod1 da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante dos extratos totais de proteínas das medulas dos ratos modelo de ELA em função da manifestação de sintomas conforme indicado. As condições de preparação dos extratos de proteínas das medulas estão descritas em Materiais e Métodos.

Surpreendentemente, esta análise mostrou a ocorrência de múltiplas espécies imunoreativas para o anticorpo da hSod1 na região de peso molecular associada ao dímero covalente, sendo que uma delas está correlacionada com o aparecimento dos sintomas. Sendo assim, foi feita a análise das amostras por eletroforese bidimensional para se constatar o número de diferentes formas de hSod1 provenientes das medulas dos ratos transgênicos que aparentemente migram como um dímero covalente da proteína (Figura 18).

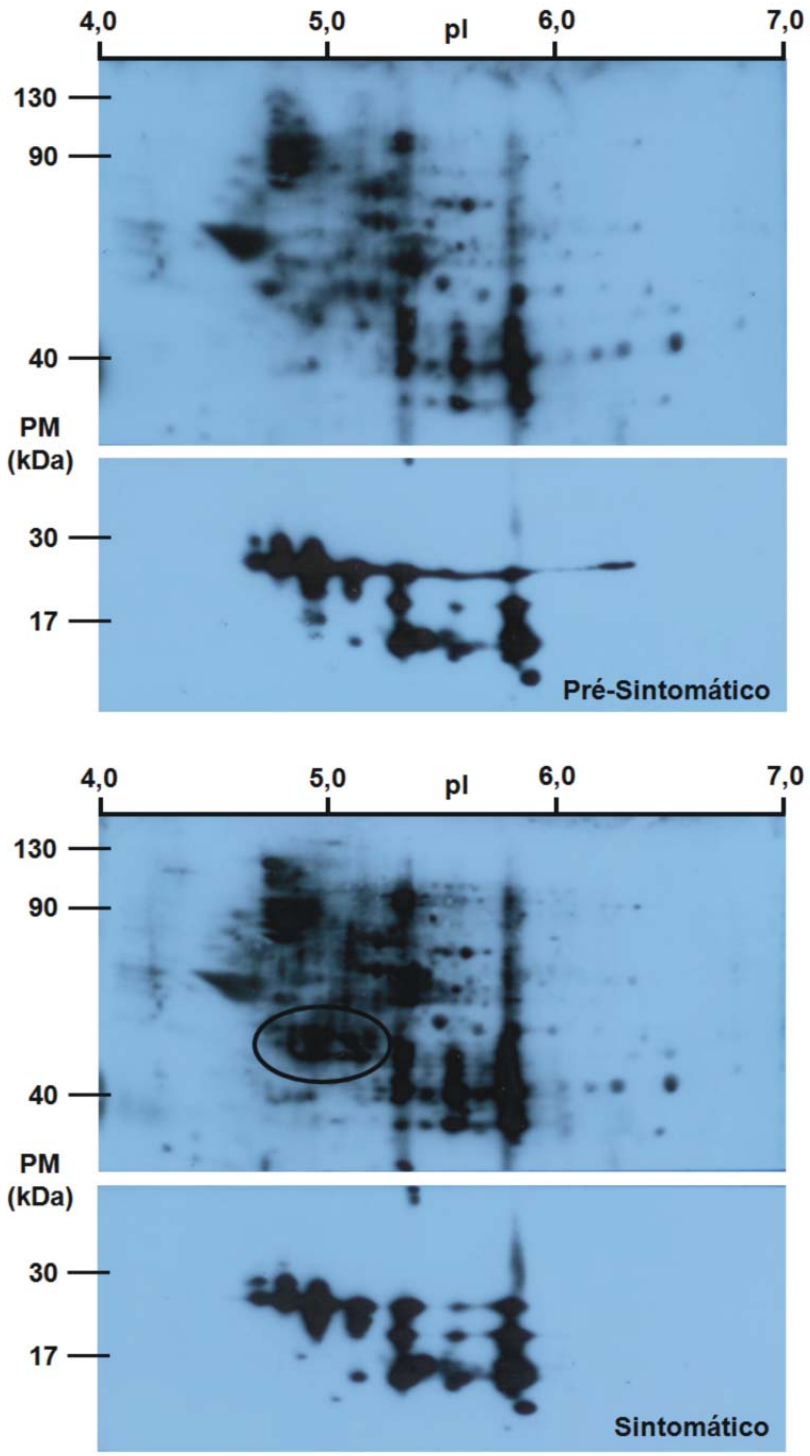


Figura 18. Análise por Western-blot para a hSod1 da eletroforese bidimensional dos extratos totais de proteínas das medulas dos ratos modelo de ELA em função da manifestação de sintomas conforme indicado. As espécies de hSod1 correlacionadas com o aparecimento de sintomas foram destacadas. As condições de preparação dos extratos de proteínas das medulas e procedimentos da eletroforese bidimensional estão descritos em Materiais e Métodos. PM: peso molecular. pI: ponto isoelétrico.

Embora algumas das marcações do Western-blot sejam devido ao reconhecimento inespecífico do anticorpo contra a hSod1, a existência de inúmeras espécies possivelmente

relacionadas ao suposto dímero covalente da proteína é inquestionável. Vale salientar ainda que as espécies correlacionadas com a manifestação dos sintomas típicos de ELA possuem ponto isoelétrico (pI) ao redor de 5,0 e migram ligeiramente acima da banda de 40 kDa do padrão de peso molecular, assim como esperado para o dímero covalente oriundo da atividade peroxidásica da hSod1.

Apesar de constituírem um bom indício, as coordenadas de ponto isoelétrico e peso molecular da proteína na eletroforese bidimensional são insuficientes para atestar a equivalência entre as espécies formadas *in vitro* e *in vivo*. Desta forma, procedeu-se com a caracterização do dímero covalente da hSod1 produzido *in vitro* por proteólise e espectrometria de massa para a obtenção de um marcador bioquímico desta espécie que servirá como ferramenta essencial no estudo das formas de hSod1 presentes *in vivo*.

4.9 Obtenção e purificação do dímero covalente da hSod1 produzido durante a atividade peroxidásica da enzima

O dímero covalente da hSod1 descrito por Zhang *et al.* (2003) foi obtido pela incubação da enzima com peróxido de hidrogênio em tampão bicarbonato e purificado por cromatografia de exclusão após um tratamento desnaturante, redutor e alquilante da proteína (Figura 19A). A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida mostrou um alto rendimento da dimerização (~ 20-25% da proteína total) bem como a pureza das frações do dímero covalente e do monômero (Figura 19B). Além disso, a cromatografia de exclusão também evidenciou a formação de trímero e tetrâmero covalentes, embora numa quantidade muito menor (Figura 19A).

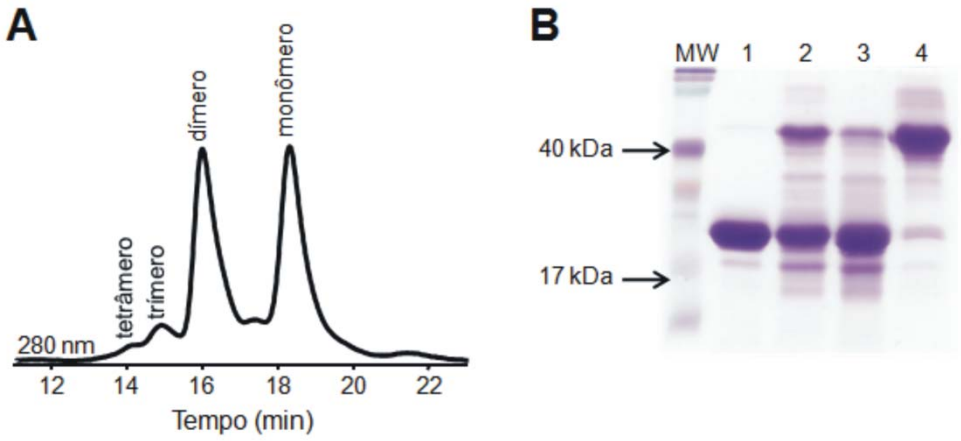


Figura 19. Oligomerização covalente da hSod1 durante sua atividade peroxidásica na presença de bicarbonato. A incubação foi feita em tampão 200 mM bicarbonato de sódio (equilibrado com 50% CO_2 e 50% ar), pH 7,4 contendo 100 µM de DTPA, 10 µM hSod1 e 1 mM peróxido de hidrogênio por 2 horas a 25°C. Após a incubação oxidante, a proteína foi submetida a um tratamento desnaturante, redutor e alquilante descrito em Materiais e Métodos. A – A proteína desnaturada/reduzida/alquilada foi submetida à cromatografia de exclusão para purificação dos oligômeros covalentes. B – Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante da hSod1 controle (1), hSod1 incubada com peróxido de hidrogênio (2), fração da cromatografia de exclusão correspondente ao monômero oxidado (3) e fração da cromatografia de exclusão correspondente ao dímero covalente da hSod1 (4). MW: marcador de peso molecular.

Com base em experimentos de captação de spin e mutação sítio dirigida, Zhang *et al.* (2003) demonstraram que a dimerização covalente da hSod1 depende completamente da oxidação do único resíduo de triptofano da proteína, ou seja, do resíduo triptofano 32 (Trp^{32}). Contudo, os resíduos efetivamente envolvidos na ligação covalente entre as subunidades, bem como a estrutura do aduto, não foram determinados. Para tal, procedeu-se a digestão por tripsina seguida pela análise comparativa dos peptídeos provenientes do monômero da hSod1 não tratada com peróxido de hidrogênio (controle ou monômero nativo), do monômero da hSod1 obtido na cromatografia de exclusão (monômero oxidado) e do dímero covalente da hSod1 para identificação de peptídeos trípticos característicos da proteólise do dímero covalente, os quais poderão ser empregados como marcadores bioquímicos desta espécie.

4.10 Análise dos peptídeos trípticos da hSod1 por HPLC/UV-vis e HPLC/ESI-MS

A análise comparativa dos peptídeos trípticos do monômero nativo, monômero oxidado e dímero covalente da hSod1 por HPLC/UV-vis e HPLC/ESI-MS (Figura 20), combinada

com os dados da digestão tríptica da proteína *in silico*, identificou o peptídeo contendo o resíduo Trp^{32} (Figura 20A, pico 1, tempo retenção = 42,4 min e massa = 688,5 Da) no monômero nativo e peptídeos contendo os produtos de oxidação do resíduo de triptofano, quinurenina (Kyn) e N-formil-quinurenina (FMK), (Figura 20A, picos 2 e 3, tempo de retenção = 39,7 e 41,3 min e massa = 692,4 e 720,6 Da, respectivamente) no monômero oxidado.

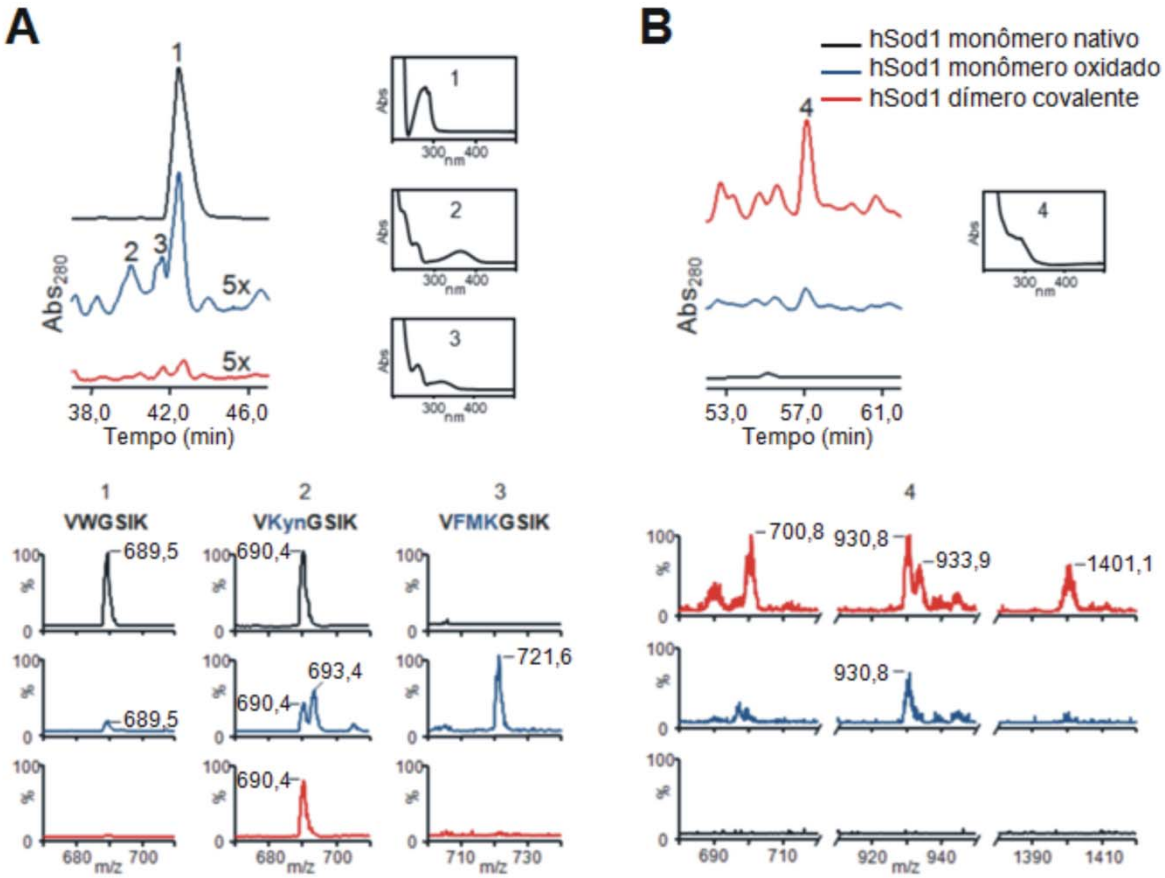


Figura 20. Análise comparativa dos peptídeos trípticos da hSod1 por HPLC/UV-vis e HPLC/ESI-MS. A – A hSod1 controle (monômero nativo) e as frações monômero oxidado e dímero covalente da hSod1 da cromatografia de exclusão foram digeridas com tripsina e submetidas à cromatografia de fase reversa. A análise por UV-vis e espectrometria de massa identificou os picos 1, 2 e 3, que correspondem ao peptídeo tríptico da hSod1 contendo o resíduo Trp^{32} e seus produtos de oxidação, quinurenina (Kyn) e N-formil-quinurenina (FMK), respectivamente. B – Espectros UV-vis e de massa do pico 4, que corresponde a um peptídeo tríptico obtido exclusivamente da proteólise do dímero covalente da hSod1.

Contudo, a inspeção dos dados de HPLC/UV-vis e HPLC/ESI-MS para o dímero covalente da hSod1 não encontrou nenhum peptídeo contendo o resíduo Trp^{32} ou os respectivos produtos de oxidação. Este fato evidencia que ambos resíduos de triptofano

estejam comprometidos na ligação covalente entre as subunidades da hSod1. O produto principal da digestão do dímero covalente (Figura 20B, pico 4, tempo de retenção = 57,2 min e massa = 2799,4 Da) possui um espectro de UV-vis característico, que se assemelha ao espectro de UV-vis do resíduo de triptofano (Figura 20B). Além disso, a análise por HPLC/ESI-MS detectou três estados de carga deste produto (m/z = 1400,1, 933,9 e 700,8), que devem refletir o peptídeo com duas, três e quatro cargas, respectivamente, e uma massa molecular média de 2799,4 Da (Figura 20B).

Digno de nota, este peptídeo foi observado apenas na digestão do dímero covalente da hSod1. Também, a digestão *in silico* da hSod1 com tripsina, combinada com incrementos de massa referentes a modificações oxidativas conhecidas em resíduos de proteínas, não foram capazes de prever um peptídeo de massa 2799,4 Da, indicando que este peptídeo pode conter a ligação covalente entre subunidades. Desta forma, procederam-se os experimentos para confirmar a natureza dimérica deste peptídeo.

4.11 Marcação do C-terminal dos peptídeos trípticos da hSod1 pela digestão da proteína em meio de água marcada com o isótopo de oxigênio-18 ($H_2{}^{18}O$)

As análises de espectrometria de massa seguintes foram feitas por Q-Tof-MS, que permitiu a determinação exata da massa monoisotópica do peptídeo correspondente ao pico 4 da Figura 20B. O espectro de massa do peptídeo apresentou novamente três estados de carga, que puderam ser atribuídas sem ambiguidade com base na separação de picos no envelope isotópico[2], ao peptídeo contendo três, quatro e cinco cargas (Figura 21A, m/z do primeiro pico de cada envelope igual a 933,49, 700,37 e 560,50, respectivamente), confirmando a conclusão dos dados anteriores. Assim, a massa monoisotópica do peptídeo é de 2797,5 Da, enquanto que sua massa média calculada previamente é de 2799,4 Da. Estes valores concordam bem

[2] Envelope isotópico é o termo utilizado para designar o conjunto de picos do espectro de massa de um peptídeo provenientes da ocorrência natural de isótopos de carbono-13 na molécula.

com a diferença de aproximadamente 0,06% entre massa monoisotópica e massa média para peptídeos e proteínas.

Em seguida, foram analisados os peptídeos trípticos obtidos da digestão do dímero covalente da hSod1 em H_2O e $H_2{}^{18}O$. A proteólise em $H_2{}^{18}O$ leva a incrementos de dois e/ou quatro Dalton na massa do peptídeo em virtude da incorporação de um e/ou dois átomos de ^{18}O durante a hidrólise (o primeiro átomo de ^{18}O é incorporado na etapa de hidrólise da ligação peptídica e o segundo pode ser adicionado na troca de oxigênio com a água catalisada pela tripsina). Esta abordagem claramente distingue peptídeos lineares de peptídeos diméricos porque a marcação de dois C-terminais com átomos de ^{18}O produz incrementos de quatro, seis e oito Dalton na massa do peptídeo dimérico.

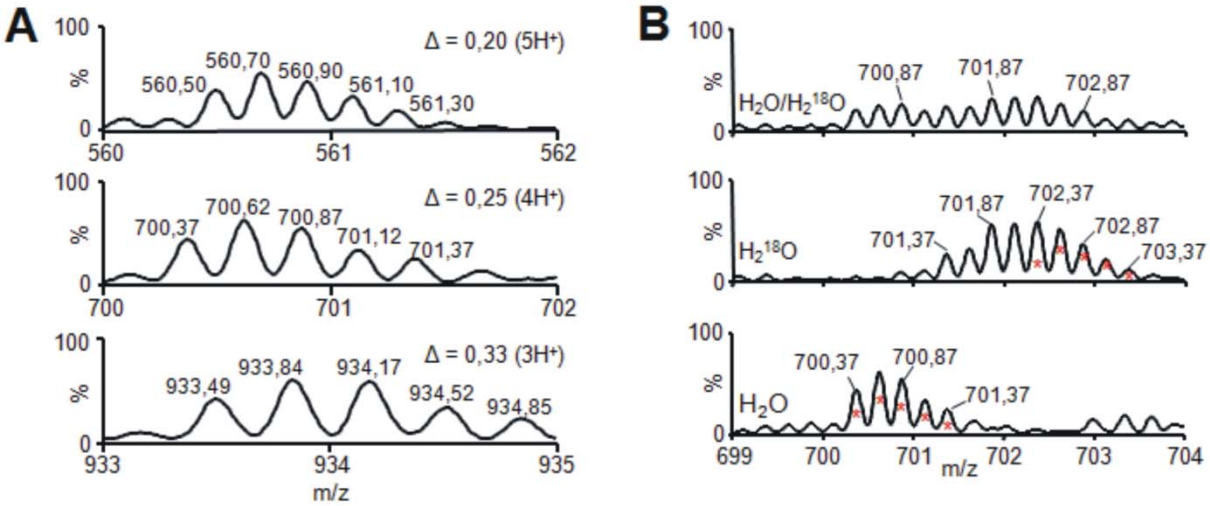


Figura 21. Análise por UPLC/Q-Tof-MS do peptídeo tríptico do dímero covalente da hSod1. A – O peptídeo tríptico do dímero covalente da hSod1 foi detectado em três estados de carga por UPLC/Q-Tof-MS. As separações dos picos no envelope isotópico bem como a carga correspondente do peptídeo estão indicadas em cada espectro. B – O dímero covalente da hSod1 foi digerido com tripsina em H_2O e $H_2{}^{18}O$ conforme descrito em Materiais e Métodos e analisado por UPLC/Q-Tof-MS. Os espectros mostram o peptídeo característico da digestão do dímero covalente da hSod1 contendo quatro cargas. O peptídeo obtido da digestão em H_2O ou $H_2{}^{18}O$ está indicado em cada espectro enquanto que $H_2O/H_2{}^{18}O$ se refere à mistura das amostras imediatamente antes da injeção no espectrômetro de massa. Os asteriscos indicam o envelope isotópico do peptídeo e seu correspondente contendo quatro átomos de ^{18}O incorporados no C-terminal.

A Figura 21B mostra os espectros de massa do peptídeo tríptico proveniente do dímero covalente da hSod1 (pico 4 da Figura 20B, contendo quatro cargas) obtido pela proteólise em H_2O e $H_2{}^{18}O$ e também o espectro da mistura das amostras previamente à análise por

espectrometria de massa. Deve-se salientar que incrementos de massa de quatro, seis e oito Dalton se traduzem em incrementos de m/z de uma, uma e meia e duas unidades quando a carga do peptídeo for quatro.

O envelope isotópico deste peptídeo consiste de cinco picos, começa em 700,37 e termina em 701,37 (Figura 21B). A digestão em $H_2{}^{18}O$ produziu três envelopes isotópicos que se sobrepõe (início em 701,37 e fim em 703,37) e correspondem à incorporação de dois, três e quatro átomos de ^{18}O no peptídeo, demonstrando de maneira inequívoca sua natureza dimérica. Ainda, nenhum outro peptídeo do dímero covalente mostrou a incorporação de átomos de ^{18}O consistente com dois C-terminais.

4.12 Análise do peptídeo tríptico dimérico por Q-Tof-MS/MS para determinação de sua sequência

O sequenciamento do peptídeo dimérico foi feito por análise de MS/MS e identificação da série de fragmentos tipo y. De maneira intrigante, o espectro de MS/MS do peptídeo dimérico contém a série y que pode ser atribuída ao peptídeo linear de sequência ESNGPVKVWGSIK (Figura 22 e Tabela 4). Este peptídeo possui massa 1399,75 Da e ocorre quando a tripsina perde o sítio de clivagem na Lys^{30}, correspondendo aos resíduos 24 a 36 da hSod1. Além disso, a marcação do C-terminal do peptídeo dimérico mostrou que esta série y é derivada da quebra da ligação entre as cadeias polipeptídicas porque os fragmentos contêm apenas um C-terminal (inserto da Figura 22). Digno de nota, junto aos fragmentos y5 a y13 desta série observou-se a existência de fragmentos correlatos contendo dois Dalton a menos nas respectivas massas. Vale ressaltar que o resíduo Trp^{32} é incorporado a partir do fragmento y5, indicando que a ligação entre cadeias pelos resíduos de triptofano sofre fragmentação e gera uma cadeia contendo o Trp^{32} aparentemente não modificado e outra cadeia contendo o Trp^{32} com dois átomos de hidrogênio a menos em sua estrutura (Tabela 4). De fato, a soma da

massa monoisotópica do fragmento y13 (m/z = 700,87, duas cargas) com a do seu correlato (m/z = 699,87, duas cargas) equivale à massa monoisotópica do peptídeo dimérico (i.e. 1399,75 Da + 1397,75 Da = 2797,50 Da). Desta forma, o peptídeo tríptico dimérico consiste de duas cadeias ESNGPVKVWGSIK ligadas pelos resíduos de triptofano.

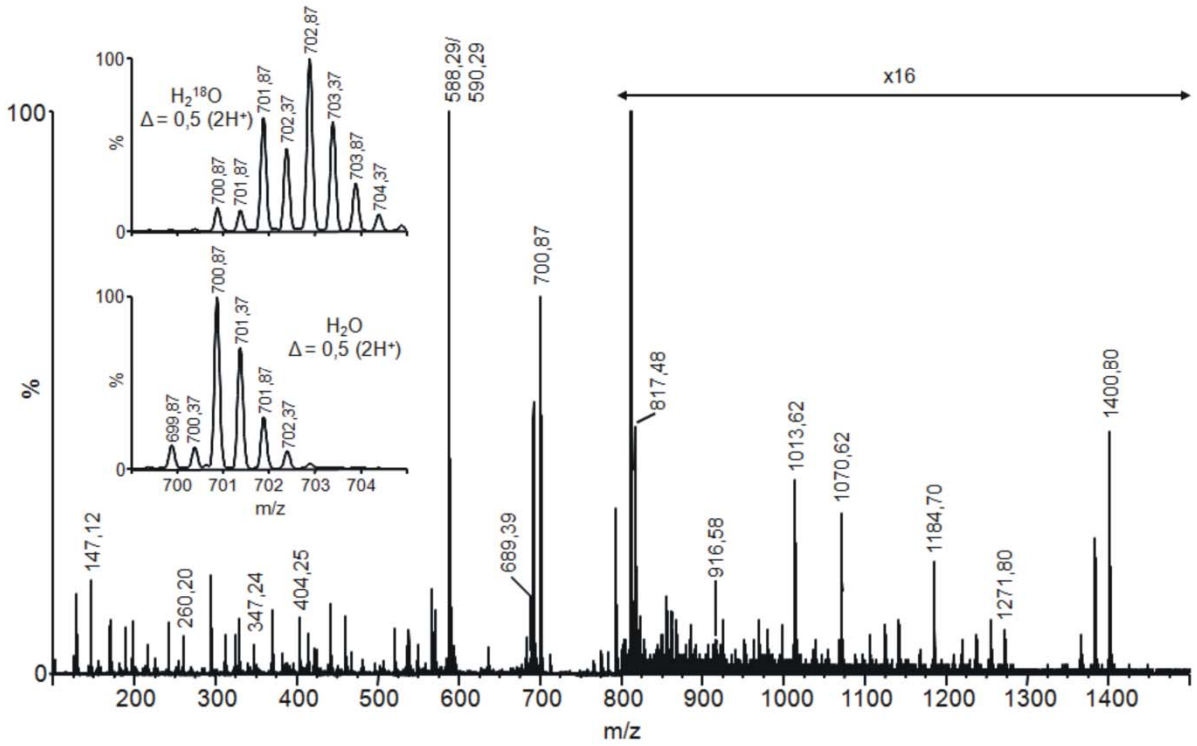


Figura 22. Análise do peptídeo tríptico dimérico por UPLC/Q-Tof-MS/MS. O peptídeo dimérico obtido da digestão do dímero covalente da hSod1 com tripsina foi analisado por MS/MS para seu sequenciamento. O espectro de MS/MS contém os fragmentos y indicados, os quais também estão listados na Tabela 4. O inserto mostra o fragmento y13 do peptídeo dimérico obtido em H_2O e $H_2{}^{18}O$. As separações de picos no envelope isotópico e a carga dos fragmentos estão indicadas.

A existência de alguns fragmentos do tipo y que contêm a ligação entre triptofanos intacta, conforme determinado pelo incremento de massa proveniente da incorporação de átomos de ^{18}O, corrobora esta conclusão. Por exemplo, o íon de m/z = 861,47, contendo três cargas, possui massa monoisotópica de 2581,41 e corresponde ao fragmento y NGPVKV**W**(ESNGPVKV**W**GSIK)GSIK.

Claramente, a perda de dois átomos de hidrogênio na estrutura dos resíduos de triptofano ligados covalentemente evidencia a formação de um ditriptofano na dimerização da hSod1 e a quebra da ligação covalente deste aduto na análise de MS/MS do peptídeo dimérico

indica que se trata de uma ligação entre carbono e nitrogênio. Ainda, a quebra da ligação entre carbono e nitrogênio do ditriptofano deve envolver um rearranjo no qual um átomo de hidrogênio é transferido entre os resíduos de triptofano ligados covalentemente resultando num fragmento de massa 1399,75 Da (ESNGPVKVWGSIK) e noutro de massa 1397,75 Da (ESNGPVKVW**(-2H)**GSIK).

Tabela 4. Séries de fragmentos tipo y obtidas na análise de MS/MS do peptídeo tríptico dimérico[a]

Fragmento y	Sequência	m/z	Sequência	m/z
y1	K	147,2	K	147,2
y2	IK	260,2	IK	260,2
y3	SIK	347,2	SIK	347,2
y4	GSIK	404,2	GSIK	404,2
y5	**WGSIK**	**590,3**	**W(-2H)GSIK**	**588,3**
y6	VWGSIK	689,3	VW(-2H)GSIK	687,3
y7	KVWGSIK	817,4	KVW(-2H)GSIK	815,4
y8	VKVWGSIK	916,5	VKVW(-2H)GSIK	914,5
y9	PVKVWGSIK	1013,5	PVKVW(-2H)GSIK	1011,5
y10	GPVKVWGSIK	1070,5	GPVKVW(-2H)GSIK	1068,5
y11	NGPVKVWGSIK	1184,6	NGPVKVW(-2H)GSIK	1182,6
y12	SNGPVKVWGSIK	1271,6	SNGPVKVW(-2H)GSIK	1269,6
y13	ESNGPVKVWGSIK	1400,7	ESNGPVKVW(-2H)GSIK	1398,7

[a] As duas séries de fragmentos tipo y determinam a mesma sequência, mas diferem a partir do fragmento y5 (destacado em negrito) devido à perda de dois átomos de hidrogênio da estrutura de um dos resíduos de triptofano (Trp^{32}).

Com base na natureza carbono-nitrogênio da ligação covalente entre os resíduos de triptofano e no rearranjo que ocorre durante sua quebra na análise de MS/MS foi possível deduzir que a estrutura do ditriptofano formado na dimerização covalente da hSod1 possui uma ligação entre N1 (nitrogênio do anel indólico) de um resíduo de triptofano e C3 (posição 3 do anel indólico) do outro, como mostrado na Figura 23.

Por fim, o peptídeo ESNGPVKVW(ESNGPVKVWGSIK)GSIK sofre uma fragmentação característica na análise de MS/MS produzindo séries complementares de fragmentos tipo y e pode ser empregado como um marcador bioquímico para o estudo da dimerização covalente da hSod1 no modelo de ELA.

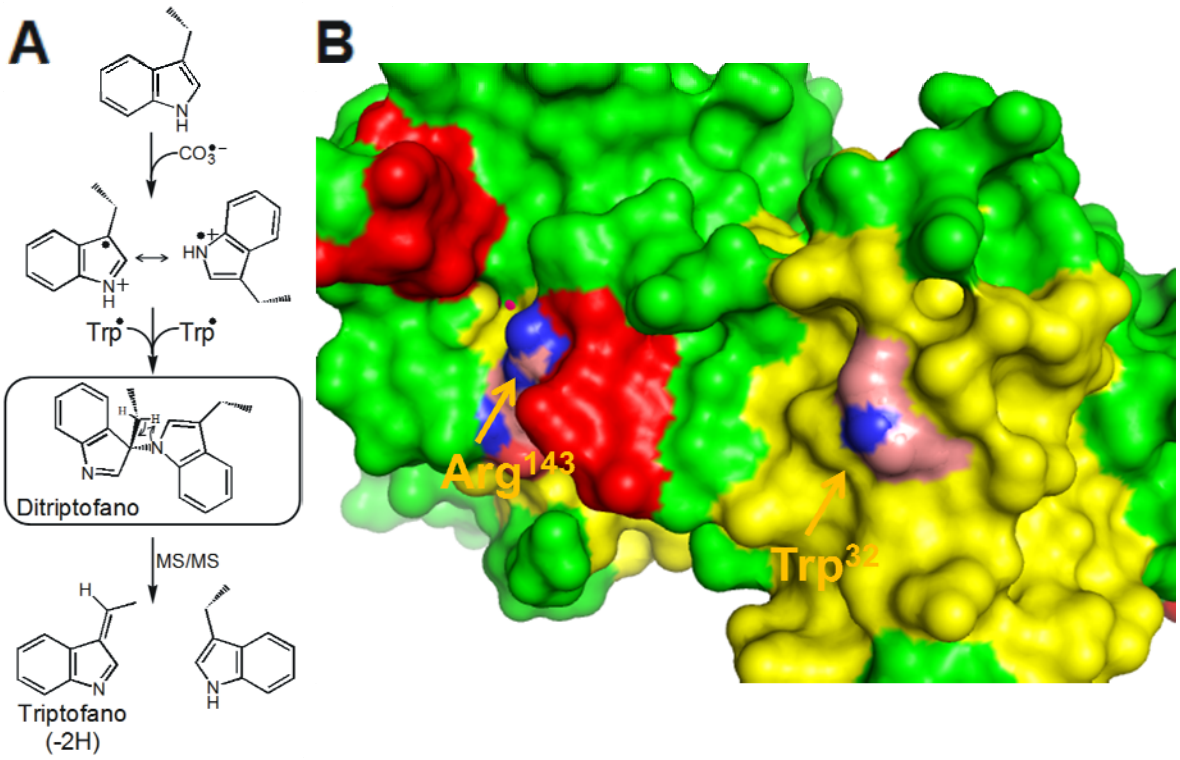


Figura 23. Mecanismo de dimerização covalente da hSod1 pelo radical carbonato produzido na atividade peroxidásica da enzima. A – A dimerização envolve a recombinação dos radicais triptofanila provenientes do ataque do radical carbonato no resíduo Trp^{32}. A recombinação radicalar descrita produz um aduto de ditriptofano envolvendo a ligação entre N1 de um resíduo e C3 de outro. Na análise de MS/MS ocorre a quebra desta ligação pelo rearranjo ilustrado, produzindo um resíduo de triptofano e seu correspondente com menos dois átomos de hidrogênio na estrutura. B – Superfície da hSod1 mostrando a exposição dos resíduos Arg^{143}, envolvido da produção do radical carbonato, e Trp^{32}, alvo de oxidação.

4.13 Enriquecimento e análise por espectrometria de massa das proteínas de peso molecular na faixa de 40 a 60 kDa imunoreativas ao anticorpo contra a hSod1

Apesar do peptídeo tríptico ESNGPVKVW(ESNGPVKVWGSIK)GSIK constituir um marcador bioquímico de grande especificidade, as espécies de hSod1 que migram como dímero da proteína são pouco abundantes e foram enriquecidas antes da digestão com tripsina e análise por espectrometria de massas.

Como as referidas espécies migram como dímero da hSod1 nas condições desnaturantes e redutoras da eletroforese em gel de poliacrilamida, o extrato de proteínas da medula foi preparado em tampão contendo cloreto de guanidina (Gua-HCl), ditiotreitol (DTT) e o

quelante de metais DTPA e então as proteínas desnaturadas e reduzidas foram alquiladas pela adição de iodoacetato (ver Materiais e Métodos).

A hSod1 desnaturada, reduzida e alquilada possui vários resíduos de histidina livres que antes constituíam o sítio ativo da enzima. Desta forma, a primeira etapa do enriquecimento da hSod1 foi feita por cromatografia de afinidade por níquel. A análise das frações cromatográficas por Western-blot mostrou que a hSod1 foi eluída da coluna de níquel como um único pico (Figura 24).

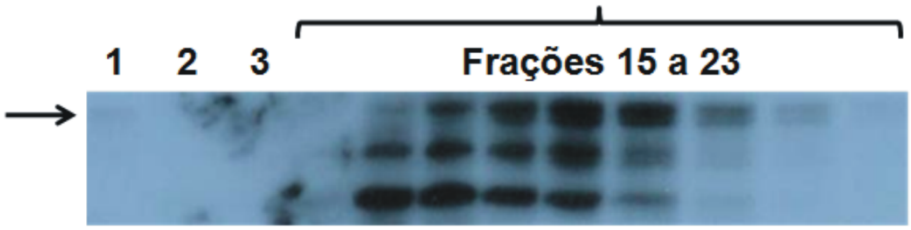


Figura 24. O extrato de proteínas desnaturadas das medulas foi submetido à cromatografia de afinidade por níquel e as frações cromatográficas foram analisadas por Western-blot para a hSod1. A amostra 1 corresponde a 2 ng do dímero covalente da hSod1 obtido *in vitro*. As amostras 2 e 3 correspondem a 5 µg do extrato total de proteínas das medulas antes e após passagem pela coluna de afinidade por níquel. As frações cromatográficas apresentadas definem o pico de eluição dos supostos dímeros covalentes da hSod1 presentes nas medulas. A seta indica a migração do dímero covalente da hSod1 obtido *in vitro*.

Na segunda etapa, as frações da cromatografia de afinidade por níquel imunoreativas ao anticorpo contra a hSod1 foram submetidas à cromatografia de troca aniônica. Ao contrário da eluição anterior, a hSod1 eluída da coluna de troca aniônica constituiu vários picos cromatográficos (Figura 25). Este perfil evidenciou a existência de diferentes formas da hSod1 nas medulas dos ratos transgênicos, conforme já observado na eletroforese bidimensional apresentada na Figura 18.

Mesmo que em detrimento do enriquecimento da hSod1 nesta etapa, todas as frações da cromatografia de troca aniônica foram misturadas, concentradas e submetidas à eletroforese bidimensional. O Western-blot da separação bidimensional revelou a existência de aproximadamente quinze espécies imunoreativas ao anticorpo contra a hSod1 na faixa de peso molecular de 40 a 60 kDa (Figura 26). Cada uma destas espécies (um a quinze, Figura 26) foi

digerida com tripsina separadamente e analisada por espectrometria de massa seguida da identificação da proteína pela busca no banco de dados de estrutura primária de proteínas de mamíferos.

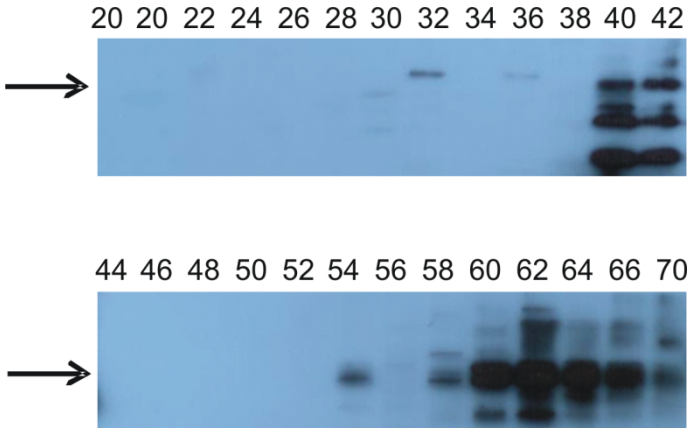


Figura 25. As frações da cromatografia de afinidade por níquel contendo a hSod1 foram submetidas à cromatografia de troca aniônica e as correspondentes frações cromatográficas analisadas por Western-blot para a hSod1. As frações cromatográficas apresentadas definem vários picos de eluição de espécies candidatas a dímero covalente da hSod1 presentes nas medulas. A seta indica a migração do dímero covalente da hSod1 obtido *in vitro*.

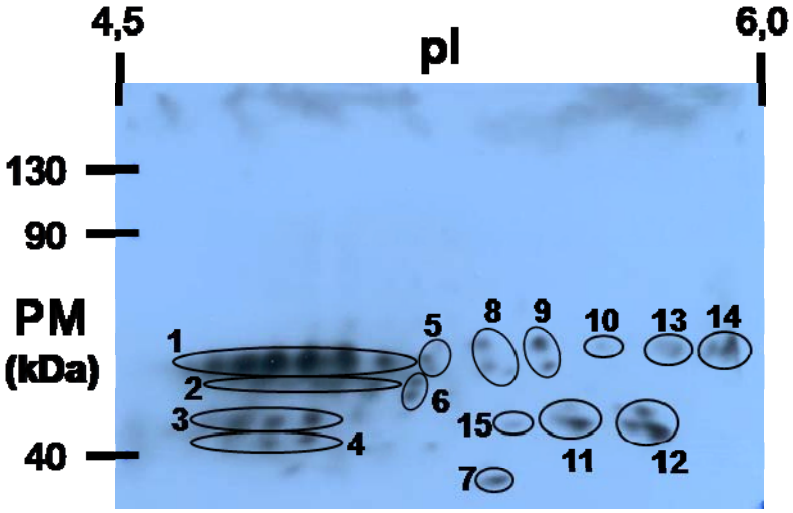


Figura 26. Análise por Western-blot da eletroforese bidimensional do extrato de proteínas das medulas enriquecido por cromatografia (afinidade por Ni e troca aniônica) em espécies de peso molecular 40 – 60 kDa imunoreativas ao anticorpo da hSod1. As espécies foram agrupadas em quinze conjuntos conforme indicado, submetidas à digestão com tripsina e análise por espectrometria de massa seguida da busca no banco de dados de estrutura primária de proteínas de mamíferos usando a plataforma MASCOT (ver Tabela 5).

Todas as espécies analisadas foram identificadas como hSod1 (Tabela 5), atestando a validade da detecção por Western-blot. Todavia, o peptídeo tríptico ESNGPVKVW(ESNGPVKVWGSIK)GSIK não foi detectado em nenhuma das espécies

candidatas a dímero covalente da hSod1. As possíveis causas para a não observação do peptídeo dimérico seriam a presença de contaminantes que suprimam sua ionização, sua extração ineficiente da malha do gel de poliacrilamida devido ao seu alto peso molecular ou a hidrólise da ligação carbono-nitrogênio do ditriptofano em função da condição ácida da extração dos peptídeos.

Tabela 5. Identificação de espécies de peso molecular entre 40 e 60 kDa da hSod1 obtidas na eletroforese bidimensional do extrato de proteínas das medulas dos ratos modelo de ELA através de digestão tríptica e análise por espectrometria de massa

Espécie (Western-blot)[a]	% de Cobertura da Sequência	Peptídeo Tríptico KVW^{32}GSIK[b]	Peptídeo Tríptico Dimérico[c]
hSod1Dim 1	45%	ND	ND
hSod1Dim 2	51%	✓	-
hSod1Dim 3	21%	ND	ND
hSod1Dim 4	29%	✓	-
hSod1Dim 5	17%	ND	ND
hSod1Dim 6	17%	ND	ND
hSod1Dim 7	17%	ND	ND
hSod1Dim 8	17%	ND	ND
hSod1Dim 9	17%	ND	ND
hSod1Dim 10	9%	ND	ND
hSod1Dim 11	17%	ND	ND
hSod1Dim 12	17%	ND	ND
hSod1Dim 13	21%	ND	ND
hSod1Dim 14	21%	ND	ND
hSod1Dim 15	17%	ND	ND

[a] As espécies de hSod1 separadas na eletroforese 2D e detectadas por Western-blot foram digeridas *in gel* com tripsina e os peptídeos analisados e sequenciados por UPLC/Q-Tof-MS/MS. Os dados de MS/MS foram utilizados na busca de proteínas no banco de dados de estrutura primária de proteínas de mamíferos utilizando o programa MASCOT. Todas as identificações foram estatisticamente significantes ($p<0,01$).
[b] A detecção do peptídeo KVW^{32}GSIK significa que o resíduo de triptofano 32 da hSod1 não encontra-se modificado na espécie analisada.
[c] O peptídeo tríptico dimérico refere-se ao peptídeo (ESNGPVKV**W**^{32}(ESNGPVKV**W**^{32}GSIK)GSIK) utilizado como marcador bioquímico para o dímero covalente da hSod1 dependente da oxidação do resíduo W^{32}.
ND – Não detectado.

De qualquer maneira, apenas duas das quinze formas de hSod1 identificadas por espectrometria de massa tiveram o resíduo Trp^{32} observado (Tabela 5). Nas outras treze, o resíduo de triptofano pode simplesmente não ter sido detectado ou de fato estar modificado.

Assim, a hipótese da formação do dímero covalente da hSod1 dependente da oxidação do Trp^{32} em ELA permanece em discussão.

5 Discussão

5.1 Mecanismo de produção do radical carbonato pela atividade peroxidásica da Sod1

O presente trabalhou investigou o mecanismo de produção do radical carbonato pela Sod1 para fundamentar as bases moleculares do efeito do tampão bicarbonato em oxidações catalisadas por metais de transição.

Classicamente, a literatura relacionada a radicais livres e oxidantes recorre ao radical hidroxila produzido *in situ* pelo mecanismo de Fenton para explicar os efeitos deletérios associados ao peróxido de hidrogênio, embora a reação seja lenta ($k_{Fe(II)/H2O2}$ = 76 $M^{-1}s^{-1}$, (Halliwell & Gutteridge, 2007)). Desta forma, este paradigma norteou o mecanismo proposto para o ciclo peroxidativo da Sod1 bem como para explicar a produção do radical carbonato na presença de bicarbonato/dióxido de carbono (Hodgson & Fridovich, 1975; Zhang *et al.*, 2000; Liochev & Fridovich, 2004).

Não obstante, a comparação da oxidação de bicarbonato/dióxido de carbono, nitrito e formato pela atividade peroxidásica da Sod1 demonstrou que o intermediário oxidante SodCu(II)($OH^{\bullet}$) não pode sustentar a produção de radical carbonato observada (Figuras 8 a 11). De fato, a oxidação de nitrito e formato, espécies capazes de proteger a Sod1 contra a inativação pelo peróxido de hidrogênio, são favorecidas em relação à oxidação de bicarbonato/dióxido de carbono, haja vista as constantes de velocidade destas espécies com o próprio radical hidroxila ($k_{NO2^-/OH\bullet}$ ~ 10^9 $M^{-1}s^{-1}$ (Logager & Sehested, 1993); $k_{HCO2^-/OH\bullet}$ ~10^9 $M^{-1}s^{-1}$ (Buxton *et al.*, 1988); $k_{HCO3^-/OH\bullet}$ ~ 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ (Buxton & Elliot, 1986); $k_{CO2/OH\bullet}$, reação desconhecida), e respondem de forma coerente em função do pH, validando a abordagem experimental. Além disso, o efeito do bicarbonato/dióxido de carbono frente ao do nitrito e formato no consumo de peróxido de hidrogênio pela Sod1 suporta a conclusão de que o ciclo peroxidativo da enzima na presença do par bicarbonato/dióxido de carbono não envolve a

produção do oxidante com caráter de radical hidroxila (SodCu(II)($OH^{\bullet}$)) (Figura 8), suplantando o mecanismo de Fenton em favor de outros intermediários reativos.

A demonstração de que o dióxido de carbono, mas não o bicarbonato, constitui a espécie ativa nas oxidações mediadas pela Sod1 reforçou a proposta de que o precursor do radical carbonato produzido pela enzima é o ânion peroxomonocarbonato (Medinas *et al.*, 2007). De fato, os experimentos de ^{13}C RMN e modelagem molecular evidenciaram que o peroxomonocarbonato adota uma conformação no sítio ativo da hSod1 que favorece sua redução ao radical carbonato (Figuras 13 e 14). Ainda, os experimentos de cinética de fluxo interrompido e simulações cinéticas demonstraram que o radical carbonato é oriundo da redução do peroxomonocarbonato formado no sítio ativo da enzima conforme o Esquema 3.

Além da contribuição cinética que a Sod1 efetua ao assistir a formação do peroxomonocarbonato orientado em direção ao cobre catalítico, a redução do peroxomonocarbonato em detrimento da redução do peróxido de hidrogênio pela enzima também possui cunho termodinâmico. Embora muito oxidante, o radical carbonato não é tão instável quanto o radical hidroxila proveniente da redução do peróxido de hidrogênio, e deve ser produzido preferencialmente em oxidações catalisadas por metais de transição (Ramirez *et al.*, 2005).

Em virtude da ubiquidade do tampão bicarbonato nos organismos, os efeitos deletérios de oxidantes outrora atribuídos ao radical hidroxila produzido pelo mecanismo de Fenton devem ser reavaliados, levando em consideração principalmente a compartimentalização das espécies e o pH local.

Digno de nota, as mutantes da hSod1 relacionadas à ELA acumulam no espaço entre membranas da mitocôndria produzindo agregados da proteína (Ferri *et al.*, 2006). Além disso, a hSod1 do espaço entre membranas da mitocôndria parece constituir uma reserva do sistema antioxidante e pode ser ativada por peróxido de hidrogênio, ou seja, em condições de estresse

oxidativo (Iñarrea *et al.*, 2005). Assim, o espaço entre membranas da mitocôndria compõe um ambiente propício para a produção de radical carbonato pelas mutantes da hSod1 implicadas em ELA, pois trata-se de um compartimento continuamente exposto ao peróxido de hidrogênio em condições de pH que favorecem o dióxido de carbono em equilíbrio com o bicarbonato, fato que poderia contribuir para a disfunção mitocondrial típica de ELA (Rothstein, 2009).

Dentre os possíveis mecanismos tóxicos do radical carbonato na degeneração dos neurônios motores, vale destacar seu potencial de causar a formação do dímero covalente da hSod1, espécie recorrente na literatura da doença e associada ao caráter neurotóxico das mutantes da proteína (Shaw & Valentine, 2007). Desta forma, o presente trabalho prosseguiu com a caracterização do dímero covalente da hSod1 produzido durante a atividade peroxidásica da enzima *in vitro*, para depois investigar esta espécie em modelo animal de ELA.

5.2 Caracterização do dímero covalente da hSod1 produzido durante a atividade peroxidásica da enzima

O radical carbonato produzido pela hSod1 pode se difundir do sítio ativo e oxidar alvos no meio externo. A oxidação do resíduo Trp^{32} na superfície da proteína pode acarretar a formação *in vitro* de dímero, trímero e tetrâmero covalentes da hSod1 resistentes a redutores de ligação dissulfeto análogos às espécies de alto peso molecular da hSod1 detectadas em modelos experimentais e pacientes de ELA (Zhang *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 2000; Gruzman *et al.*, 2007). Haja vista a implicação da atividade peroxidásica da hSod1 no ganho de função tóxica de suas mutantes na doença, tornou-se imprescindível a investigação desta via oxidante na formação de agregados da proteína reportados *in vivo*.

A análise do dímero covalente da hSod1 e do extrato de proteínas das medulas dos ratos modelo de ELA na mesma eletroforese atestou a validade desta hipótese (Figura 16). Contudo, a marcação do Western-blot também revelou a existência de múltiplas espécies candidatas a dímero covalente da hSod1, sendo que algumas delas apresentaram correlação com a manifestação dos sintomas característicos da degeneração dos neurônios motores (Figuras 17 e 18). Em virtude desta complexidade, procedeu-se a caracterização do dímero covalente da hSod1 por espectrometria de massa para posterior estudo das espécies *in vivo*.

A proteólise com tripsina produz um conjunto de peptídeos específicos que podem ser utilizados para a identificação de proteínas pela busca em bancos de dados de estrutura primária. Portanto, esta abordagem foi empregada para a identificação de um peptídeo tríptico característico do dímero covalente da hSod1 que poderá funcionar como um marcador bioquímico específico para esta espécie.

A análise comparativa dos peptídeos trípticos obtidos da digestão do monômero nativo, monômero oxidado e dímero covalente da hSod1 por HPLC/UV-vis e HPLC/ESI-MS identificou um peptídeo tríptico característico de massa média 2799,4 Da (Figura 20). Já, a análise dos produtos de digestão em $H_2{}^{18}O$ confirmou inequivocamente a natureza dimérica do peptídeo em questão (Figura 21). Por fim, o sequenciamento do peptídeo do dímero covalente da hSod1 por MS/MS revelou a perda da clivagem pela tripsina em sítios adjacentes aos resíduos Trp^{32} nas duas cadeias polipeptídicas e a estrutura primária ESNGPVKV**W**(ESNGPVKV**W**GSIK)GSIK. Ainda, mostrou que o aduto entre cadeias laterais corresponde a um ditriptofano composto por dois resíduos Trp^{32} unidos através de uma ligação covalente entre o nitrogênio do anel indólico de um resíduo e o carbono da posição 3 do outro (Figuras 22 e 23, Tabela 4), estrutura consistente com a recombinação entre radicais triptofanila. De grande relevância, o ditriptofano aqui descrito não possui precedentes na literatura e contribuirá para compreensão de questões que envolvam a

oxidação de resíduos de triptofano. Além disso, esta estrutura de ditriptofano também é passível de oxidação e recombinação com o radical triptofanila, explicando a formação do trímero e tetrâmero covalentes da hSod1, embora a proteína contenha apenas um resíduo de triptofano. Vale salientar que a resistência do sítio da ligação entre cadeias à digestão por tripsina indica que este dímero covalente da hSod1 em ELA pode ser altamente tóxica aos neurônios motores devido ao seu acúmulo para formação de agregados de proteína.

Em suma, o peptídeo tríptico ESNGPVKV**W**(ESNGPVKV**W**GSIK)GSIK constitui um marcador bioquímico específico para o dímero covalente da hSod1 e pode ser empregado na procura desta espécie *in vivo*.

5.3 Enriquecimento e análise por espectrometria de massa das proteínas de peso molecular na faixa de 40 a 60 kDa imunoreativas ao anticorpo contra a hSod1

A purificação por cromatografia seguida da eletroforese bidimensional resultou em quinze grupos de espécies imunoreativas ao anticorpo contra a hSod1 na faixa de peso molecular entre 40 e 60 kDa provenientes das medulas dos ratos modelo de ELA (Figura 26). Embora pareça que as espécies um e dois correspondam àquelas detectadas no estágio sintomático da doença (Figura 18), esta etapa da pesquisa teve por finalidade verificar a existência do dímero covalente da hSod1 no modelo de ELA e, portanto, foi feito o estudo das quinze espécies por digestão tríptica e análise por espectrometria de massa.

Todas as espécies foram identificadas como hSod1 pela busca em banco de dados de estrutura primária de proteínas, confirmando a complexidade da formação de espécies de alto peso molecular da hSod1 em ELA. As espécies dois e quatro tiveram o resíduo Trp^{32} detectado sem modificações e não podem corresponder ao dímero covalente da hSod1 em questão. Todavia, nas outras treze espécies o resíduo Trp^{32} nativo não foi identificado, assim

como não foi observado o peptídeo tríptico dimérico ESNGPVKV**W**(ESNGPVKV**W**GSIK)GSIK.

Desta forma, a hipótese sobre a dimerização covalente da hSod1 em ELA via radical carbonato permanece em aberto apesar do esforço experimental conduzido neste trabalho. Conforme discutido anteriormente, diversas razões poderiam explicar a falha na detecção do peptídeo dimérico, tais como contaminantes em excesso, extração ineficiente do gel de poliacrilamida, hidrólise da ligação carbono-nitrogênio do ditriptofano durante a manipulação da amostra, entre outros. Assim, os trabalhos que darão sequência a esta tese deverão adequar os procedimentos experimentais utilizados em estudos de proteoma ao peptídeo dimérico em questão, bem como empregar metodologias alternativas, tal qual a produção de um anticorpo contra o ditriptofano descrito, para chegar a uma conclusão definitiva quanto à natureza destas espécies de hSod1 potencialmente neurotóxicas.

6 Conclusões

O presente trabalho conclui que a mutação G93A *per se* não afeta as atividades dismutásica e peroxidásica da hSod1. Portanto, o eventual aumento da atividade peroxidásica desta mutante *in vivo* estaria relacionado a outros fatores como enovelamento alterado da enzima levando à coordenação aberrante do íon de cobre. Ainda, a demonstração que o peroxomonocarbonato constitui a espécie precursora do radical carbonato produzido pela hSod1 contribuiu para a compreensão do efeito do tampão bicarbonato na atividade peroxidásica da enzima, em que pese o paradigma do mecanismo de Fenton corrente na literatura de oxidantes em biologia e medicina. Por fim, a caracterização do dímero covalente da hSod1 levou à descoberta de uma nova estrutura de ditriptofano coerente com um mecanismo de dimerização envolvendo recombinação radicalar e que poderá servir como um biomarcador do radical carbonato, contribuindo para determinar seu papel na formação de agregados protéicos em patologias associadas ao estresse oxidativo, como a esclerose lateral amiotrófica (ELA).

7 Referências

ADAM, A., e MEHTA, M. KH(O2)CO2.H2O2 - An oxygen-rich salt of monoperoxocarbonic acid, **Angew. Chem. Int. Ed.**, 37(10), 1387-88, 1998.

ALLEN, F.H. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising, **Acta Cryst. B**, 58(Part 3 Sp. Iss. 1), 380-88, 2002.

ALVAREZ, B., DEMICHELI, V., DURÁN, R., TRUJILLO, M., CERVEÑANSKY, C., FREEMAN, B.A., e RADI, R. Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical, **Free Radic. Biol. Med.**, 37(6), 813-22, 2004.

ALVAREZ, M.N., PELUFFO, G., FOLKES, L., WARDMAN, P., e RADI, R. Reaction of the carbonate radical with the spin-trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide in chemical and cellular systems: pulse radiolysis, electron paramagnetic resonance, and kinetic-competition studies, **Free Radic. Biol. Med.**, 43(11), 1523-33, 2007.

ANDERSEN, P.M. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene, **Curr. Neurol. Neurosci. Rep.**, 6(1), 37-46, 2006.

ANDRADE, M.A., CHACÓN, P., MERELO, J.J., MORÁN, F. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism an unsupervised learning neural network, **Protein Eng.**, 6(4), 383-90, 1993.

ANDRUS, P.K., FLECK, T.J., GURNEY, M.E., e HALL, E.D. Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis, **J. Neurochem.**, 71(5), 2041-48, 1998.

AUGUSTO, O., BONINI, M.G., AMANSO, A.M., LINARES, E., SANTOS, C.C., DE MENEZES, S.L. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology, **Free Radic. Biol. Med.**, 32(9), 841-59, 2002.

BEAL, M.F., FERRANTE, R.J., BROWNE, S.E., MATTHEWS, R.T., KOWALL, N.W., e BROWN, R.H. JR. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis, **Ann. Neurol.**, 42(4), 644-654, 1997.

BECKMAN, J.S., ESTÉVEZ, A.G., CROW, J.P., e BARBEITO, L. Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS, **Trends Neurosci.**, 24(11 Suppl), S15-20, 2001.

BERLETT, B.S., CHOCK, P.B., YIM, M.B., e STADTMAN, E.R. Manganese(II) catalyzes the bicarbonate-dependent oxidation of amino acids by hydrogen peroxide and the amino acid-facilitated dismutation of hydrogen peroxide, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 87(1), 389-93, 1990.

BONINI, M.G., RADI, R., FERRER-SUETA, G., FERREIRA, A.M., e AUGUSTO, O. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide, **J. Biol. Chem.**, 274(16), 10802-6, 1999.

BONINI, M.G., FERNANDES, D.C., e AUGUSTO, O. Albumin oxidation to diverse radicals by the peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase in the presence of bicarbonate or nitrite: diffusible

radicals produce cysteinyl and solvent-exposed and -unexposed tyrosyl radicals, **Biochemistry**, 43(2), 344-51, 2004.

BREDT, D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology, **Free Radic. Res.**, 31(6), 577-96, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal. Biochem.**, 72, 248-54, 1976.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetes complications, **Nature**, 414(6865), 813-20, 2001.

BRUIJN, L.I., MILLER, T.M., e CLEVELAND, D.W. Unraveling the Mechanisms Involved in Motor Neuron Degeneration in ALS, **Annu. Rev. Neurosci.**, 27, 723-49, 2004.

BUXTON, G.V., e ELLIOT, A.J. Rate-constant for reaction of hydroxyl radicals with bicarbonate ions, **Radiat. Phys. Chem.**, 27(3), 241-43, 1986.

BUXTON, G.V., GREENSTOCK, C.L., HELMAN, W.P., e ROSS, A.B. Critical-review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen-atoms and hydroxyl radicals (.OH/.O-) in aqueous-solutions, **J. Phys. Chem. Ref. Data**, 17(2), 513-886, 1988.

CABELLI, D.E., ALLEN, D., BIELSKI, B.H., e HOLCMAN, J. The interaction between Cu(I) superoxide dismutase and hydrogen peroxide, **J. Biol. Chem.**, 264(17), 9967-71, 1989.

CHOU, S.M., WANG, H.S., e KOMAI, K. Colocalization of NOS and SOD1 in neurofilament accumulation within motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study, **J. Chem. Neuroanat.**, 10(3-4), 249-58, 1996.

CLAIBORN, A. In GREENWALD, R.A. **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research**, Primeira Edição, Boca Raton, CRC Press, 1985. p. 283-84.

CLEVELAND, D.W. e LIU, J. Oxidation versus aggregation – how do SOD1 mutants cause ALS?, **Nat. Med.**, 6(12), 1320-21, 2000.

COZZOLINO, M., FERRI, A., e CARRÌ, M.T. Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications, **Antioxid. Redox Signal.**, 10(3), 405-43, 2008.

CROW, J.P., SAMPSON, J.B., ZHUANG, Y., THOMPSON, J.A., e BECKMAN, J.S. Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite, **J. Neurochem.**, 69(5), 1936-44, 1997.

CULOTTA, V.C., KLOMP, L.W., STRAIN, J., CASARENO, R.L., KREMS, B., e GITLIN, J.D. The copper chaperone for superoxide dismutase, **J. Biol. Chem.**, 272(38), 23469-72, 1997.

DEFREITAS, D.M., LUCHINAT, C., BANCI, L., BERTINI, I., e VALENTINE, J.S. Phosphorous-31 NMR-study of the interaction of inorganic-phosphate with bovine copper-zinc superoxide-dismutase, **Inorg. Chem.**, 26(17), 2788-91, 1987.

DELANO, W.L. **In The PyMOL Molecular Graphics System**, DeLano Scientific LLC, Palo Alto, 2002.

ELAM, J.S., MALEK, K., RODRIGUEZ, J.A., DOUCETTE, P.A., TAYLOR, A.B., HAYWARD, L.J., CABELLI, D.E., VALENTINE, J.S., e HART, P.J. An alternative mechanism of bicarbonate-mediated peroxidation by copper-zinc superoxide dismutase: rates enhanced via proposed enzyme-associated peroxycarbonate intermediate, **J. Biol. Chem.**, 278(23), 21032-39, 2003.

ELLERBY, L.M., CABELLI, D.E., GRADEN, J.A., e VALENTINE, J.S. Copper-zinc superoxide dismutase: why Not pH-dependent?, **J. Am. Chem. Soc.**, 118(28), 6556-61, 1996.

FARAGGI, M., CARMICHAEL, A., e RIESZ, P. OH radical formation by photolysis of aqueous porphyrin solutions. A spin trapping and e.s.r. study, **Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.**, 46(6), 703-13, 1984.

FAROOQUI, T., e FAROOQUI, A.A. Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases, **Mech. Ageing Dev.**, 130(4), 203-15, 2009.

FERRANTE, R.J., BROWNE, S.E., SHINOBU, L.A., BOWLING, A.C., BAIK, M.J., MACGARVEY, U., KOWALL, N.W., BROWN, R.H. JR., e BEAL, M.F. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis, **J. Neurochem.**, 69(5), 2064-74, 1997.

FERRI, A., COZZOLINO, M., CROSIO, C., NENCINI, M., CASCIATI, A., GRALLA, E.B., ROTILIO, G., VALENTINE, J.S., e CARRÌ, M.T. Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 103(37), 13860-65, 2006.

FIELD, L.S., FURUKAWA, Y., O'HALLORAN, T.V., e CULOTTA, V.C. Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria, **J. Biol. Chem.**, 278(30), 28052-9, 2003.

FRIDOVICH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?, **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 893, 13-18, 1999.

FUCHS, H.J., e BORDERS, C.L.JR. Affinity inactivation of bovine Cu,Zn superoxide dismutase by hydroperoxide anion, HO2-, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 116(3), 1107-13, 1983.

FURUKAWA, Y., TORRES, A.S., e O'HALLORAN, T.V. Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS, **EMBO J.**, 23(14), 2872-81, 2004.

FURUKAWA, Y e O'HALLORAN, T.V Posttranslational modifications in Cu,Zn-superoxide dismutase and mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis, **Antioxid. Redox Signal.**, 8(5-6), 847-67, 2006.

GHARAHDAGHI, F., WEINBERG, C.R., MEAGHER, D.A., IMAI, B.S., e MISCHE, S.M. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity, **Electrophoresis**, 20(3), 601-5, 1999.

GOTO, J.J., ZHU, H., SANCHEZ, R.J., NERSISSIAN, A., GRALLA, E.B., VALENTINE, J.S., e CABELLI, D.E. Loss of in vitro metal ion binding specificity in mutant copper-zinc superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, **J. Biol. Chem.**, 275(2), 1007-14, 2000.

GÖTZ, R., GNANN, A., e ZIMMERMANN, F.K. Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast Saccharomyces cerevisiae causes an oxygen-sensitive growth defect, **Yeast**, 15(10A), 855-64, 1999.

GRUZMAN, A., WOOD, W.L., ALPERT, E., PRASAD, M.D., MILLER, R.G., ROTHSTEIN, J.D., BOWSER, R., HAMILTON, R., WOOD, T.D., CLEVELAND, D.W., LINGAPPA, V.R., LIU, J. Common molecular signature in SOD1 for both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 104(30), 12524-29, 2007.

GURNEY, M.E., PU, H., CHIU, A.Y., DAL CANTO, M.C., POLCHOW, C.Y., ALEXANDER, D.D., CALIENDO, J., HENTATI, A., KWON, Y.W., DENG, H.X., et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation, **Science**, 264(5166), 1772-75, 1994.

HALLIWELL, B., e GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Quarta Edição, Nova Iorque, Oxford University Press Inc., 2007.

HODGSON, E.K., e FRIDOVICH, I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme, **Biochemistry**, 14(24), 5294-99, 1975.

HODGSON, E.K., e FRIDOVICH, I. The mechanism of the activity-dependent luminescence of xanthine oxidase, **Arch. Biochem. Biophys.**, 172(1), 202-5, 1976.

HOWLAND, D.S., LIU, J., SHE, Y., GOAD, B., MARAGAKIS, N.J., KIM, B., ERICKSON, J., KULIK, J., DEVITO, L., PSALTIS, G., DEGENNARO, L.J., CLEVELAND, D.W., e ROTHSTEIN, J.D. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS), **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 99(3), 1604-9, 2002.

ILIEVA, H., POLYMENIDOU, M., e CLEVELAND, D.W. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond, **J. Cell Biol.**, 187(6), 761-72, 2009.

IÑARREA, P., MOINI, H., RETTORI, D., HAN, D., MARTÍNEZ, J., GARCÍA, I., FERNÁNDEZ-VIZARRA, E., ITURRALDE, M., E CADENAS, E. Redox activation of mitochondrial intermembrane space Cu,Zn-superoxide dismutase, **Biochem. J.**, 387(Pt 1), 203-9, 2005.

JANSSEN-HEININGER, Y.M., MOSSMAN, B.T., HEINTZ, N.H., FORMAN, H.J., KALYANARAMAN, B., FINKEL, T., STAMLER, J.S., RHEE, S.G., e VAN DER VLIET, A. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises, **Free Radic. Biol. Med.**, 45(1), 1-17, 2008.

JEWETT, S.L., OLMSTED, H.K., MARACH, J.A., ROJAS, F., e SILVA, K. Anion protection of CuZnSOD during peroxidative activity with H(2)O(2), **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 274(1), 57-60, 2000.

JOHNSTON, J.A., DALTON, M.J., GURNEY, M.E., e KOPITO, R.R. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 97(23), 12571-76, 2000.

KISHIDA, K.T., HOEFFER, C.A., HU, D., PAO, M., HOLLAND, S.M., e KLANN, E. Synaptic plasticity deficits and mild memory impairments in mouse models of chronic granulomatous disease, **Mol. Cell Biol.**, 26(15), 5908-20, 2006.

KISHIDA, K.T., e KLANN, E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory, **Antioxid. Redox Signal.**, 9(2), 233-44, 2007.

LAMBETH, J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen, **Nat. Rev. Immunol.**, 4(3), 181-89, 2004.

LANCASTER, J.R.Jr., A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide, **Nitric Oxide**, 1(1), 18-30, 1997.

LANIUS, R.A., KRIEGER, C., WAGEY, R., e SHAW, C.A. Increased [35S]glutathione binding sites in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis, **Neurosci. Lett.**, 163(1), 89-92, 1993.

LEINWEBER, B., BAROFSKY, E., BAROFSKY, D.F., ERMILOV, V., NYLIN, K., e BECKMAN, J.S. Aggregation of ALS mutant superoxide dismutase expressed in Escherichia coli, **Free Radic. Biol. Med.**, 36(7), 911-18, 2004.

LIOCHEV, S. I., e FRIDOVICH, I. Copper, zinc superoxide dismutase and H2O2. Effects of bicarbonate on inactivation and oxidations of NADPH and urate, and on consumption of H2O2, **J. Biol. Chem.**, 277(38), 34674-78, 2002.

LIOCHEV, S.I., e FRIDOVICH, I. CO2, not HCO3-, facilitates oxidations by Cu,Zn superoxide dismutase plus H2O2, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 101(3), 743-44, 2004.

LIU, H., ZHU, H., EGGERS, D.K., NERSISSIAN, A.M., FAULL, K.F., GOTO, J.J., AI, J., SANDERS-LOEHR, J., GRALLA, E.B., e VALENTINE, J.S. Copper(2+) binding to the surface residue cysteine 111 of His46Arg human copper-zinc superoxide dismutase, a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant, **Biochemistry**, 39(28), 8125-32, 2000.

LOGAGER, T. e SEHESTED, K. Formation and decay of peroxynitrous acid – a pulse-radiolysis study, **J. Phys. Chem.**, 97(25), 6664-69, 1993.

LOGROSCINO, G., BEGHI, E., ZOCCOLELLA, S., PALAGANO, R., FRADDOSIO, A., SIMONE, I.L., LAMBERTI, P., LEPORE, V., SERLENGA, L. e the SLAP registry. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in southern Italy: a population based study, **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, 76(8), 1094-98, 2005.

MCCORD, J.M., e FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein), **J. Biol. Chem.**, 244(22), 6049-55, 1969.

MEDINAS, D.B., CERCHIARO, G., TRINDADE, D.F., e AUGUSTO, O. The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer, **IUBMB Life**, 59(4-5), 255-62, 2007.

MENDES, P. Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3, **Trends Biochem. Sci.**, 22(9), 361-63, 1997.

MICHELSON, A.M., e DUROSAY, P. Hemolysis of human erythrocytes by activated oxygen species, **Photochem. Photobiol.**, 25(1), 55-63, 1977.

NAKANO, M., e SUGIOKA, K. Mechanism of chemiluminescence from the linoleate-lipoxygenase system, **Arch. Biochem. Biophys.**, 181(2), 371-83, 1977.

OKADO-MATSUMOTO, A., e FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria, **J. Biol. Chem.**, 276(42), 38388-93, 2001.

PETROVIC, N., COMI, A., e ETTINGER, M.J. Identification of an Apo-Superoxide Dismutase (Cu,Zn) Pool in Human Lymphoblasts, **J. Biol. Chem.**, 271(45), 28331-34, 1996.

PRETSCH, E., BÜHLMANN, P., e AFFOLTER, C. **In Structure Determination of Organic Compounds-Tables of Spectral Data**, Terceira Edição, Berlim, Springer-Verlag, 2000.

RÄISÄNEN, S.R., LEHENKARI, P., TASANEN, M., RAHKILA, P., HÄRKÖNEN, P.L., e VÄÄNÄNEN, H.K. Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis, **FASEB J.**, 13(3), 513-22, 1999.

RAMIREZ, D.C., MEJIBA, S.E., e MASON R.P. Copper-catalyzed protein oxidation and its modulation by carbon dioxide: enhancement of protein radicals in cells, **J. Biol. Chem.**, 280(29), 27402-11, 2005.

REAUME, A.G., ELLIOTT, J.L., HOFFMAN, E.K., KOWALL, N.W., FERRANTE, R.J., SIWEK, D.F., WILCOX, H.M., FLOOD, D.G., BEAL, M.F., BROWN, R.H. JR., SCOTT, R.W., e SNIDER, W.D. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury, **Nat. Genet.**, 13(1), 43-47, 1996.

RICHARDSON, D.E., YAO, H., FRANK, K.M., e BENNETT, D.A. Equilibria, kinetics, and mechanism in the bicarbonate activation of hydrogen peroxide: Oxidation of sulfides by peroxymonocarbonate, **J. Am. Chem. Soc.**, 122(8), 1729-39, 2000.

RICHARDSON, D.E., REGINO, C.A., YAO, H., e JOHNSON, J.V. Methionine oxidation by peroxymonocarbonate, a reactive oxygen species formed from CO2/bicarbonate and hydrogen peroxide, **Free Radic. Biol. Med.**, 35(12), 1538-50, 2003.

ROE, J.A., WIEDAU-PAZOS, M., MOY, V.N., GOTO, J.J., GRALLA, E.B., e VALENTINE, J.S. In vivo peroxidative activity of FALS-mutant human CuZnSODs expressed in yeast, **Free Radic. Biol. Med.**, 32(2), 169-74, 2002.

ROSEN, D.R., SIDDIQUE, T., PATTERSON, D., FIGLEWICZ, D.A., SAPP, P., HENTATI, A., DONALDSON, D., GOTO, J., O'REGAN, J.P., DENG, H.X., et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, **Nature**, 362(6415), 59-62, 1993.

ROTHSTEIN, J.D. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis, **Ann. Neurol.**, 65(Suppl 1), S3-9, 2009.

SANKARAPANDI, S., e ZWEIER, J.L. Bicarbonate is required for the peroxidase function of Cu, Zn-superoxide dismutase at physiological pH, **J. Biol. Chem.**, 274(3), 1226-32, 1999.

SHAW, P.J., INCE, P.G., FALKOUS, G., e MANTLE, D. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord, **Ann. Neurol.**, 38(4), 691-95, 1995.

SHAW, B.F., e VALENTINE, J.S. How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein?, **Trends Biochem. Sci.**, 32(2), 78-85, 2007.

SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., e MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, **Anal. Chem.**, 68(5), 850-58, 1996.

SINGH, R.J., KAROUI, H., GUNTHER, M.R., BECKMAN, J.S., MASON, R.P., e KALYANARAMAN, B. Reexamination of the mechanism of hydroxyl radical adducts formed from the reaction between familial amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn superoxide dismutase mutants and H2O2, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95(12), 6675-80, 1998.

STAMLER, J.S. Redox signaling: nitrosylation and related targets interactions of nitric oxide, **Cell**, 78(6), 931-36, 1994.

STRANGE, R.W., ANTONYUK, S.V., HOUGH, M.A., DOUCETTE, P.A., VALENTINE, J.S., e HASNAIN, S.S. Variable metallation of human superoxide dismutase: atomic resolution crystal structures of Cu-Zn, Zn-Zn and as-isolated wild-type enzymes, **J. Mol. Biol.**, 356(5), 1152-62, 2006.

STURTZ, L.A., DIEKERT, K., JENSEN, L.T., LILL, R., e CULOTTA, V.C. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage, **J. Biol. Chem.**, 276(41), 38084-89, 2001.

TAYLOR, D.M., GIBBS, B.F., KABASHI, E., MINOTTI, S., DURHAM, H.D., e AGAR, J.N. Tryptophan 32 potentiates aggregation and cytotoxicity of a copper/zinc superoxide dismutase mutant associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, **J. Biol. Chem.**, 282(22), 16329-35, 2007.

TRINDADE, D.F., CERCHIARO, G., e AUGUSTO, O. A role for peroxymonocarbonate in the stimulation of biothiol peroxidation by the bicarbonate/carbon dioxide pair. **Chem. Res. Toxicol.**, 19(11), 1475-82, 2006.

TURNER, B.J., LOPES, E.C., e CHEEMA, S.S. Neuromuscular accumulation of mutant superoxide dismutase 1 aggregates in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis, **Neurosci. Lett.**, 350(2), 132-36, 2003.

VALENTINE, J.S., PANTOLIANO, M.W., MCDONNELL, P.J., BURGER, A.R., e LIPPARD, S.J. pH-dependent migration of copper(II) to the vacant zinc-binding site of zinc-free bovine erythrocyte superoxide dismutase, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 76(9), 4245-49, 1979.

VALENTINE, J.S., e DEFREITAS, D.M. NMR studies of the anion binding sites of oxidized and reduced bovine copper-zinc superoxide dismutase. In ROTILIO, G. **Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology, and Medicine**, Amsterdam, Elsevier, 1986. p 149-154.

VALENTINE, J.S., DOUCETTE, P.A., e ZITTIN POTTER, S. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis, **Annu. Rev. Biochem.**, 74, 563-93, 2005.

VERDONK, M.L., COLE, J.C., HARTSHORN, M.J., MURRAY, C.W., e TAYLOR, R.D. Improved protein-ligand docking using GOLD, **Proteins**, 52(4), 609-23, 2003.

VICTOR, V.M., ROCHA, M., SOLÁ, E., BAÑULS, C., GARCIA-MALPARTIDA, K., e HERNÁNDEZ-MIJARES, A. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis, **Curr. Pharm. Des.**, 15(26), 2988-3002, 2009.

WIEDAU-PAZOS, M., GOTO, J.J., RABIZADEH, S., GRALLA, E.B., ROE, J.A., LEE, M.K., VALENTINE, J.S., e BREDESEN, D.E. Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis, **Science**, 271(5248), 515-18, 1996.

WINTERBOURN, C.C., PESKIN, A.V., e PARSONS-MAIR, H.N. Thiol oxidase activity of copper, zinc superoxide dismutase, **J. Biol. Chem.**, 277(3), 1906-11, 2002.

WINTERBOURN, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species, **Nat. Chem. Biol.**, 4(5), 278-86, 2008.

WONG, P.C., WAGGONER, D., SUBRAMANIAM, J.R., TESSAROLLO, L., BARTNIKAS, T.B., CULOTTA, V.C., PRICE, D.L., ROTHSTEIN, J., e GITLIN, J.D. Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97(6), 2886-91, 2000.

WRONA, M., PATEL, K., e WARDMAN, P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals, **Free Radic. Biol. Med.**, 38(2), 262-70, 2005.

YIM, M.B., KANG, J.H., YIM, H.S., KWAK, H.S., CHOCK, P.B., e STADTMAN, E.R. A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in Km for hydrogen peroxide, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93(12), 5709-14, 1996.

ZARKOVIC, K. 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases, **Mol. Aspects Med.**, 24(4-5), 293-303, 2003.

ZHANG, H., JOSEPH, J., FELIX, C., e KALYANARAMAN, B. Bicarbonate enhances the hydroxylation, nitration, and peroxidation reactions catalyzed by copper, zinc superoxide dismutase. Intermediacy of carbonate anion radical, **J. Biol. Chem.**, 275(19), 14038-45, 2000.

ZHANG, H., ANDREKOPOULOS, C., JOSEPH, J., CHANDRAN, K., KAROUI, H., CROW, J.P., e KALYANARAMAN, B. Bicarbonate-dependent peroxidase activity of human Cu,Zn-superoxide dismutase induces covalent aggregation of protein: intermediacy of tryptophan-derived oxidation products, **J. Biol. Chem.**, 278(26), 24078-89, 2003.

ZIMMERMAN, U.J., WANG, P., ZHANG, X., BOGDANOVICH, S., e FORSTER, R. Anti-oxidative response of carbonic anhydrase III in skeletal muscle, **IUBMB Life**, 56(6), 343-47, 2004.

8 Súmula Currícular

Dados Pessoais:

Danilo Bilches Medinas

Nascido em Bauru, SP/Brasil em 23 de novembro de 1981.

Educação:

Fundamental:

Colégio São José, Bauru, SP/Brasil, 1988-1995.

Escola Nossa Senhora da Ressurreição, São José do Rio Preto, SP/Brasil, 1996.

Médio:

Colégio Positivo, Curitiba, PR/Brasil, 1997-1998.

Colégio Objetivo, Santana do Parnaíba, SP/Brasil, 1998-1999.

Superior:

Universidade de São Paulo, São Paulo, SP/Brasil, 2000-2003.

Bacharel em Química.

Formação complementar:

Universidade de São Paulo, São Paulo, SP/Brasil, 2002-2003.

Especialização em Biotecnologia.

Ocupação:

Bolsista de doutorado direto, FAPESP, 2005-2009, para desenvolvimento do projeto "Papéis de Oxidantes e Radicais Livres em Esclerose Lateral Amiotrófica" sob a orientação da Profa. Dra. Ohara Augusto.

Publicações:

Resumos em congressos internacionais:

- Medinas, D.B.; Gozzo, F.C.; Santos, L.F.A.; e Augusto, O. MS Characterization of the Human Sod1 Covalent Dimer Produced from the Enzyme Peroxidase Activity. Implication to ALS. In: XVI Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, San Francisco, CA, USA, 2009.
- Medinas, D.B.; Toledo, J.C.; Cerchiaro, G.; do-Amaral, A.T.; Rezende, L; Malvezzi, A.; e Augusto, O. The Peroxidase Activity of Sod1 Diverts the Hydroxyl-like Oxidant to Peroxymonocarbonate and Carbonate Radical under Physiological Conditions. In: XV Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Indianapolis, In, USA, 2008.
- Cerqueira, F.M.; Medinas, D.B.; Demasi, M.; e Augusto, O. Doubling Expression of Sod1 in SH-SY5Y Cells Leads Altered Sod1 Forms that Are Increased on G93A Mutant Expression. In: Mutant SOD1 and Familial ALS: from the Molecule to Man, Milan, Italy, 2007.
- Medinas, D.B.; e Augusto, O. An Alternative Mechanism for Carbonate Radical Generation during Cu,ZnSod Peroxidase Activity. In: V Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine. V Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, Montevideo, Uruguay, 2007.
- Cerqueira, F.M.; Medinas, D.B.; Demasi, M.; e Augusto, O. Consequences of Sod1 and its G93A Mutant Expression in Neuroblastomas: Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). In: V Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine. V Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, Montevideo, Uruguay, 2007.
- Medinas, D.B.; e Augusto, O. Zinc-Deficient Sod1 Possesses Increased Peroxidase and Thiol Oxidase Activity. In: XII Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Austin, TX, USA, 2005.
- Cerqueira, F.M.; Medinas, D.B.; e Augusto, O. Comparison of Enzymatic Activities of Human Wt-Sod1 and Fals G93A-Sod1 In Vitro and In Cells. In: IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Águas de Lindóia, SP, Brazil, 2005.
- Fernandes, D.C.; Medinas, D.B.; Oliveira, A.; e Augusto, O. Tempol Diverts Peroxynitrite Reactivity towards Albumin and Cells from Protein Nitration to Protein Nitrosation. In: X Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Seattle, WA, USA, 2003.

Artigos completos:

- Medinas, D.B.; Gozzo, F.C.; Santos, L.F.A.; Iglesias, A.H.; e Augusto, O. (2010) Characterization of a Ditryptophan as Responsible for Human Sod1 Dimerization during its Peroxidase Activity. Implications to ALS. *(em preparação)*.

- Medinas, D.B.; Toledo, J.C.; Cerchiaro, G.; do-Amaral, A.T.; Rezende, L; Malvezzi, A.; e Augusto, O. (2009) Peroxymonocarbonate and Carbonate Radical Displace the Hydroxyl-like Oxidant in the Sod1 Peroxidase Activity under Physiological Conditions. *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 639-648.
- Medinas, D.B.; Cerchiaro, G.; Trindade, D.F.; e Augusto, O. (2007) The Carbonate Radical and Related Oxidants Derived from Bicarbonate Buffer. *IUBMB Life*, **59**, 255-262.
- Fernandes, D.C.; Medinas, D.B.; Alves, M.J.; e Augusto, O. (2005) Tempol Diverts Peroxynitrite/Carbon Dioxide Reactivity toward Albumin and Cells from Protein-Tyrosine Nitration to Protein-Cysteine Nitrosation. *Free Radic. Biol. Med.*, **38**, 189-200.

Prêmios e distinções:

- 2009: Travel Award da Society for Free Radical Biology and Medicine para apresentar o trabalho "MS Characterization of the Human Sod1 Covalent Dimer Produced from the Enzyme Peroxidase Activity. Implication to ALS.".
- 2007: Travel Award da Society for Free Radical Biology and Medicine para apresentar o trabalho "An Alternative Mechanism for Carbonate Radical Generation during Cu,ZnSod Peroxidase Activity".