



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



INSTITUTO DE QUÍMICA
Campus Araraquara

EDUARDO FESTOZO VICENTE

**USO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS NO ES-
TUDO DA PROTEÍNA DIIDROOROTATO
DESIDROGENASE HUMANA (*Hs*DHODH)**

Araraquara
2013

EDUARDO FESTOZO VICENTE

**USO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS NO ES-
TUDO DA PROTEÍNA DIIDROOROTATO
DESIDROGENASE HUMANA (*HsDHODH*)**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Araraquara
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

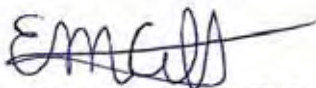
V632u	Vicente, Eduardo Festozo Uso de peptídeos sintéticos no estudo da proteína diidroorotato desidrogenase humana (<i>HsDHODH</i>) / Eduardo Festozo Vicente. – Araraquara : [s.n], 2013 136 f. : il. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Eduardo Maffud Cilli 1. Biotecnologia. 2. Diidroorotato desidrogenase humana. 3. Peptídeos. 4. Técnicas espectroscópicas. I. Título.
-------	--

EDUARDO FESTOZO VICENTE

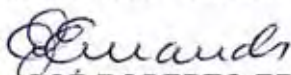
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Araraquara, 19 de agosto de 2013.

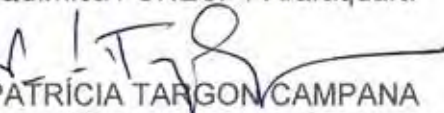
BANCA EXAMINADORA



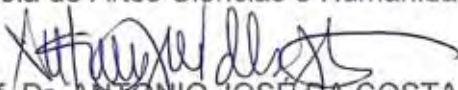
Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



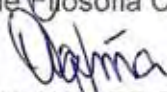
Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO ERNANDES
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof^a. Dr^a. PATRÍCIA TARGON CAMPANA
Escola de Artes Ciências e Humanidades / USP / São Paulo



Prof. Dr. ANTONIO JOSÉ DA COSTA FILHO
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto



Prof. Dr. VANI XAVIER DE OLIVEIRA JUNIOR
Centro de Ciências Naturais e Humanas / UFABC / Santo André

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Eduardo Festozo Vicente

Nome em citações bibliográficas: VICENTE, E. F.; Eduardo F. Vicente; Eduardo Festozo Vicente; VICENTE, EDUARDO F.

Endereço Profissional: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara.

Rua Prof. Francisco Degni, 55 - Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química - Unidade de Síntese, Estrutura, Aplicação de Peptídeos e Proteínas

Quitandinha

CEP 14800-900 - Araraquara, SP - Brasil

Telefone: (16) 33019822

Ramal: 9822

URL da Homepage: <http://www.iq.unesp.br/#184,187>

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO:

2009 - Doutorado em andamento em Biotecnologia (Conceito CAPES 4).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: "Uso de peptídeos sintéticos no estudo da proteína diidroorotato desidrogenase (*HsDHODH*)".

Ano de obtenção: 2013.

Orientador: Eduardo Maffud Cilli.

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Palavras-chave: peptídeos; fluorescência; síntese de peptídeos em fase sólida; CD; RPE; TOAC.

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Química de Macromoléculas.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Química de Macromoléculas / Especialidade: Peptídeos.

2012 a 2013 - Doutorado-sanduiche em Bioquímica.

Miami University-Oxford, Miami, Estados Unidos, com período sanduiche em Miami

University-Oxford (Orientador: Gary A. Lorigan).

Título: "Determinação da posição topológica do fragmento N-terminal da diidroorotato desidrogenase humana (*HsDHODH*) na interação peptídeo/membrana por meio da RPE pulsada (PELDOR)".

Ano de obtenção: 2013.

Orientador: Eduardo Maffud Cilli.

Co-orientador: Gary A. Lorigan.

Bolsista do: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

Palavras-chave: CD; DEER; dihydroorotate dehydrogenase; model membranes; peptides; Pulsed ESR (PELDOR).

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Química de Macromoléculas / Especialidade: Peptídeos.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Química de Macromoléculas.

2007 a 2009 - Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: "Síntese em Fase Sólida e Estudos Conformacionais de Análogos Contendo TOAC de um Peptídeo da Rã *Hypsiboas albopunctatus*".

Ano de Obtenção: 2009.

Orientador: Eduardo Maffud Cilli.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

Palavras-chave: aminoácidos; EPR; síntese de peptídeos em fase sólida; peptídeos antimicrobianos; fluorescência; CD.

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Química de Macromoléculas.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Química de Macromoléculas / Especialidade: Peptídeos.

2008 a 2008 - III Curso de Inverno - Instituto de Química - USP.

"Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular. (Carga horária: 80h).

Universidade de São Paulo.

2002 a 2007 - Graduação em Farmácia Bioquímica.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

PROJETOS DE PESQUISA

2010 - 2010 - "Uso da RPE no estudo de peptídeos bioativos".

Descrição: Supervisão científica realizada no projeto "Uso da RPE no estudo de peptídeos bioativos", auxiliando a aluna Michely Fernanda Leopoldo nas purificações, sínteses e confecção de relatórios.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Especialização: (0) / Mestrado acadêmico: (0) / Mestrado profissionalizante: (0) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Eduardo Festozo Vicente - Integrante / Cilli, Eduardo M. - Coordenador / Michely Fernanda Leopoldo - Integrante.

2009 - 2013 - "Uso de peptídeos sintéticos no estudo da proteína diidroorotato desidrogenase (*HsDHODH*)".

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Eduardo Maffud Cilli - Coordenador / Eduardo Festozo Vicente - Integrante.

Financiador: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

2007 - 2009 - "Síntese em Fase Sólida e Estudos Conformacionais de Análogos Contendo TOAC de um Peptídeo da Rã *Hypsiboas albopunctatus*".

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Eduardo Maffud Cilli - Coordenador / Eduardo Festozo Vicente - Integrante.

Financiador: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

ÁREAS DE ATUAÇÃO

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.

2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Química de Macromoléculas.

3. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Química de Macromoléculas/Especialidade: Proteínas.

IDIOMAS

Inglês: Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Espanhol: Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Português: Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES ATÉ AGOSTO/2013

1. VICENTE, EDUARDO F.; BASSO, LUIS GUILHERME M.; CESPEDES, GRAZIELY F.; LORENZÓN, ESTEBAN N.; CASTRO, MARIANA S.; MENDES-GIANNINI, MARIA JOSÉ S.; COSTA-FILHO, ANTONIO JOSÉ; CILLI, EDUARDO M. **Dynamics and Conformational Studies of TOAC Spin Labeled Analogues of Ctx(Ile²¹)-Ha Peptide from *Hypsiboas albopunctatus*.** Plos One, v. 8, p. e60818, 2013.
 2. LORENZON, E. N.; CESPEDES, G. F.; VICENTE, E. F.; NOGUEIRA, L. G.; BAUAB, T. M.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. **Effects of Dimerization on the Structure and Biological Activity of Antimicrobial Peptide Ctx-Ha.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Print), v. 56, p. 3004-3010, 2012.
 3. CESPEDES, G. F.; LORENZÓN, E. N.; VICENTE, E. F.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. **Mechanism of Action and Relationship Between Structure and Biological Activity of Ctx-Ha, a New Cerato-toxin-like Peptide from *Hypsiboas albopunctatus*.** Protein and Peptide Letters, v. 19, p. 596-603, 2012.
 4. NAKAIE, CLOVIS R.; OLIVEIRA, ELIANDRE; VICENTE, E. F.; JUBILUT, GUITA N.; SOUZA, SINVAL E.G.; MARCHETTO, REINALDO; CILLI, EDUARDO M. **Solid Phase Peptide Synthesis in Highly Loaded Conditions.** Bioorganic Chemistry (Print), v. 39, p. 101-109, 2011.
 5. BASSO, LUIS G. MANSOR; VICENTE, EDUARDO F.; CILLI, EDUARDO M.; COSTA-FILHO, ANTONIO J. **Interaction of Biologically-Relevant Peptides with Membrane Model Systems.** Biophysical Journal (Print), v. 100, p. 495a-495a, 2011.
 6. CESPEDES, G. F.; VICENTE, E. F.; JUBILUT, G. N.; NAKAIE, C. R.; CILLI, E. M. **Use of FTIR in the obtention of resins and peptides synthesis in solid phase.** Química Nova (Impresso), v. 34, p. 589-594, 2011.
 7. VICENTE, E. F.; CESPEDES, G. F.; CRUSCA JUNIOR, E.; CASTRO, M. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; BASSO, L. G. M.; COSTA-FILHO, A. J.; CILLI, E. M. **Conformational studies of TOAC-analogues from new cytolytic peptide isolated from *Hypsiboas albopunctatus*.** Journal of Peptide Science (Print), v. 16, p. 141-142, 2010.
 8. CRUSCA JUNIOR, E.; VICENTE, E. F.; CESPEDES, G. F.; CASTRO, M. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; CILLI, E. M. **Studies of an active peptide isolated from *Hyla biobeba* and its synthetic analogues.** Amino Acids (Wien. Print), v. 37, p. 44-45, 2009.
 9. CILLI, E. M.; VICENTE, E. F.; CRUSCA JUNIOR, E.; NAKAIE, C. R. **EPR investigation of the influence of side chain protecting groups on peptide-resin solvation of the Asx and Glx model containing peptides.** Tetrahedron Letters, v. 48, p. 5521-5224, 2007.
-

BANCAS

Participação em bancas de comissões julgadoras para bolsas de PDSE - CAPES pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - IQ-UNESP

MARCHETTO, R.; COELHO, P. S. R.; VICENTE, E. F.. Comissão de bolsas do Programa de pós-Graduação em Biotecnologia. 2010. Instituto de Química- UNESP.

MARCHETTO, R.; CARMONA, E. C.; VICENTE, E. F.. Comissão de bolsas do Programa de pós-Graduação em Biotecnologia. 2010. Instituto de Química- UNESP.

CILLI, E. M.; NOVO, M. T. M.; VICENTE, E. F.. Comissão de bolsas do Programa de pós-Graduação em Biotecnologia. 2010. Instituto de Química- UNESP.

CILLI, E. M.; SOUZA, D. H. F.; VICENTE, E. F.. Comissão de bolsas do Programa de pós-Graduação em Biotecnologia. 2010. Instituto de Química- UNESP.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRASV

VICENTE, E. F. ; CILLI, E. M. ; BERTOLINI, M. C. ; SCARPA, R. A. ; PULCINELLI, S. H. ; VILEGAS, W. ; RIBEIRO, W. C. I Workshop dos Programas de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia IQ - UNESP - 15 Anos do PPG em Biotecnologia, 2009.

OUTRAS INFORMAÇÕES

Tem experiência na área de Bioquímica e Biofísica e tem como principal estudo as interações entre peptídeo/proteína e miméticos de membrana utilizando as técnicas de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), cromatografia líquida de alta performance (HPLC), Espectrometria de Massas, Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), Dicroísmo Circular (CD), Fluorescência e Espectroscopia na região do infravermelho/ultravioleta/visível. Foi selecionado e participou do III Curso de Inverno da USP - SP "Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular", com carga horária de 80h, realizado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Participou de diversos Congressos da área de Bioquímica, com ênfase no campo de Peptídeos, tanto internacionais (23rd American Peptide Symposium, 31st European Peptide Symposium, VII Iberoamerican Congress of Biophysics) quanto nacionais (seis edições da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq). Foi Representante Discente, tanto titular como suplente do Conselho do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - IQ UNESP Araraquara, no período de 2007 a 2011; também foi Representante Discente titular da Congregação do Instituto de Química - UNESP Araraquara, no período de out/2010 até out/2011. Foi membro titular da Associação dos Pós-Graduandos do Instituto de Química de Araraquara, no período de set/2007 até jun/2012. Participou de 4 (quatro) bancas de comissões julgadoras para bolsas PDSE do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, na qualidade de Representante Discente.

*Aos meus pais, Heloisa e Ado, e ao meu irmão, Henrique,
que SEMPRE estiveram ao meu lado, me apoiando
e me incentivando. Vocês tem todo o meu respeito,
admiração e carinho, pois todos os meus objetivos
alcançados eu devo a vocês. Sou eternamente grato pelo que
fizeram e fazem por mim.
Amo vocês.*

*Aos meus queridos, tio Paulo Roberto (Pór - in memorian)
e vovó Heleninha (in memorian), os quais
infelizmente não puderam presenciar este passo
importante de minha vida, mas que, com certeza,
estão num lugar melhor que este, sempre olhando por mim.
Muito obrigado. Saudades.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS**, que me deu a graça e a oportunidade de estudar, conhecer pessoas excepcionais e a APRENDER mais sobre a ciência de nossa vida, sempre com HUMILDADE. A vida é, no final das contas, um grande e contínuo aprendizado.

Ao meu orientador, **Eduardo Maffud Cilli**, amigo, tutor e exemplo de vida. Muito obrigado por acreditar em mim nestes 10 anos de trabalho juntos. Obrigado por me apresentar, incentivar e me aperfeiçoar no maravilhoso campo da ciência e do ensino. Obrigado por me dar a motivação necessária para que eu superasse todos os obstáculos pelo caminho do meu trabalho. Não tenho palavras para descrever o quanto sou grato à sua pessoa, pois todo o aprendizado do conhecimento científico que adquiri em todos esses anos, eu devo a você. Muito obrigado, meu mestre.

À toda minha família, que sempre me apoiou para que eu conseguisse completar esta etapa de minha vida: **Vovô Alberto e Vovô João, Vovó Maria, Tio "Casoberto"** (meu querido e amado padrinho), **Tio Sérgio e Tia Cecília, Tio "Cao"** (obrigado pelas longas conversas sobre os assuntos mais variados...) e **Tia Gláucia**; meus queridos primos, **Bruno, Vicka, Laura, Felipe, Tiago, Breno, Vítinho, Lucas, Nina, Ana Carolina** e principalmente à **Marina**, o qual considero a minha irmã mais velha; também ao meu afilhado **Leandro**, o qual amo incondicionalmente. Não tenho dimensões para quantificar o quanto vocês me fazem bem. Muito obrigado.

À minha namorada, **Ana Paula**, companheira, confidente, melhor amiga e minha eterna "criança" que, mesmo muitas vezes distante de mim, sempre me apoiou em minhas decisões, preocupou-se comigo e fez de tudo para me ajudar a alcançar esta vitória. Obrigado simplesmente por você existir, pois minha vida se torna melhor com você ao meu lado. O meu muito obrigado é pouco para você. Te amo muito.

Aos meus amigos acadêmicos e de coração, **Saulo, Edson Crusca, Juliana "Juquinha", Wanessa, Esteban (Argentino), Graziely, Daniel "Koala", "Zé" Rodolfo, José Roberto "Urso" e Ricardo "Smurff"**. Obrigado por vocês serem um pilar forte e confiável para mim, onde tenho certeza que posso contar SEMPRE. Obrigado por vocês serem o que vocês são, VERDADEIROS AMIGOS. Que essa amizade dure para sempre. Meu muito obrigado e contem comigo por toda a vida.

Ao meu amigo e professor, **Reinaldo Marchetto**, pelos ensinamentos, pelas discussões acadêmicas, pelas conversas e risadas. Tenho orgulho e gratidão por trabalhar ao seu lado também por estes 10 anos. Muito obrigado pela pessoa que você é, o qual sempre considerarei como meu coorientador e exemplo de professor.

Aos professores e colegas colaboradores deste trabalho: Prof. Dr. **Gary A. Lorigan**, Prof. Dr. **Antonio José da Costa-Filho**, Dr. **Indra Dev Sahu**, Dr. **Alberto Alécio (Albertinho)**, Ademir, Dr. **Fábio Dyszy**, **Luis Guilherme (Militar)** e aos queridos **Thatyane Nobre e Felipe Pavinatto** que, com a contribuição, auxílio e

suporte acadêmico, este trabalho teve o êxito de ser concluído. Meu muito obrigado a vocês.

À **Miami University**, universidade americana que me recebeu e me deu a oportunidade de completar a parte experimental do meu doutorado, contribuindo grandiosamente ao meu trabalho. Obrigado pelo apoio, suporte e oportunidade oferecida a mim.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, com quem trabalhei e compartilhei experiências: **Ana, Camila, Davi "Pardal", Anderson, Aderson, Edson "Arake-tu", Matheus, Julia, Isabella, Gabriela e Norival**; aos amigos da minha querida **República Caverna**, os quais sempre terei um carinho imenso e saudades; aos meus amigos de coração dos EUA, **Kiama, Patrick, Njoroge, Wathu "Precious", Tedros, Kwame, Nanci, Johnnie, Marcus, Vanessa, Nayara, Gabriela, João, Guilherme, Papis, Alberto, Jimmy, Kamau, Oliver, Steve, Xavier, Greg, Jessica, Sarah e Franci**. Vocês foram muito importantes na minha vida e não tenho palavras para agradecer o quando vocês me fizeram feliz e contribuíram para este passo importante na minha vida; e amigos da minha cidade natal Bebedouro e de Araraquara, incluindo os da minha ex-banda "**Bejamz**", os quais me deram muitas alegrias, mesmo que por um pequeno espaço de tempo. Muito obrigado a vocês todos.

Às "meninas" da **Seção de Pós-Graduação** que sempre me deram o suporte necessário e ajuda para que a parte burocrática do meu curso de doutorado estivesse sempre em ordem. Ao pessoal da Biblioteca, em especial a **Cristina** e a **Valéria**, que me ajudaram na confecção das referências e pela total atenção e prestatividade. Muito obrigado a vocês e sentirei saudades dos nossos papos e risadas.

Ao **Instituto de Química da UNESP - Araraquara**, que me acolheu por 10 anos. À todos os **funcionários**, principalmente os que estão locados no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química: **Zilda, Fernando, Tarcísio, Ademir, Luíza e Valdenir**. Obrigado também à **CAPES**, ao **CNPq** e **FAPESP** pelo financiamento do meu doutorado, sem o qual não poderia ser realizado.

A todos que me ajudaram diretamente e indiretamente neste trabalho, tanto academicamente quanto pessoalmente, pois é impossível citar todos por aqui. Fica aqui registrado o meu agradecimento, pois você foi, de certa forma, importante para que meu trabalho ficasse completo.

EPÍGRAFE

"O trabalho enobrece e dignifica o homem."
Sabedoria popular

"No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz."

"Se cheguei onde cheguei e consegui fazer tudo o que fiz, foi porque tive a oportunidade de crescer bem, num bom ambiente familiar, de viver bem, sem problemas econômicos e de ser orientado no caminho certo nos momentos decisivos de minha vida."

"Não importa o que você seja, quem você seja, ou o que deseja na vida, a ousadia em ser diferente reflete na sua personalidade, no seu caráter, naquilo que você é. E é assim que as pessoas lembrarão de você um dia."

*"Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá.
De alguma maneira você chega lá."*



Ayrton Senna da Silva

RESUMO

A diidroorotato desidrogenase é uma enzima que apresenta um papel central na biossíntese de pirimidinas e catalisa a oxidação do diidroorotato a orotato. A enzima atua durante a via "de novo" de síntese de pirimidinas e está presente em quase todos os organismos vivos. A diidroorotato desidrogenase humana (*HsDHODH*) pode representar um importante alvo para o tratamento de doenças hiperproliferativas e inflamatórias, já que sua inibição bloqueia a síntese de ácidos nucleicos, impedindo a sua proliferação. Esta enzima tem uma estrutura monomérica e está associada com a membrana interna das mitocôndrias pela sua extensão N-terminal. Assim, entender em detalhes como esta enzima interage com a membrana poderia elucidar um alvo seletivo para drogas antiproliferativas, antiparasíticas e imunossupressivas. Esta região está também envolvida com a catálise central da enzima, sequestrando moléculas de ubiquinona presentes na membrana, fundamentais para as reações de oxirredução feitas pela enzima. Deste modo, para um melhor entendimento destes aspectos, neste trabalho foram sintetizados, por meio da Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS) o peptídeo Ac-GDERFYAEHLMPTLQGLDPESAHLAVRFTSLG-NH₂, que corresponde ao microdomínio existente na porção N-terminal da *HsDHODH*, entre os resíduos 33 e 66. Três análogos marcados com o aminoácido paramagnético TOAC nas posições 0, 12 ou 20, além de dois análogos duplamente marcados também foram obtidos. Ambos os peptídeos com dupla marcação possuem uma cisteína ligada ao spin MTSSL na posição 35 (C-terminal) se diferenciando pela posição do segundo marcador: um contendo outra cisteína ligada ao MTSSL na posição 12 e o segundo possuindo o TOAC na posição 0 (ou N-terminal). Estes peptídeos foram estudados por técnicas espectroscópicas para aquisição de informações sobre sua estrutura, conformação e dinâmicas, quando interagindo com miméticos de membranas tais como micelas, vesículas e monocamadas de Langmuir. Os dados de dicróismo circular mostram que o peptídeo na presença de miméticos de membrana possui um alto teor de estruturas helicoidais, homólogas à descrita na literatura para esta região na *DHODH*, comprovando a capacidade do peptídeo em mimetizar o microdomínio proposto. Os resultados de fluorescência e monocamadas de Langmuir confirmaram a interação do peptídeo com a membrana, mostrando também a influência de fatores como a fluidez dos lipídios e a natureza da cabeça polar dos lipídios na afinidade do peptídeo com estes miméticos de membrana. Os dados de RPE indicam que todos os peptídeos análogos interagem com as micelas e vesículas, diferenciando-se pela intensidade das linhas: a posição 0 encontra-se mais livre, por estar na porção N-terminal; a posição 12 apresenta a menor mobilidade, provavelmente com a face desta hélice contendo o marcador voltada para a membrana. A posição 20 parece indicar duas populações, uma em solução e outra incorporada à membrana, mostrando provavelmente a mudança conformacional sentida por esta região quando ocorre a interação com o substrato. Os dados de DEER mostraram que o peptídeo apresenta três conformações diferentes: uma não estruturada, em solução; uma "fechada", quando está interagindo com micelas e uma "aberta", quando interage com vesículas. Estas mudanças conformacionais podem indicar um possível mecanismo de regulação para o sítio ativo da enzima *HsDHODH* ao nível molecular, reportado pela primeira vez em um trabalho científico.

Palavras-chave: Diidroorotato desidrogenase humana. Monocamadas de Langmuir. Peptídeos. RPE. SPFS. Dicróismo Circular. TOAC. RPE pulsada.

ABSTRACT

The dihydroorotate dehydrogenase is an enzyme that has a central role on the pyrimidine biosynthesis and catalyses the oxidation of dihydrorotate to orotate. The enzyme acts on "de novo" pyrimidines nucleotides pathway and it is present in almost all the live organisms. The human dihydroorotate dehydrogenase (*HsDHODH*) can represent an important target for the treatment of hiperproliferative and inflammatory diseases, since its inhibition blocks the nucleic acid synthesis, which restrains the cell proliferation. This enzyme has a monomeric structure and it is associated into the inner mitochondrial membrane by the N-terminal extension. Thus, understanding in details how this enzyme interacts with the membrane could help to elucidate a selective target for antiproliferative, antineoplastic and immunosuppressive drugs. This region is also involved with the central enzyme catalysis, harboring quinones molecules that are in the membranes, which is essential for the oxidation-reduction reactions made by the *HsDHODH*. In this way, for a better evaluation of these aspects, in this work we synthesized through the Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) the peptide Ac-GDERFYAEHLMPTLQGLLDPESAHRLAVRFTSLG-NH₂, which corresponds to the *HsDHODH* N-terminal microdomain, between the residues 33 to 66. Three analogues labeled with the paramagnetic amino acid TOAC in the positions 0, 12 or 20 and two doubly labeled analogues were also synthesized. Both doubly labeled peptides contain a MTSSL-attached cysteine residue bounded to the position 35 (C-terminus), differing by the position of the second spin label: one possessing a cysteine with MTSSL at position 12 and the other contains TOAC at position 0 (N-terminus). These peptides were studied by spectroscopy techniques in order to obtain information about the structure, conformation and dynamics when they interact with membrane mimetic such as micelles, vesicles and Langmuir monolayers. The CD data showed that the peptides in presence of membrane mimetic present a high amount of helicoidal structures, homologous to that described in literature for the N-terminal microdomain in *HsDHODH*, which support the capacity of the peptide to simulate the microdomain proposed. The fluorescence results and Langmuir monolayers confirmed the peptide interaction with the membranes and also showed the influence of some specific features such as fluidity and head polar groups nature of the lipids in the peptide affinity with the membrane mimetic. The EPR data indicates that all peptides interact with the micelles and vesicles, differing by the line shape intensities: the position 0 is more mobile for being in the N-terminus; the position 12 presents the less mobility, probably with the face of the first helix pointing toward the membrane. The position 20 seems to show two populations, one in solution and another attached to the membrane, which can indicate the conformational changes that this region produces when the interaction with the substrate occurs. The DEER data showed that the peptide presents three distinct conformations: unstructured in water solution, a "closed" conformation when interacting to micelles and another "opened", when bound to vesicles. These conformational changes indicate a possible mechanism of action for regulation of the *HsDHODH* at the molecular level, reported for the first time in a scientific study.

Keywords: Human dihydroorotate dehydrogenase. Langmuir monolayers. Peptides. EPR. SPPS. CD. TOAC. DEER.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síntese "de novo" de nucleotídeos de pirimidina em eucariotos.	24
Figura 2: Localização das enzimas da via de biossíntese "de novo" de nucleotídeos de pirimidina em eucariotos.	25
Figura 3: <i>Hs</i> DHODH (PDB ID 1D3H).	27
Figura 4: Região N-terminal da enzima <i>Hs</i> DHODH.	27
Figura 5: As duas semireações globais catalisadas pela enzima DHODH.	28
Figura 6: Esquema geral representando as etapas da SPFS.	30
Figura 7: Diagrama representando o efeito Zeeman.	32
Figura 8: A interação hiperfina nuclear.	34
Figura 9: Os marcadores de spin utilizados na RPE.	35
Figura 10: Comparação entre os espectros de CW-RPE no peptídeo fosfolambam (PLB) marcados com TOAC e MTSSL.	36
Figura 11: Efeito da temperatura no tempo de correlação e no parâmetro de ordem nos espectros de RPE.	37
Figura 12: Esquema simplificado da determinação das distâncias interspins detectadas pelos experimentos de DEER.	39
Figura 13: A escala de distâncias que podem ser acessadas pelos diferentes métodos de RPE.	40
Figura 14: O experimento de DEER.	42
Figura 15: O plano da ligação peptídica.	44
Figura 16: Espectros de CD característicos das estruturas secundárias.	45
Figura 17: Diagrama de Jablonski.	46
Figura 18: Cuba de Langmuir.	50
Figura 19: Isoterma de Pressão de Superfície para uma monocamada contendo o fosfolípido DPPC puro.	51
Figura 20: Helical Wheel do peptídeo N-t(DH).	56

Figura 21: Solução de Fmoc-TOAC na presença de Na ₂ SO ₄ .	59
Figura 22: Protocolo de síntese utilizando a estratégia Fmoc.	61
Figura 23: Espectro na região do Ultravioleta do peptídeo N-t(DH).	65
Figura 24: Cromatogramas do material obtido e do Fmoc-TOAC padrão.	73
Figura 25: Cromatogramas dos peptídeos brutos.	77
Figura 26: Cromatogramas dos peptídeos brutos revertidos.	78
Figura 27: Reação de ligação do marcador de spin MTSSL às cadeias laterais das cisteínas.	79
Figura 28: Cromatogramas da reação de marcação de spin com MTSSL.	80
Figura 29: Cromatogramas dos peptídeos puros.	81
Figura 30: Espectros de massas dos peptídeos puros.	82
Figura 31: Espectros de fluorescência do peptídeo N-t(DH) em diferentes concentrações de LPC.	83
Figura 32: Espectros de fluorescência do peptídeo N-t(DH) em solução a 30 µmol L ⁻¹ , em diferentes concentrações de acrilamida.	85
Figura 33: Espectros de fluorescência do peptídeo N-t(DH) em LPC	85
Figura 34: Espectros de fluorescência do peptídeo N-t(DH) a 30 µmol L ⁻¹ em concentrações diferentes de vesículas.	86
Figura 35: Espectros de fluorescência do peptídeo N-t(DH) a 30 µmol L ⁻¹ em vesículas na concentração de 0,8 mmol L ⁻¹ , em diferentes concentrações de acrilamida.	87
Figura 36: Variações da razão de emissão de fluorescência inicial sobre a fluorescência máxima (F ₀ /F) obtida para o peptídeo N-t(DH) em solução, em micelas de LPC e em vesículas de DPPC, em diferentes concentrações de acrilamida.	87
Figura 37: Cinéticas de adsorção (A) e curvas de pressão de superfície das isotermas (B) para o peptídeo N-t(DH) em diferentes concentrações, na interface água-ar.	89
Figura 38: Cinéticas de adsorção (A) e curvas de pressão de superfície das isotermas (B) para a cardiolipina, exibindo o comportamento do peptídeo em diferentes concentrações.	90

Figura 39: Cinéticas de adsorção (A) e curvas de pressão de superfície das isothermas (B) para o DPPC, exibindo o comportamento do peptídeo em diferentes concentrações.	92
Figura 40: Cinéticas de adsorção (A) e curvas de pressão de superfície das isothermas (B) para o DPPE, exibindo o comportamento do peptídeo em diferentes concentrações.	94
Figura 41: Curvas de compressibilidade para cardiolipina (A), DPPC (B) e DPPE (C), para o peptídeo N-t(DH) em diferentes concentrações.	95
Figura 42: Espectro de PM-IRRAS para o peptídeo N-t(DH) em solução tampão entre 2800 a 3200 cm^{-1} (A) e entre 1000 a 1800 cm^{-1} (B).	96
Figura 43: Espectro de PM-IRRAS para cardiolipina em solução tampão (A) e com o peptídeo N-t(DH) incorporado (B), entre 1000 a 1800 cm^{-1} .	98
Figura 44: Espectro de PM-IRRAS para DPPC em solução tampão entre 2800 a 3200 cm^{-1} (A) e entre 1000 a 1800 cm^{-1} (B); DPPC na presença do peptídeo N-t(DH) entre 2800 a 3200 cm^{-1} (C) e 1000 a 1800 cm^{-1} (D).	100
Figura 45: Espectro de PM-IRRAS para o DPPE em solução tampão (A) e com o peptídeo N-t(DH) incorporado (B) entre 1000 a 1800 cm^{-1} .	101
Figura 46: Espectros de CD dos peptídeos e análogos marcados com TOAC. (A) N-t(DH), (B) $[\text{TOAC}^0]\text{N-t(DH)}$, (C) $[\text{TOAC}^{20}]\text{N-t(DH)}$ e (D) $[\text{TOAC}^{12}]\text{N-t(DH)}$ em diferentes condições.	104
Figura 47: Espectros de CD do peptídeo N-t(DH) em diferentes concentrações de vesículas de DPPC:DPPE:CL.	105
Figura 48: Espectros de CD do peptídeo N-t(DH) a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações de LPC (A) e SDS (B).	106
Figura 49: Espectros de CD dos análogos duplamente marcados do peptídeo N-t(DH) a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes condições. $[\text{Cys}^{12-35}\text{MTSSL}]\text{N-t(DH)}$ (A) e $[\text{Cys}^{35}\text{MTSSL-TOAC}^0]\text{N-t(DH)}$ (B).	107
Figura 50: Espectros de CD dos peptídeos análogos duplamente marcados ao N-t(DH) a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em DPC a 10 mmol L^{-1} . $[\text{Cys}^{12-35}\text{MTSSL}]\text{N-t(DH)}$ (A) e $[\text{Cys}^{35}\text{MTSSL-TOAC}^0]\text{N-t(DH)}$ (B).	107
Figura 51: Espectros de CD do análogo $[\text{Cys}^{12-35}\text{MTSSL}]\text{N-t(DH)}$ a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução aquosa e POPC.	108
Figura 52: Espectros de RPE dos peptídeos análogos ao N-t(DH) contendo a sonda paramagnética TOAC na posição 0 ou N-terminal (A), na posição 20 (B) e na posição 12 (C) da cadeia peptídica	110

Figura 53: Espectros de RPE dos peptídeos análogos [TOAC ⁰]N-t(DH) (A) e [TOAC ¹²]N-t(DH) (B)	113
Figura 54: Espectros de RPE dos peptídeos análogos [TOAC ⁰]N-t(DH) (A), [TOAC ²⁰]N-t(DH) (B) e [TOAC ¹²]N-t(DH) (C), em diferentes composições de vesículas multilamelares.	114
Figura 55: Espectros de CW-RPE do peptídeo análogo [Cys ^{12,35} MTSSL]N-t(DH).	117
Figura 56: Sinal de DEER de domínio de tempo para o análogo [Cys ^{12,35} MTSSL]N-t(DH) em diferentes miméticos de membrana.	120
Figura 57: Espectros de CW-RPE do peptídeo análogo [Cys ³⁵ MTSSL-TOAC ⁰]N-t(DH). (A) em solução tampão e em micelas de DPC e LPC; (B) em diferentes composições de vesículas multilamelares.	121
Figura 58: Sinal de DEER de domínio de tempo para o análogo [Cys ³⁵ MTSSL-TOAC ⁰]N-t(DH) em diferentes miméticos de membrana.	121
Figura 59: Espectros de CW-RPE dos análogos [Cys ¹²⁻³⁵ MTSSL]N-t(DH) (A) e [Cys ³⁵ MTSSL-TOAC ⁰]N-t(DH) (B).	122
Figura 60: Sinal de DEER de domínio de tempo para os análogos [Cys ^{12,35} MTSSL]N-t(DH) (A) e [Cys ³⁵ MTSSL-TOAC ⁰]N-t(DH) (B) em miméticos de membrana contendo POPC:POPE:CL:UBQ.	123

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Números de onda e os respectivos grupos ou estruturas químicas representadas na região do infravermelho de aplicação neste trabalho.	54
Quadro 2: Sequências do peptídeo N-t(DH) e seus análogos.	57
Quadro 3: Massas obtidas das sínteses do peptídeo N-t(DH) e análogos.	76
Quadro 4: Valores das larguras do pico central (W_0) dos espectros de CW-RPE dos análogos contendo TOAC ao peptídeo N-t(DH).	111
Quadro 5: Distâncias entre os centros paramagnéticos dos análogos $[\text{Cys}^{12,35}\text{MTSSL}]\text{N-t(DH)}$ e $[\text{Cys}^{35}\text{MTSSL-TOAC}^0]\text{N-t(DH)}$.	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. Aminoácidos

Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Ácido aspártico
Cys (C)	Cisteína
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Ácido Glutâmico
Gly (G)	Glicina
His (H)	Histidina
Ile (I)	Isoleucina
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
Met (M)	Metionina
Phe (F)	Fenilalanina
Pro (P)	Prolina
Ser (S)	Serina
Thr (T)	Treonina
Trp (W)	Triptofano
Tyr (Y)	Tirosina
Val (V)	Valina

2. Outras terminologias

a_N	desdobramento hiperfino
ACN	Acetonitrila
Boc	<i>t</i> -butiloxicarbonila
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD	Dicroísmo Circular
CL	Cardiolipina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Concentração micelar crítica
CW-RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica em onda contínua
DCM	diclorometano
DEER	"Double Electron-Electron Resonance"
DHODH	diidroorotato desidrogenase
HsDHODH	diidroorotato desidrogenase humana
DIC	N,N-diisopropilcarbodiimida
DIEA	N,N,N-diisopropiletilamina
DMF	N,N-dimetilformamida
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfatidilcolina
DPPE	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfatidiletanolamina
ϵ	coeficiente de extinção molar
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonila
HATU	hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônico
HBTU	hexafluorofosfato de <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônico
HOBt	N-hidroxibenzotriazol
K_{sv}	Constante de Stern-Volmer
LPC	1-palmitoil-2-hidroxi- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
LUV	vesículas unilamelares grandes
MLV	vesículas multilamelares

MTSSL	marcador de spin (1-óxido-2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-metil) metanotiosulfonato
NMP	N-metilpirrolidona
PM-IRRAS	"Polarization-Modulated Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy"
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfatidilcolina
POPE	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfatidiletanolamina
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TFA	ácido trifluoracético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TIS	triisopropilsilano
TOAC	ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxido-4-amino-4-carboxílico
UBQ	Decilubiquinona (CoQ ₁₀)
UV-Vis	Luz ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	DHODH	23
1.2	Síntese de peptídeos	29
1.3	Ressonância paramagnética eletrônica	31
1.3.1.	Ressonância eletrônica dupla ou DEER ("double electron-electron resonance")	38
1.4	Dicroísmo circular	43
1.5	Fluorescência	46
1.6	Monocamadas de Langmuir	48
2	OBJETIVOS	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1	Síntese do Fmoc-TOAC	58
3.2	Síntese dos peptídeos	60
3.3	Reversão do aminoácido paramagnético toac	62
3.4	Purificação e caracterização dos peptídeos	62
3.5	Fluorescência	65
3.6	Dicroísmo circular	67
3.7	Monocamadas de Langmuir	69
3.8	Ressonância paramagnética eletrônica	70
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1	Caracterização do Fmoc-TOAC-OH	73
4.2	Síntese dos peptídeos	73
4.3	Purificação e caracterização dos peptídeos	76
4.4	Fluorescência	83
4.4.1	Interação do peptídeo N-t(DH) com micelas	83
4.4.2	Interação do peptídeo N-t(DH) com vesículas	86
4.5	Monocamadas de Langmuir	88
4.5.1	Adsorção do N-t(DH) em interface água-ar	88
4.5.2	Interação entre o peptídeo N-t(DH) e modelos de membrana	89
4.5.2.1	Interação entre o peptídeo N-t(DH) e cardiolipina	89
4.5.2.2	Interação entre o peptídeo N-t(DH) e DPPC	92
4.5.2.3	Interação entre o peptídeo N-t(DH) e DPPE	93
4.5.2.4	Compressibilidade	94
4.5.3	Análises com PM-IRRAS	96
4.5.3.1	Cardiolipina	97
4.5.3.2	DPPC	98
4.5.3.3	DPPE	100
4.6	Dicroísmo circular	102
4.7	Ressonância paramagnética eletrônica	109
4.7.1	Análogos marcados com TOAC	109
4.7.2	Análogos duplamente marcados	117
5	CONCLUSÕES	125
	REFERÊNCIAS	127

1 INTRODUÇÃO

A inibição das vias metabólicas de biossíntese de nucleotídeos vem sendo largamente empregada na pesquisa científica como estratégia para o desenvolvimento de novas drogas. Como esta via é imprescindível para a sobrevivência de praticamente todos os organismos vivos, inclusive os seres humanos, o seu estudo é importante na busca da cura ou otimização dos tratamentos de diversos males, tais como o câncer, artrites reumatóides, doenças autoimunes, leucemias, entre outras graves doenças proliferativas que acometem os homens por todo o mundo.^{1,2}

Existem duas rotas metabólicas que produzem nucleotídeos: as vias "de novo", onde são utilizados precursores mais simples para a síntese de nucleotídeos, como aminoácidos, ribose 5-fosfato, CO_2 e NH_3 ; e as vias de recuperação ou "salvação", as quais reciclam as bases livres e os nucleotídeos liberados na quebra dos ácidos nucléicos. Ambas as vias são essenciais no metabolismo celular de praticamente todos os organismos vivos conhecidos.

Contudo, células que se proliferam rapidamente ou necessitam de rápida multiplicação, como linfócitos T, células cancerígenas, entre outras, utilizam-se das vias de biossíntese "de novo" de nucleotídeos que, embora com um custo mais energético, propicia uma maior produção de nucleotídeos. Células humanas, em condições normais, fazem uso principalmente das vias biossintéticas de "salvação" para atender à demanda de fabricação de bases nitrogenadas na célula.^{3,4} Frente a isto, agentes inibidores da biossíntese "de novo" dos nucleotídeos, particularmente no caso das bases nitrogenadas pirimidínicas, são candidatos promissores a fármacos quimioterápicos, pois estas células específicas são particularmente sensíveis a agentes que interferem nesta via metabólica.

1.1 DHODH

Uma proteína importante encontrada na via de biossíntese "de novo" é a diidroorotato desidrogenase (DHODH).⁵ Esta proteína é uma enzima que catalisa a conversão de L-diidroorotato a orotato, no quarto e único passo onde ocorre uma e-

Introdução

tapa de oxirredução na via "de novo" de biossíntese de pirimidinas (figura 1), sendo este considerado o passo limitante da reação.

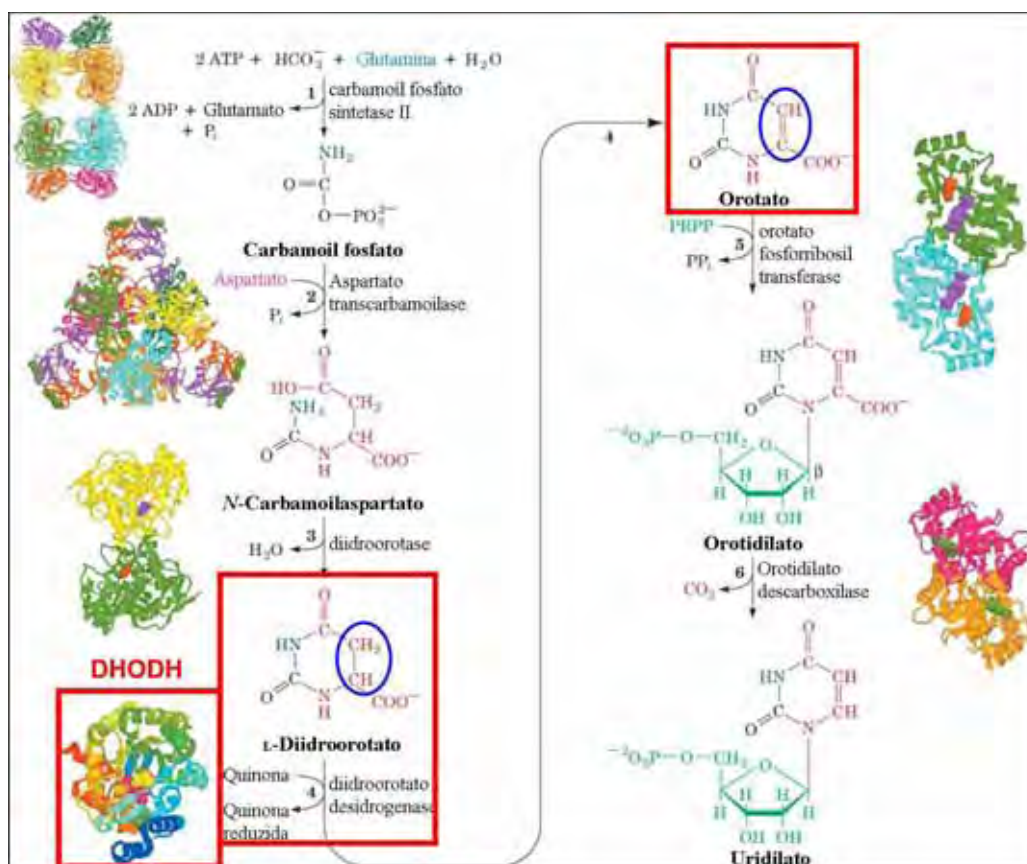


Figura 1: Síntese "de novo" de nucleotídeos de pirimidina em eucariotos. A enzima DHODH atua no quarto passo desta síntese, oxidando o diidroorotato em orotato, em destaque nos retângulos de cor vermelha. No círculo em azul, indica-se em que conjunto de átomos ocorre a reação de oxidação catalisada pela enzima.

Esta enzima tem recebido uma especial atenção por possuir características únicas dentro da via de biossíntese de pirimidinas em mamíferos: enquanto que todas as enzimas responsáveis pelos passos catalíticos da via "de novo" de biossíntese encontram-se no citosol das células, a enzima DHODH localiza-se na membrana interna da mitocôndria, "desviando" a rota de síntese.⁴

Além disso, o complexo enzimático multifuncional CAD (que compreende as enzimas citoplasmáticas carbamoil fosfato sintetase II, aspartato transcarbamoilase e diidroorotase) e o complexo UMP sintetase (formado pelas enzimas orotato fosforribosil transferase e orotidilato descarboxilase - figura 2), que catalisam respectivamente os três primeiros passos e o quinto e sexto passos da via "de novo", são codificadas por dois genes distintos: *pyr1a-1b-3-2* e *pyr5-6*, respectivamente. Em contra-

Introdução

partida, a enzima DHODH é codificada independentemente por apenas um gene, *p-yr4*, fato que facilita seu isolamento, entendimento e função na via metabólica.⁵

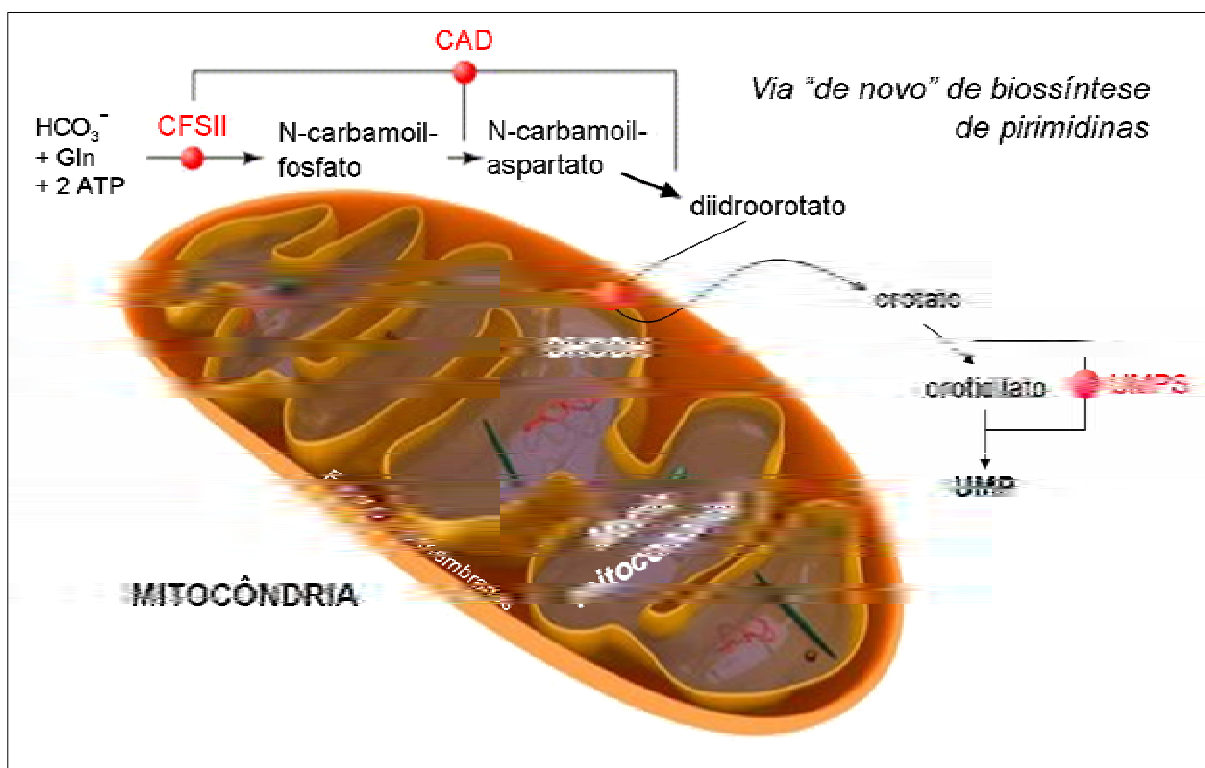


Figura 2: Localização das enzimas da via de biossíntese "de novo" de nucleotídeos de pirimidina em eucariotos. Os complexos CAD e UMPS, como pode se observar na figura, encontram-se no citosol celular, enquanto que a enzima DHODH localiza-se na camada externa da bica-mada interna da membrana mitocondrial. Adaptado de Loffler et al.⁴

A estrutura da DHODH foi elucidada para vários tipos de organismos diferentes, como *Escherichia coli* (*EcDHODH*),⁶ *Plasmodium falciparum* (*PfDHODH*),⁷ *Lactococcus lactis* (*LDHODH*)⁸ e *Trypanosoma cruzi* (*TcDHODH*).⁹ Em todos os casos, a estrutura da DHODH é do tipo barril α/β , com oito fitas β paralelas circundadas por α -hélices. O sítio ativo para o diidroorotato está localizado na parte superior do barril, onde várias fitas adicionais formam um bolsão para a ligação do grupo prostético flavina mononucleotídeo (FMN) e também para o orotato.

Baseado na análise da sequência de aminoácidos e nas propriedades estruturais das diversas DHODHs, estas proteínas foram divididas em duas famílias ou classes, denominadas 1 e 2. As enzimas pertencentes à família 1 são proteínas citosólicas, encontradas em bactérias gram-positivas, arqueobactérias e alguns eucariotos

Introdução

unicelulares. Estas por sua vez são subdivididas em três grupos: A, B e S. Este último é encontrado especificamente em arqueobactérias termoacidófilas.¹⁰

DHODHs da classe 1A são proteínas homodiméricas que contêm o fumarato como receptor de elétrons. As enzimas da classe 1B são heterotetrâmeros que contêm não só o FMN como cofator (como todas as outras DHODHs), mas também um cluster contendo ferro-enxofre e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Ambas as classes possuem um resíduo de cisteína tido como essencial no seu sítio ativo. Em comparação, as enzimas pertencentes à família 2 são proteínas catalíticas monoméricas associadas a membranas, encontradas em eucariotos superiores e possuem um resíduo de serina como sítio ativo, além de usar quinonas como receptores de elétrons.

A estrutura das DHODHs de classe 2, família onde está compreendida a *Hs*-DHODH (*Homo sapiens* DHODH - *Hs*DHODH ou DHODH humana, figura 3),^{11,12} é composta por dois domínios: um grande C-terminal (Met⁷⁸-Arg³⁹⁶) – estruturalmente similar às enzimas de classe 1 – localizado no espaço intermembranas e um pequeno, o qual interage com a membrana pela região N-terminal. A região N-terminal possui um microdomínio (Met³⁰ - Leu⁶⁸) que consiste em duas α -hélices ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) conectadas por um loop de aproximadamente quatro aminoácidos, num domínio altamente conservado em praticamente todas as enzimas de classe 2.^{11,13} Estas duas hélices $\alpha 1$ e $\alpha 2$ formam uma fenda de aproximadamente 10 a 20 Å² no então chamado "canal hidrofóbico", além do loop que conecta as duas α -hélices, situando-se na extremidade mais estreita desta fenda. Com isto, esta fenda forma, hipoteticamente, uma entrada para o barril. Acredita-se, então, que este microdomínio aja como uma "tampa" ou uma porta de entrada para o barril que leva ao sítio catalítico, participando ativamente da regulação da atividade enzimática por meio da captura das ubiquinonas, que são usadas como aceptores de elétrons.¹³⁻¹⁵



Figura 3: *HsDHODH* (PDB ID 1D3H). As hélices em azul escuro representam a porção N-terminal desta enzima. Figura criada usando o programa UCSF Chimera.¹⁶

A sequência que precede este microdomínio N-terminal está relacionada ao endereçamento da *HsDHODH*, funcionando como um sinal pós-traducional que governa a importação e a correta inserção da enzima na membrana interna da mitocôndria (figura 4).^{17,18}

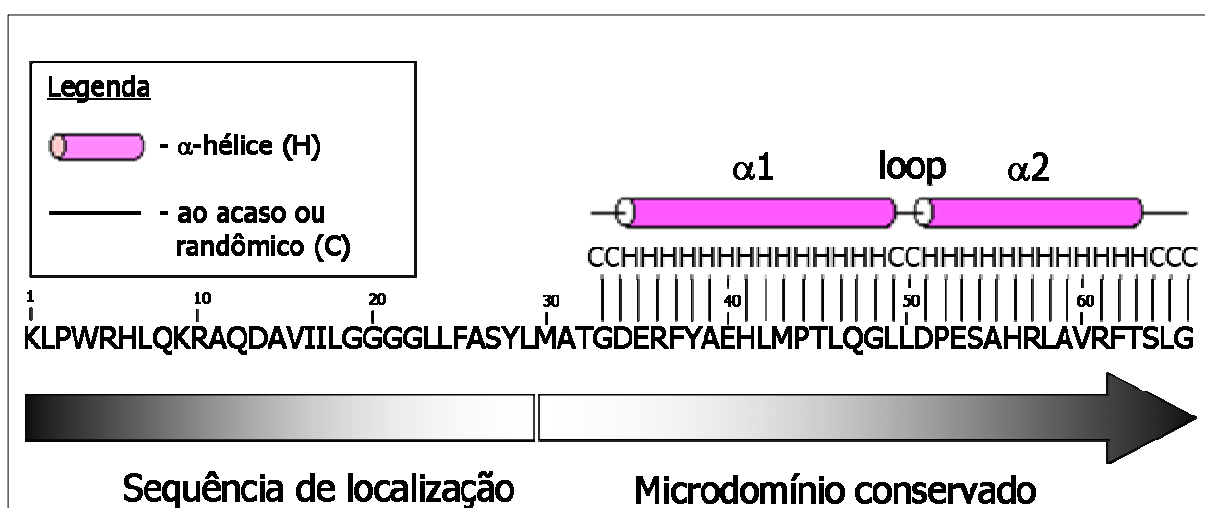


Figura 4: Região N-terminal da enzima *HsDHODH*. Em destaque na seta indicadora em cinza, os resíduos 1 ao 29 representam a sequência responsável pelo endereçamento da *HsDHODH*; os resíduos 30 ao 66 representam o microdomínio conservado. Acima deste domínio, está representado a estruturação deste microdomínio na enzima *HsDHODH*. Adaptado de Rawls et al.¹⁷

Introdução

Especificamente para a reação de oxirredução da *HsDHODH*, ela ocorre em duas semi-reações por meio de um mecanismo de "ping-pong", típico de uma enzima DHODH de classe 2: na primeira, o diidroorotato é oxidado a orotato, reduzindo o FMN; na segunda, o orotato é liberado antes que a ubiquinona se ligue em um segundo sítio, onde ocorre a reoxidação do cofator FMN e, conseqüentemente, sua regeneração (figura 5).

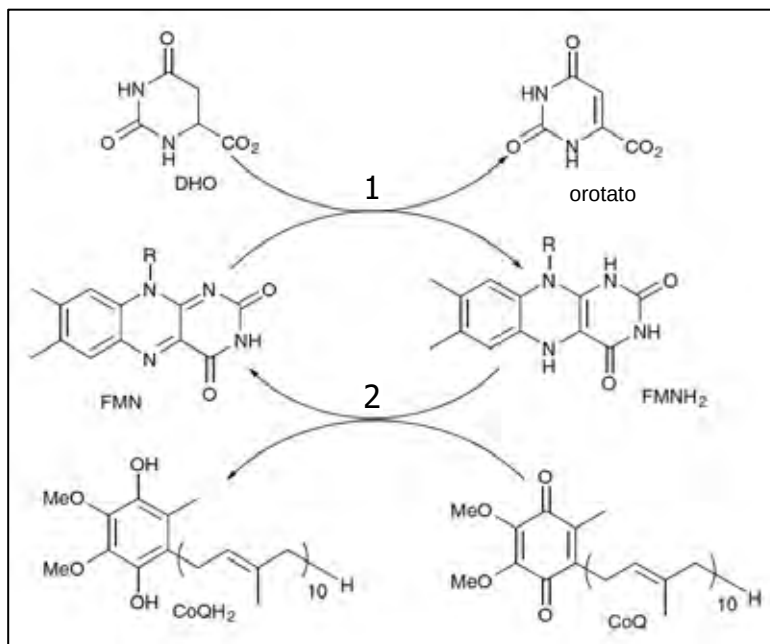


Figura 5: As duas semirreações globais catalisadas pela enzima DHODH. 1) oxidação do diidroorotato em orotato, com a redução do FMN em FMNH₂; **2)** regeneração do FMNH₂ por meio de uma reoxidação pela ubiquinona (CoQ), que se reduz a CoQH₂.

A *HsDHODH* também está relacionada com o metabolismo aeróbico das células, por utilizar as ubiquinonas como moléculasceptoras de elétrons para a regeneração do FMN que, posteriormente, serão reoxidadas pelo complexo III presente na cadeia respiratória de elétrons.¹⁹⁻²¹ Desta forma, a inibição desta enzima pode ocasionar uma diminuição do aporte de nucleotídeos pirimídínicos e/ou a interrupção total das sínteses destas bases nitrogenadas.²²

Assim, visto a grande necessidade destes nucleotídeos em células que precisam de rápida multiplicação para se proliferarem, tais como linfócitos em metástase e células proliferativas de resposta imune,²³ esta enzima se tornou um alvo de estudo muito interessante dentro da pesquisa científica. Devido a este fato, as enzimas DHODHs vêm sendo bastante estudadas na literatura^{21,24,25} com a finalidade de se

Introdução

desenvolver novos fármacos ou moléculas com capacidade inibidora da sua função catalítica.

Até o presente momento, não há descrição estrutural ou qualquer informação relacionada à ligação da ubiquinona no seu microdomínio N-terminal ou uma descrição das dinâmicas desta região na literatura. As evidências descritas são que as ubiquinonas, pelo seu caráter hidrofóbico, podem facilmente difundir pela membrana interna da mitocôndria e, assim, penetrar no túnel formado para aproximar-se ao cofator FMN, a fim de se concluir a reação redox.¹³

1.2 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

A síntese de peptídeos vem sendo amplamente empregada por diversos grupos acadêmicos com a finalidade do desenvolvimento e aplicação destas moléculas em diversos campos da Ciência.

Em 1963, Bruce Merrifield, ao desenvolver o método da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS),²⁶ revolucionou o campo da síntese de peptídeos e, por seu notório trabalho, foi laureado com o prêmio Nobel de Química em 1984. Atualmente, é o método mais eficiente e rápido para a produção destas biomoléculas em laboratório. Além disso, com o decorrer dos anos, a otimização da SPFS tornou-se uma pauta cada vez mais explorada pelos cientistas, inclusive com vários trabalhos publicados pelo nosso grupo de pesquisa.²⁷⁻³⁰ Além disso, a exploração por técnicas espectroscópicas de sequências peptídicas contendo aminoácidos fluorescentes e a síntese de peptídeos análogos por substituição de aminoácidos em posições chave por triptofano ou aminoácidos paramagnéticos como o TOAC (descrito adiante), foram utilizados por nosso grupo de pesquisa para estudos da interação peptídeo/membrana em diversos sistemas.³¹⁻³⁴

A técnica de SPFS baseia-se no crescimento da cadeia peptídica por meio da adição de um aminoácido por vez pela sua região C-terminal. Desta forma, a síntese ocorre na direção C-terminal para a N-terminal, permanecendo durante todo o processo reacional covalentemente ligada a um suporte polimérico (fase sólida), previa-

Introdução

mente funcionalizada (resina) com um grupo adequado para o acoplamento ou ligação do primeiro resíduo.

Atualmente, a estratégia mais empregada é a da química Fmoc.³⁵ Esta estratégia tem com princípio utilizar o grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonila como protetor temporário da porção N-terminal dos aminoácidos, sendo um composto base-lábil e facilmente removido quando adicionado uma base à reação. As cadeias laterais reativas dos aminoácidos também são protegidas, mas por compostos estáveis a base utilizada: como exemplo, os grupos *t*-butiloxycarbonila, tritila e *t*-butila, que são lábeis ao ácido trifluoracético (TFA).

As reações são realizadas em placas porosas, permitindo a separação da resina e dos componentes em solução por simples filtração. Para a realização do acoplamento, os grupos carboxila dos aminoácidos devem ser ativados por reagentes ativantes e usa-se, geralmente, um excesso de reagentes. O ciclo geral de síntese está apresentado na figura 6.



Figura 6: Esquema geral representando as etapas da SPFS.

1.3 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

A Ressonância Paramagnética Eletrônica, assim como qualquer outra espectroscopia, é o estudo da luz interagindo com a matéria. Quando uma molécula absorve um fóton, há uma transição nos níveis de energia, passando do estado fundamental a um estado excitado, de maior energia. A lei de Einstein-Planck determina que a absorção somente ocorre se a energia do fóton for a mesma da diferença entre estes níveis de energia, de acordo com a equação 1:

$$\Delta E = h\nu \quad (1)$$

onde ν é a frequência do fóton e h é a constante de Planck. Na técnica de ressonância magnética, o fenômeno encontrado na absorção do fóton é a inversão no spin. No caso da RPE, o fenômeno estudado é a inversão do spin do elétron desemparelhado.

Todos os elétrons possuem um momento angular intrínseco, o qual lhes dá o spin quântico (S). O momento magnético (μ) é um produto do spin eletrônico (S) com o fator giromagnético (γ), que depende da carga e da espécie da partícula. O spin propriamente dito não pode ser medido, porém o seu momento magnético ao longo de um determinado eixo, sim. Considerando um sistema onde um campo magnético estático é aplicado no eixo z (figura 7), o dipolo magnético (μ) pode adotar duas possíveis orientações em relação ao H_0 : alinhado ou contra-alinhado ao campo. Se a magnitude do campo estático é zero, então não haverá diferença de energia entre as duas orientações; porém, em um valor não nulo de campo, a energia (E) da interação entre o campo magnético estático (H_0) e o momento magnético (μ) no eixo z pode então ser definida como o produto do vetor do campo estático e do spin eletrônico pela equação 2:

$$E = -\gamma S_z H_0 \quad (2)$$

Introdução

Desde que o spin é quantizado, S_z pode somente ter valores de $m_s\hbar$, onde o número quântico de spin magnético é $m_s = \pm 1/2$ e $\hbar$ é a constante de Planck reduzida $h/2\pi$. O fator giromagnético (γ) pode ser expresso como $-g\beta/\hbar$, onde g é o fator g do elétron (um elétron livre, teoricamente não influenciado por qualquer fator externo, tem um valor g igual a 2,002319304386) e β é o magnéton de Bohr.

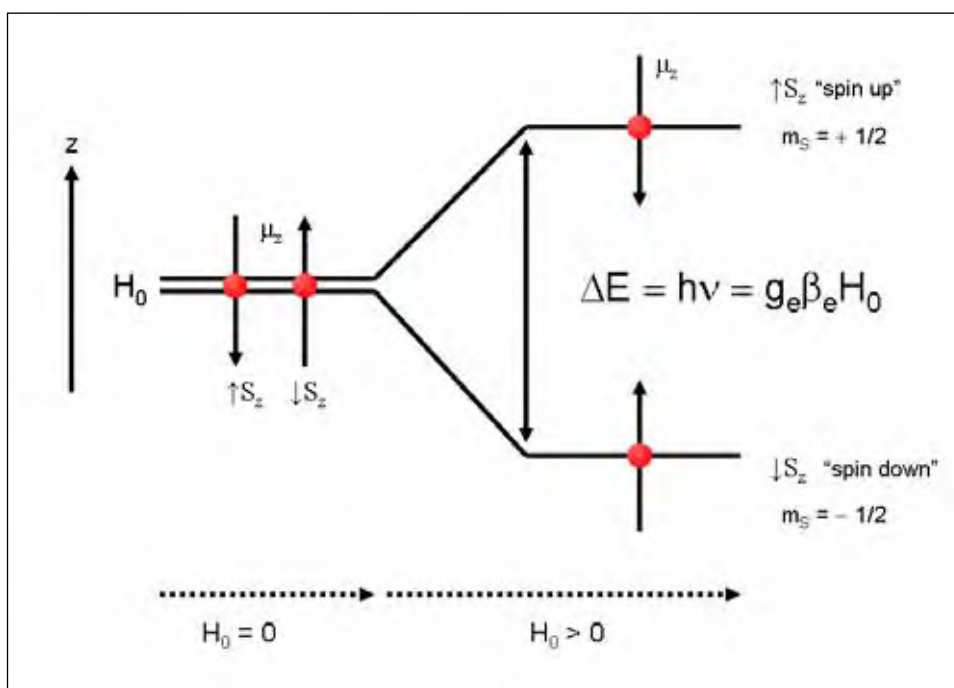


Figura 7: Diagrama representando o efeito Zeeman. Quando a magnitude do campo magnético é zero, não haverá diferença de energia nas duas possíveis orientações do μ_z . À medida que o campo magnético aumenta, a diferença de energia entre os momentos magnéticos alinhados "spin down" e o contra-alinhados "spin up" irão aumentar linearmente com a magnitude do campo magnético.

Desta forma, a equação fundamental da RPE pode ser descrita como na equação 3:

$$\Delta E = h\nu = g\beta H \quad (3)$$

que é a equação que descreve a interação Zeeman do elétron quando submetido a um campo magnético (figura 7).

Introdução

Na espectroscopia da RPE, a absorção é detectada mantendo-se o campo magnético estático constante (H_0) e ajustando a frequência de micro-ondas (ν) a fim de se encontrar as posições do campo ressonante, H_{res} , representadas na equação 4:

$$H_{res} = \frac{h\nu}{g\beta} \quad (4)$$

Diferente da espectroscopia óptica, não é o componente elétrico da radiação de micro-ondas que induzirá a absorção, mas sim a componente magnética (H_1), que é aplicada perpendicularmente ao campo magnético estático, o qual induz a inversão dos spins. Tipicamente, o espectro de RPE não é registrado como um espectro de absorção, mas sim pela sua primeira derivada, aplicando-se uma pequena amplitude de modulação ao campo magnético estático. Isto permite que, para fases de detecções sensíveis à fase, aumente-se a razão sinal/ruído, detectando-se pequenas variações no sistema.

Como a grande maioria das moléculas não possui elétrons desemparelhados, o método mais comum para a realização da medida das dinâmicas e estrutura de peptídeos e proteínas usando a RPE é ligar um marcador de spin, geralmente contendo um radical nitróxido, à sequência primária da molécula. Este marcador de spin contém um elétron desemparelhado, responsável pelo sinal na RPE. Este elétron desemparelhado está acoplado a um núcleo de ^{14}N , o qual possui um spin nuclear intrínseco e também um momento magnético associado. Assim como o spin eletrônico, o spin nuclear também permite orientações quando em um campo magnético. O núcleo de ^{14}N possui três orientações num campo magnético: $m_I = -1, 0$ e $+1$ (figura 8). O momento magnético nuclear do ^{14}N afeta a magnitude do campo magnético estático experimentado pelo elétron desemparelhado e divide a ressonância, antes única, em três desdobramentos, dependentes do estado de spin nuclear (m_I). O desdobramento das linhas (T) é anisotrópico e dependente de θ , o ângulo entre o campo magnético estático e o principal eixo do radical nitróxido.

Tradicionalmente, o estudo da estrutura e dinâmica de proteínas e peptídeos vem sendo realizado usando a técnica de marcação de spin sítio-dirigida, do termo inglês "site-directed spin labeling" (SDSL), técnica desenvolvida pelo grupo de pes-

Introdução

quiza do Dr. Wayne Hubbell.³⁶⁻³⁸ Nesta metodologia, uma mutagênese sítio-dirigida é usada para introduzir um resíduo específico (geralmente Cys) em um ponto estrategicamente selecionado na proteína. Para peptídeos, pode-se ligar o marcador diretamente na cadeia principal peptídica ("backbone") ou ainda na cadeia lateral dos aminoácidos, dependendo do tipo de marcador de spin utilizado.

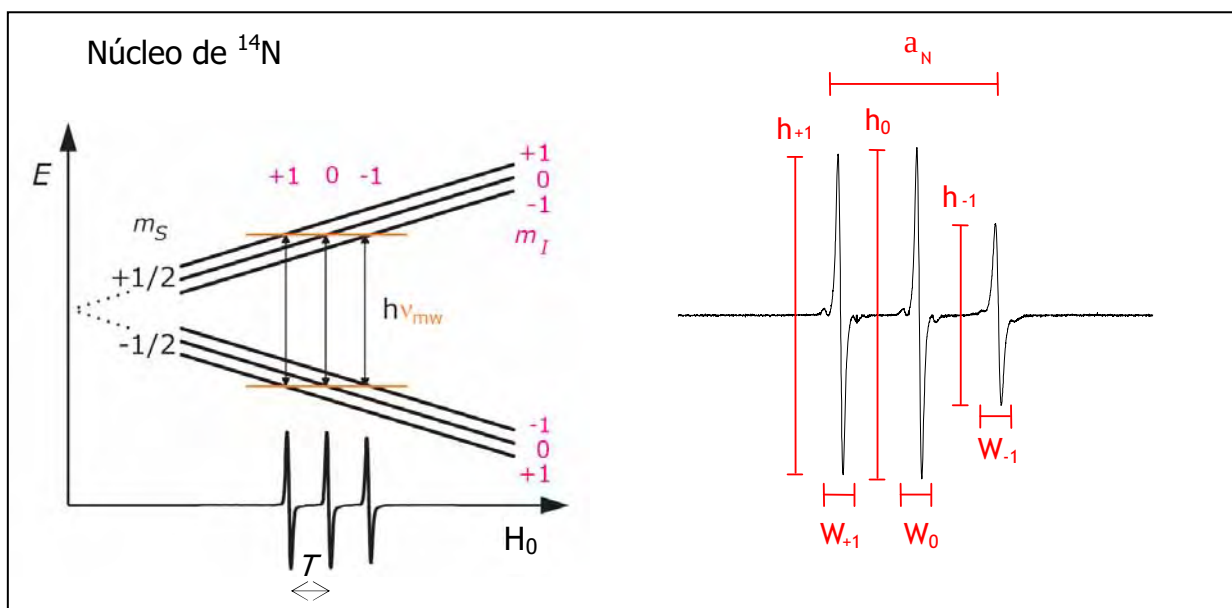


Figura 8: A interação hiperfina nuclear. À esquerda, gráfico de energia (E) versus campo magnético estático (H_0), mostrando o desdobramento das linhas espectrais características do radical nitróxido (T). À direita, ilustração dos parâmetros usados nas medidas de RPE aplicados aos espectros obtidos experimentalmente. Adaptado de Campbell et al.³⁹

O marcador de spin mais usado atualmente para proteínas é o MTSSL, o qual reage com o resíduo de cisteína e se liga à cadeia lateral desse aminoácido. Para peptídeos, o aminoácido sintético TOAC, acoplado diretamente à sequência primária, é bastante utilizado. O marcador de spin DOXYL também é utilizado para marcações de cadeias hidrocarbonadas alifáticas, geralmente utilizado em lipídios (figura 9).^{40,41} Estes compostos são muito menores (praticamente do tamanho de um resíduo de prolina) e menos hidrofóbicos que as sondas fluorescentes, o que torna uma vantagem significativa na realização das análises.

Apesar da SDSL ser uma ferramenta importante e eficaz, ela é falha em responder a pequenas alterações conformacionais e de mobilidade especificamente em relação à cadeia principal dos peptídeos, devido à sua grande flexibilidade (figura 10B).⁴² Consequentemente, uma dinâmica mais lenta da cadeia principal pode ser

Introdução

imperceptível em tempos da ordem de nanosegundos ou subnanosegundos, o que pode não retratar a real dinâmica do sistema experimentado.

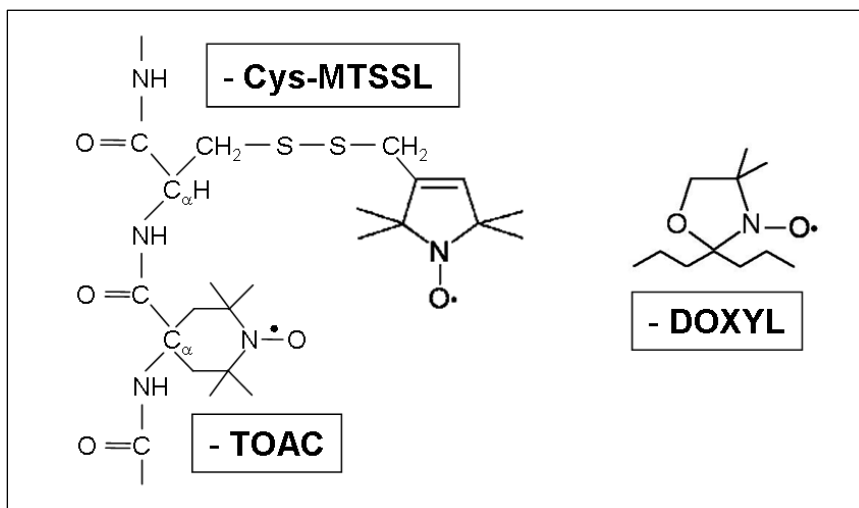


Figura 9: Os marcadores de spin utilizados na RPE. À esquerda, está representado uma cadeia peptídica, onde hipoteticamente estariam ligados os marcadores de spin MTSSL (ligado à cadeia lateral de um resíduo de cisteína) e TOAC (diretamente à cadeia peptídica). À direita, observa-se o marcador de spin DOXYL, muito usado em marcações de spin em lipídios.

Nestes casos, o TOAC tem características distintas, pois está ligado diretamente no arcabouço da cadeia peptídica, já que este composto nada mais é do que um aminoácido não-natural. Esta ligação do radical nitróxido com a cadeia peptídica aumenta a resolução espectral quando se comparado a marcadores ligados na cadeia lateral da cisteína, como o MTSSL (figura 9). Isto é bem evidenciado no estudo de Karim et al.,⁴² onde marcou-se o peptídeo fosfolambam (PLB) com MTSSL e TOAC na mesma posição (posição 11 da cadeia peptídica) e obtiveram-se os espectros de RPE. Na figura 10 pode-se notar que, apesar da mesma posição onde se encontram os marcadores de spin, a resolução do espectro do peptídeo contendo TOAC é muito maior do que o espectro contendo MTSSL. Além de aumentar a sensibilidade das dinâmicas da cadeia peptídica, as distâncias medidas entre os spins do marcador TOAC são mais precisas, devido à maior rigidez movimentacional que esta molécula possui quando ligada à cadeia peptídica.

Além disso, o TOAC, por possuir uma estrutura rígida, se assemelha a uma prolina e ao ácido α -aminoisobutírico, conhecidos por induzir dobras e/ou aumentar

Introdução

a helicidade do peptídeo.^{43,44} Assim, este marcador de spin vem sendo utilizado em diversos estudos de dinâmicas estruturais e conformacionais.^{31,45-48}

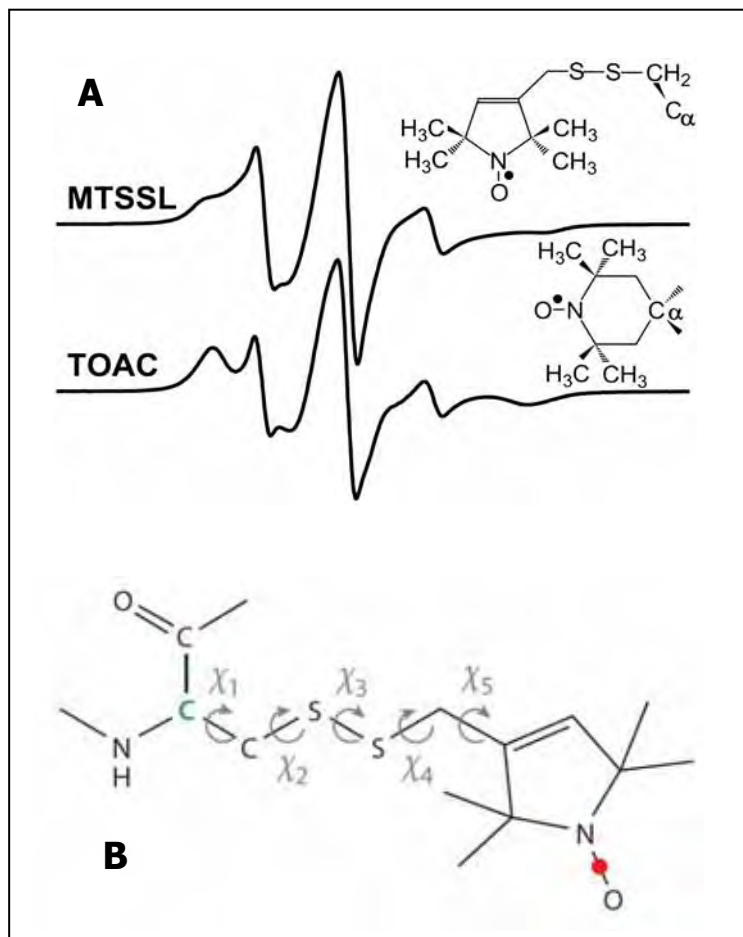


Figura 10: Comparação entre os espectros de CW-RPE no peptídeo fosfolambam (PLB) marcados com TOAC e MTSSL. (A) Notadamente, observa-se uma melhora na sensibilidade do espectro do peptídeo fosfolambam em bicamadas lipídicas quando se examina as dinâmicas experimentadas pelo marcador de spin TOAC em relação ao MTSSL. Este último possui um grau maior de mobilidade em relação à cadeia principal do peptídeo, o que é devido à maior quantidade de ângulos rotacionais presentes na estrutura **(B)**. Figuras extraídas de Karim et al.⁴² e Jeschke, G.⁴⁹

As informações obtidas pelos marcadores de spin são obtidas por meio do espectro de RPE, que é dependente da anisotropia destas moléculas-sonda. Os movimentos rotacionais podem ser modelados em dois tipos: a rotação difusional isotrópica e a anisotrópica. A rotação difusional isotrópica assume que o marcador de spin está sem nenhuma restrição de movimento, ou seja, num movimento de rotação livre. Neste caso, o espectro é dependente do tempo de correlação (τ_R) do marcador de spin.

Introdução

O modelo de rotação difusional anisotrópica assume que o marcador de spin é submetido a um movimento rotacional restrito, com um tempo de correlação da ordem de subnanossegundos. Neste caso, o espectro é dependente da amplitude de movimento, que é definida como o parâmetro de ordem (S), que é a anisotropia observada quando comparada a máxima anisotropia, obtida experimentalmente por uma amostra congelada, sem nenhum movimento rotacional. Os valores de parâmetro de ordem podem variar de 0, onde há movimento isotrópico em um limite rápido de movimento, resultando em linhas espectrais muitas estreitas, até 1, onde há movimento anisotrópico em regime rígido, resultando em linhas espectrais largas. Além disso, a temperatura também afeta a anisotropia, já que ela aumenta a energia cinética das partículas, aumentando, assim, o movimento rotacional (figura 11).

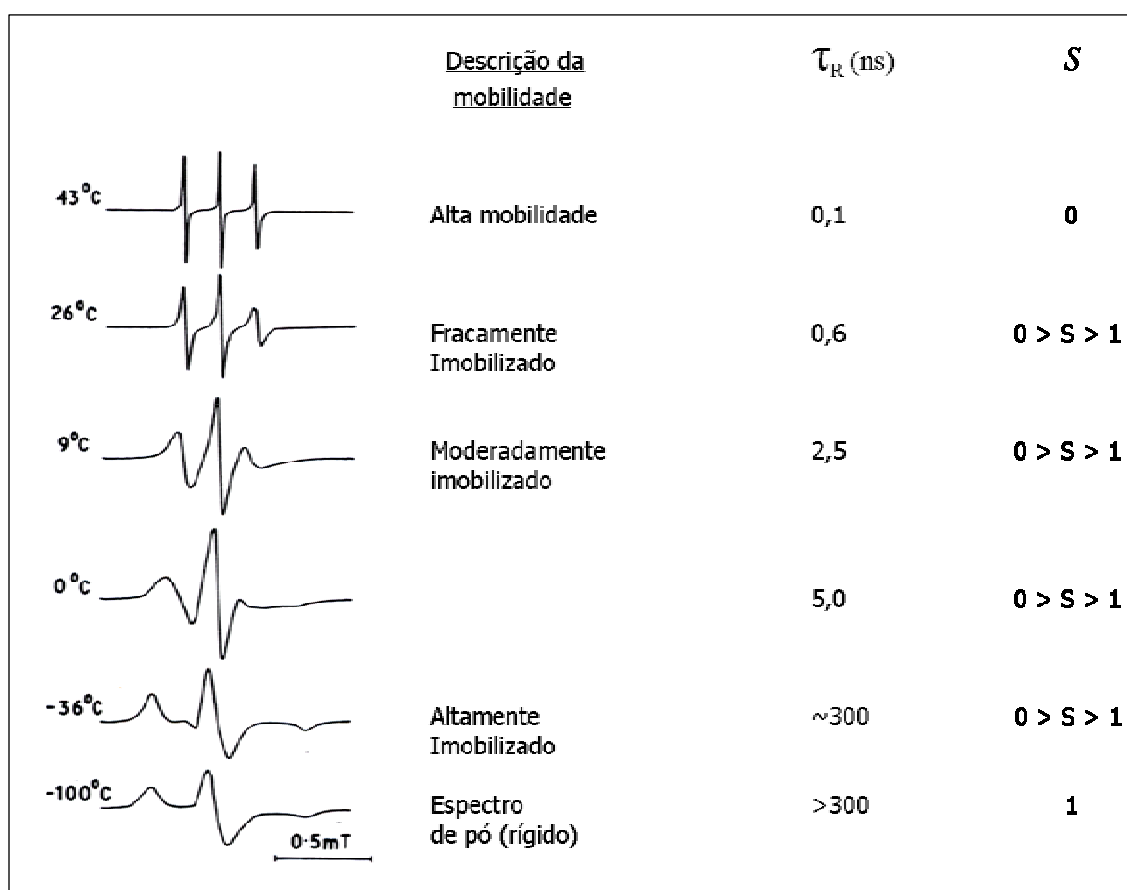


Figura 11: Efeito da temperatura no tempo de correlação e no parâmetro de ordem nos espectros de RPE. Espectros de RPE de um marcador de spin submetido a um movimento isotrópico em solução de glicerol, em função da temperatura (à esquerda). À direita, os tempos de correlação calculados e os parâmetros de ordem. Adaptado de Campbell et al.³⁹

Usando essa útil ferramenta espectroscópica e determinando-se os parâmetros citados acima nos espectros obtidos por meio da RPE, pode-se obter informações importantes sobre as dinâmicas da interação de peptídeos com membranas.

1.3.1 RESSONÂNCIA ELETRÔNICA DUPLA OU DEER ("*Double Electron-Electron Resonance*")

A técnica de DEER, também conhecida como Ressonância Eletrônica Dupla ou PELDOR ("*Pulsed Electron Double Resonance*"), estuda as interações dipolares que existem entre dois pares de elétrons que estão desemparelhados e acoplados em um sistema. As interações são observadas no domínio de tempo por uma abordagem paralela a do experimento de spin-eco em ressonância dupla, usado na Ressonância Magnética Nuclear (RMN).⁴⁹

A abordagem de aplicação de uma sequência de pulsos de durações constantes, introduzida por Milov et al.,⁵⁰ foi mais tarde estendida para uma sequência de quatro pulsos para medir o sinal sem o "dead time", ou tempo morto, em espectrômetros de Ressonância Eletrônica Dupla. Este experimento resultante de DEER com quatro pulsos tornou-se o método mais amplamente utilizado para medição de distâncias entre os dois centros paramagnéticos em biomacromoléculas, numa faixa de detecção de aproximadamente 1,8 a 6,0 nm^{51,52} e, em casos excepcionais, superior a 8 nm, utilizando-se de uma sequência diferente de pulsos.⁵³

As medidas de distância entre dois spins são baseadas nas interações dipolares principais dos centros paramagnéticos. Considerando-se um sistema com dois marcadores de spin, A e B em proximidade, o momento magnético do spin B cria um pequeno campo magnético que irá afetar o campo local experimentado pelo spin A. Uma vez que o estado do spin ("spin up" ou "spin down") dos spins A e B são independentes entre eles e a probabilidade do spin B estar nos dois estados é igual, o campo magnético do spin B adicionará ou subtrairá a sua magnetização gerada ao campo magnético aplicado. Este fenômeno separa a posição do campo de ressonância do spin A em duas novas posições e por duas vezes o campo do acoplamento dipolar (H_{dd}). O acoplamento dipolar é proporcional ao cubo inverso da distância in-

Introdução

terspin (r) e também é dependente de θ , que é o ângulo entre o vetor interspin e o campo magnético aplicado H_0 (figura 12).

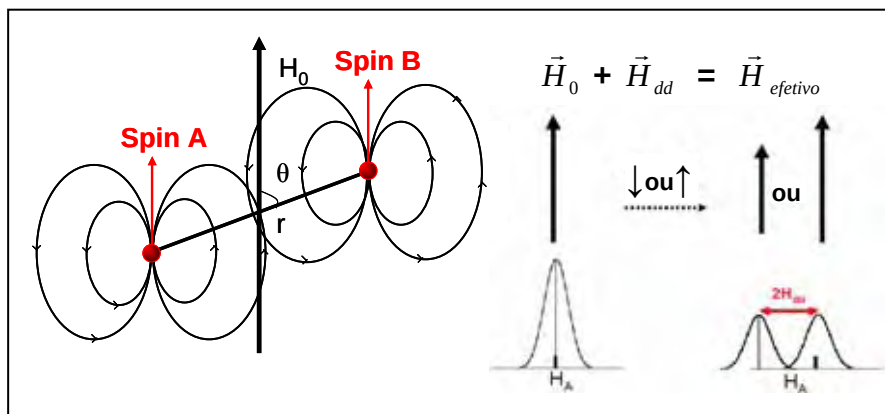


Figura 12: Esquema simplificado da determinação das distâncias interspins detectadas pelos experimentos de DEER. O campo magnético aplicado H_0 experimentado pelo spin A é afetado por um pequeno campo magnético produzido pelo spin B. Esta interação ou acoplamento dipolar desdobra a transição do spin A (H_A) em um dublete em torno de H_A cuja separação é de $2H_{dd}$. O acoplamento dipolar é proporcional ao inverso cubo da distância interspin (r) e à (θ) , o ângulo entre o vetor interspin e o campo magnético aplicado.

Na espectroscopia de RPE de onda contínua (CW - "*continuous wave*" RPE), o acoplamento dipolar gera um alargamento das linhas espectrais, as quais são analisadas para determinar a distância interspin. Já na Ressonância Eletrônica Dupla, a frequência de acoplamento dipolar é diretamente detectada nos experimentos de DEER de domínio de tempo.⁴⁹

Os experimentos de CW-RPE são utilizados para medidas de distância entre 0,8 a 2,0 nm, enquanto que a técnica de DEER é escolhida para distâncias de 1,8 até 8 nm (figura 13).

A fim de determinar as distribuições de distâncias nos experimentos de CW-RPE, dois tipos de espectros são requeridos: um espectro de não-interação, compreendendo uma molécula marcada unicamente (monômero) e um outro espectro compreendendo a molécula duplamente marcada com os marcadores de spin. Visto que as linhas espectrais são sensíveis a ambos os movimentos rotacionais e alargamento dipolar, as amostras são preparadas com um crioprotetor (geralmente usa-se o glicerol). Congela-se a amostra rapidamente e, desta forma, os espectros são adquiridos em torno de 200 K, assegurando-se que não há movimentos rotacionais que possam eventualmente afetar o formato das linhas espectrais.

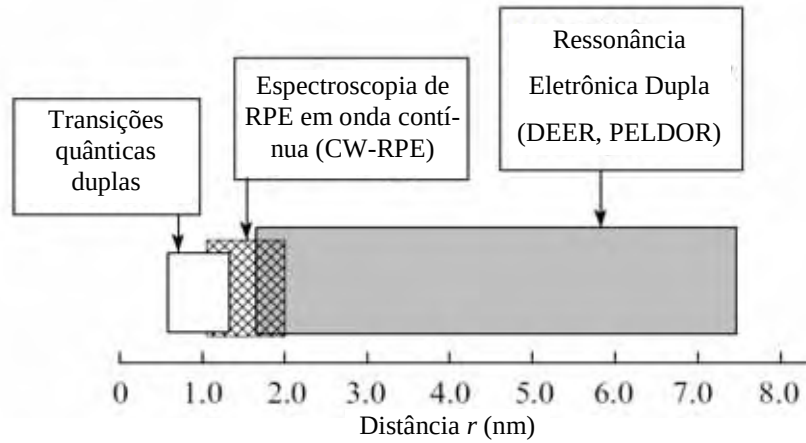


Figura 13: A escala de distâncias que podem ser acessadas pelos diferentes métodos de RPE.

Assim, como estabelecido acima, a interação dipolar entre spins acoplados causa um alargamento das linhas espectrais de RPE. A magnitude da interação dipolar pode ser calculada usando a equação 5:⁵¹

$$H_{dd}(r, \theta) = \pm \left(\frac{\mu}{4\pi} \frac{g\beta}{r^3} (3\cos^2 \theta - 1) \right) / 2 \quad (5)$$

onde μ é a permissividade do espaço livre e o fator $\mu/4\pi$ é requisitado para conversão de unidades no Sistema Internacional. O termo $\cos^2$ indica que o acoplamento dipolar terá valores de máximo e mínimo, quando o vetor interspin for paralelo ou perpendicular ao H_0 , respectivamente. Devido a maioria das amostras dipolares de RPE serem randomicamente orientadas com relação ao campo magnético, θ não é um valor único e sim uma distribuição senoidal de todos os valores possíveis. Consequentemente, cada posição de ressonância não é dividido por H_{dd} , mas alargado por um padrão de Pake, que é definido pela equação 6:⁵⁴

$$P(H) = \frac{\alpha}{r^3} \left(H + \frac{\alpha}{2r^3} \right)^{-1/2} + \frac{\alpha}{r^3} \left(-H + \frac{\alpha}{2r^3} \right)^{-1/2} \quad (6)$$

Introdução

onde $\alpha = \mu g \beta / 4\pi$ e r é a distância interspin. Simulações e ajustes ("fitting") são realizados para extrair as distribuições de distância do espectro de alargamento dipolar. Funções de alargamentos são simuladas das distribuições de distâncias e depois usadas para convoluir o espectro de não-interação. O espectro alargado resultante é então ajustado ao espectro experimental e o processo é repetido até uma solução não-degenerada ser encontrada.

Para experimentos de determinação de distâncias maiores de 2 nm, utiliza-se os experimentos de medidas da técnica de DEER, já que na CW-RPE o alargamento dipolar é menor que a largura de linha intrínseca, não sendo detectado por essa técnica. Na figura 14 estão representados a sequência de DEER em quatro pulsos de micro-ondas, o espectro da intensidade do eco em relação ao campo magnético (EDFS - "Echo Detected Field Sweep") e um sinal típico de decaimento no domínio de tempo.

Um pulso de $\pi/2$ é inicialmente aplicado ao conjunto A de spins a uma frequência ω_A , a qual faz girar a magnetização no plano x-y. Os spins começam a precessionar com uma frequência ω_A mas, devido às heterogeneidades do campo local causados por fenômenos tais como relaxação spin-spin ou acoplamento dipolar com outros spins, esta precessão será levemente diferente. Por exemplo, spins A acoplados com spins B irão precessar com uma taxa angular de $1/2 \omega_{AB}$. Isto irá defasar os spins, os quais são subsequentemente refocalizados com o pulso π depois do τ_1 , formando um eco de Hahn. Depois do tempo τ_2 , outro pulso π é aplicado aos spins A e um eco refocalizado a um tempo τ_2 é integrado para regenerar o sinal da RPE. Se um pulso dependente do tempo, chamado de "bombeio", é aplicado para os spins B a uma frequência ω_B entre o eco de Hahn e o segundo pulso refocalizante, esta inversão induzida aos spins B irá agora causar aos spins A uma precessão a uma taxa angular de $-1/2 \omega_{AB}$. Esta mudança na taxa angular de precessão irá defasar os spins A como um resultado direto da frequência do acoplamento dipolar.

Introdução

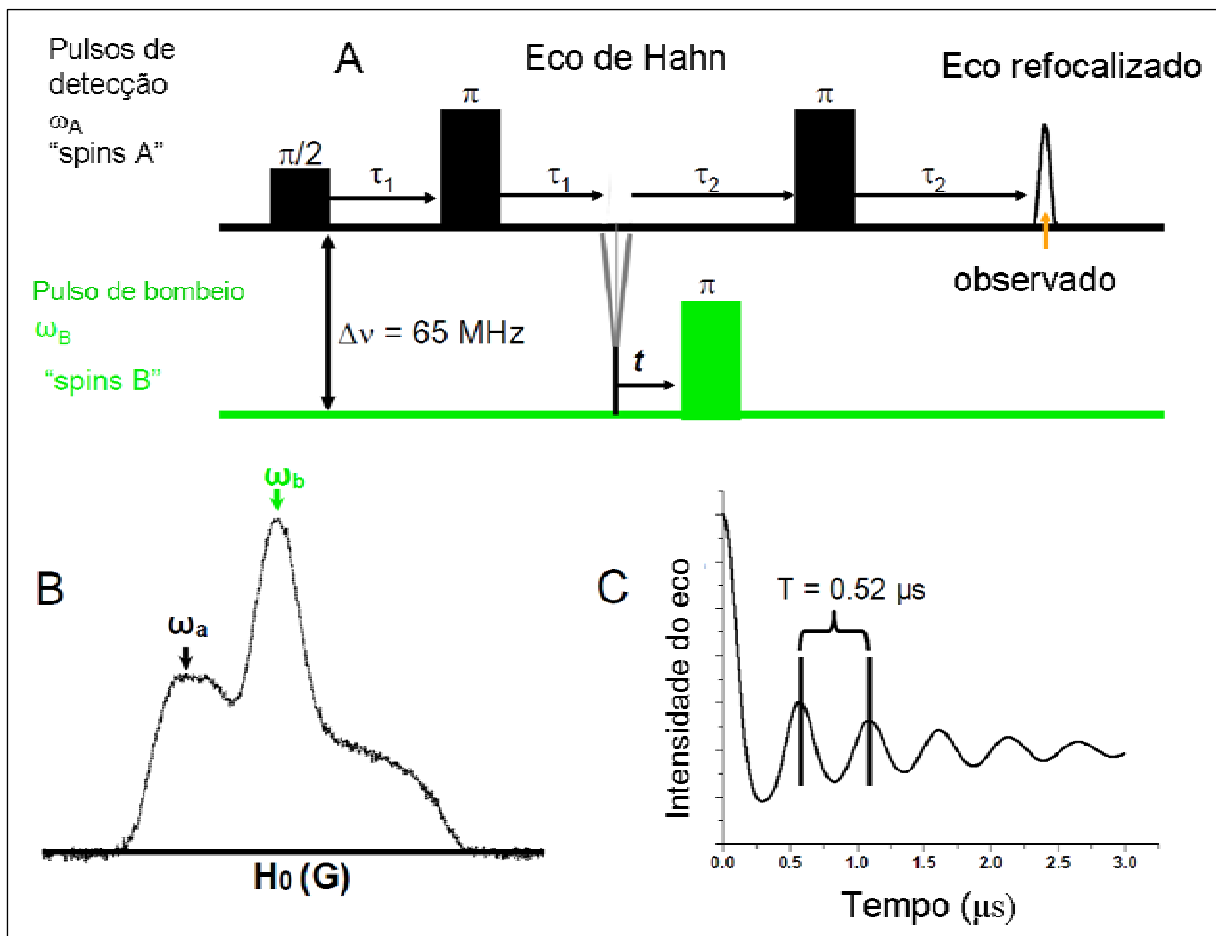


Figura 14: O experimento de DEER. (A) O esquema de experimentos de DEER em quatro pulsos, mostrando a sequência dos pulsos de detecção para os spins A e a sequência de pulsos de bombeio para os spins B. **(B)** o espectro da intensidade do eco em relação ao campo magnético (EDFS - "Echo Detected Field Sweep") detectado para as frequências ω_A e ω_B para os respectivos spins. **(C)** O decaimento do sinal de DEER simulado de uma distribuição de distância Gaussiana, no gráfico de domínio de tempo. A frequência de oscilação (T) é uma função da distribuição de distância e pode ser usada para calcular as distâncias interspins.

Como teorizado anteriormente, a frequência de acoplamento dipolar é dependente do ângulo entre o vetor interspin e o campo magnético (θ) e da distância interspin (r), como descrito na equação 5. Assim como na CW-RPE, em uma amostra randomicamente orientada, como uma solução de vesículas, θ não é um valor discreto, mas assume todas as orientações ponderadas pela função senoidal. Além disso, r é improvável de ser também um valor discreto, mas sim uma distribuição de valores. Consequentemente, ω_{AB} é uma soma de padrões de Pake (ver equação 6) ponderada pela distribuição das distâncias interspins.

1.4 DICROÍSMO CIRCULAR

O dicróismo circular (CD - "circular dichroism") é uma técnica fundamental na análise conformacional e estrutural de peptídeos e proteínas. Sua grande importância está relacionada com a investigação das estruturas secundárias, originárias das ligações de hidrogênio específicas entre as ligações peptídicas e as cadeias laterais dos aminoácidos. Estas interações induzem uma estruturação mais ordenada, que pode ser observada a partir desta técnica espectroscópica.

Essas formas mais regulares e ordenadas de arranjos atômicos interagem de modo particular com a radiação polarizada, fazendo, por exemplo, com que uma luz com polarização circular no sentido horário seja absorvida diferentemente do que uma luz com polarização no sentido anti-horário. A espectroscopia de dicróismo circular mede justamente essa diferença de absorção de radiação polarizada circularmente e permite verificar se estão ocorrendo arranjos helicoidais, fitas estendidas, dobras e até mesmo estruturas randômicas (ou ao acaso) em uma molécula protéica ou peptídica.

Esta leitura das estruturas secundárias só é possível de ser feita por meio da radiação polarizada circularmente porque as ligações dos carbonos alfa em uma molécula protéica ou peptídica são assimétricas ou quirais, exceto no aminoácido glicina. Assim, moléculas sem um plano de simetria apresentam o fenômeno do dicróismo circular.

As amidas formadas nas ligações peptídicas estão presentes num plano onde não há rotações entre os seus átomos, devido ao caráter duplo da ligação, o que resulta na coplanaridade dos átomos CONH. Existem apenas duas ligações onde a rotação é permitida: $C_{\alpha}-NH$, cujo ângulo de rotação é denominado "fi" (Φ) e $C_{\alpha}-CO$, cujo ângulo é denominado "psi" (Ψ) – figura 15. A rotação destes ângulos e a interação das cadeias laterais formarão, assim, as estruturas secundárias básicas das proteínas: as α -hélices, as folhas- β paralelas e antiparalelas, as dobras- β ou β -"turns" e as estruturas randômicas ou ao acaso.

Na teoria simplificada do orbital molecular, os orbitais $2p_x$ dos átomos de nitrogênio, carbono e oxigênio das ligações amida são combinados para formar três combinações lineares ortogonais: π^+ , π^0 e π^- . Estes três orbitais tem o plano da li-

Introdução

gação peptídica como seu plano nodal. Os quatro elétrons π preenchem os primeiros dois orbitais moleculares de menores níveis de energia: o π^+ , o qual é fortemente ligante, e o π^0 , que é quase não-ligante. Os dois elétrons restantes são elétrons não-ligantes no átomo de oxigênio (orbital n) da ligação amida, os quais são convencionalmente denominados como elétrons 2Py. Estes elétrons têm uma energia que é semelhante a dos orbitais atômicos do hidrogênio. Deste modo, a transição eletrônica $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ envolve a promoção de um elétron do orbital π^0 para o orbital π^* , a qual é considerada uma transição forte e é a transição eletrônica dominante. Neste caso, um elétron do orbital n é excitado essencialmente a orbitais atômicos de maior energia do que o estados fundamentais dos átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio da ligação amida, encontrada por volta de 185 a 200 nm. Já a transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$ envolve a promoção do orbital n para o orbital π^* . Esta transição é muito fraca, pois os estados fundamentais e excitados possuem planos nodais que são perpendiculares uma à outra. Devido a este fato, a transição $n \rightarrow \pi^*$ é dita proibida eletronicamente, porém permitida magneticamente. Assim, a banda de absorção desta transição é muito fraca, localizada por volta de 215 a 230 nm. Num espectro de CD típico de proteínas e peptídeos, portanto, as amidas dominam a absorção abaixo do comprimento de onda de 250 nm.^{55,56}

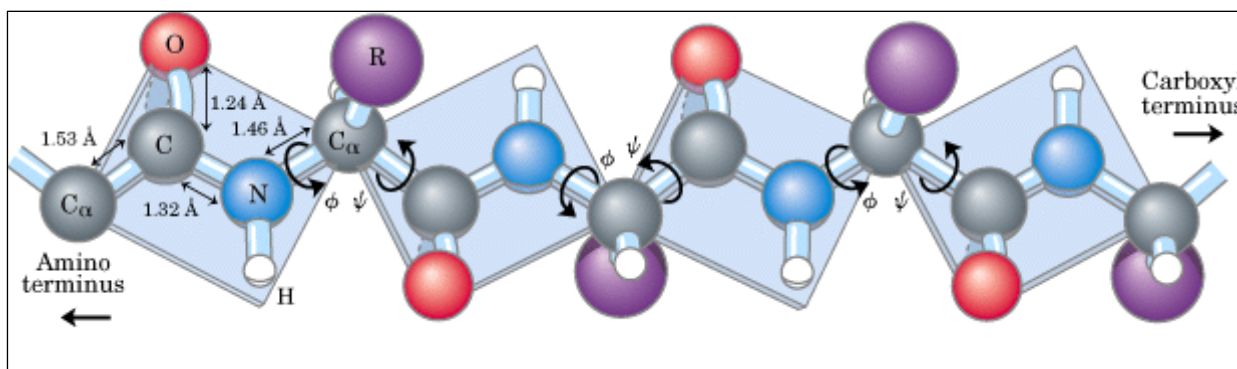


Figura 15: O plano da ligação peptídica. Os ângulos Φ e Ψ , ligados ao carbono α , são os únicos que permitem a torção da cadeia peptídica. A letra R indicado nas bolas roxas representa as cadeias laterais dos aminoácidos presentes na cadeia peptídica. Adaptado de Lehninger.⁵⁷

A transição $n \rightarrow \pi^*$ é responsável pela banda negativa no comprimento de onda de 222 nm, que é característico de um espectro de α -hélice. Além desta banda, ela também é responsável pela banda negativa em 216 a 218 nm, típica absorção de

Introdução

uma fita β . Já a transição $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ produz, primariamente, a banda positiva em aproximadamente 190-195 nm e uma negativa em 208 nm, características de um espectro estruturado em α -hélice; esta transição também é evidenciada na banda positiva a aproximadamente 198 nm, o que dá características ao espectro de uma estrutura secundária de fita β (figura 16).

Salienta-se que, no espectro adquirido na técnica de dicroísmo circular, o que se obtém é a soma de todas as estruturas secundárias presentes na amostra analisada. Assim, a maior contribuição da estrutura secundária presente na proteína ou no peptídeo é a que será mais evidenciada, sendo sobreposta às outras curvas no espectro de dicroísmo circular.

Desta forma, esta técnica pode ser utilizada para: 1) evidenciar estruturas secundárias e 2) observar variações e diferenças estruturais quando a amostra interage com diferentes tipos e meios.

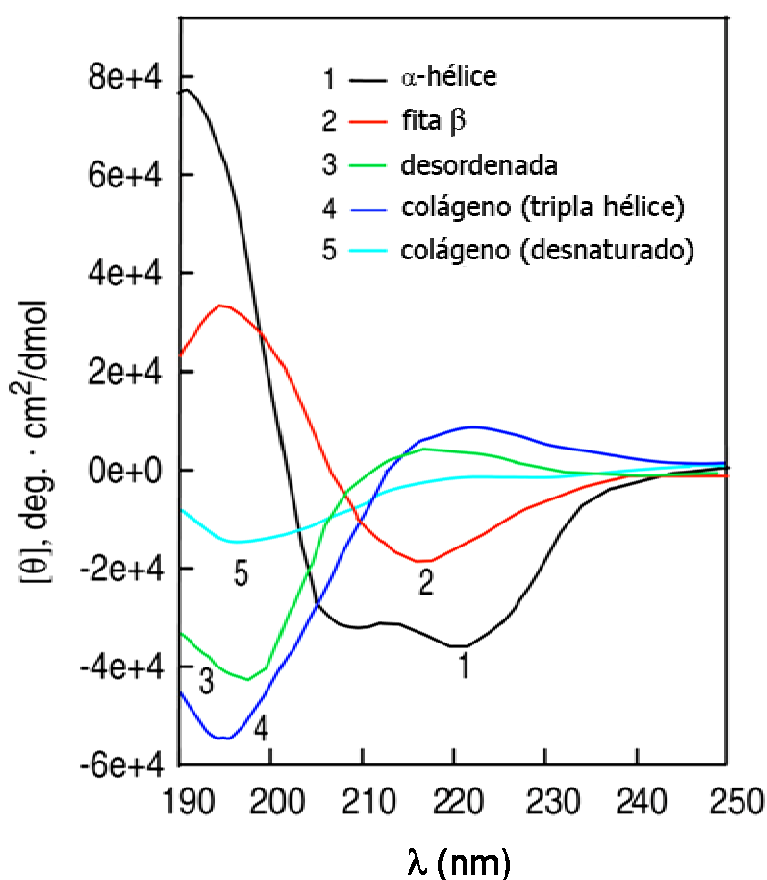


Figura 16: Espectros de CD característicos das estruturas secundárias. Adaptado de Greenfield.⁵⁸

1.5 FLUORESCÊNCIA

Um dos estudos mais realizados atualmente em análises conformacionais envolvendo fragmentos transmembranais é a interação com miméticos de membranas por meio da fluorescência. Esta técnica é baseada, resumidamente, na emissão de energia na forma de luz após a sua absorção.⁵⁹ A absorção de energia por certos grupos, denominados cromóforos, os faz passar para um estado excitado (singlete excitado S_1), ocorrendo logo em seguida uma emissão de parte desta energia em comprimentos de onda específicos, voltando para seu estado fundamental (singlete fundamental S_0), descritos pelo diagrama de Jablonski - figura 17.

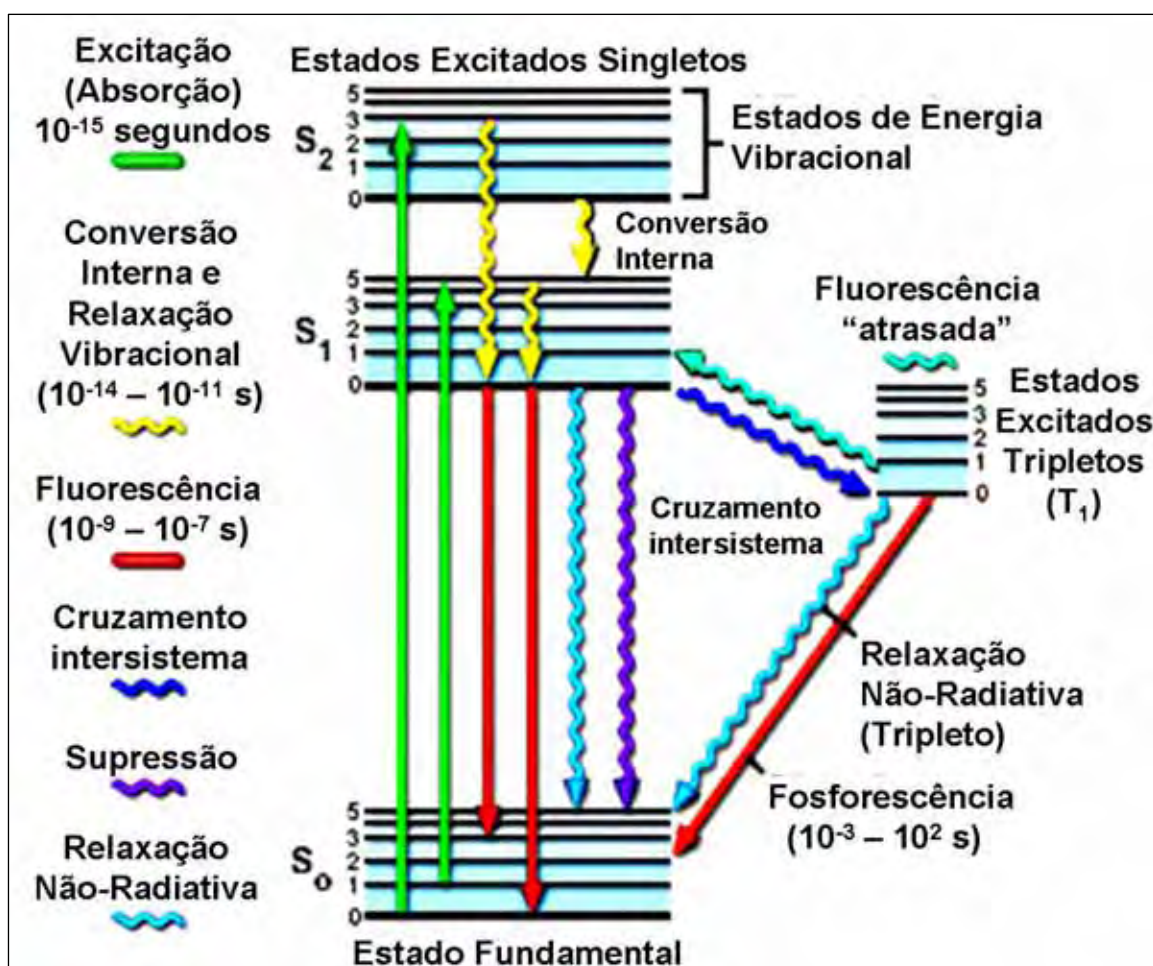


Figura 17: Diagrama de Jablonski. A representação mostra os processos físicos que podem ocorrer após uma molécula absorver um fóton com energia na faixa do ultravioleta ou visível. Adaptado do sítio Microscopy Resource Center.⁶⁰

Introdução

Quando um fóton com energia suficiente para excitar um elétron do estado fundamental (S_0) para um nível energético superior (S_n , $n = 1$ ou 2) é absorvido, ocorre uma transição entre esses estados. Cada um desses níveis eletrônicos possui vários níveis vibracionais para os quais as transições podem ocorrer. O fóton de menor energia absorvido pela molécula tem energia igual à diferença entre S_0 e o primeiro estado excitado (S_1). Fótons mais energéticos podem ser absorvidos, resultando em transições para níveis energéticos superiores a S_1 . Como as transições ocorrem, quase que em sua maioria, a partir do mais baixo nível vibracional S_0 (o qual é o estado onde mais freqüentemente se encontram os elétrons), o espectro de absorção reflete, basicamente, os níveis vibracionais do estado excitado e seu acoplamento com o estado fundamental.

Os estados excitados mais energéticos têm um tempo de vida muito curto e os elétrons excitados a esses níveis rapidamente relaxam para o nível vibracional mais baixo do S_1 , que tem um tempo de vida mais longo. Esse processo de decaimento não-radiativo entre níveis de mesma multiplicidade (S-S, T-T) é conhecido como conversão interna. Transições a partir de S_1 podem ocorrer para um dos níveis vibracionais do estado fundamental, via decaimento radiativo, ou seja, com emissão de luz. Esse fenômeno é conhecido como a fluorescência propriamente dita. Analogamente à absorção, a linha do espectro de fluorescência está estreitamente relacionada com os níveis vibracionais dos estados de menor energia.

Outra possibilidade, após a relaxação de um nível excitado mais energético para o primeiro nível vibracional de S_1 – por conversão interna –, é a ocorrência do cruzamento intersistemas, que dá origem a elétrons excitados no estado tripleto. O cruzamento intersistemas é o termo utilizado para designar transições entre estados de diferentes multiplicidades (S – T). Em geral, o primeiro nível do tripleto está situado em uma energia mais baixa que o primeiro nível do singleto. Isso se deve ao não emparelhamento dos elétrons que formam um estado tripleto. Como eles se repelem mutuamente, é de se esperar que os mesmos tenham uma menor energia de ligação.

Como a multiplicidade do estado tripleto ($M = 3$) é diferente da do estado fundamental ($M = 1$), uma transição direta é dita proibida. O decaimento do elétron de um nível tripleto a um estado menos energético pode ocorrer de duas maneiras:

Introdução

I) novo cruzamento intersistemas para um nível vibracional do estado fundamental de maior energia e posterior relaxação não-radiativa ou II) por decaimento radiativo de T_1 para S_0 , processo este conhecido como fosforescência. Como a fosforescência envolve uma transição “proibida”, o tempo do elétron excitado tripleto é bastante longo, muito superior ao de fluorescência.

Os dados obtidos por esta técnica permitem estudar o ambiente em torno do fluoróforo presente no peptídeo e a interação deste com moléculas do solvente e/ou membranas, além da interação com outras moléculas peptídicas. Este estudo é possível devido à sensibilidade dos fluoróforos ao ambiente que os circunda, que altera a energia do estado excitado e, conseqüentemente, a frequência de emissão. Os parâmetros que podem ser utilizados nestes estudos são o comprimento de onda de máxima de emissão ($\lambda_{\text{máx}}$), rendimento quântico (Φ_F), tempo de vida do fluoróforo (τ_F) e propriedades de polarização.

A fluorescência em proteínas e peptídeos⁶¹ ocorre devido à presença de resíduos aromáticos do triptofano e tirosina; a fenilalanina também possui esta característica, mas com um rendimento quântico muito baixo, fazendo com que sua emissão raramente seja observada. O espectro de emissão de fluorescência, tanto do triptofano quanto da tirosina, se faz pela excitação em um comprimento de onda do máximo de absorção, em torno de 280 nm. No entanto, o triptofano pode ser excitado seletivamente entre 295 e 305 nm.

1.6 MONOCAMADAS DE LANGMUIR

A técnica de monocamadas de Langmuir ou filme de Langmuir-Blodgett (LB) vem sendo extensivamente estudada como ferramenta de investigação de moléculas que interagem com um biofilme nanoestruturado, devido ao possível controle de suas propriedades no nível molecular. Basicamente, um filme de Langmuir é produzido inserindo moléculas anfipáticas ao sistema, usando uma subfase geralmente aquosa como suporte para a formação do filme na superfície desta.

Os materiais tradicionais empregados com a técnica LB são anfifílicos ou anfipáticas, com partes polares e apolares bem definidas, tais como os ácidos graxos,

Introdução

álcoois, ésteres e fosfolipídios de cadeias longas. Várias aplicações têm sido sugeridas para os filmes LB, quase sempre explorando suas características de filmes ultrafinos e com controle da arquitetura molecular. Além disso, filmes de Langmuir constituídos de fosfolipídios representam um modelo mais simples para uma membrana celular, cujo arcabouço é formado por uma bicamada de fosfolipídios.⁶²

Moléculas anfifílicas podem se orientar na interface de uma subfase aquosa com uma fase gasosa ou uma fase líquida para minimizar sua energia livre. A parte hidrofóbica, freqüentemente formada de cadeias alifáticas, diminui a solubilidade das moléculas na subfase aquosa. A parte hidrofílica é responsável pelo espalhamento do filme na superfície da água devido à sua maior interação com a subfase aquosa. O filme interfacial resultante tem a espessura de uma molécula e é simplesmente chamado de "monocamada".

As monocamadas ou filmes de Langmuir são geralmente obtidos por meio da dissolução da substância apropriada em um solvente apolar (de baixa constante dielétrica), volátil, seguida da sua distribuição sobre a superfície da subfase. Filmes de Langmuir são produzidos numa cuba, usualmente de forma retangular e feita de um material hidrofóbico, como o politetrafluoretileno ou "Teflon", que contém a subfase aquosa. Para que o filme seja tão fino a ponto de se atingir a espessura de uma molécula, esta área superficial deve ser suficientemente extensa e/ou a quantidade de material espalhado suficientemente pequena. A solução é espalhada sobre toda a superfície e o solvente evapora em poucos minutos. Se a área disponível por molécula for elevada, o filme se encontra no estado denominado gasoso, onde as interações entre as moléculas são fracas e podem ser desprezadas. Se a área superficial para o filme for diminuída, por meio da compressão do filme com uma barreira móvel, as moléculas interagirão progressivamente à medida que a área média ocupada por molécula diminuir. A Figura 18 mostra a cuba de Langmuir com seus acessórios.

Uma grande variedade de técnicas experimentais tem sido empregada no estudo de filmes de Langmuir, tais como: cinéticas de adsorção, isotermas de pressão de superfície e PM-IRRAS ("polarization-modulated infrared reflection-absorption spectroscopy").

As cinéticas de adsorção são definidas como o tempo que o peptídeo ou a molécula estudada leva para adsorver ou saturar a monocamada, após a sua formação.

Introdução

No momento da injeção da molécula na subfase, começa-se a medir as diferenças de pressão de superfície que a molécula produz na monocamada nanoestruturada. Este parâmetro é fundamental para analisarmos algumas características importantes da molécula, como a atividade superficial intrínseca, que é a propriedade da molécula de interagir somente com a superfície água-ar, além de averiguar as variações na pressão de superfície (π - descrita a seguir) antes mesmo de se iniciar a compressão da monocamada já estruturada.

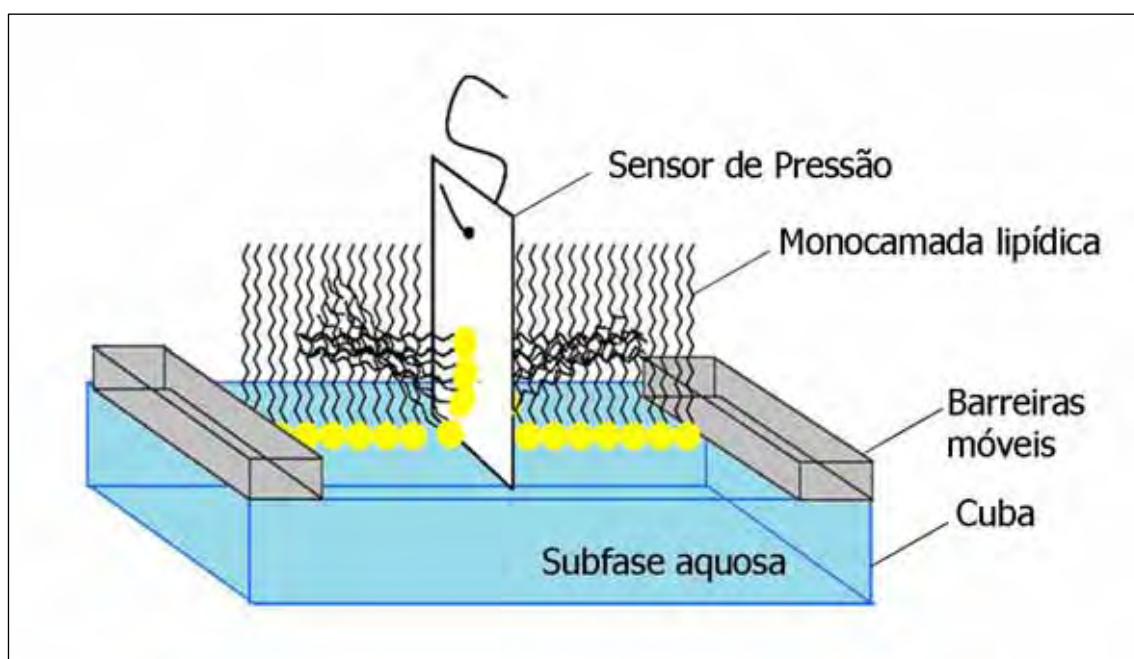


Figura 18: Cuba de Langmuir. A representação indica os acessórios e mostra esquematicamente como é formado o filme de Langmuir. A figura não está em escala.

A pressão de superfície (π) é a diferença em tensão superficial entre uma subfase na ausência do material e uma subfase com a monocamada. Esta pressão pode ser obtida medindo-se a força por unidade de comprimento sobre uma barreira mantida fixa por meio de uma eletrobalança, ou medindo-se as tensões superficiais pelo método da placa de Wilhelmy, entre outras. A mínima pressão medida é aproximadamente zero, e a máxima – para monocamadas bem estáveis – aproxima-se da tensão superficial da subfase, que é cerca de 73 mN m^{-1} (25°C) para a água pura. Uma curva de pressão de superfície *versus* área por molécula é o análogo bidimensional de uma isoterma pressão-volume. Podem ser definidas várias fases para a mo-

Introdução

nocamada. Para ilustrar, será discutido a isoterma de um fosfolípido, a dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), usada neste trabalho e mostrada como exemplo na figura 19.

Como já mencionado, para áreas superficiais extensas, as moléculas encontram-se na fase gasosa (G). A fase líquida (L) ocorre quando as moléculas se aproximam umas das outras e a área por molécula diminui. Dependendo da molécula a ser estudada, podem estar presentes as fases líquido-expandida (LE) e/ou a líquido-condensada (LC), onde a compressibilidade, definida pela derivada de cada ponto da isoterma, é alta. Nesta última, a compressibilidade é menor que no caso LE, mas ainda não se tem o empacotamento molecular da fase sólida. Pode também ocorrer coexistência das fases LE e LC, como mostrado na figura 19.

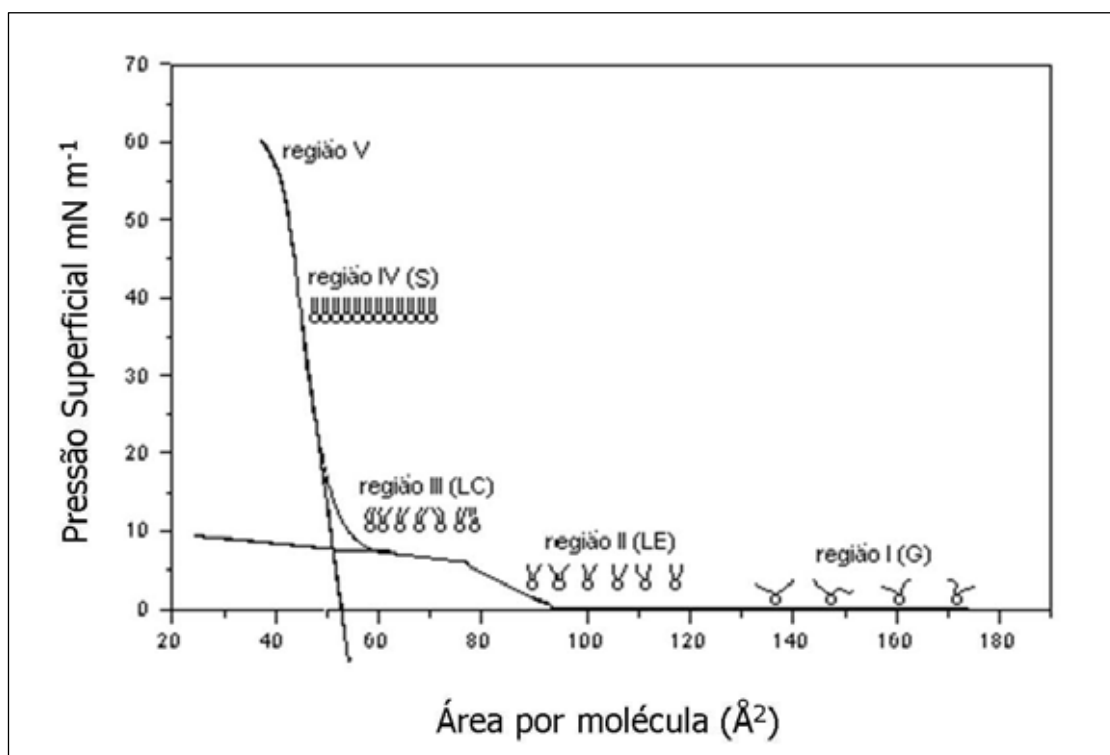


Figura 19: Isoterma de Pressão de Superfície para uma monocamada contendo o fosfolípido DPPC puro. Representação esquematizada das fases de uma monocamada de Langmuir com as diferentes regiões de compressão do filme. **Região I:** fase gasosa, as moléculas estão muito longe umas das outras, não há interação entre elas e a pressão superficial é zero; **região II:** fase líquido-expandida (LE), as moléculas se aproximam, de tal modo que uma pode sentir sua vizinha mais próxima, mais ou menos entre 100 e 80 Å²; **região III:** fase líquido-condensada (LC), aqui a proximidade entre as moléculas aumenta e algumas se tocam, aproximadamente entre 60 e 50 Å². A **região IV** (aproximadamente entre 50 e 45 Å²) equivale à fase condensada ou sólida (S) em que as moléculas estão empacotadas de tal modo que se a monocamada for comprimida um pouco mais ocorre o colapso. Esta é a **região V**, em que o colapso do filme pode dar lugar a agregados, dissolução na subfase, bicamadas e multicamadas, abaixo de aproximadamente 45 Å². Adaptado de Ferreira et al.⁶²

Introdução

Para áreas ainda menores, a compressibilidade da monocamada diminui drasticamente, atingindo uma fase "sólida" (S), ou melhor denominada como "condensada" (C), própria de um cristal bi-dimensional. O colapso ocorre quando o ordenamento cristalino é destruído e a monocamada forma estruturas diferentes daquela ordenada, apresentada anteriormente. Uma linha traçada na região da fase sólida pode ser extrapolada ao eixo x, sendo esta interseção conhecida como a área limite da dispersão molecular e representada como a área ocupada por uma molécula que não pode ser mais comprimida em uma monocamada de Langmuir.⁶²

As monocamadas de Langmuir podem ser acopladas a outras técnicas, para melhor determinação do fenômeno que está ocorrendo no sistema. Uma delas é a técnica espectroscópica PM-IRRAS, a qual é uma ferramenta que utiliza o fenômeno de incidência e reflexão de uma luz polarizada e modulada na região do infravermelho para detectar a absorção desta luz e, assim, averiguar qual é a estruturação e caracterização da amostra, quando esta está interagindo com a monocamada, além da aquisição de informações adicionais a respeito das orientações neste sistema.

O princípio desta técnica está descrito em Buffeteau et al.⁶³ Brevemente, a técnica de PM-IRRAS se baseia na alternância da polarização da luz incidente entre p (paralela) e s (perpendicular) com uma frequência de ordem de dezenas de kHz. Dessa forma, ambos os espectros podem ser medidos quase que simultaneamente e a refletividade diferencial (S) pode ser calculada pela equação 7, a partir da refletividade de ambas as polarizações, R_p e R_s :

$$S = C \frac{J_2(\phi_0)(R_p - R_s)}{(R_p + R_s) + J_0(\phi_0)(R_p - R_s)} \quad (7)$$

onde R_p e R_s são as refletividades para a polarização paralela (p) e perpendicular (s) ao plano de incidência e C é a razão de amplificação elétrica dos dois sinais obtidos. J_2 e J_0 são as funções de Bessel de segunda e nula ordem, respectivamente, do ângulo de defasagem máxima ϕ_0 que é introduzido pelo PEM (modulador fotoelástico). Os dados espectrais são representados como na equação 8:

$$\frac{S - S_0}{S_0} \quad (8)$$

onde S e S_0 são os sinais de PM-IRRAS da superfície coberta e livre do biofilme, respectivamente. Esta representação é independente de J_2 e C e reduz o largo sinal produzido pela subfase dielétrica. O espectro resultante pode conter bandas tanto positivas quanto negativas, dependendo do ângulo de incidência e da orientação dos momentos de transição da molécula estudada. A um dado ângulo de incidência de 75° , uma banda positiva de reflexão e absorção indica um momento de transição orientado preferencialmente no plano da superfície, enquanto que uma banda negativa indica um momento de transição preferencialmente orientado perpendicular à superfície. Momentos de transição intermediários dão origem a bandas com componentes adjacentes positivos e negativos.^{64,65}

Na espectroscopia na região do infravermelho (IV), a luz com comprimento de onda entre 2,5 e 25 μm (ou número de onda entre 400 e 4000 cm^{-1}) interage com a matéria e entra em ressonância com os dipolos das ligações e grupos químicos das moléculas, sendo absorvida. Como os diferentes grupos ou ligações químicas de uma molécula possuem frequência de oscilação características, cada molécula possui um espectro típico de IV. Assim, informações químicas estruturais podem ser obtidas. A seguir, no quadro 1, estão representadas as bandas mais importantes vistas na região do infravermelho e aplicadas na técnica de PM-IRRAS.

Os resultados de PM-IRRAS nos espectros de infravermelho obtidos foram selecionados do "background", em números de onda estratégicos para a interpretação dos resultados: de 1000 a 1800 cm^{-1} , onde estão localizadas as bandas da amida I e II, o qual apresentam características de estrutura secundária de peptídeos e proteínas, além das principais bandas das cabeças polares dos lipídios (fosfato, vibrações e estiramento de grupos carbonilas, etc); e de 2800 a 3200 cm^{-1} , que correspondem às vibrações de grupos C—H provenientes das cadeias alquilas dos lipídios. Deste modo, tem-se a possibilidade de obter dados sobre a estruturação do peptídeo quando na presença e ausência das monocamadas, bem como informações sobre sua orientação em relação ao eixo da monocamada.

Introdução

Quadro 1: Números de onda e os respectivos grupos ou estruturas químicas representadas na região do infravermelho de aplicação neste trabalho.

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo/Estrutura representada pela banda
1100	PO ₂ simétrico
1225	PO ₂ antissimétrico
1466	CH ₂ - simétrico
1550	N-H amida II
1615 - 1643	cadeia estendida/folha β
1692 - 1697	fita β
1647 - 1654	Desordenada
1650 - 1660	α -hélice
1663 - 1695	voltas/dobras
1710 - 1740	C=O amida I
2918	CH ₂ estiramento antissimétrico
2850	CH ₂ - estiramento simétrico
2959	CH ₃ - antissimétrico (menos intenso)
2879	CH ₃ - simétrico (menos intenso)

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Por meio das ferramentas físicas e bioquímicas apresentadas, pretendemos buscar informações estruturais e da interação do microdomínio existente entre os resíduos 30 a 66 da região N-terminal da enzima *HsDHODH* com membranas, em nível molecular. Especificamente, foi estudado o peptídeo contendo a sequência Ac-GDERFYAEHLMPTLQGLLDPESAHRLAVRFTSLG-NH₂ que corresponde aos aminoácidos existentes entre as posições 33 a 66, nomeado de *N-t(DH)*.¹¹ Esta região foi escolhida por conter as duas α -hélices deste microdomínio, além do loop que as conecta (figura 4 e 20).

Deste modo, visando obter informações estruturais e conformacionais necessárias para o entendimento do mecanismo molecular deste microdomínio, foram feitas substituições e adições pontuais ao peptídeo proposto. Assim, o design das sínteses dos análogos do peptídeo N-t(DH) foi realizada com base na análise da estrutura descrita na literatura do microdomínio N-terminal da enzima *HsDHODH*. Este tipo de abordagem tem sido utilizado com sucesso por grupos de pesquisa nos estudos de outras proteínas e peptídeos, tais como a esticolisina II,⁶⁶ a esticolisina I²⁶ e os "loops" extramembranais da GPCR⁶⁷.

Portanto, o presente estudo se propôs a estudar o fragmento da enzima que, como mostrado na figura 4, representa uma região possivelmente mergulhada na membrana e participante do controle catalítico da enzima *HsDHODH*. Para esta finalidade, foram substituídas as prolinas das posições 12 ou 20 pelo aminoácido paramagnético TOAC ou adicionou-se este marcador de spin também à extremidade N-terminal do N-t(DH). Estas substituições são permitidas, já que o aminoácido sintético TOAC possui uma estrutura familiar a da prolina, além de também possuir as características de indução de dobras ou curvaturas que podem aumentar a helicidade do peptídeo.

Com o intuito de pesquisarmos em detalhes as conformações específicas que este peptídeo poderia apresentar, foram sintetizados também dois análogos do pep-

Objetivos

tídeo N-t(DH): ambos contendo uma cisteína adicionada na extremidade C-terminal, diferenciando-se pela substituição do seu segundo marcador de spin: um análogo contém uma substituição de uma prolina na posição 12 por uma cisteína e o outro possuindo o aminoácido TOAC na extremidade N-terminal. As adições e/ou substituições pelo resíduo de cisteína têm por finalidade a posterior ligação do marcador de spin MTSSL que, como descrito anteriormente, reage com as cadeias sulfidrilas das cisteínas.

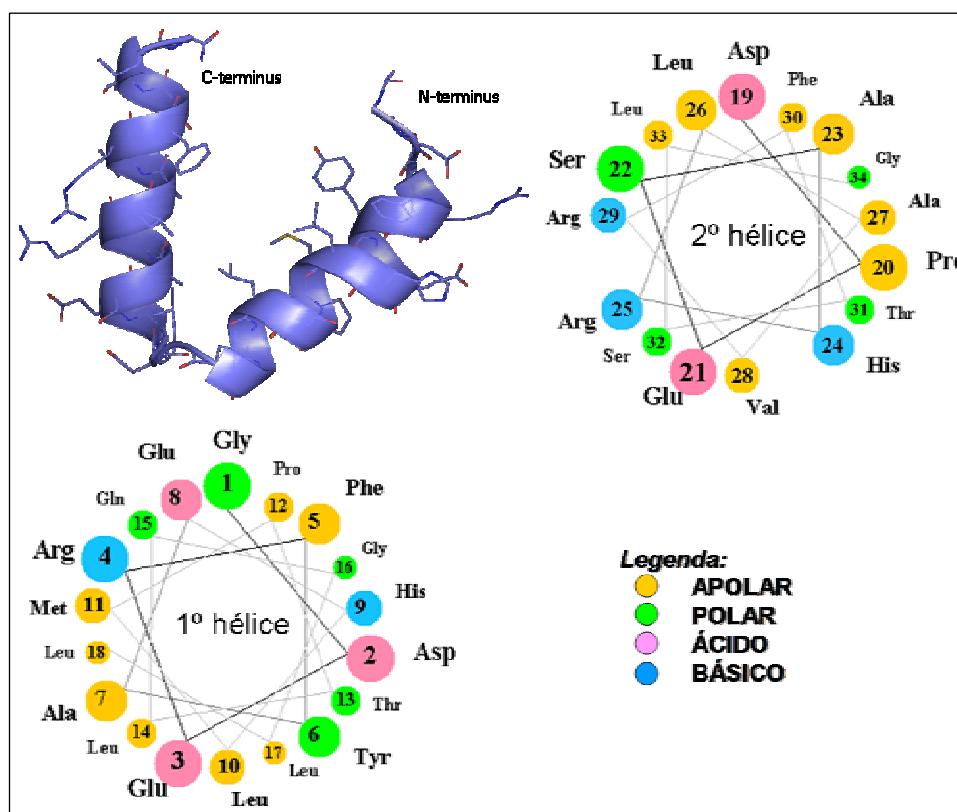


Figura 20: Helical Wheel do peptídeo N-t(DH). Na parte superior esquerda, está representado o fragmento correspondente ao microdomínio N-terminal da enzima *HsDHODH* e suas cadeias laterais, indicando as regiões terminais. Ao lado e abaixo estão esquematizados os "helical wheels" de cada uma das duas hélices correspondentes do microdomínio.

Objetivos Específicos

O quadro 2 ilustra as sequências sintetizadas para esta tese.

Sumariamente, para se atingir os objetivos específicos deste trabalho, foram feitas as seguintes etapas:

Objetivos

Quadro 2: Sequências do peptídeo N-t(DH) e seus análogos. Os análogos que contêm a sonda paramagnética TOAC (O - sombreado em amarelo) e com os resíduos de cisteínas marcados com MTSSL (C - sombreado em vermelho) estão em destaque.

Peptídeo	SEQUÊNCIA																																					
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		
N-t(DH)																																						
[TOAC ⁰]N-t(DH)	Q																																					
[TOAC ¹²]N-t(DH)																																						
[TOAC ²⁰]N-t(DH)																																						
[Cys ¹²⁻³⁵ MTSSL]N-t(DH)																																						
[Cys ³⁵ MTSSL-TOAC ⁰]N-t(DH)	Q																																					

1. Sínteses do peptídeo N-t(DH) e de seus análogos marcados com TOAC, objetivando a aquisição de dados da interação deste microdomínio com membranas.
2. Síntese dos análogos do peptídeo N-t(DH) duplamente marcados (MTSSL ou TOAC) para obtenção de dados específicos sobre a conformação, estruturação e topologia do peptídeo, por meio da medida de distâncias entre os centros paramagnéticos pela técnica de DEER.
3. Estudos de interação com miméticos de membranas por meio do estudo da fluorescência da tirosina presente na posição 6 da sequência primária do peptídeo.
4. Estudos de interação do peptídeo N-t(DH) por meio da técnica de Monocamadas de Langmuir e PM-IRRAS.
5. Análise da interação destes peptídeos na presença de miméticos de membrana, como micelas e lipossomas de diferentes composições, de acordo com a proporção majoritária de lipídios que constituem a membrana interna da mitocôndria.
6. Estudos espectroscópicos e estruturais do peptídeo N-t(DH) e seus análogos por meio das técnicas de CD e CW-RPE, a fim de elucidarmos os mecanismos moleculares da interação do peptídeo com membranas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SÍNTESE DO Fmoc-TOAC

Incorporando o aminoácido paramagnético artificial TOAC em posições estratégicas na cadeia peptídica, pode-se estudar as dinâmicas e a estruturação do peptídeo por meio da RPE. Assim, foi sintetizado o aminoácido Fmoc-TOAC^{69,79} como passo inicial nossos estudos e também por ser um composto caro para aquisição.

Para esta finalidade, 23 mmol (4,95 g) de H-TOAC-OH (ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil-4-amino-4-carboxílico) e 23 mmol (1,95 g) de NaHCO₃ (bicarbonato de sódio) foram colocados em 75 mL de água destilada. A esta solução foi adicionado 18,5 mmol (6,2 g) de Fmoc-OSu (N-[9-fluorenilmetoxycarboniloxil] succinimida) em 50 mL de 1,4-dioxano. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 24 h, protegida de luz. Após este período, 7 mmol (2,3 g) de Fmoc-OSu e NaHCO₃ (0,5 g; 6 mmol) foram acrescentados à mistura reacional. Continuou-se a agitação com agitador magnético por mais 3 dias, a temperatura ambiente, protegido da luz.

Adicionalmente, mais NaHCO₃ (0,385 g; 4,6 mmol) e uma outra porção de Fmoc-OSu (2,0 g; 6 mmol) foram adicionadas, e a solução foi agitada por mais 6 dias, nas mesmas condições. Por fim, o pH foi ajustado até o valor de 8 com NaHCO₃. A solução foi primeiramente filtrada para retirada do excesso de sais precipitados e, após isso, evaporou-se o 1,4-dioxano por meio de rotavapor. A solução aquosa remanescente foi extraída com CH₃CH₂OCH₂CH₃ (éter etílico ou sulfúrico) num funil de separação, a fim de remover o Fmoc-OSu que não reagiu.

O pH da solução obtida foi ajustado ao valor de 3 com KHSO₄ (bissulfato de potássio) a 0 °C com a finalidade de protonar os grupos ácidos do Fmoc-TOAC-OH e mudar, assim, a sua solubilidade. A solução acidificada foi extraída com CH₃COOC₂H₅ (acetato de etila).

A fase orgânica obtida foi lavada 3 vezes com uma solução de KHSO₄ 10% em água destilada. Após este procedimento, foi adicionado Na₂SO₄ (sulfato de sódio), um agente secante, a fim de retirar as moléculas de água remanescentes das lava-

Materiais e Métodos

gens. Parou-se somente de adicionar este sal quando visualmente não houve mais interação com a água (figura 21).



Figura 21: Solução de Fmoc-TOAC na presença de Na_2SO_4 . Erlenmeyer contendo Fmoc-TOAC-OH em acetato de etila (solução alaranjada) com o agente secante Na_2SO_4 (já totalmente hidratado).

Depois, a solução foi filtrada para a retirada deste sal e posteriormente concentrada em rotavapor, a fim de se retirar o solvente acetato de etila. Após total evaporação do solvente, colocou-se por 2 h no dessecador a vácuo para retirada total do acetato de etila e conseqüente secagem do produto.

O material obtido foi recristalizado com éter de petróleo. Para isto, adicionou-se este solvente a quente para a solubilização do produto e após resfriamento, obteve-se o material praticamente puro. Após isso, a solução foi filtrada e o filtrado, um pó amarelo e cristalino, foi colocado em frascos de cintilação tarados e, após secagem a vácuo, pesados.

3.2 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

Para a obtenção dos peptídeos e análogos foi utilizada a metodologia de Síntese de Peptídeos de Fase Sólida (SPFS)²⁶, utilizando a química Fmoc.³⁵ Este protocolo foi o escolhido por ser mais rápido e não empregar etapas ácidas durante a síntese, evitando assim a degradação do composto paramagnético TOAC. Para as sínteses, foi usada a resina Rink Amide AM - Synpep®, com 0,6 mmol/g de grau de substituição, protegida com o grupo protetor Fmoc.

Os aminoácidos glutamina e histidina foram utilizados contendo o grupo tritila (Trt) como protetor da cadeia lateral. Para os aminoácidos ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, treonina e tirosina foi usado o grupo *t*-butila (tBu) e para o aminoácido arginina empregou-se o grupo 2,2,4,6,7-pentametildiidrobenzofurano-5-sulfonila (Pbf) como protetor da cadeia lateral guanidina. Os demais aminoácidos foram utilizados sem protetor e foram adquiridos da Synpep® e NovaBiochem.

Para a realização do acoplamento, os grupos carboxila dos aminoácidos foram ativados com diisopropilcarbodiimida (DIC)/N-hidroxibenzotriazola (HOBt). Também foi utilizado o ativador hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-ila)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU)/N-etildiidopropilamina (DIEA) quando foi necessário repetir a etapa de acoplamento. O excesso de reagentes utilizado foi de três vezes e o tempo reacional foi de cerca de duas horas. A remoção do grupo Fmoc base-lábil foi realizada por meio de duas lavagens com uma solução de 20% piperidina em DMF, durante um e vinte minutos. Para a eliminação do excesso dos reagentes e dos subprodutos obtidos, em cada passo sintético foram realizadas lavagens com DMF e DCM. As etapas de síntese estão indicadas na figura 22.

A incorporação do aminoácido paramagnético TOAC – devido ao seu alto custo – foi realizada com 1,2 vezes de excesso, usando como agentes acoplantes o hexafluorofosfato de 2-(1-*H*-7-azabenzotriazo-1-ila)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HATU) – AnaSpec Inc.®, que é um agente ativador mais eficiente que os outros citados anteriormente.⁶⁸ O HATU necessita de um meio básico para a promoção de uma acilação eficiente, portanto é adicionado ao processo reacional à base DIEA, com a finalidade de ajustar o pH reacional para aproximadamente 9. O solvente utilizado foi uma mistura contendo *N*-metilpirrolidona (NMP) – Merck® e diclorometano (DCM) - Synth®,

Materiais e Métodos

que apresentou, por avaliação visual, o melhor inchamento da resina. Ambos os agentes acoplantes estavam presentes com 5 vezes de excesso. O aminoácido a ser acoplado ao TOAC, necessitou do desenvolvimento de uma metodologia especial, que será descrita nos Resultados e Discussão.

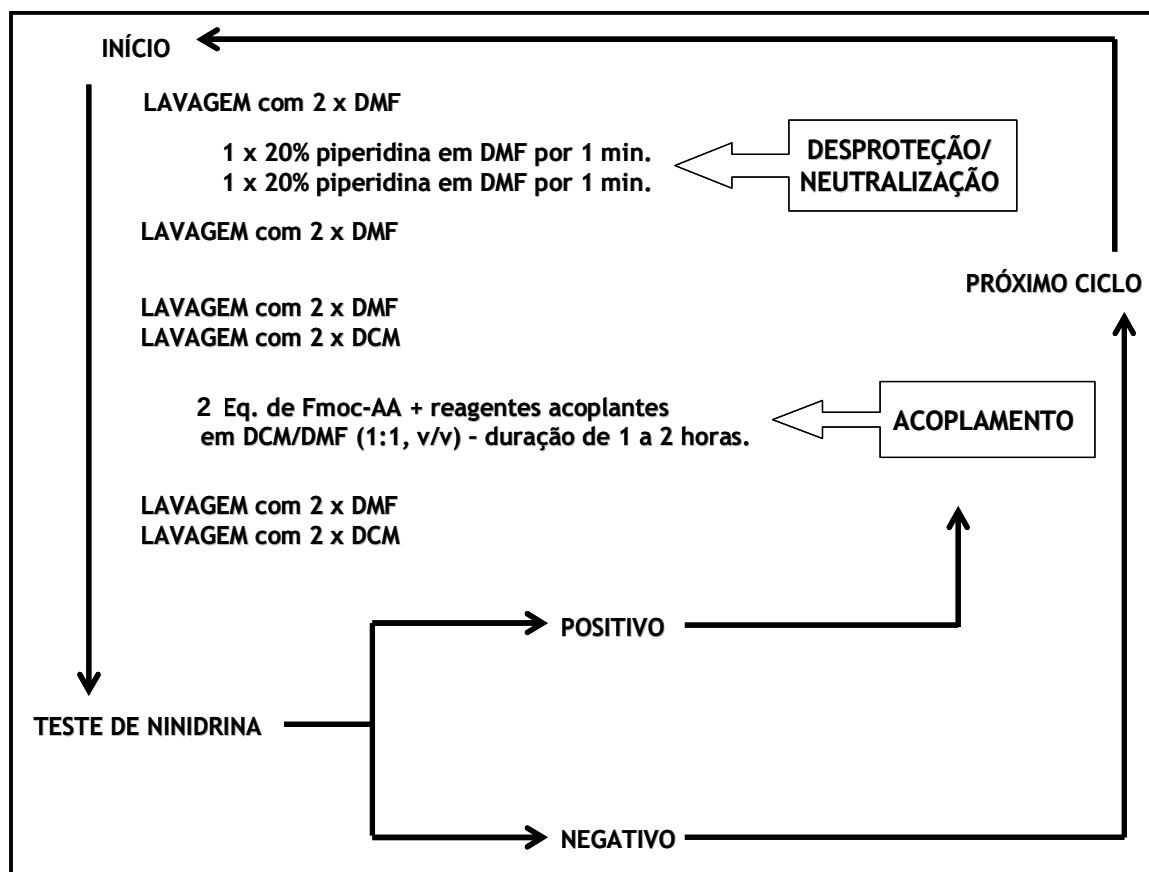


Figura 22: Protocolo de síntese utilizando a estratégia Fmoc.

A comprovação do acoplamento foi monitorada pelo teste de ninidrina, que em altas temperaturas (110° C), durante cerca de 3 minutos e na presença de grupos amino livres, ocorre a formação de um produto de coloração azul escura. Desta forma, a cor azul indica que o acoplamento não foi completo, já que ainda restam grupos aminos na peptidil-resina livres. A cor amarela, cor natural da ninidrina, mostra 100% de eficácia de reação, indicando a ausência de grupos aminos livres na peptidil-resina.

Ao final da síntese, a clivagem do peptídeo foi realizada pela adição de uma solução contendo água deionizada, TIS (triisopropilsilano), e ácido trifluoracético - TFA (proporção de 2,5:2,5:95 respectivamente; v,v,v) num frasco de cintilação, du-

rante duas horas sob agitação branda. O volume utilizado foi na proporção de 10 mL de solução para cada 1 g de resina.

Após este período, o peptídeo junto com a resina foram precipitados com éter etílico gelado e transferidos para tubos Falcon para a centrifugação. O precipitado foi então lavado 3 vezes com éter a fim de separarmos o peptídeo e a resina dos subprodutos e reagentes resultantes da clivagem. Depois desta etapa, a extração do peptídeo foi realizada com a adição de água deionizada acidulada e acetonitrila, se necessário, para posterior centrifugação. Este último procedimento também foi repetido 3 vezes. O sobrenadante resultante foi o peptídeo bruto. Este líquido foi liofilizado, obtendo-se um material branco e floculoso, que representa nosso material de interesse.

3.3 REVERSÃO DO AMINOÁCIDO PARAMAGNÉTICO TOAC

No processo de clivagem ácida, o TOAC perde seu elétron desemparelhado, devido à protonação do grupo nitróxido. Esta reação não é interessante, pois anula a propriedade paramagnética deste composto, fato este que nos impede de observar seu comportamento na RPE.^{69,70} Para recuperar a propriedade paramagnética do TOAC, foi feita uma reação chamada de reversão, onde os peptídeos marcados com a sonda foram colocados em um meio alcalino para a desprotonação do grupo nitróxido e consequente regeneração do sinal paramagnético. Neste processo, solubilizou-se o peptídeo bruto em água deionizada e adicionou-se hidróxido de amônio até o pH atingir o valor de 10. A reação durou de 4 a 8 horas e foi acompanhado por CLAE.

3.4 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Por meio da CLAE em fase reversa foram realizadas a purificação e caracterização dos peptídeos.

Materiais e Métodos

As purificações foram realizadas em modo semipreparativo utilizando um CLAE System Gold BECKMAN, com coluna de fase reversa C18 da marca Phenomenex® de dimensões 25 x 2,12 cm. O grau de pureza das frações foi determinado em um CLAE Shimadzu Corporation, modelo LC-10A/C-47A (Kyoto, Japão), com uma coluna analítica (25 x 0,46 cm) de fase reversa C18 da marca Kromasil®.

Para a purificação do peptídeo original, foi utilizado o sistema de solventes convencional usado no laboratório: solvente A (0,045 % de TFA em água deionizada) e B (0,036 % de TFA em acetonitrila). Os solventes para a purificação dos peptídeos contendo TOAC ou MTSSL foram 0,02 mol L⁻¹ de acetato de amônio em pH 5 (solvente A2) e 90 % acetonitrila em solvente A2 (solvente B2). Estes solventes foram utilizados para evitar a protonação do grupo nitróxido. Em pHs mais ácidos, como nos solventes normalmente utilizados no laboratório, notou-se a protonação do grupo nitróxido.

O teor de pureza das frações obtidas foram determinadas por CLAE analítica utilizando os solventes A (0,045 % de TFA em água deionizada) e B (0,036 % de TFA em acetonitrila), e o programa empregado foi um gradiente de 5 a 95 % de solvente B em 30 minutos.

A caracterização dos peptídeos sintetizados foi realizada por espectrometria de massas. Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas Fison Plataform ESI (ElectroSpray Injection Mass Spectrometry), com injeção direta com uma bomba Shimadzu LC-10AD, em modo de detecção positiva, num modelo ZMD Micromass (Milford, MA, EUA), localizado no Instituto de Química de Araraquara - UNESP, no Departamento de Química Orgânica.

A espectrometria de massas é uma ferramenta muito útil na caracterização dos peptídeos, pois permite determinar a razão massa molecular/carga (MM/z) das amostras analisadas. A técnica basicamente baseia-se em uma câmara injetora que ioniza a amostra por um método chamado *eletrospray*, um quadrupolo simples e um detector, todos dentro de um sistema a vácuo.

Materiais e Métodos

O espectro de massas mostra a razão MM/z , permitindo assim o cálculo das massas moleculares obtidas experimentalmente, pela equação 9:

$$MM_{pept} = \frac{(MM_z + zMM_{H^+})}{z} \quad (9)$$

onde MM_{pept} é a massa molecular do peptídeo analisado, MM_z é a massa molecular quando o peptídeo está ionizado com carga z ($z = 1, 2, 3...$), z é a quantidade de cargas em que está o peptídeo e MM_{H^+} é a massa molecular do hidrogênio protonado, de valor $1,008 \text{ g mol}^{-1}$.

A fim de fazer as medidas de concentração dos peptídeos purificados e obtidos, foi feito um espectro de varredura na região de luz ultravioleta em um espectrofotômetro UV 1601 PC Shimadzu de duplo feixe, situado em nosso laboratório, numa sala com temperatura climatizada em 25°C . Esse procedimento também foi realizado para averiguarmos em qual comprimento de onda o peptídeo teria uma absorbância máxima para posterior utilização na fluorescência. De acordo com a figura 23, encontrou-se um pico de comprimento de onda máximo em 276 nm. Este pico refere-se a absorção do resíduo de tirosina na posição 6 da sequência do peptídeo ($\epsilon = 1.490 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$).⁷¹ Assim foi possível determinar a concentração de peptídeos na amostra por meio da equação 10, de Lambert-Beer:

$$A_{276} = c \times \ell \times \epsilon \quad (10)$$

onde A é a absorbância no comprimento de onda em 276 nm, c é a concentração da amostra, ℓ é o caminho óptico utilizado em centímetros (em nosso caso, utilizou-se uma cubeta de 1 cm) e ϵ é o coeficiente de extinção molar da tirosina.

Uma solução estoque de peptídeo e análogos de concentração 1 mg mL^{-1} foi utilizada e sua concentração foi determinada como descrito acima. A partir desta solução estoque, foram preparadas as demais concentrações desejadas.

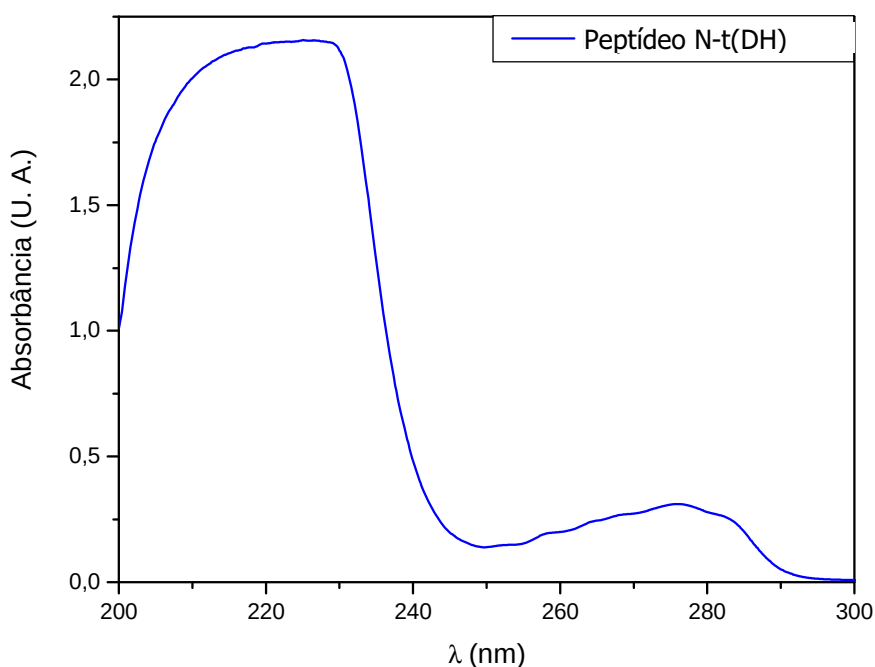


Figura 23: Espectro na região do Ultravioleta do peptídeo N-t(DH). A varredura foi feita de 200 a 350 nm, encontrando-se dois picos: o primeiro a 220 nm devido à absorção das ligações peptídicas e o segundo em 276 nm, responsável pela absorção da tirosina.

3.5 FLUORESCÊNCIA

A aquisição dos dados de fluorescência foi realizada em um espectrofluorímetro Cary Eclipse Varian e o comprimento de onda de excitação da tirosina utilizado foi 276 nm. O espectro de emissão de fluorescência foi adquirido em uma faixa de 294 a 365 nm, obtendo-se a intensidade de fluorescência e o comprimento de onda de emissão máxima para cada peptídeo e condição estudada.

Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando-se uma concentração de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de peptídeos, com volume final (cubeta) de $600 \mu\text{L}$. A temperatura do sistema foi mantida a 25°C por meio de um controlador de temperatura Cary Temperature Controller da marca Varian, a base de circulação de água para refrigeração do sistema.

Os estudos de interação com micelas foram feitos por meio da titulação do peptídeo com o detergente zwitteriônico 1-palmitoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (LPC), adquirido da Avanti Polar Lipids. As micelas foram utilizadas neste trabalho por serem bem estáveis, pequenas e se oligomerizem naturalmente

Materiais e Métodos

quando em uma solução aquosa, além de serem amplamente utilizadas para os estudos de interação entre peptídeo e membranas.^{33,72,73} Nestes estudos, uma solução estoque do surfactante foi preparada em alta concentração (LPC 100 mmol L⁻¹), e armazenada sob refrigeração. As concentrações utilizadas durante a titulação variaram de 0 a 10 mmol L⁻¹ e, para cada experimento, utilizou-se o tampão Tris-HCl 0,01 mol L⁻¹, NaCl 0,01 mol L⁻¹ e em pH 7,4, com o intuito de simular o pH fisiológico. Os parâmetros usados para analisar o comportamento estrutural dos peptídeos foram a intensidade de fluorescência (*I*) nos estudos de interação e fluorescência inicial (*F*₀) sobre a fluorescência emitida (*F*) nos estudos de supressão por acrilamida.

Para averiguar a interação do peptídeo com membranas, foram feitos estudos utilizando um sistema mais semelhante com as membranas naturais. As vesículas ou lipossomas diferem das micelas por possuírem em seu interior um compartimento aquoso e uma bicamada lipídica. Os lipídios usados para a confecção das vesículas foram o DPPC, por meio de uma solução estoque de concentração final de 0,8 mmol L⁻¹. A preparação dos lipídios foi feita da seguinte maneira: foi pesado o lipídio para uma concentração final de 15 mmol L⁻¹ em um tubo de vidro e ressuspensos em 1 mL de clorofórmio e metanol (4:1, v:v). Após este procedimento, evaporou-se o solvente em N₂ até se formar um fino filme aderido na parede do tubo de ensaio. Este filme foi mantido sob vácuo durante 12 h para eliminação dos solventes orgânicos residuais. Após esta etapa, o filme foi hidratado com tampão Tris-HCl 0,01 mol L⁻¹, NaCl 0,01 mol L⁻¹ em pH 7,4. A solução obtida foi, sucessivamente, colocada em banho-maria a 60°C, agitada num equipamento Vortex e ultrassonicada, num intervalo de uma hora, para que as camadas e interações das multicamadas formadas fossem quebradas e o tamanho das vesículas diminuídas (agitação seguida de repouso). As vesículas unilamelares grandes (LUVs) foram obtidas utilizando-se um extrusor (Avanti Polar Lipids), contendo filtro de polycarbonato com poros de 100 nm (Avanti Polar Lipids) de diâmetro. Foram realizados 20 ciclos no extrusor para que os lipossomas ficassem uniformes, todos com o mesmo tamanho. Durante essa etapa, o extrusor foi mantido aquecido a uma temperatura de aproximadamente 60°C. Notou-se após esta etapa que a solução lipídica ficou mais translúcida, indicando a homogeneização dos lipossomas extruídos, mesmo após o retorno à temperatura ambiente.

Para verificar se este peptídeo interage com a membrana, foram feitos estudos de supressão de fluorescência com o peptídeo em solução tampão e em presença de miméticos de membrana a fim de encontrarmos a constante de Stern-Volmer (K_{sv}). Neste sentido, numa solução contendo $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de peptídeo solubilizado em solução tampão, adicionou-se acrilamida (supressor de fluorescência) nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 mmol L^{-1} . O mecanismo de supressão de fluorescência da acrilamida é devido aos choques colisionais entre a molécula supressora e o anel da cadeia lateral do aminoácido tirosina, que é a responsável pela fluorescência neste caso. A partir destes espectros, calculou-se a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) para os peptídeos em solução, por meio da tangente da reta dos valores de fluorescência inicial (F_0) sobre a fluorescência emitida (F) em função da concentração de acrilamida, seguindo a regressão linear de Stern-Volmer, representada na equação 11:

$$F_0/F = 1 + K_{sv} \times [Q] \quad (11)$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na presença e ausência de acrilamida, respectivamente, e $[Q]$ é a concentração molar total do supressor na amostra.

3.6 DICROÍSMO CIRCULAR

As análises de dicroísmo circular foram feitas em um espectropolarímetro Jasco J-715, localizado no Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo, Grupo de Biofísica Molecular "Sérgio Mascarenhas". O tempo de integração foi de 3 s por ponto, em celas de 1,0 mm de caminho óptico, com 8 varreduras por espectro e a concentração peptídica de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para todos os experimentos a leitura foi feita a cada 0,2 nm.

Em nossos ensaios foram utilizados inicialmente quatro meios diferentes para averiguar o comportamento estrutural para o peptídeo N-t(DH) e seus análogos marcados somente com TOAC na sequência: **1)** solução tampão Tris-HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, NaCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e em pH 7,4 com o intuito de simular o pH fisiológico (pH 7,38); **2)**

Materiais e Métodos

60% de trifluoretanol (TFE); **3**) 10 mmol L⁻¹ de lisofosfatidilcolina (LPC); e **4**) 20 mmol L⁻¹ de dodecilsulfato de sódio (SDS).

O cálculo da elipcidade molar $[\theta]$ foi feito utilizando a equação 12:⁶⁶

$$[\theta] = \frac{(m \text{ deg})}{10 \times \ell \times [\text{peptídeo}] \times AA} \quad (12)$$

onde (*mdeg*) é o valor obtido em "millidegree" pelo equipamento, ℓ é o caminho óptico utilizado na cubeta (0,1 cm), $[\text{peptídeo}]$ é a concentração de peptídeo usada no experimento em mol L⁻¹ e *AA* é a quantidade de resíduos presentes no peptídeo que, em nosso caso, é de número 34 para os peptídeos N-t(DH), [TOAC¹²]N-t(DH) e [TOAC²⁰]N-t(DH); de número 35 para os peptídeos [TOAC⁰]N-t(DH) e [Cys¹²⁻³⁵MTSSL]N-t(DH) e, finalmente, de número 36 para o peptídeo [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH).

Para as análises dos peptídeos em solução contendo vesículas, foi utilizado o protocolo estabelecido pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Gary A. Lorigan, no qual emprega-se as MLVs em vez das LUVs para as análises de CD. O lipídio escolhido foi o POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3-fosfatidilcolina). A preparação dos filmes de vesículas foi idêntica à descrita acima, com a diferença de que os lipídios já haviam sido solubilizados em clorofórmio, o que não houve a necessidade de pesagem, já que os cálculos são feitos baseados no volume e na concentração dos mesmos. Além disso, os peptídeos foram solubilizados em uma solução de clorofórmio e trifluoretanol numa proporção de 9:1 (v:v) e adicionados junto com os lipídios para a formação do filme. Após esta etapa, evaporou-se os solventes orgânicos restantes com gás nitrogênio e submeteu-se o tubo já seco ao vácuo por no mínimo 4 h para a completa secagem. Depois de seco, suspendeu-se o filme já com o peptídeo em tampão Tris-HCl 0,01 mol L⁻¹, NaCl 0,01 mol L⁻¹ pH 7,4 e realizou-se 6 ou 7 ciclos, descritos a seguir: rápido congelamento com nitrogênio líquido, ultrasonicação e consequente descongelamento por um minuto e agitação por meio de agitador vortex, também por um período de um minuto. Após este procedimento, faz-se a leitura no espectropolarímetro.

3.7 MONOCAMADAS DE LANGMUIR

As monocamadas foram obtidas espalhando uma solução lipídica numa subfase aquosa contendo o tampão Tris 0,01 mol L⁻¹, NaCl 0,01 mol L⁻¹ em pH 7,4. Água MilliQ-Plus™ com resistividade de 18,2 MΩ cm⁻¹ (pH 5,5) foi usada para preparar todas as soluções tampão.

As composições lipídicas escolhidas foram baseadas nos constituintes principais da membrana interna da mitocôndria (28% de fosfatidilcolina (PC), 13% de fosfatidiletanolamina (PE) e 6% de cardiolipina (CL)),^{74,75} local onde a proteína *HsDHO-DH* está ancorada através da região N-terminal.^{17,25} Deixa-se claro aqui que, apesar das características das cadeias alquílicas não conterem insaturações, distintas das que encontram-se naturalmente nas membranas biológicas, o grupo das cabeças polares destes lipídios, interagindo imediatamente com a subfase aquosa, pode apresentar informações importantes sobre a interação do peptídeo. As soluções lipídicas foram preparadas em clorofórmio para o DPPC ou cardiolipina, ou em clorofórmio e metanol (4:1, v:v) para o DPPE. Após a dissolução em tampão, a concentração final foi de 1 mmol L⁻¹. As medidas de pressão de superfície das isotermas π -A foram feitas numa cuba mini-KSV (KSV, Finlândia) Langmuir, previamente calibrada usando água MilliQ-Plus™ com uma pressão de superfície de aproximadamente 72,4 mN m⁻¹. A cuba foi equipada com um sensor de pressão de superfície (método Wilhelmy) e instalada numa sala limpa classe 10.000.

As isotermas foram obtidas por meio da compressão das monocamadas usando barreiras móveis numa velocidade de 10 Å² mol⁻¹ min⁻¹. Inicialmente, a cuba de Langmuir com capacidade total de 250 mL foi preenchida com solução tampão e os lipídios foram espalhados na superfície água-ar para atingir uma área inicial por molécula de lipídio de aproximadamente 135 Å². Depois do espalhamento, esperou-se 20 min para a evaporação do solvente e para as monocamadas atingirem o equilíbrio. A solução do peptídeo N-t(DH) foi injetada na subfase numa concentração final de 10, 20 e 50 nmol L⁻¹, com exceção dos estudos com DPPE, onde as concentrações foram de 10, 20 e 30 nmol L⁻¹, pois nessa última concentração o peptídeo já apresentava uma alta atividade intrínseca de adsorção. A injeção foi realizada abaixo dos lipídios pré-estruturados e sua absorção foi monitorada em função do tempo e pelas

mudanças nos valores de pressão superficial. Após o sistema atingir o equilíbrio em relação à pressão de superfície, os experimentos de isotermas foram avaliados em função da compressão das monocamadas. Todos os experimentos foram feitos a 22 ± 1 °C.

Os experimentos de PM-IRRAS foram feitos concomitantemente às monocamadas de Langmuir e foram adquiridos em um instrumento KSV PMI 550 (KSV, Biolin Scientific, Finlândia), usando protocolo descrito na literatura.⁷⁶ A cuba de Langmuir foi ajustada de tal modo que a luz infravermelha atinge a monocamada num ângulo de incidência fixo de 80°. A luz incidente foi modulada a uma frequência de 50 kHz entre as polarizações s- e p-, as quais permitiram medições simultâneas para ambas as orientações de polarização. O sinal detectado foi dividido em dois canais e o espectro de refletividade diferencial $\Delta R = (R_p - R_s)/(R_p + R_s)$ foi calculado (R_p e R_s são as refletividades polarizadas nas direções paralela e perpendicular ao plano incidente, respectivamente). A luz paralelamente polarizada é sensível a dipolos verticalmente orientados, e as perpendicularmente polarizadas são preferencialmente absorvidas por dipolos que se encontram "deitados" na superfície aquosa. Devido à estas diferentes absorções, o espectro de refletividade diferencial é sensível à orientação molecular. Especialmente para os resultados que serão mostrados neste trabalho, bandas positivas indicam momentos dipolos de transição orientados paralelamente à superfície da água (perpendicular ao plano de incidência da luz IR); o oposto é aplicado para momentos dipolos perpendiculares à superfície aquosa. É também importante notar que as medidas simultâneas e a normalização com relação ao espectro da subfase aquosa reduz absorções indesejadas, tais como aquelas oriundas do vapor d'água e dióxido de carbono, naturalmente presentes no ambiente.

3.8 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

Para confirmar a manutenção da capacidade paramagnética dos peptídeos e, principalmente, obter informações sobre a mobilidade da região contendo o grupo TOAC, foram realizados experimentos com os peptídeos análogos ao N-t(DH) por meio da RPE. Assim, as amostras foram analisadas em duas etapas: no Brasil, utili-

Materiais e Métodos

zando um espectrômetro Varian (Santa Clara, CA, EUA) E-109, banda X (9,5 GHz) de onda contínua (CW) à temperatura ambiente (22°C), usando células chatas de quartzo. O equipamento está localizado no Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo, Grupo de Biofísica Molecular "Sérgio Mascarenhas", sob a supervisão do Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho. As condições experimentais foram: campo central de 3362 G, largura da varredura de 100 G, amplitude de modulação 0,5 G, frequência de modulação de 100 kHz, potência de micro-ondas de 10 mW, constante de tempo de 128 ms e o tempo de aquisição das amostras foram de 150 s. A segunda parte foi realizada nos Estados Unidos da América, no laboratório do Prof. Dr. Gary A. Lorigan localizado na Miami University - Department of Chemistry and Biochemistry, Oxford - Ohio, sob o processo PDSE BEX nº 6834/12-4 de bolsa de doutorado-sanduíche no exterior. O equipamento utilizado foi um espectrômetro Bruker EMX, banda X (9,5 GHz) de onda contínua (CW) à temperatura ambiente (22°C), usando capilares finos de quartzo para as medidas. As condições experimentais foram as mesmas utilizadas na primeira parte dos estudos.

Para os estudos de RPE, foram feitos filmes lipídicos em POPC, POPC:POPE (2,15:1), POPC:CL (4,67:1) e POPC:POPE:CL (4,67:2,17:1). Este último filme lipídico está bem próximo de simular a real composição da membrana interna da mitocôndria, enquanto que as outras composições visam entender melhor qual o papel individual dos lipídios na interação com os análogos do peptídeo N-t(DH). Todos os peptídeos foram analisados utilizando estes modelos de membrana por meio da técnica de CW-EPR e DEER.

Com estes mesmos filmes, foram realizados também estudos com a adição de ubiquinona (decilubiquinona, Sigma-Aldrich), a fim de verificar se existiam mudanças significativas nas dinâmicas conformacionais dos análogos marcados, já que este composto é descrito por supostamente interagir ou ligar-se com a região N-terminal da enzima.

As distâncias dos marcadores de spin nos análogos por meio da técnica de DEER foi avaliada nestas composições lipídicas, na presença e ausência de ubiquinona, a fim de se ter uma ideia geral de como o peptídeo se comporta frente a presença deste composto, dando-nos informações sobre seu mecanismo de ação na captação das quinonas, essenciais para a catálise da enzima.

Materiais e Métodos

A proporção molar de ubiquinona entre os fosfolipídios na membrana interna da mitocôndria é de 1,36% do total de lipídios, ou 1 ubiquinona em cada 73,4 fosfolipídios, segundo Capaldi e colaboradores.⁷⁷ Porém, esta concentração relativa ao peptídeo foi muito baixa (cerca de 3,4 moléculas de ubiquinona para cada peptídeo), fato que nos levou a aumentar a concentração desta molécula. De acordo com o protocolo descrito por Malmquist e colaboradores,⁷⁸ utilizou-se uma razão ubiquinona/peptídeo de 200 a 2000:1 para experimentos pilotos. Pelos testes nos experimentos de DEER usando-se razões de ubiquinona/peptídeo de 200, 1000 e 2000:1, os espectros não se alteraram, fazendo com que se optasse pela menor proporção de quinona nos filmes (200:1).

Assim, as análises foram feitas nas seguintes condições: **1)** em solução aquosa; **2)** em micelas de LPC a 10 mmol L⁻¹, **3)** 60% de TFE; **4)** 20 mmol L⁻¹ de SDS; **5)** em MLVs de composições POPC, POPC:POPE (2,15:1), POPC:CL (4,67:1), POPC:POPE:CL (4,67:2,17:1) e **6)** utilizando a ubiquinona no filme trifásico (POPC:POPE:CL) numa razão UBQ/peptídeo de 200:1, somente para análises de DEER. Empregou-se uma concentração peptídica na faixa de 50 μmol L⁻¹, dependendo da confecção do filme elaborado.

As condições experimentais para as análises de DEER foram: espectrômetro Bruker ELEXSYS E580, banda Q (34 GHz) equipado com um criostato com fluxo contínuo de nitrogênio (Oxford Instruments). Amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, usando um crioprotetor (glicerol deuterado a 30 % do volume total da amostra, de 10 μL) para evitar que o capilar quebre e os dados foram coletados a 80 K. A frequência de bombeio para as medidas pulsadas foram ajustadas para o máximo do pico central de absorção do espectro, e a frequência de observação foi ajustada para a máxima do pico de campo baixo de absorção. Ciclagem em duas etapas foram aplicados para eliminar ecos indesejados. O tempo para o decaimento dipolar usado foi de 2 μs para se obter uma razão sinal/ruído ótima e os espectros foram tratados com o software DEERAnalysis2011, usando a regularização com a curva L de Tikhonov. Usou-se o modelo de subtração de background de três dimensões (3D) para corrigir e normalizar os dados obtidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO Fmoc-TOAC-OH

Para comprovarmos a obtenção do Fmoc-TOAC-OH, a técnica de CLAE foi utilizada para comparação com o padrão existente no laboratório.

Comparando-se os tempos de retenção das duas amostras (obtida e padrão), como mostram os cromatogramas da figura 24, conclui-se que os tempos de retenção das duas amostras são os mesmos (20,22 minutos em ambas), o que comprova a obtenção do produto de interesse. O teor de pureza foi de cerca de 85%, segundo a relação entre as áreas dos picos do cromatograma.

O rendimento final obtido foi de 64 % e, portanto, a síntese do Fmoc-TOAC-OH foi realizada com sucesso.

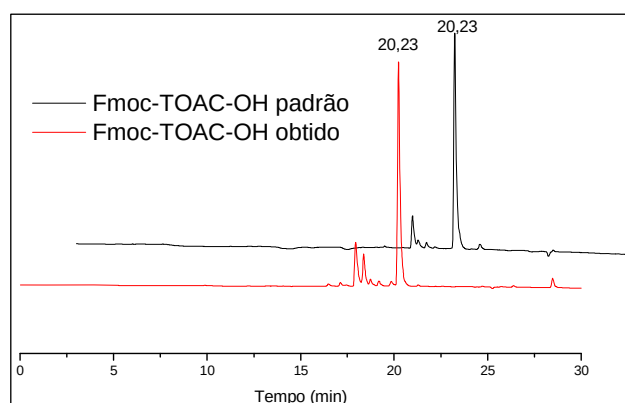


Figura 24: Cromatogramas do material obtido e do Fmoc-TOAC padrão. Nota-se que em ambas observa-se o mesmo tempo de retenção, confirmando a obtenção do composto em questão.

4.2 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

A síntese dos peptídeos foi realizada inicialmente até a obtenção da sequência ESAHRLAVRFTSLG, empregando uma resina Rink Amida MBHA de médio grau de substituição ($0,6 \text{ mmol g}^{-1}$), partindo de uma escala inicial de $1,0 \text{ mmol}$ ($1,67 \text{ g}$ de resina). Neste ponto, a peptidil-resina foi dividida em três partes: $0,2 \text{ mmol}$ de escala

Resultados e Discussão

para a síntese do peptídeo [TOAC²⁰]N-t(DH) (sequência Ac-GDERFYAEHLMPTLQGLLD-**TOAC**-ESAHRLAVRFTSLG-CONH₂) substituindo uma prolina da posição 20 pelo aminoácido paramagnético TOAC; 0,4 mmol para a síntese da sequência intermediária TLQGLLDPESAHRLAVRFTSLG; e 0,4 mmol foram guardados sob refrigeração para posteriores novas sínteses.

A sequência TLQGLLDPESAHRLAVRFTSLG obtida acima foi dividida em duas partes: 0,2 mmol para a síntese do peptídeo original da N-terminal da *Hs*DHODH, o N-t(DH) (GDERFYAEHLMPTLQGLLDPESAHRLAVRFTSLG-CONH₂) e 0,2 e para a síntese do análogo [TOAC¹²]N-t(DH), onde foi substituído o resíduo de prolina da posição 12 pelo marcador de spin TOAC, resultando a sequência (Ac-GDERFYAEHLM-**TOAC**-TLQGLLDPESAHRLAVRFTSLG-CONH₂). Metade da massa do peptídeo N-t(DH) foi acetilada (0,1 mmol - Ac-GDERFYAEHLMPTLQGLLDPESAHRLAVRFTSLG-CONH₂), sendo que o restante (0,1 mmol) foi utilizado para a incorporação do TOAC na posição 0, adicionando o marcador na porção N-terminus do peptídeo N-t(DH), originando o análogo [TOAC⁰]N-t(DH), de sequência primária Ac-**TOAC**-GDERFYAEHLMPTLQGLLDPESAHRLAVRFTSLG-CONH₂.

A incorporação do Fmoc-TOAC foi realizada como descrita em Materiais e Métodos. O acoplamento do aminoácido posterior ao TOAC na sequência primária dos peptídeos necessitou de uma maior atenção do que os outros aminoácidos devido a baixa reatividade do TOAC. O grupamento amino do TOAC (figura 9), apresenta um alto impedimento estérico e um pK_a baixo (menor que 6) quando ligado à cadeia peptídica.⁸⁰ Vale salientar aqui que o teste de ninidrina não é eficaz no monitoramento deste acoplamento, sendo que esta reação deve ser avaliada por outras metodologias, como espectrometria de massas e CLAE. Estes dois últimos métodos foram os escolhidos e analisou-se o rendimento deste acoplamento após a clivagem de uma pequena quantidade de resina.

Neste sentido, o aminoácido posterior ao TOAC foi acoplado seis vezes consecutivas, com cinco vezes de excesso de Fmoc-aminoácido, utilizando os agentes acoplantes HATU/DIEA, em altas temperaturas (entre 50° e 60°C) e por aproximadamente 4 h. O rendimento obtido foi de aproximadamente 60% de acoplamento, onde observou-se por CLAE e por espectrometria de massas (não mostrado) a formação de um pico com maior tempo de retenção, em virtude da entrada do Fmoc-

Resultados e Discussão

aminoácido na sequência. Depois da incorporação do ácido aspártico na sequência [TOAC²⁰]N-t(DH) e da metionina no [TOAC¹²]N-t(DH), foi realizada uma acetilação dos grupos aminos restantes que não reagiram, o que facilita a purificação posterior do produto final da síntese. Todos os peptídeos obtidos foram acetilados após o acoplamento do último aminoácido e clivados como descrito anteriormente.

Para a síntese dos análogos duplamente marcados, usou-se uma resina Rink Amida MBHA com um grau de substituição de 0,36 mmol g⁻¹. O menor teor de sítios por grão de resina foi utilizado com a finalidade de se obter uma síntese mais rápida, devido a menor interação entre as cadeias peptídicas. A síntese seguiu os mesmos protocolos descritos acima, porém o primeiro aminoácido acoplado foi a cisteína. Depois, continuou-se com a sequência primária do microdomínio da região N-terminal da *Hs*DHODH até a treonina (TLQGLLDPESAHRLAVRFTSLG-**Cys**). A partir deste ponto, a síntese, inicialmente com escala de 0,2 mmol, foi dividida em 2 partes: 0,1 mmol para a obtenção do peptídeo contendo TOAC na extremidade N-terminal ([Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH) - Ac-**TOAC**-GDERFYAEHLMPTLQGLLDPESAHRLAVRFTSLG-**Cys**-CONH₂) e o restante foi usado para a obtenção do outro peptídeo análogo [Cys¹²⁻³⁵MTSSL]N-t(DH) - Ac-GDERFYAEHLM-**Cys**-TLQGLLDPESAHRLAVRFTSLG-**Cys**-CONH₂. O quadro 3 mostra as massas de resinas e de material bruto obtidas das sínteses e das clivagens .

Os peptídeos análogos ao N-t(DH) contendo o aminoácido paramagnético TOAC na posição 0 ou 12 ou 20 foram submetidos, logo após a etapa de clivagem, à reação de reversão, a fim de se desprotonar o radical nitróxido, pois, devido à clivagem em meio ácido, um hidrogênio se ligou este grupamento. A reação foi acompanhada e monitorada por CLAE (dados não mostrados), com a finalidade de observar a formação de um pico com tempo de retenção maior e/ou diminuição do pico do material inicial, devido às mudanças de polaridade da molécula.

Quadro 3: Massas obtidas das sínteses do peptídeo N-t(DH) e análogos.

Peptídeo	Massa de resina clivada (mg)	Massa do material bruto/revertido (mg)
N-t(DH)	608	314 (bruto)
[TOAC ⁰]N-t(DH)	590	321 (bruto revertido)
[TOAC ¹²]N-t(DH)	607	128 (bruto revertido)
[TOAC ²⁰]N-t(DH)	220	131 (bruto revertido)
[Cys ¹²⁻³⁵ MTSSL]N-t(DH)	545	230 (bruto)
[Cys ³⁵ MTSSL-TOAC ⁰]N-t(DH)	983	485 (bruto)

4.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

A purificação foi realizada em um sistema de CLAE semipreparativa. A determinação do gradiente a ser utilizado foi feita por meio dos valores dos tempos de retenção obtidos nos cromatogramas dos peptídeos revertidos (em torno de 17 min, correspondente a concentração de 51% de acetonitrila). Os perfis dos peptídeos brutos não revertidos estão na figura 25.

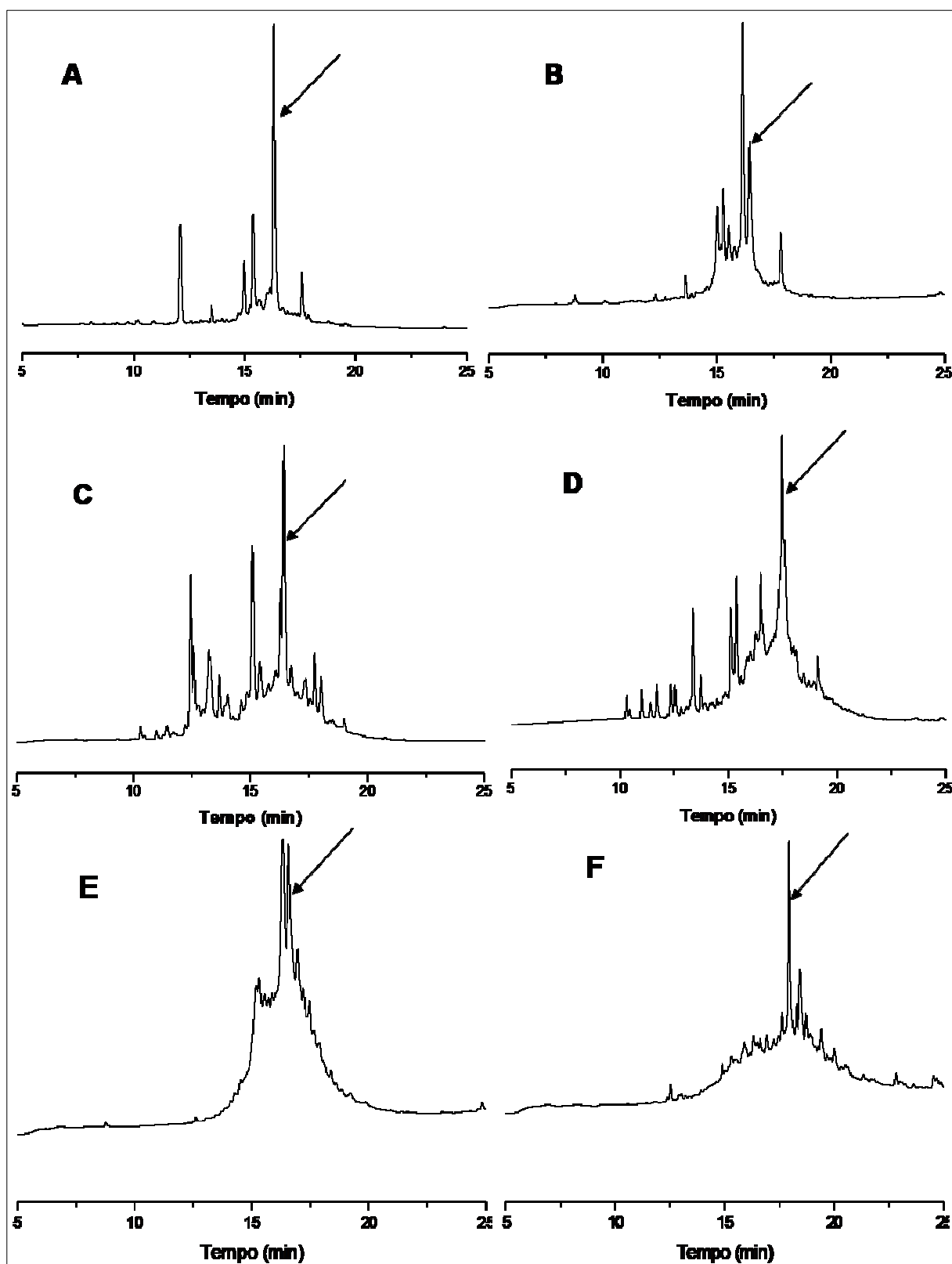


Figura 25: Cromatogramas dos peptídeos brutos. A) N-t(DH), **B)** [TOAC⁰]N-t(DH), **C)** [TOAC²⁰]N-t(DH), **D)** [TOAC¹²]N-t(DH), **E)** [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH) e **F)** [Cys¹²⁻³⁵MTSSL]N-t(DH). Gradiente: 5 a 95% de solvente B em 30 minutos. Na figura estão representadas escalas de tempo de 5 a 25 minutos para melhor visualização. A seta indica o material de interesse, determinado por meio da espectrometria de massas.

Resultados e Discussão

A figura 26 indica os perfis cromatográficos dos brutos revertidos dos análogos contendo TOAC após a reação de reversão.

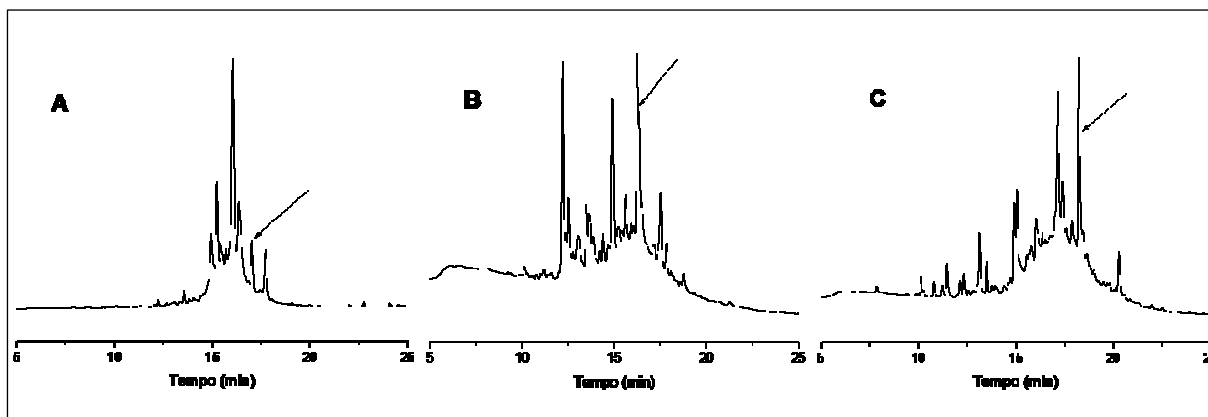


Figura 26: Cromatogramas dos peptídeos brutos revertidos. A) $[\text{TOAC}^0]\text{N-t(DH)}$, **B)** $[\text{TOAC}^{20}]\text{N-t(DH)}$ e **C)** $[\text{TOAC}^{12}]\text{N-t(DH)}$. Gradiente: 5 a 95% de solvente B em 30 minutos. Na figura estão representadas escalas de tempo de 5 a 25 minutos para melhor visualização. A seta indica o material de interesse por meio da espectrometria de massas.

Para a purificação dos peptídeos brutos e/ou revertidos no modo semipreparativo, os gradientes escolhidos para cada peptídeo foram:

- N-t(DH) e $[\text{Cys}^{12-35}\text{MTSSL}]\text{N-t(DH)}$ - programa de 35 a 65 % de solvente B em 120 minutos;
- $[\text{TOAC}^0]\text{N-t(DH)}$, $[\text{TOAC}^{12}]\text{N-t(DH)}$, $[\text{TOAC}^{20}]\text{N-t(DH)}$ e $[\text{Cys}^{35}\text{MTSSL-TOAC}^0]\text{N-t(DH)}$ - programa de 30 a 60 % de solvente B em 90 minutos.

Devido à complexidade dos materiais obtidos para os peptídeos contendo TOAC, as massas obtidas foram divididas e purificadas em 3 etapas nas mesmas condições. A injeção de menor massa melhora a resolução dos picos e facilita a separação dos materiais. Visando melhorar ainda mais a qualidade do material obtido, juntou-se as frações mais puras resultantes destas purificações e realizou-se uma etapa adicional de purificação nas mesmas condições, obtendo-se o peptídeo puro final. Nos dois análogos contendo cisteínas, também foi executada uma etapa adicional após as três purificações realizadas.

Na reação da ligação do marcador de spin MTSSL nas cadeias sulfidrilas destes aminoácidos (figura 27) foram usados 5 vezes de excesso do marcador de spin MTSSL em relação à quantidade do peptídeo $[\text{Cys}^{35}\text{MTSSL-TOAC}^0]\text{N-t(DH)}$ e 10 vezes para o análogo $[\text{Cys}^{12-35}\text{MTSSL}]\text{N-t(DH)}$ – devido às duas cisteínas presentes – em tampão Tris-HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, NaCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,4 por 4 h.

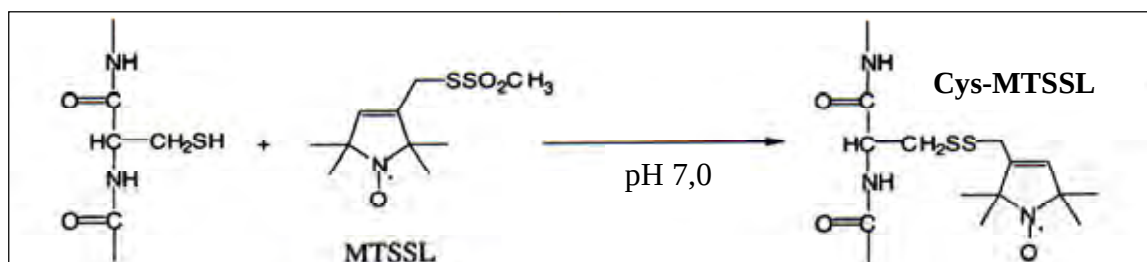


Figura 27: Reação de ligação do marcador de spin MTSSL às cadeias laterais das cisteínas.

Os perfis cromatográficos obtidos dos peptídeos semipuros submetidos à marcação com MTSSL e os cromatogramas após esta reação estão representados na figura 28. Os materiais obtidos foram novamente purificados, obtendo-se assim, as frações puras. Os perfis cromatográficos dos peptídeos mais puros obtidos com o seu respectivo tempo de retenção estão na figura 29.

Ressalta-se que o pico adjacente à esquerda do pico principal dos análogos [TOAC⁰]N-t(DH) e [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH) - indicado pela seta na figura 29 - representa o material não revertido, comprovado por massas (não mostrado), não sendo considerado uma impureza e sim o material de interesse com o radical nitróxido protonado. Interessante notar que, para o análogo [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH), a reação de marcação com MTSSL em uma solução de pH 7 já foi suficiente para a reversão do aminoácido paramagnético TOAC, obtendo-se o peptídeo já com os dois marcadores de spin com sinais paramagnéticos ativos.

Com a finalidade de comprovarmos a obtenção dos peptídeos de interesse, foram realizadas as análises de espectrometria de massas, obtendo-se a relação massa/carga dos peptídeos purificados. As massas moleculares teóricas calculadas dos peptídeos são: N-t(DH) – 3.869,3 g mol⁻¹; [TOAC⁰]N-t(DH) – 4.066,6 g mol⁻¹; [TOAC²⁰]N-t(DH) e [TOAC¹²]N-t(DH) – 3.969,5 g mol⁻¹; [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH) – 4.354,8 g mol⁻¹ e [Cys¹²⁻³⁵MTSSL]N-t(DH) – 4.346,6 g mol⁻¹. A figura 30 apresenta os espectros de massas obtidos para os peptídeos, confirmando a obtenção dos materiais desejados.

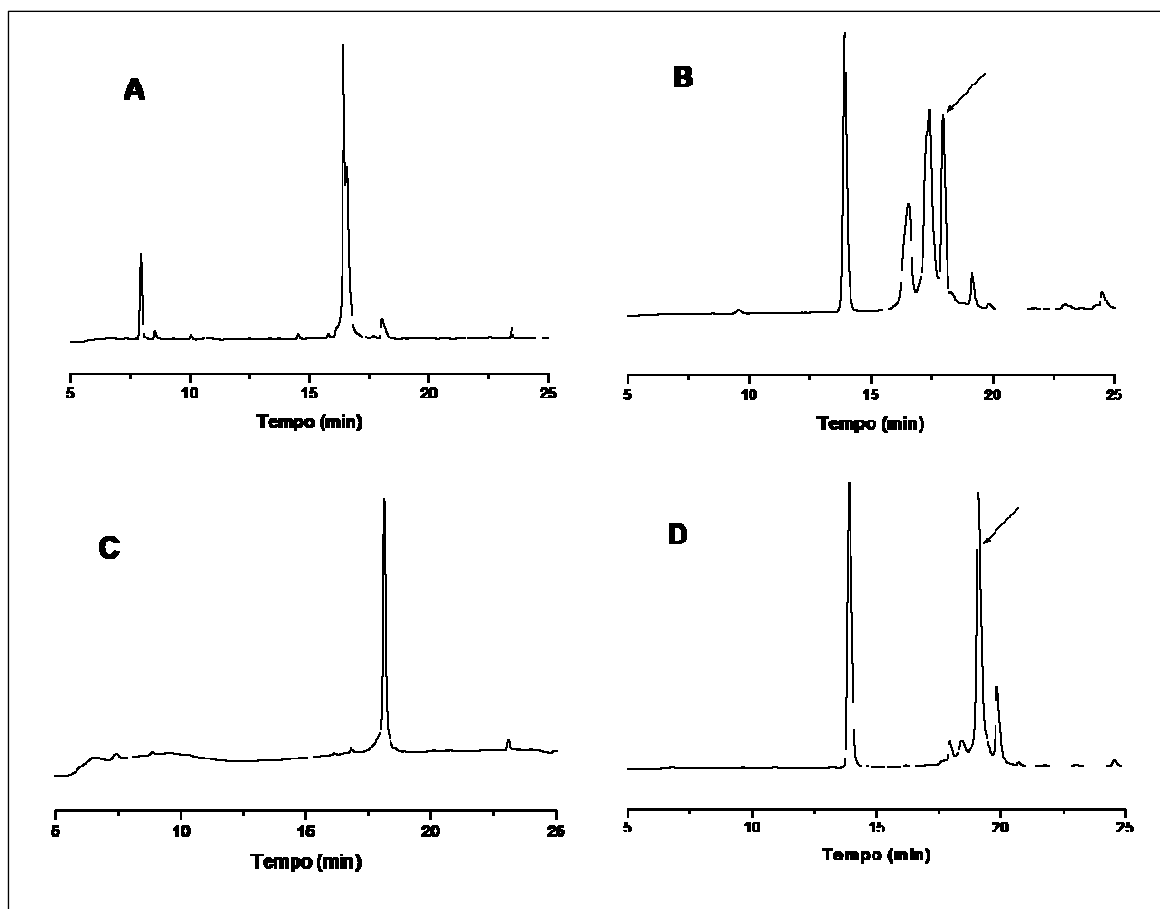


Figura 28: Cromatogramas da reação de marcação de spin com MTSSL. Em **A)** o análogo $[\text{Cys}^{35}\text{MTSSL-TOAC}^0]\text{N-t(DH)}$ após as três etapas de purificação; **B)** $[\text{Cys}^{35}\text{MTSSL-TOAC}^0]\text{N-t(DH)}$ após a reação de marcação de spin com MTSSL. O pico de maior intensidade indica o marcador de spin MTSSL livre. **C)** $[\text{Cys}^{12-35}\text{MTSSL}]\text{N-t(DH)}$ após as três etapas de purificação e **D)** $[\text{Cys}^{12-35}\text{MTSSL}]\text{N-t(DH)}$ após a reação de marcação de spin com MTSSL. O primeiro pico é o marcador de spin MTSSL livre. Gradiente: 5 a 95% de solvente B em 30 minutos. Na figura estão representadas as corridas de 5 a 25 minutos para melhor visualização. A seta indica o material de interesse por meio da espectrometria de massas.

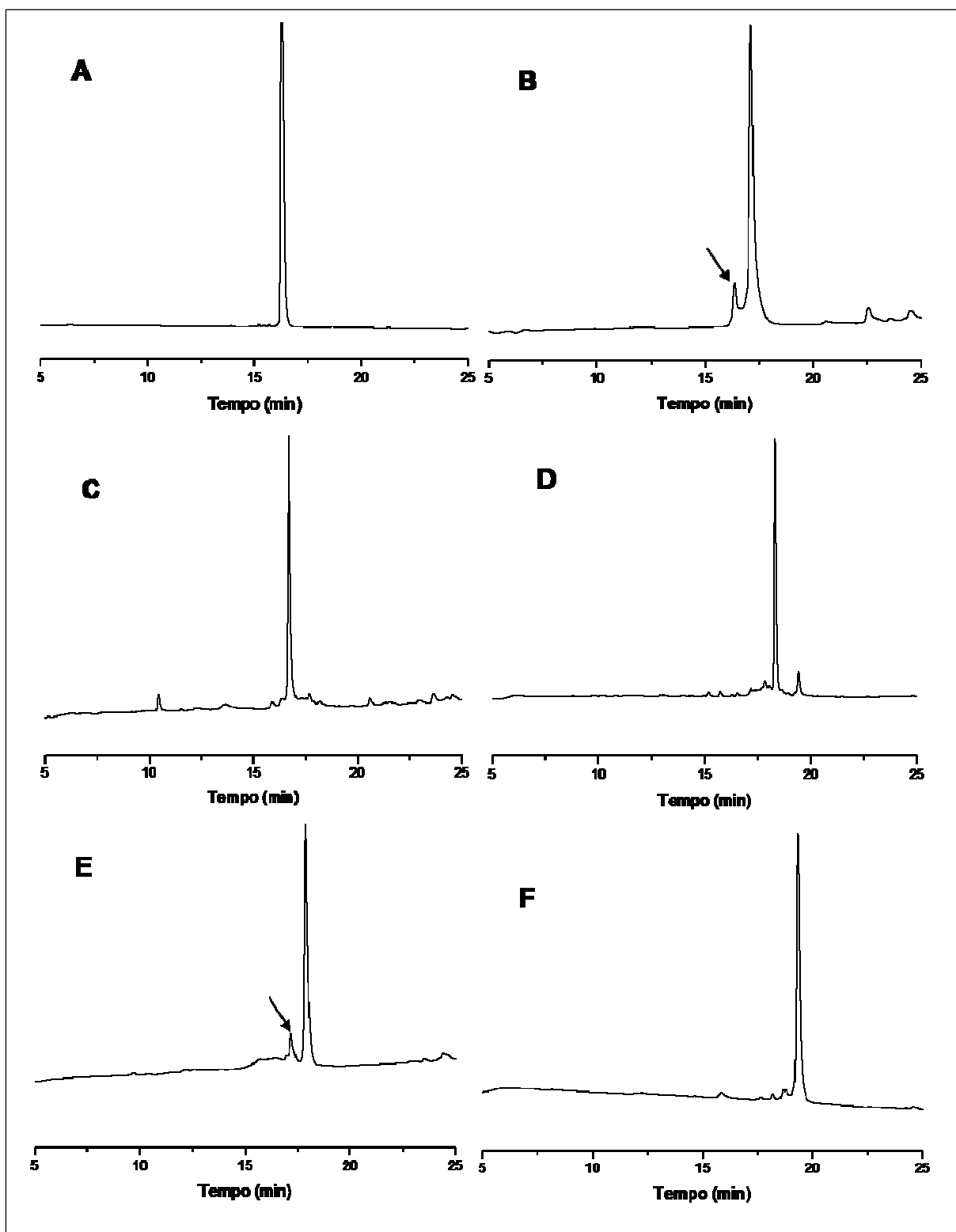


Figura 29: Cromatogramas dos peptídeos puros. A) N-t(DH), **B)** $[\text{TOAC}^0]\text{N-t(DH)}$, **C)** $[\text{TOAC}^{20}]\text{N-t(DH)}$, **D)** $[\text{TOAC}^{12}]\text{N-t(DH)}$, **E)** $[\text{Cys}^{35}\text{MTSSL-TOAC}^0]\text{N-t(DH)}$ e **F)** $[\text{Cys}^{12-35}\text{MTSSL}]\text{N-t(DH)}$. Gradiente: 5 a 95% de solvente B em 30 minutos. Na figura estão representadas escalas de tempo de 5 a 25 minutos para melhor visualização. A seta indica o material não-revertido, identificado por meio da espectrometria de massas.

Resultados e Discussão

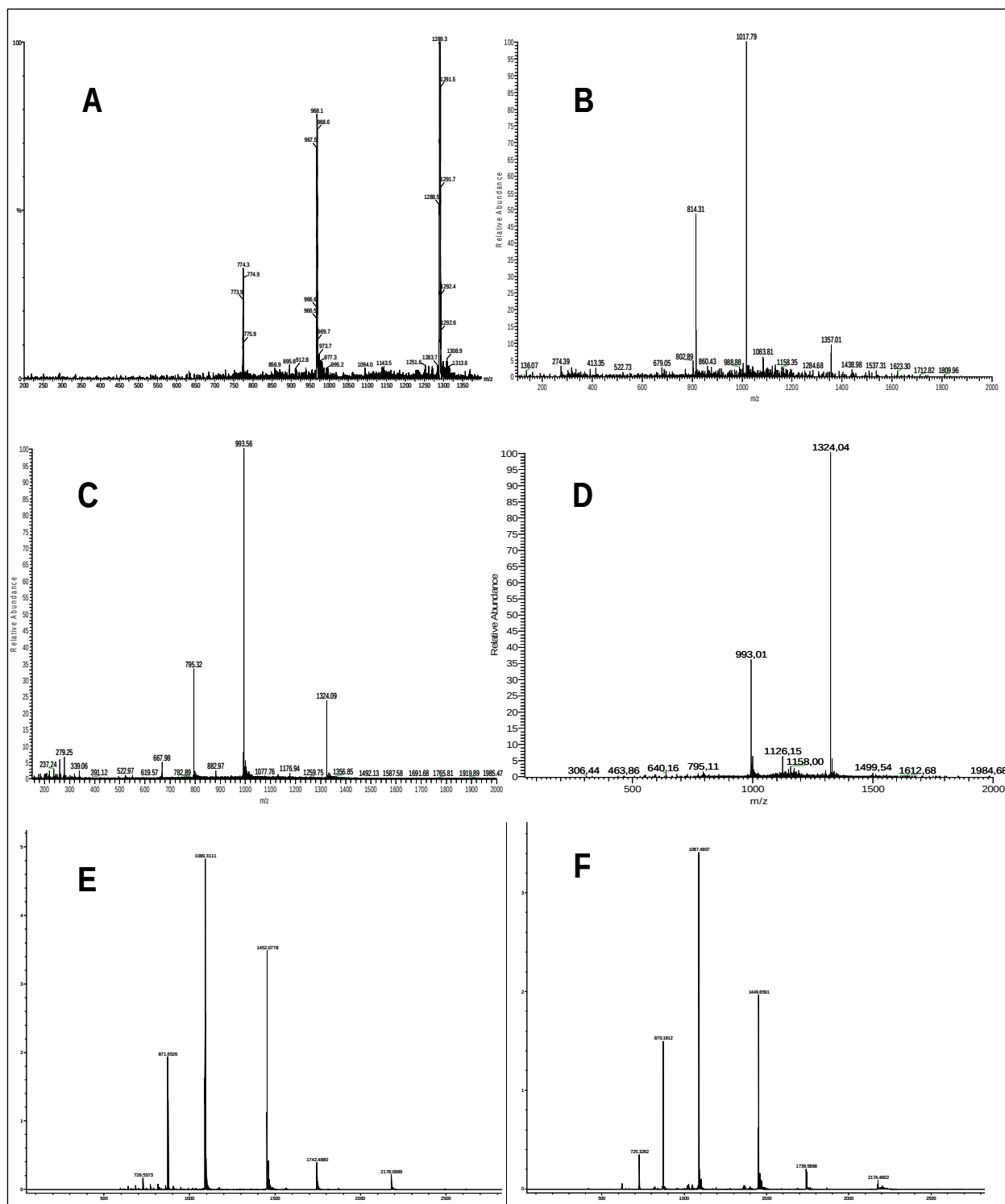


Figura 30: Espectros de massas dos peptídeos puros. A) N-t(DH): $z = 3$ (razão massa/carga teórica de $1290,7 \text{ g mol}^{-1}$), $z = 4$ (razão massa/carga teórica de $968,3 \text{ g mol}^{-1}$) e $z = 5$ (razão massa/carga teórica de $774,9 \text{ g mol}^{-1}$); **B)** $[\text{TOAC}^0]\text{N-t(DH)}$: $z = 4$ (razão massa/carga teórica de $1017,7 \text{ g mol}^{-1}$) e $z = 5$ (razão massa/carga teórica de $814,32 \text{ g mol}^{-1}$). **C)** $[\text{TOAC}^{20}]\text{N-t(DH)}$ e **D)** $[\text{TOAC}^{12}]\text{N-t(DH)}$: $z = 3$ (razão massa/carga teórica de $1324,2 \text{ g mol}^{-1}$) e $z = 4$ (razão massa/carga teórica de $993,4 \text{ g mol}^{-1}$); **E)** $[\text{Cys}^{35}\text{MTSSL-TOAC}^0]\text{N-t(DH)}$: $z = 3$ (razão massa/carga teórica de 1452 g mol^{-1}), $z = 4$ (razão massa/carga teórica de $1089,3 \text{ g mol}^{-1}$) e $z = 5$ (razão massa/carga teórica de $871,6 \text{ g mol}^{-1}$) e **F)** $[\text{Cys}^{12-35}\text{MTSSL}]\text{N-t(DH)}$: $z = 3$ (razão massa/carga teórica de $1449,8 \text{ g mol}^{-1}$), $z = 4$ (razão massa/carga teórica de $1087,5 \text{ g mol}^{-1}$) e $z = 5$ (razão massa/carga teórica de $870,2 \text{ g mol}^{-1}$).

4.4 FLUORESCÊNCIA

4.4.1 INTERAÇÃO DO PEPTÍDEO N-t(DH) COM MICELAS

A fim de avaliarmos se o peptídeo N-t(DH) interage com a membrana, como descrito na literatura, estudamos a interação deste peptídeo com micelas de LPC. Neste sentido, uma solução de peptídeo de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi titulada com este surfactante em pH 7,4. Os resultados obtidos das titulações encontram-se na figura 31.

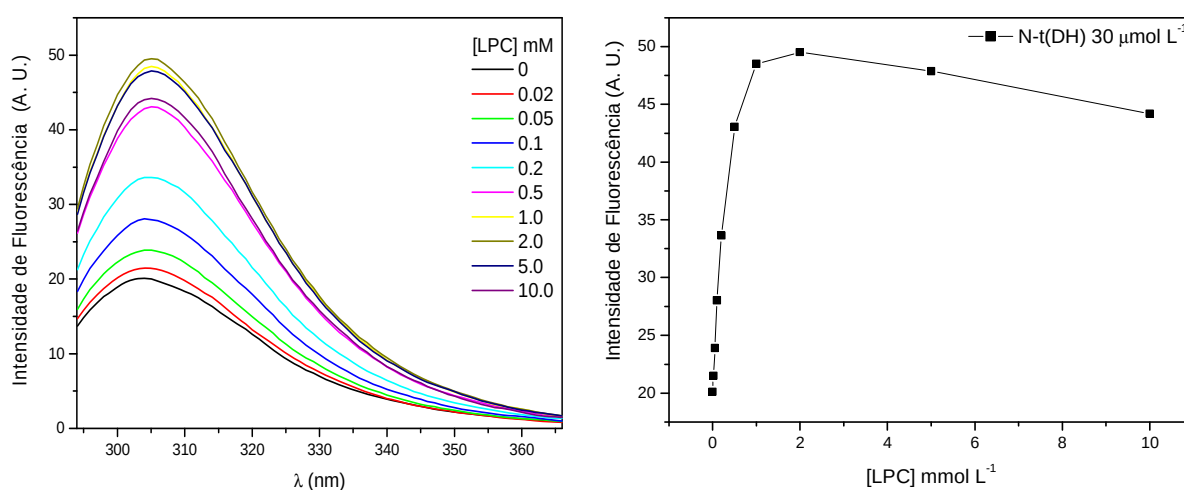


Figura 31: Espectros de fluorescência do peptídeo N-t(DH) em diferentes concentrações de LPC. À direita, observa-se o gráfico de variação da intensidade de fluorescência máxima do peptídeo N-t(DH), nas diferentes concentrações de LPC.

De acordo com os espectros obtidos acima, à medida que se adicionou o surfactante ao peptídeo, notou-se que houve um aumento gradual da intensidade de emissão da fluorescência da tirosina até atingir a concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de LPC, ficando praticamente constante nas maiores concentrações estudadas. Se considerarmos o número de agregação moléculas de LPC para a formação de uma micela de 139^{81} e que a sua concentração micelar crítica está em torno de $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ para o maior raio de Stokes apresentado por este surfactante,⁸² a emissão de fluorescência do peptídeo se estabilizou numa concentração 20 vezes maior do que a CMC do LPC. A razão peptídeo/surfactante para que ocorresse uma interação ótima

Resultados e Discussão

do peptídeo com a micela foi, portanto, de uma molécula de peptídeo para aproximadamente 33 moléculas de LPC.

O aumento de fluorescência gradual obtida na titulação e a estabilização da fluorescência quando adicionadas concentrações maiores de LPC indicaram que todos os peptídeos interagiram com o sistema micelar. Este incremento na emissão da fluorescência é resultado da mudança de ambiente do fluoróforo, de um meio aquoso/polar para um hidrofóbico/apolar, o qual é devido às menores interações polares sofridas pelo fluoróforo com as moléculas que o circundam. Neste caso, quando o fluoróforo absorve os fótons e passa para um estado excitado de energia, há uma mudança no momento dipolo do mesmo, o qual induz uma alteração também nos momentos dipolares das moléculas que estão circundando-o. Como somente moléculas polares possuem momento dipolar, a emissão de fluorescência pelo fluoróforo sofre uma maior interferência pela troca de energia com estas moléculas polares, diminuindo a energia que seria liberada devido a esta interação entre eles. Desta forma, quando há a migração para um meio polar para outro apolar, as trocas de energia com o fluoróforo são bem menores, o que possibilita uma maior emissão de fluorescência.

Para confirmar se o peptídeo N-t(DH) realmente interage com os modelos de membrana estudados, foram feitos estudos de supressão de fluorescência utilizando a acrilamida. Este composto colide com a tirosina, ocorrendo a supressão de sua fluorescência. Neste estudo, foi utilizado o peptídeo em solução tampão e na presença de miméticos de membrana, determinando-se a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) - figuras 32 e 33. A constante encontrada para o peptídeo em solução foi de 28,2 L mol⁻¹ (figura 32), o que significa que a fluorescência da tirosina foi suprimida à medida que titulou-se a acrilamida ao sistema, obtendo-se um valor relativamente alto de K_{sv} . Altos valores de K_{sv} indicam alta exposição do fluoróforo ao solvente.

Após este estudo, realizou-se o estudo de supressão de fluorescência titulando a solução final do peptídeo titulado com LPC, na concentração de 10 mmol L⁻¹. O valor de K_{sv} obtido para o peptídeo em LPC foi de 11,9 L mol⁻¹, muito menor que o do peptídeo em solução (28,2 L mol⁻¹), o que confirma a interação do peptídeo com este meio que simula o ambiente da membrana (figura 33).

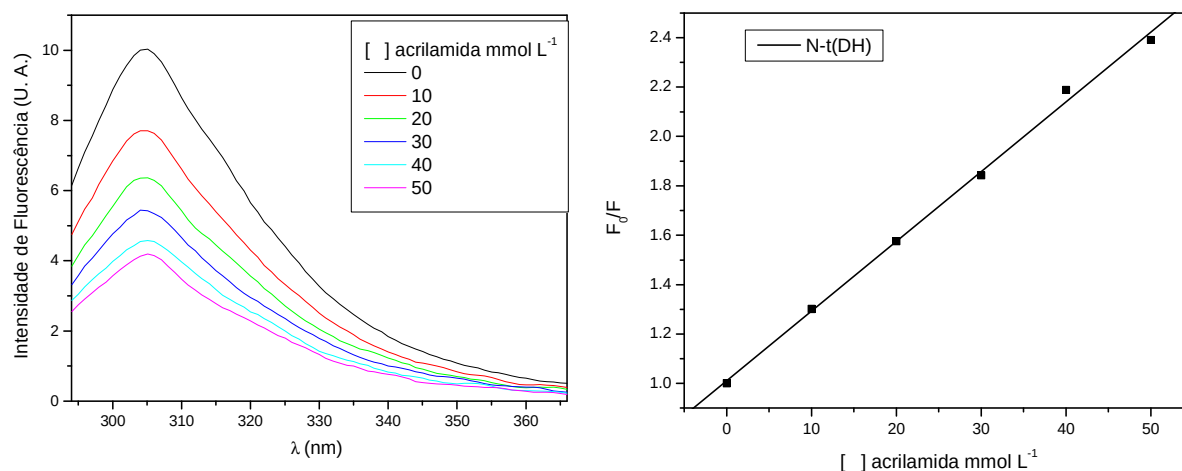


Figura 32: Espectros de fluorescência do peptídeo N-t(DH) em solução a $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, em diferentes concentrações de acrilamida. À direita, o gráfico mostra a variação da razão de emissão de fluorescência inicial sobre a fluorescência máxima (F_0/F) obtida para o peptídeo N-t(DH) em solução, nas diferentes concentrações de acrilamida.

Quanto menor este valor, mais difícil é a colisão da acrilamida com o fluoróforo, indicando que o peptídeo está imerso na micela, dificultando assim a acessibilidade deste supressor à tirosina. A acrilamida, que possui característica polar, não consegue penetrar no mimético de membrana.

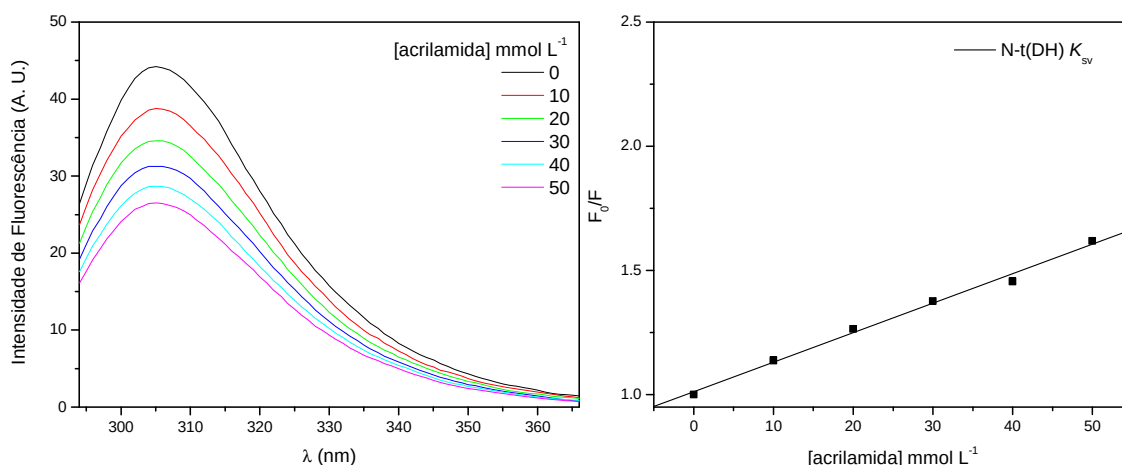


Figura 33: Espectros de fluorescência do peptídeo N-t(DH) em LPC, em diferentes concentrações de acrilamida, à esquerda. À direita, gráfico que mostra a variação da razão de emissão de fluorescência inicial sobre a fluorescência máxima (F_0/F) obtida para o peptídeo N-t(DH) em solução, nas diferentes concentrações de acrilamida.

4.4.2 INTERAÇÃO DO PEPTÍDEO N-t(DH) COM VESÍCULAS

Para comprovar os resultados acima e comprovar a interação do peptídeo com a membrana, outro sistema mimético foi utilizado. Neste novo experimento foram feitos estudos utilizando um mimético mais semelhante com as membranas naturais: as vesículas ou lipossomas. O lipídio usado para a confecção das vesículas foi o DPPC, seguindo a metodologia anteriormente descrita. Os espectros de emissão de fluorescência obtidos quando o peptídeo foi titulado com vesículas de DPPC estão apresentados na figura 34.

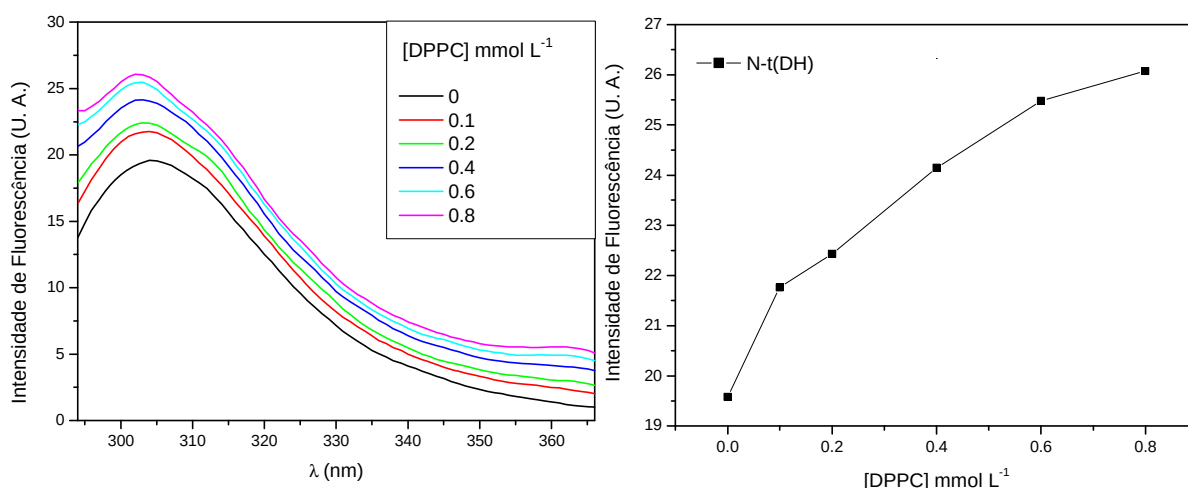


Figura 34: Espectros de fluorescência do peptídeo N-t(DH) a 30 μmol L⁻¹ em concentrações diferentes de vesículas. À direita, gráfico da variação da intensidade de fluorescência do peptídeo N-t(DH) em vesículas nas diferentes concentrações.

Pelos dados apresentados, observou-se novamente um aumento da intensidade de fluorescência emitida pela tirosina quando da adição do mimético de membrana, o que se pode concluir que o peptídeo também está interagindo com este sistema lipídico. Porém, a menor variação dos valores de intensidade de fluorescência máxima obtidas, quando comparado ao LPC, indicam uma menor interação com este mimético de membrana. No entanto, o valor de K_{sv} obtido de 12,0 mol L⁻¹ no estudo de supressão de fluorescência pela acrilamida (figura 35) foi o mesmo encontrado em micelas (figura 36), indicando mesma interação com o mimético de membranas. Desta forma, os resultados encontrados indicaram que o peptídeo interage nos dois sistemas miméticos estudados; no entanto, os dados não permitiram uma avaliação comparativa quantitativa desta interação.

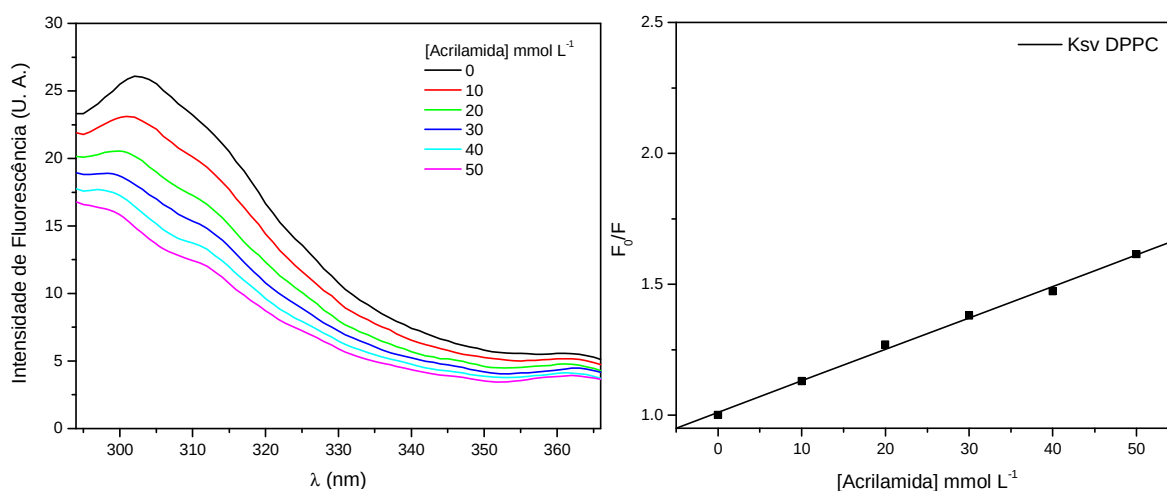


Figura 35: Espectros de fluorescência do peptídeo N-t(DH) a $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em vesículas na concentração de $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$, em diferentes concentrações de acrilamida. À direita, gráfico da variação da razão de emissão de fluorescência inicial sobre a fluorescência máxima (F_0/F) obtida para o peptídeo N-t(DH) em vesículas nas diferentes concentrações de acrilamida.

A fim de fazer uma discussão geral dos dados, a figura 36 apresenta os gráficos do conjunto de K_{sv} calculados de todos os sistemas de miméticos de membrana estudados nos estudos de supressão por acrilamida.

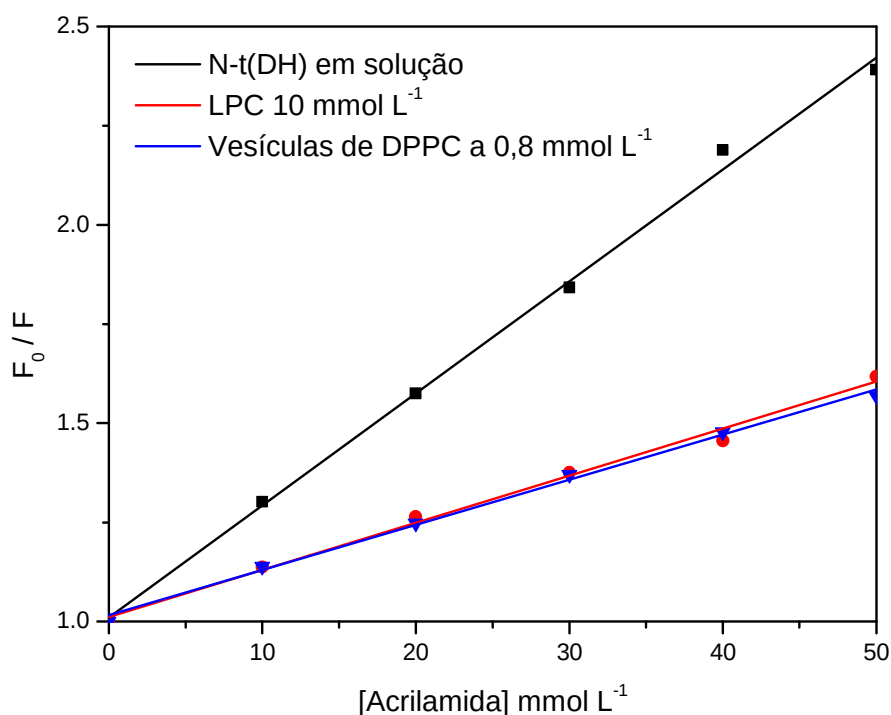


Figura 36: Variações da razão de emissão de fluorescência inicial sobre a fluorescência máxima (F_0/F) obtida para o peptídeo N-t(DH) em solução, em micelas de LPC e em vesículas de DPPC, em diferentes concentrações de acrilamida.

Quando o valor de K_{SV} para o peptídeo livre em solução aquosa ($28,2 \text{ L mol}^{-1}$) é comparado aos valores obtidos após a adição dos miméticos de membrana, pode-se notar que há uma diminuição neste valor ($11,9 \text{ L mol}^{-1}$ para as micelas de LPC e $12,0 \text{ L mol}^{-1}$ para as vesículas de DPPC). Este fato sugere que o peptídeo está interagindo com os miméticos de membrana estudados e que, além disso, a região da tirosina na posição 6 na primeira hélice está imersa nas micelas e nas vesículas estudadas. Estes dados corroboram os dados descritos na literatura que esta região da proteína está imersa na membrana da mitocôndria.

Para obtermos dados mais detalhados da interação do peptídeo com a membrana e avaliarmos o comportamento do peptídeo frente a diferentes tipos de lipídios foram realizados em sequência estudos com monocamadas de Langmuir constituídas de lipídios de diferentes naturezas.

4.5 MONOCAMADAS DE LANGMUIR

4.5.1 ADSORÇÃO DO N-t(DH) EM INTERFACE ÁGUA-AR

As cinéticas de adsorção do peptídeo sem marcador foram primeiramente estudadas na interface água-ar em diferentes concentrações. A figura 37A mostra que em 20 nmol L^{-1} de peptídeo a mudança na pressão de superfície do sistema é praticamente nula mas, a 50 nmol L^{-1} , o peptídeo adsorve na interface água-ar, promovendo um aumento na pressão de superfície de 15 mN m^{-1} , fato que lhe confere uma atividade superficial intrínseca, possuindo naturalmente afinidade por meios hidrofóbicos. Este resultado está de acordo com a possibilidade deste microdomínio estar imerso na membrana e com os dados obtidos nos estudos de fluorescência. Depois da adsorção do peptídeo na interface, a monocamada de Gibbs foi comprimida e os resultados estão representados na figura 37B. A abscissa nesta figura é expressa em termos da área da cuba, já que definir área por mol neste caso não é conveniente, pois ocorre um equilíbrio entre moléculas adsorvidas e não adsorvidas. A pressão de colapso obtida foi de aproximadamente 25 mN m^{-1} . Este valor foi encontrado para ambas as concentrações peptídicas, sugerindo que a mesma quantidade desta biomolécula estava na interface antes do colapso das monocamadas.

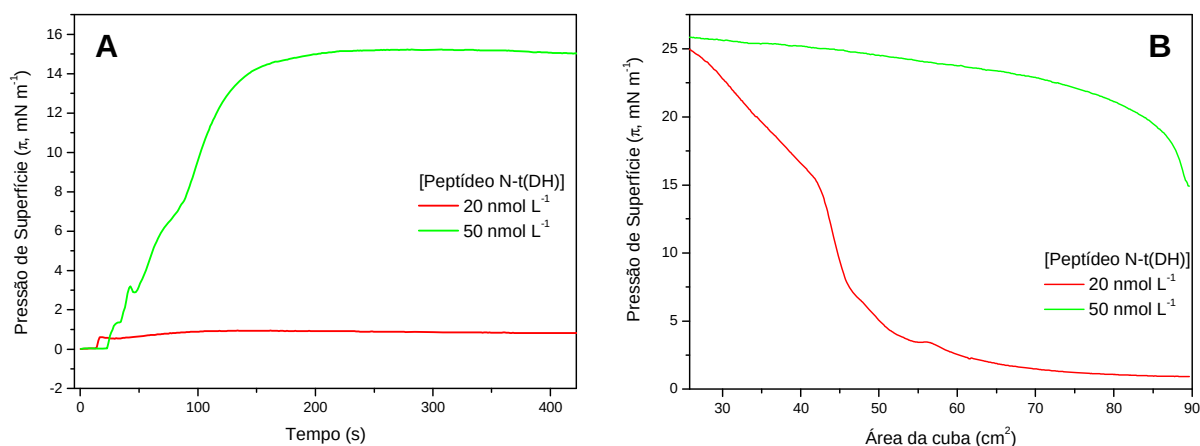


Figura 37: Cinéticas de adsorção (A) e curvas de pressão de superfície das isotermas (B) para o peptídeo N-t(DH) em diferentes concentrações, na interface água-ar.

4.5.2 INTERAÇÃO ENTRE O PEPTÍDEO N-t(DH) E MODELOS DE MEMBRANA

A interação entre o peptídeo e cada componente majoritário da membrana interna da mitocôndria foi estudada separadamente, com o intuito de investigar o efeito individual de cada lipídio. De acordo com Daum⁷⁴ e Krebs e colaboradores,⁷⁵ a membrana interna da mitocôndria, na maioria dos mamíferos, possui a seguinte composição lipídica média: 14 - 23% de cardiolipina, 32 - 39% de fosfatidiletanolamina, 38 - 45% de fosfatidilcolina e 2 - 7% de fosfatidilinositol. Assim, baseado nesta constituição, os lipídios cardiolipina, DPPC e DPPE foram investigados devido à maior constituição nesta membrana.

4.5.2.1 INTERAÇÃO ENTRE O PEPTÍDEO N-t(DH) E CARDIOLIPINA

Após a formação da monocamada, a solução peptídica foi injetada na subfase e as cinéticas de adsorção foram medidas para três concentrações diferentes, não se observando tempo de indução (figura 38A) para nenhuma destas concentrações. O tempo de indução corresponde à etapa difusiva do peptídeo até atingir a interface.

Resultados e Discussão

No caso do peptídeo N-t(DH), este dado indicou que a adsorção do peptídeo ocorre de forma quase que instantânea nas monocamadas. Porém, a pressão de superfície obtida foi concentração dependente, para as concentrações de 20 nmol L⁻¹ e 50 nmol L⁻¹ a variação de pressão foi praticamente a mesma. Extrapolando o tempo até 2.500 s nas curvas de cinética (dado não mostrado), a pressão de superfície alcança aproximadamente 8 mN m⁻¹ para o peptídeo de concentração de 20 nmol L⁻¹, valor igual ao da concentração de 50 nmol L⁻¹.

A figura 38B traz as curvas de pressão de superfície *versus* área molecular para o lipídio cardiolipina em tampão e na presença do peptídeo. A curva para o lipídio puro está de acordo com o descrito na literatura.⁸³ Com a adição do peptídeo, foi possível observar um colapso em valores menores de área superficial. Este fato pode ter ocorrido devido à agregação das moléculas na interface devido à compressão, micelização ou expulsão de algumas moléculas lipídicas da interface.

As isotermas π -A para a cardiolipina em presença do peptídeo são interessantes, já que se pode notar o aparecimento de um plateau em aproximadamente 27 mN m⁻¹ nas três concentrações estudadas, fato que não existe para uma isoterma de cardiolipina pura. Este plateau mostrou diferentes extensões, dependendo da concentração do peptídeo usada: para 10 nmol L⁻¹, ele começou a ocorrer em aproximadamente 125 Å²/molécula e terminou próximo de 75 Å²/molécula.

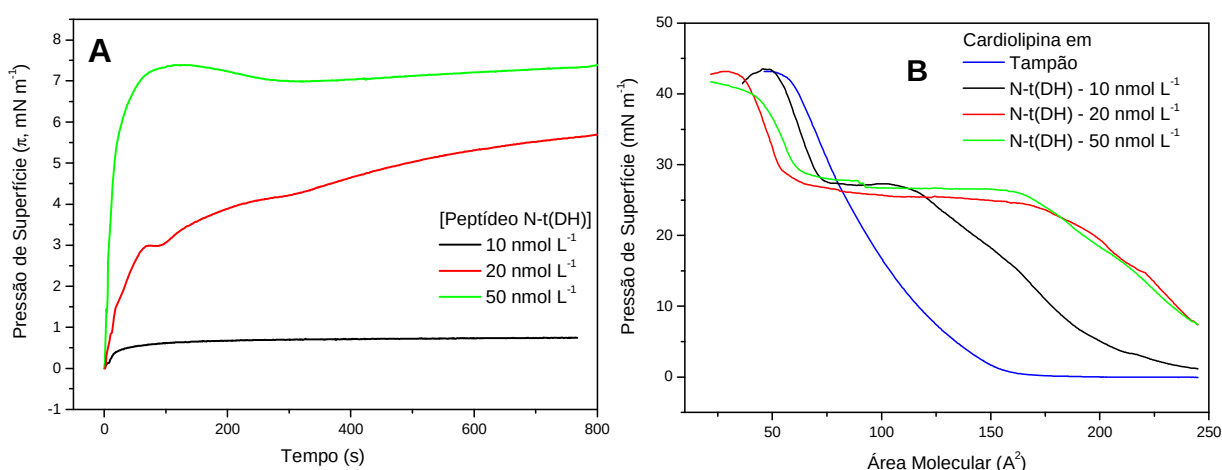


Figura 38: Cinéticas de adsorção (A) e curvas de pressão de superfície das isotermas (B) para a cardiolipina, exibindo o comportamento do peptídeo em diferentes concentrações.

Resultados e Discussão

Para 20 nmol L⁻¹, o plateau é muito maior, iniciou-se em 175 A²/molécula e terminou em 50 A²/molécula. Resultado similar foi obtido para o peptídeo a 50 nmol L⁻¹, sugerindo uma saturação do peptídeo na interface lipídica.

A constância da pressão de superfície com a compressão da monocamada é comum para alguns filmes lipídicos, como DPPC,⁸⁴ DPPG,⁸⁵ e DMPA.⁸⁶ Muitos estudos sobre este plateau demonstraram que ele estava relacionado com uma região na qual o lipídio na fase de líquido-expandido (LE) coexiste com lipídios na fase de líquido-condensado (LC), durante a compressão. Isto significa que este plateau pode ter demarcado o começo e o fim da transição LE-LC do sistema. É importante esclarecer também que muitas transições de fase ocorrem sem a coexistência de fases; assim, este plateau não é observado para estes casos. É sabido da literatura que estas transições podem ser influenciadas pela temperatura,⁸⁷ força iônica e adição de algumas moléculas nesta subfase.⁸⁸

Neste caso, acredita-se que este plateau está relacionado à mudança conformacional ou de posição do peptídeo. Esta interpretação foi também utilizada para a gramicidina A, onde os autores atribuíram o plateau obtido à mudança estrutural do peptídeo de uma estrutura desordenada para uma folha- β entrelaçada.^{89,90} Em outro trabalho, Ruiz-Garcia e colaboradores⁹¹ verificaram que apolipoproteínas humanas CI e monocamadas AII exibiram uma transição de primeira ordem quando em valores de pressão de superfície altos (acima de 30 mN m⁻¹). Usando imagens de microscopia de força atômica e difração de raios-X, os autores concluíram que esta transição correspondeu a uma mudança de fase, passando de uma desordem bidimensional para uma fase contendo um estado mais ordenado. Os autores também concluíram que, entre os dois motivos anfipáticos da molécula, um estava confinado na interface e o outro estava inclinado para a direção do meio hidrofóbico (ar).

Para misturas de sistemas lipídio-peptídicos, Nakahara e colaboradores⁹² estudaram a interação do peptídeo antimicrobiano Hel 13-5 com monocamadas de DPPC. As isotermas π -A para a mistura destes sistemas mostraram uma curva com dois pontos: o primeiro, a uma baixa pressão superficial (próximo de 15 mN m⁻¹), foi atribuído à uma transição LE-LC de primeira ordem e o segundo, a 45 mN m⁻¹, foi atribuído ao colapso estrutural do peptídeo. Outro estudo, onde as propriedades superficiais do neuropeptídeo Y (NPY) foram averiguadas, revelaram que as suas isotermas

Resultados e Discussão

π -A apresentaram um plateau em 12 mN m^{-1} , o qual o autor atribuiu ao colapso da camada associada à superfície das hélices neste valor específico de pressão.⁹³

Assim, de acordo com a literatura, existem muitas possibilidades para explicar a presença do plateau observado na figura 38B, tais como mudanças na orientação do peptídeo, estrutura secundária ou a sua expulsão da interface por meio da compressão.

4.5.2.2 INTERAÇÃO ENTRE O PEPTÍDEO N-t(DH) E DPPC

Observando o gráfico das cinéticas de absorção para o lipídio DPPC, observou-se um pronunciado tempo de indução para a concentração de 50 nmol L^{-1} (figura 39A). Este tempo de indução não é encontrado para concentrações peptídicas menores, sugerindo que o peptídeo pode estar agregado em solução, sendo que o caráter anfipático do DPPC ou uma monocamada mais estruturada pode estar dificultando sua adsorção. Isto não foi observado para a cardiolipina, provavelmente devido ao caráter mais fluido desta monocamada.

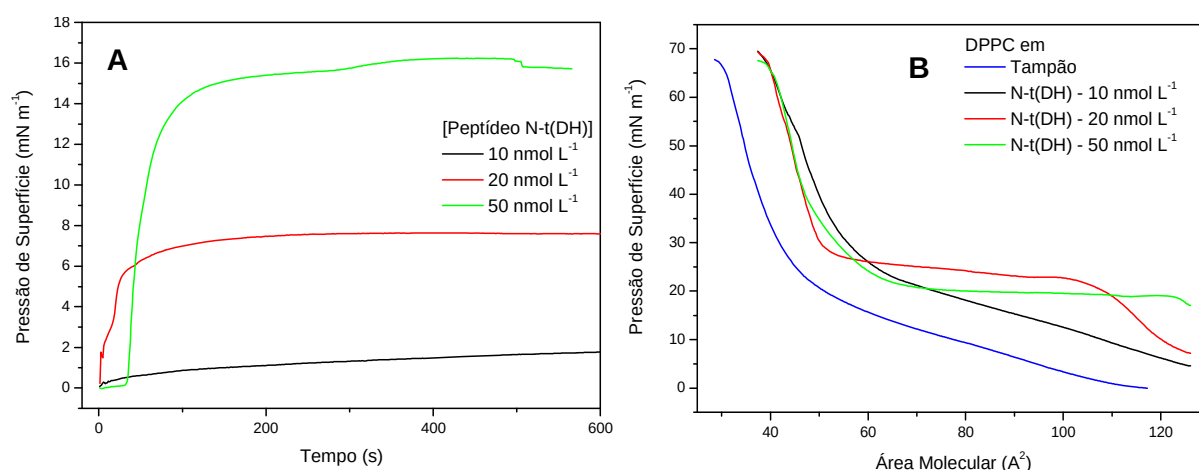


Figura 39: Cinéticas de adsorção (A) e curvas de pressão de superfície das isotermas (B) para o DPPC, exibindo o comportamento do peptídeo em diferentes concentrações.

As isotermas π -A para o peptídeo N-t(DH) em DPPC (figura 39B) mostraram que a presença do peptídeo induz um deslocamento para maiores valores de pressão, na mesma área molecular do lipídio. No entanto, para a concentração de 10 nmol L^{-1} , somente discretas mudanças no formato da curva foram visualizadas. Para

maiores concentrações de peptídeo, 20 e 50 nmol L⁻¹, um plateau foi observado, aumentando com o incremento da concentração peptídica utilizada. Diferentemente do observado para o peptídeo em cardiolipina, o colapso das monocamadas de DPPC na presença de peptídeo ocorreu em maiores áreas moleculares. Isto indica que o peptídeo ainda estava incorporado na monocamada lipídica quando do colapso da monocamada, mostrando uma alta afinidade do peptídeo por este lipídio.

4.5.2.3 INTERAÇÃO ENTRE O PEPTÍDEO N-t(DH) E DPPE

A interação do peptídeo com o DPPE também foi avaliada em termos de suas cinéticas de adsorção. As curvas de cinética do peptídeo N-t(DH) em DPPE podem ser observadas na figura 40A. Os resultados indicaram que, em concentrações acima de 10 nmol L⁻¹, o peptídeo possui uma atividade superficial mais pronunciada para este lipídio, quando comparada com DPPC e cardiolipina, em maiores variações de pressão superficial. A concentração máxima de peptídeo estudada neste lipídio foi de 30 nmol L⁻¹, menor que as outras concentrações usadas anteriormente. Isto foi devido justamente à intensa atividade superficial apresentada neste sistema, que causou grande mudança nos valores de pressão superficial. Assim, esta concentração pode ser considerada apropriada para comparações com as maiores concentrações de peptídeos nos outros lipídios estudados.

Nas isotermas de pressão de superfície (figura 40B) observou-se que o peptídeo não afetou o colapso quando comparado ao lipídio puro, indicando a expulsão total do peptídeo da monocamada. No entanto, o mesmo plateau observado para cardiolipina e DPPC foi observado, mas em maiores valores de pressão de superfície.

Tomados em conjunto, os resultados da interação entre o peptídeo N-t(DH) e as monocamadas dos lipídios estudados podem ser assim sumarizados:

- 1) O peptídeo interage com todas as monocamadas estudadas, induzindo uma expansão da monocamada em todos os casos, particularmente para a fosfatidiletanolamina. A adsorção na monocamada foi mais eficiente para o lipídio contendo fosfatidiletanolamina, em comparação com a fosfatidilcolina e a cardiolipina.
-

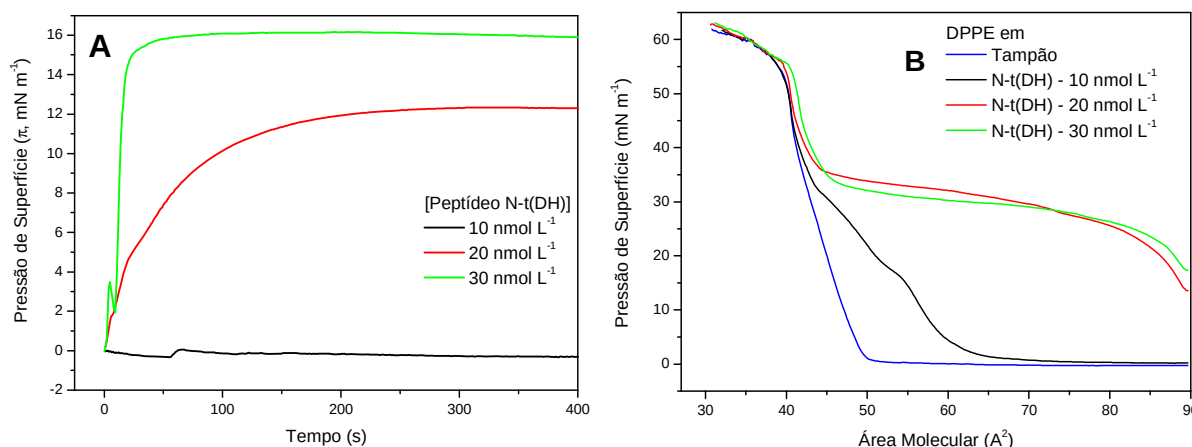


Figura 40: Cinéticas de adsorção (A) e curvas de pressão de superfície das isotermas (B) para o DPPE, exibindo o comportamento do peptídeo em diferentes concentrações.

- 2) A expansão aumentou com a concentração peptídica. O comportamento do peptídeo a altas pressões de superfícies ($> 30 \text{ mN m}^{-2}$), valor próximo ao encontrado nas membranas biológicas, foi diferente para cada lipídio. Para o DPPE, as moléculas peptídicas foram expelidas da interface, enquanto que para o DPPC elas continuaram incorporadas na monocamada quando ocorreu o colapso desta monocamada. Para a CL, o colapso da monocamada ocorreu em diferentes áreas, menores que aquelas obtidas para a curva da CL pura, o que é incomum para monocamadas. Isto pode ter sido causado pela agregação das moléculas na interface devido à compressão, micelização ou expulsão de algumas moléculas lipídicas da interface. Além disso, sabe-se que nas cristas mitocondriais existem "clusters" com alta concentração de cardiolipina, onde esta molécula se agrega, formando a curvatura característica desta região da membrana mitocondrial.⁹⁴ Este fato também pode explicar, aliado à interação do peptídeo, as menores áreas de colapso da monocamada de CL.

4.5.2.4 COMPRESSIBILIDADE

Os dados de compressibilidade corroboraram os resultados acima. Estes dados foram obtidos calculando-se a primeira derivada das curvas de isotermas de pressão de superfície. Portanto, é uma maneira diferente de interpretar as informações obti-

Resultados e Discussão

dos nas isotermas, olhando a interação do peptídeo com as monocamadas por outro ângulo.

Pela figura 41A, evidenciou-se no lipídio cardiolipina menores valores de pressão superficial, o que indica uma maior fluidez neste tipo de monocamada. Este resultado pode explicar o motivo das menores áreas de colapso alcançadas na presença do peptídeo, em comparação com a curva de isoterma contendo somente a cardiolipina. Pode-se sugerir, devido a este fato, que o peptídeo "forçou" um rearranjo nas cadeias acilas da cardiolipina devido à sua fluidez, obtendo-se assim menores áreas no final da curva de isoterma.

No caso do DPPC (figura 41B), notaram-se picos de maior compressibilidade em aproximadamente $45 \text{ \AA}^2$ nas curvas com o peptídeo em relação ao lipídio puro, o que nos indicou que o lipídio apresentou uma compressibilidade numa área maior que o do tampão, corroborando o fato do peptídeo estar adsorvido junto ao lipídio nesse sistema. Além disso, para o DPPC podem-se notar valores de compressibilidade maiores que a cardiolipina e menores que em DPPE, evidenciando uma fluidez intermediária em relação aos outros lipídios estudados.

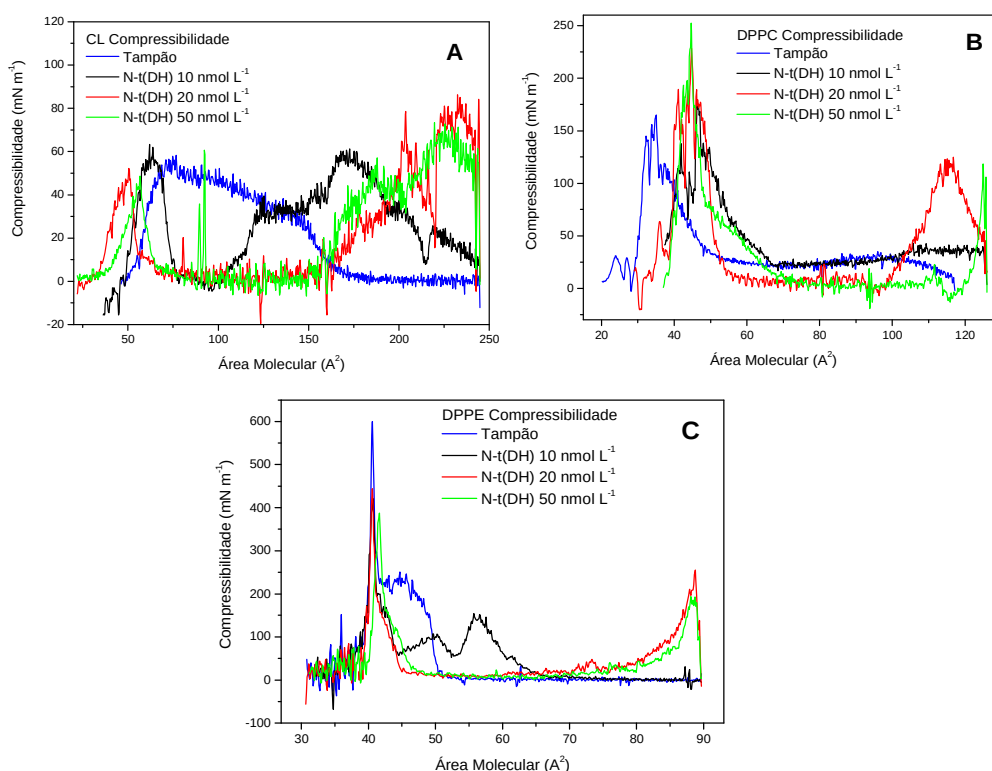


Figura 41: Curvas de compressibilidade para cardiolipina (A), DPPC (B) e DPPE (C), para o peptídeo N-t(DH) em diferentes concentrações.

Resultados e Discussão

Em DPPE (figura 41C), os valores de compressibilidade são muito mais altos quando comparados aos outros, mostrando um alto empacotamento dos lipídios e consequentemente uma baixa fluidez. Esta monocamada possui, em seu ponto máximo de compactação na curva com peptídeo a 50 nmol L^{-1} , valor de compressibilidade em torno de 400 mN m^{-1} – fato que pode explicar o porquê da expulsão do peptídeo na etapa final da isoterma.

4.5.3 ANÁLISES COM PM-IRRAS

Para obtermos dados da dinâmica estrutural do peptídeo quando ocorre a interação com as monocamadas, foram utilizados estudos por espectrofotometria na região do infravermelho. A técnica utilizada foi a PM-IRRAS, que permite obter informações das mudanças estruturais que acontecem na monocamada e no peptídeo durante os ensaios realizados acima. Inicialmente, avaliou-se o sistema contendo apenas o peptídeo, isto é, na interface água/ar - figura 42. Nenhuma banda foi vista claramente na figura 42A para a região dos hidrocarbonetos. Todavia, ao se analisar a figura 42B, é possível observar a presença da banda da amida II em 1560 cm^{-1} , atribuída a uma combinação de estiramentos C–N e deformações angulares ou "bendings" no plano das ligações N–H, além da banda da amida I entre $1600\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$ atribuída principalmente às vibrações de estiramento de ligações C=O.⁹⁵

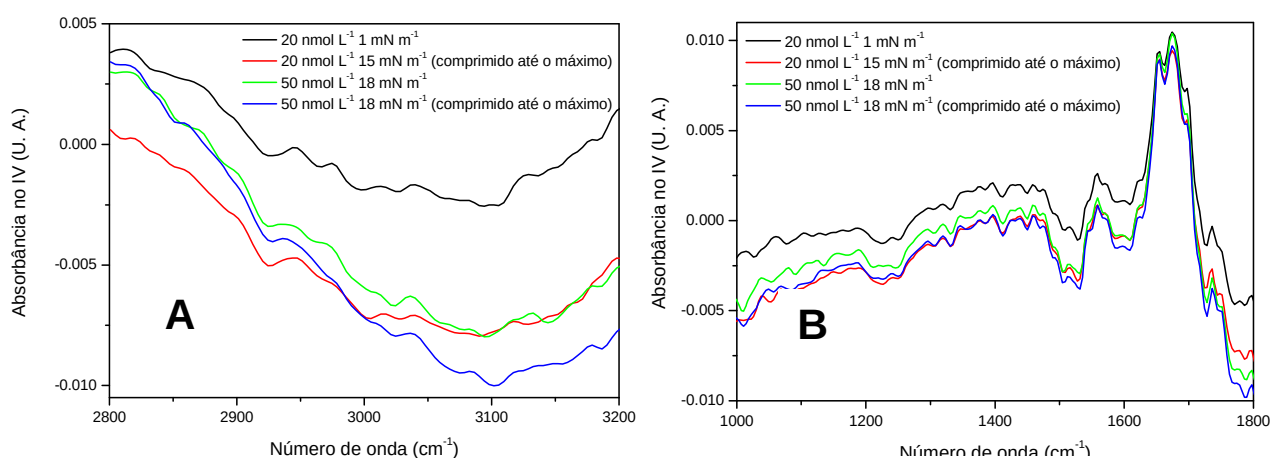


Figura 42: Espectro de PM-IRRAS para o peptídeo N-t(DH) em solução tampão entre 2800 a 3200 cm^{-1} (A) e entre 1000 a 1800 cm^{-1} (B).

Esta última vibração é constituída por duas bandas parcialmente sobrepostas, com seus máximos de absorção centrados em 1653 e 1670 cm^{-1} . Isto mostra que o peptídeo possui uma mistura de duas estruturas secundárias na interface: em α -hélice (indicada pela banda em 1670 cm^{-1}) e randômica ou aleatória (indicada pela banda em 1653 cm^{-1}).

4.5.3.1 CARDIOLIPINA

Na monocamada de cardiolipina em tampão, nenhuma banda foi detectada entre 2800 a 3200 cm^{-1} (dados não mostrados), provavelmente devido ao baixo empacotamento deste lipídio na interface. Este baixo empacotamento foi notado nas isotermas π -A da figura 38B, provavelmente devido à carga elétrica negativa deste lipídio, o que promove repulsão eletrostática entre as moléculas. Além disso, mesmo depois da adsorção do peptídeo, nenhuma banda foi notada no espectro, o que nos leva a crer que o peptídeo não afetou a orientação das cadeias fosfolipídicas. O espectro entre 1000 a 1800 cm^{-1} mostrado na figura 43 apresenta bandas positivas em 1255 cm^{-1} (P=O estiramento antissimétrico) e 1738 cm^{-1} (estiramento C=O de funções éster), e bandas negativas em 1050 - 1200 cm^{-1} e 1600 - 1700 cm^{-1} , as quais são atribuídas a vibrações angulares das ligações OH do éter e água. Estas bandas aparecem devido à reestruturação interfacial das moléculas de água na presença do filme.⁹⁶ Interessante notar que a forma da curva permanece praticamente a mesma depois da absorção do peptídeo e da compressão do filme (figura 43B).

Destes resultados, pode-se inferir que o peptídeo possui pouco ou nenhum efeito no empacotamento ou orientação da CL. Mais que isso, não foi possível verificar mudanças estruturais nos peptídeos adsorvidos na interface do filme, já que nenhuma banda adicional atribuível à estruturação do peptídeo foi detectada.

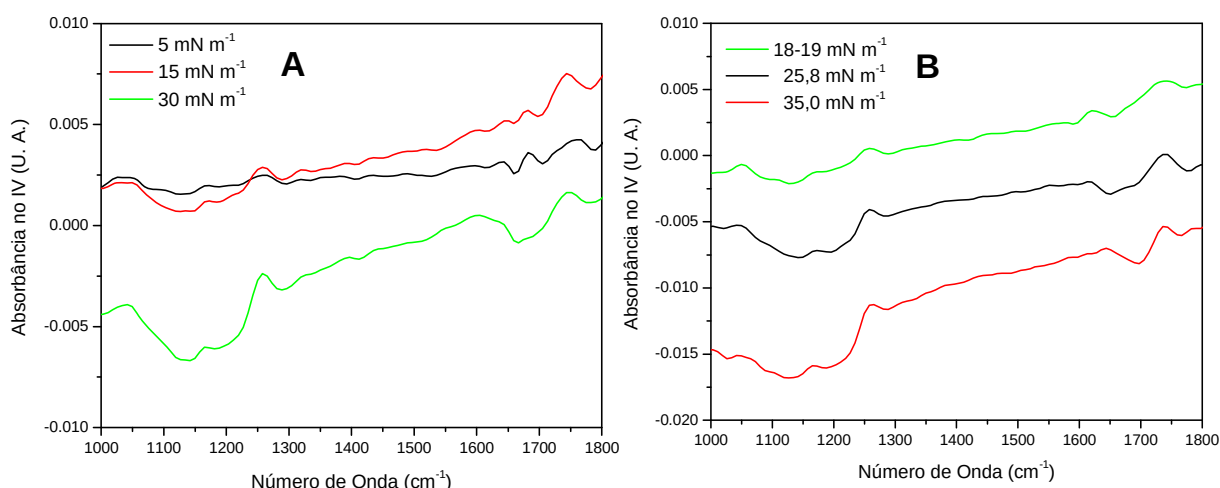


Figura 43: Espectro de PM-IRRAS para cardiolipina em solução tampão (A) e com o peptídeo N-t(DH) incorporado (B), entre 1000 a 1800 cm⁻¹.

4.5.3.2 DPPC

A figura 44 mostra as vibrações simétricas e assimétricas das ligações C–H dos grupos metilênicos das caudas alquilas na monocamada de DPPC, que correspondem as bandas em 2850 e 2915 cm⁻¹, respectivamente. Na região correspondente aos grupamentos das cabeças polares, o espectro da figura 44B está praticamente idêntico ao descrito para a cardiolipina, com as bandas para os grupos fosfato e carbonila como vibrações majoritárias.

Com a inserção do peptídeo N-t(DH), ambos os conjuntos espectrais são levemente alterados. Para a região das cadeias alquilas (2800 a 3200 cm⁻¹ - figura 44C), as vibrações C–H são somente vistas na pressão mais alta estudada, no caso a 30 mN m⁻¹. Isto indica que o peptídeo afetou a monocamada, diminuindo o empacotamento e, conseqüentemente, a orientação das cadeias alquilas na monocamada.

A incorporação do peptídeo teve grandes efeitos na região de 1000 a 1800 cm⁻¹ - figura 44D, com as maiores mudanças em destaque: **I)** a larga banda negativa de 1000 a 1200 cm⁻¹ desapareceu; **II)** a banda em 1520 cm⁻¹, atribuída a vibrações da banda da amida II, surge no espectro da monocamada em todas as pressões de superfície averiguadas; **III)** uma pequena e positiva banda centrada em 1650 cm⁻¹ pode ser vista em todos os espectros, exceto no de 30 mN m⁻¹. Como tal

Resultados e Discussão

banda é atribuída a vibrações da amida I do peptídeo N-t(DH), a sua presença indicou que o peptídeo está situado na superfície em todas as fases de empacotamento. Um "ombro" é visível também em 1690 cm^{-1} , a qual mostra que o peptídeo adota as conformações randômicas e em α -hélices na interface. É importante notar que a banda da amida em 1650 cm^{-1} é substituída pela larga e negativa absorção devido aos "bendings" ou deformações angulares da molécula de água, quando o empacotamento do filme aumentou de 23 a 30 mN m^{-1} . Esta observação vem a confirmar que o peptídeo N-t(DH) permanece incorporado na interface, mas sofreu uma mudança completa em sua conformação para α -hélice, ou ainda ele é reorientado em relação ao plano da superfície. Tais mudanças nos espectros de PM-IRRAS confirmaram o alto empacotamento lipídico proposto quando se analisa os plateaus das isotermas de pressão de superfície (figura 39B). Isto é também refletido na banda do grupo C=O em 1738 cm^{-1} , a qual é praticamente extinta para baixos valores de pressão de superfície, mas recuperada em altos empacotamentos (30 mN m^{-1}).

Em suma, mudanças foram observadas para ambas as regiões dos lipídios nas monocamadas (cabeças polares e caudas hidrocarbonadas), sugerindo que o peptídeo pode penetrar na parte hidrofóbica das moléculas de DPPC. Quantitativamente, é difícil discutir sobre a organização e topologia do peptídeo N-t(DH) nesta interface. Entretanto, as mudanças das bandas da amida I indicam que o peptídeo tem sua conformação ou orientação alterada nos filmes de Langmuir.

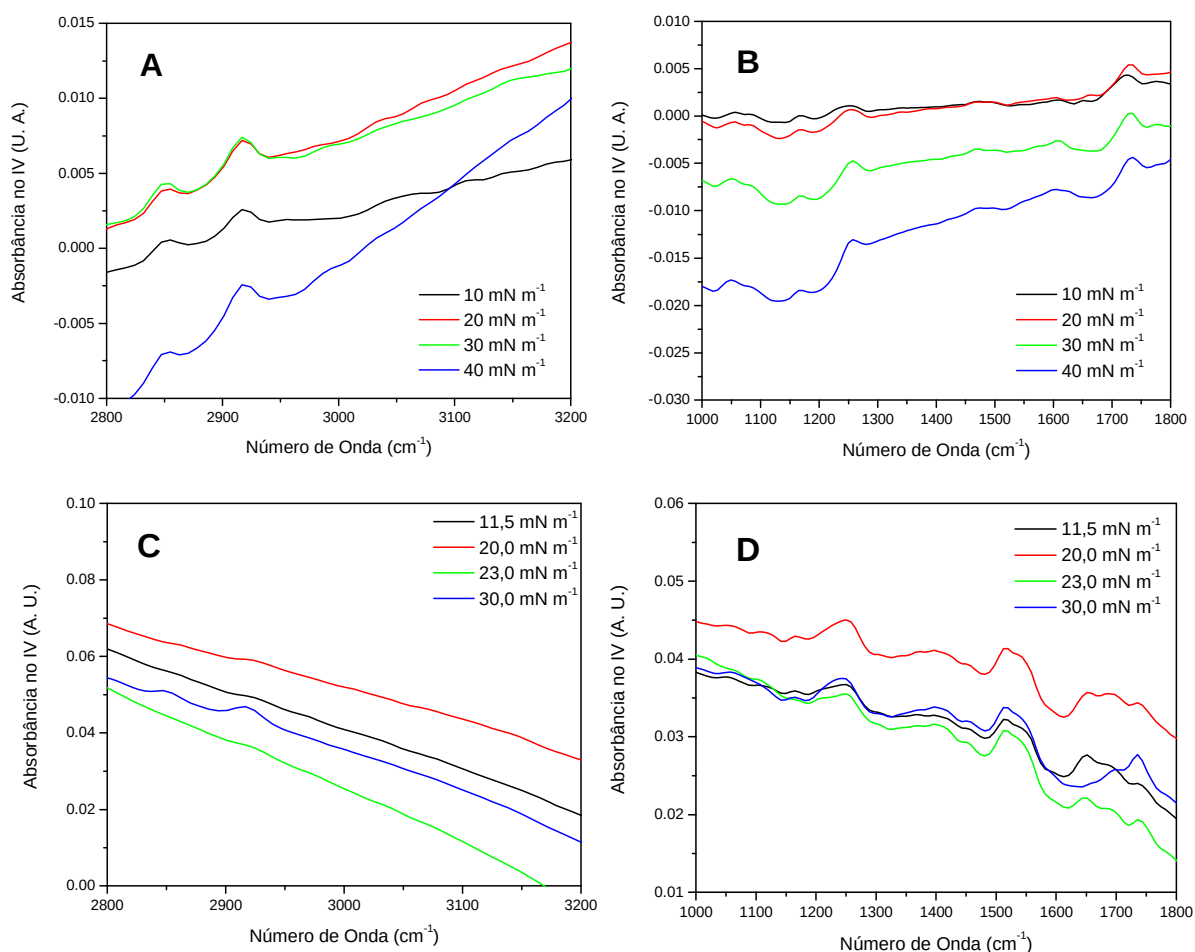


Figura 44: Espectro de PM-IRRAS para DPPC em solução tampão entre 2800 a 3200 cm⁻¹ (A) e entre 1000 a 1800 cm⁻¹ (B); DPPC na presença do peptídeo N-t(DH) entre 2800 a 3200 cm⁻¹ (C) e 1000 a 1800 cm⁻¹ (D).

4.5.3.3 DPPE

Os espectros de PM-IRRAS para os lipídios puros de DPPE em solução tampão estão mostrados na figura 45A e possuem bandas: entre 1240 - 1250 cm⁻¹, atribuídas ao estiramento assimétrico dos grupos P=O; em 1535 cm⁻¹, devido aos grupamentos aminos e, por último, em aproximadamente 1740 cm⁻¹, atribuída ao estiramento do grupo C=O, todos derivados da cabeça polar da fosfatidiletanolamina.⁹⁷ A incorporação do peptídeo alterou o espectro drasticamente, com a maioria das bandas desaparecendo do espectro - figura 45B. Assim, o empacotamento do DPPE foi perturbado ou interrompido pela presença do peptídeo. Para valores de pressão de

Resultados e Discussão

superfície próximos de 15 mN m^{-1} , a banda da amida I a 1650 cm^{-1} é positiva. Entretanto, para valores de pressão de superfície maiores que 30 mN m^{-1} , esta banda tem uma orientação apontada para baixo no espectro, a qual mostra que os peptídeos inicialmente estão em uma conformação de α -hélice paralela à superfície aquosa e, após o aumento da pressão de superfície, deslocou-se para uma conformação perpendicular à interface. Isto é consistente com as pressões de superfície das isotermas adquiridas (figura 40B), o que mostra o plateau por volta de 30 mN m^{-1} (assim como para DPPC). Outra importante observação é que o pico da banda da amida I é deslocado de 1650 a 1690 cm^{-1} , indicando que houve um aumento da conformação em α -hélice, juntamente com a alteração na reorientação.

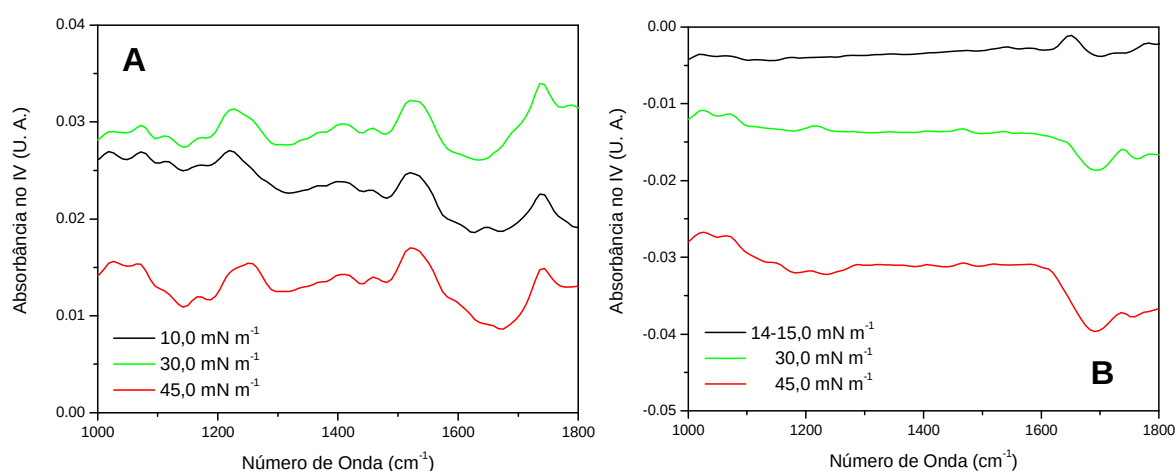


Figura 45: Espectro de PM-IRRAS para o DPPE em solução tampão (A) e com o peptídeo N-t(DH) incorporado (B) entre 1000 a 1800 cm^{-1} .

Tomados em conjunto, os resultados mostraram que o peptídeo N-t(DH) interage fortemente com os lipídios de DPPE quando em monocamadas. A orientação molecular alterou-se com o aumento do empacotamento lipídico, consistente com as pressões de superfície das isotermas obtidas. Antes do plateau, o peptídeo adotou uma conformação de α -hélice, orientada paralelamente ao plano de superfície. Após a compressão, o peptídeo mudou para uma orientação perpendicular, provavelmente como requerimento para a molécula continuar a manter a interação com o filme compactado, reduzindo a sua área.

Além disso, o peptídeo N-t(DH) estruturalmente possui uma conformação com duas hélices conectadas por um loop, estas estruturas secundárias poderiam estar mais afastadas antes de acontecer o plateau, numa conformação mais "aberta". Com

a compressão da monocamada e com a diminuição da área ocupada, estas hélices poderiam se aproximar, o que também pode explicar a ocorrência do plateau. Estes resultados são evidências de que existe uma flexibilidade conformacional do peptídeo, o que poderia mimetizar o sistema de regulação da entrada de ubiquinonas na região N-terminal da enzima *HsDHODH*, fenômeno que já foi hipotetizado para outros tipos da classe 2 das enzimas DHODH.¹⁴ A fim de estudarmos mais especificamente as mudanças estruturais do peptídeo, novos experimentos foram realizados utilizando as técnicas de CD e RPE.

4.6 DICROÍSMO CIRCULAR

Com o intuito de se avaliar a estruturação do peptídeo N-t(DH) e dos seus análogos contendo TOAC nos diversos ambientes estudados, o dicróismo circular foi utilizado. A figura 46 representa os espectros de dicróismo circular (CD) obtidos para o peptídeo N-t(DH) e os análogos [TOAC⁰]N-t(DH), [TOAC²⁰]N-t(DH) e [TOAC¹²]N-t(DH) em cinco condições diferentes: em solução tampão, em micelas de LPC a 10 mmol L⁻¹ e SDS a 20 mmol L⁻¹, em solução de TFE a 60% e em vesículas multilamelares de POPC, numa razão peptídeo/lipídio de 1:250. Notou-se que, para todos os peptídeos, a adição de surfactantes (LPC ou SDS) ou do indutor de estrutura TFE promoveu uma mudança na estrutura secundária da molécula, passando de uma conformação pouco estruturada quando em solução tampão, para uma estrutura em α -hélice, bem evidenciada pelo aumento das bandas negativas com máximos em 208 e 222 nm e positiva com máximo em 195 nm.

Em micelas de LPC, os peptídeos apresentaram maior helicidade em relação aos outros miméticos de membrana estudados, indicando uma maior interação e estruturação dos peptídeos na presença deste surfactante. Resultado este coerente com o encontrado nos estudos de monocamadas de Langmuir, onde uma grande interação foi encontrada em vesículas de DPPC, lipídio com cabeça polar similar ao encontrado no LPC. Observou-se também que, em solução tampão, todos os análogos do peptídeo N-t(DH), exceto o [TOAC¹²]N-t(DH), apresentaram uma estrutura majoritária ao acaso, fato que corrobora os estudos anteriores de monocamadas, onde também evidenciou-se que o peptídeo encontrava-se em uma mistura das estruturas

Resultados e Discussão

randômica e α -hélice na subfase do sistema. A presença de uma estruturação para o análogo [TOAC¹²]N-t(DH) foi atribuída à inserção do marcador de spin na primeira hélice (α 1 - figura 4), o que causou um aumento da helicidade do análogo. O TOAC é descrito na literatura, devido à estrutura rígida do anel presente em sua estrutura, como também um indutor de estrutura, especificamente de α -hélices e, menos comumente, de dobras.^{31,69,98}

Notou-se também que em TFE a 60% o peptídeo e os análogos apresentaram maior ou similar helicidade quando comparado ao LPC. Considerando o TFE um agente indutor de estrutura e visto que na cristalização da enzima *HsDHODH* este microdomínio está estruturado em α -hélice, os dados obtidos ajudaram a confirmar que o peptídeo mantém a estrutura existente na proteína.

A estrutura obtida em TFE também é encontrada para os quatro peptídeos em micelas, porém sua helicidade foi maior em LPC do que em SDS. Isto pode estar ocorrendo devido às cargas negativas presentes nas micelas de SDS, pois estas podem repelir o peptídeo, que tem carga líquida negativa de aproximadamente -1,8 em pH 7,⁹⁹ fato que não ocorre nas micelas de LPC, por serem surfactantes zwitteriônicos.

Em vesículas multilamelares (MLV) de POPC, notou-se que os análogos [TOAC⁰]N-t(DH) e [TOAC¹²]N-t(DH) apresentam estrutura predominante de α -hélice. Em contraste, os peptídeos N-t(DH) e [TOAC²⁰]N-t(DH) não apresentaram uma estrutura bem definida. O comportamento do peptídeo [TOAC¹²]N-t(DH) é explicado pela inserção do TOAC na primeira hélice, o que aumentou a estruturação do peptídeo.

O fato de o análogo [TOAC²⁰]N-t(DH) não apresentar estruturação em vesículas de POPC pode ser explicado pela localização do TOAC na sequência primária deste peptídeo. Como este marcador de spin está localizado na junção do loop com a segunda hélice do peptídeo, a substituição do resíduo de prolina pelo TOAC não induziu uma estruturação do peptídeo e/ou interferiu em sua inserção apropriada nas vesículas.

Em relação ao análogo [TOAC⁰]N-t(DH), a adição do marcador de spin no N-terminal poderia induzir uma agregação entre os peptídeos, o que poderia explicar a sua não estruturação neste mimético de membrana.

Resultados e Discussão

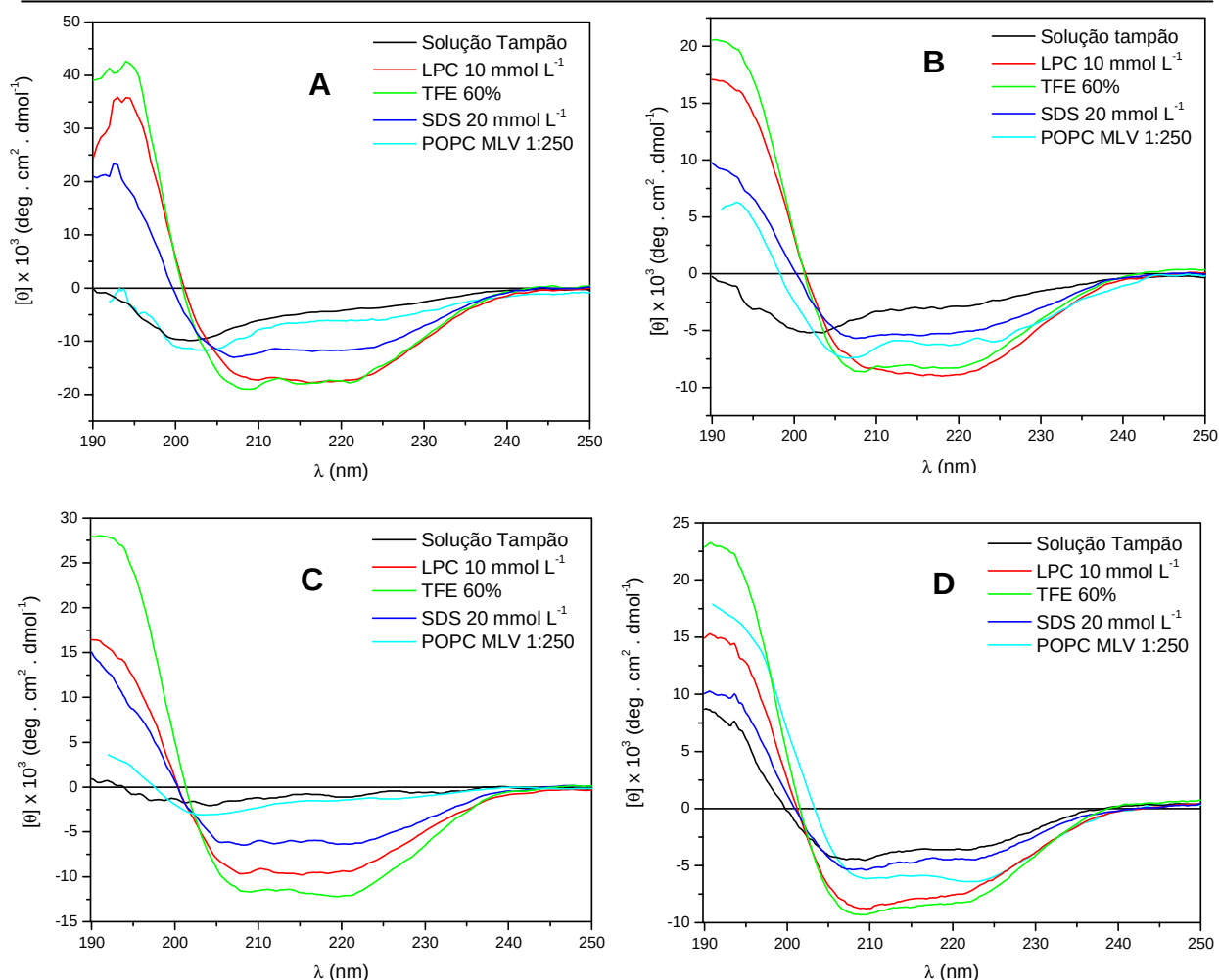


Figura 46: Espectros de CD dos peptídeos e análogos marcados com TOAC. (A) N-t(DH), (B) [TOAC⁰]N-t(DH), (C) [TOAC²⁰]N-t(DH) e (D) [TOAC¹²]N-t(DH) em diferentes condições.

No espectro para o peptídeo N-t(DH) observou-se também uma baixa estruturação. A fim de se entender melhor este fenômeno, foi feita a titulação deste peptídeo com vesículas de composição DPPC:DPPE:CL, nas proporções de 4,67:2,17:1, a mesma encontrada na membrana interna da mitocôndria, variando-se as concentrações de 0 a 3 mmol L⁻¹. Os espectros obtidos estão na figura 47.

Como se pode observar nos espectros, a partir da concentração de 1,5 mmol L⁻¹ de vesículas (razão peptídeo/lipídio de 1:50), observou-se uma mudança da banda negativa, centrada em aproximadamente 202 nm, para um comprimento de onda de 203 nm e migrando para 204 nm para a concentração de 3,0 mmol L⁻¹ (razão peptídeo/lipídio de 1:100). Um aumento de intensidade em 222 nm também foi observado, o que pode indicar uma estruturação do peptídeo para α -hélice. Deste modo, o peptídeo nas concentrações estudadas ainda não particionou totalmente nas

Resultados e Discussão

vesículas; no entanto, ele mostra uma alta tendência a se inserir na vesícula. Não foram realizados experimentos acima desta concentração lipídica devido à turbidez da solução resultante, o que impedia a leitura no espectropolarímetro. A turbidez gera grande espalhamento de luz e desgaste da célula fotomultiplicadora. Acredita-se que, ao aumentar-se a concentração de vesículas (ver testes no CW-RPE - seção seguinte) o peptídeo interagiu com a membrana, seguindo os comportamentos observados nos análogos e mesmo em micelas.

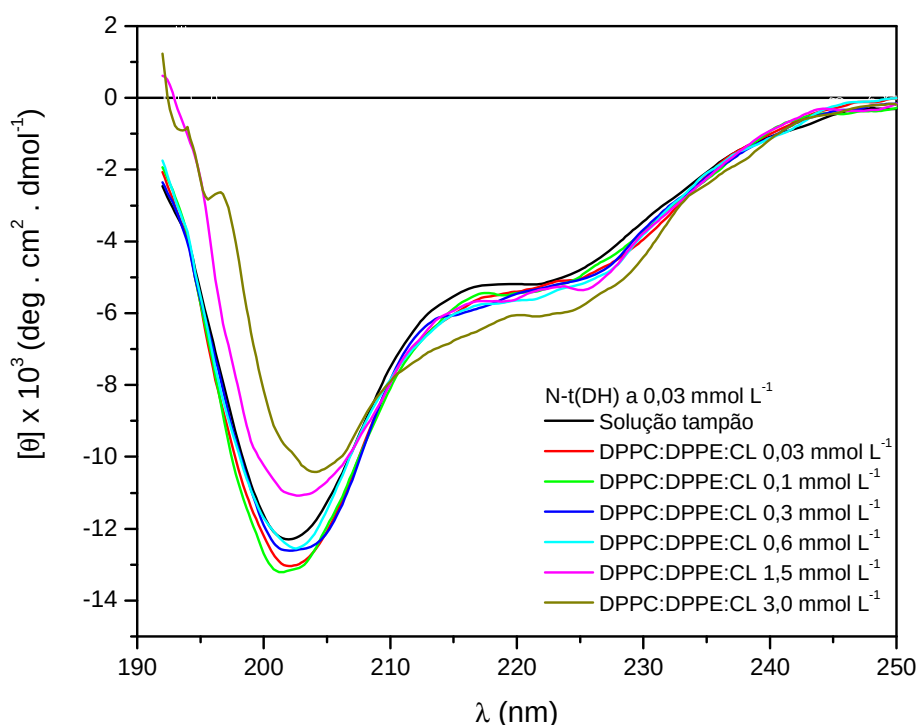


Figura 47: Espectros de CD do peptídeo N-t(DH) em diferentes concentrações de vesículas de DPPC:DPPE:CL.

Além da análise da estrutura do peptídeo em condições acima da CMC (concentração micelar crítica) e em vesículas, também foram feitas titulações do peptídeo nativo em função da concentração de LPC e SDS, a fim de evidenciarmos quando e com qual concentração de detergente o peptídeo adquire estruturação. Estas titulações foram feitas adicionando os surfactantes em concentrações crescentes de 0,1 a 10 mmol L⁻¹ para LPC e SDS. Os espectros obtidos encontram-se na figura 48.

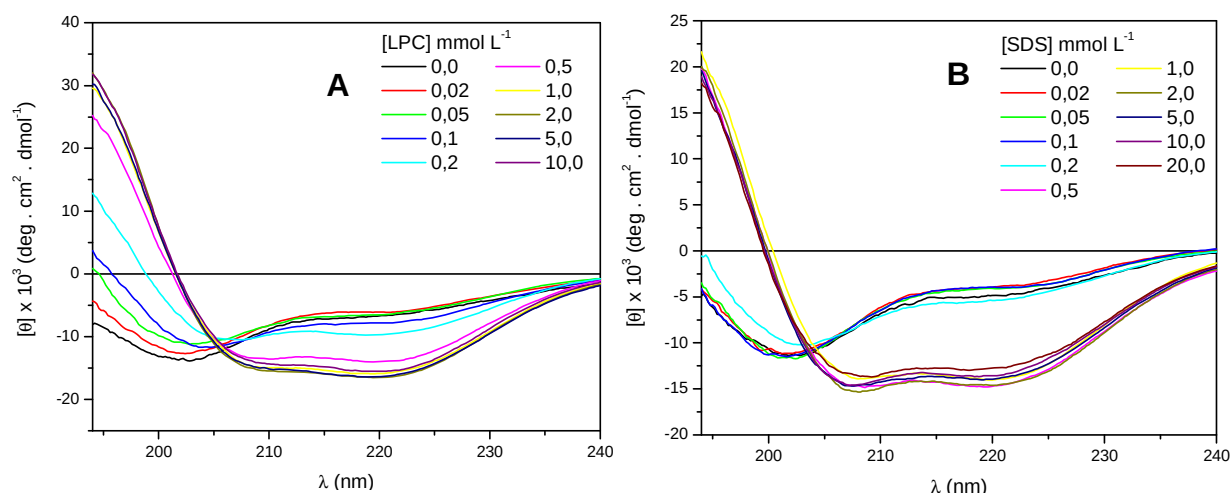


Figura 48: Espectros de CD do peptídeo N-t(DH) a 30 μmol L⁻¹ em diferentes concentrações de LPC (A) e SDS (B).

Os resultados mostraram que, em ambos os surfactantes, a partir de 0,5 mmol L⁻¹, a estrutura do peptídeo é predominantemente α -hélice. Um detalhe importante desses espectros é o "crossover"¹⁰⁰ ou ponto isodiróico ou isobéstico,¹⁰¹ observado em aproximadamente 205 nm nessas titulações, o que nos indica que o peptídeo tem sua estrutura alterada de randômica diretamente para α -hélice¹⁰² Este ponto de "crossover" indica uma sobreposição das transições $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ das estruturas desordenadas e helicoidais,^{103,104} representando um ponto de equilíbrio conformacional onde o peptídeo está em uma estrutura ao acaso e, no momento em que ele entra em contato com o surfactante, a molécula então adquire uma estruturação em α -hélice.^{105,106} Este fato corrobora os estudos anteriores obtidos em monocamadas, onde analisando-se as bandas da amida I e II provenientes do PM-IRRAS, foi possível verificar que o peptídeo na subfase está numa conformação ao acaso e, ao entrar em contato com a monocamada por meio da compressão, muda sua estrutura para uma conformação em α -hélice, devido à interação com os lipídios. Esta mudança conformacional também foi verificada nas curvas de pressão de superfície das isotermas, onde o patamar constante indica uma mudança estrutural do peptídeo próximo da pressão encontrada na membrana celular.

Os análogos duplamente marcados em sua sequência também foram avaliados por CD - figura 49 e 50, a fim de averiguar se os mesmos, após as substituições

Resultados e Discussão

e adições dos marcadores de spin na cadeia peptídica, permaneciam com a estrutura helicoidal predominante do microdomínio da região N-terminal da enzima *HsDHODH*.

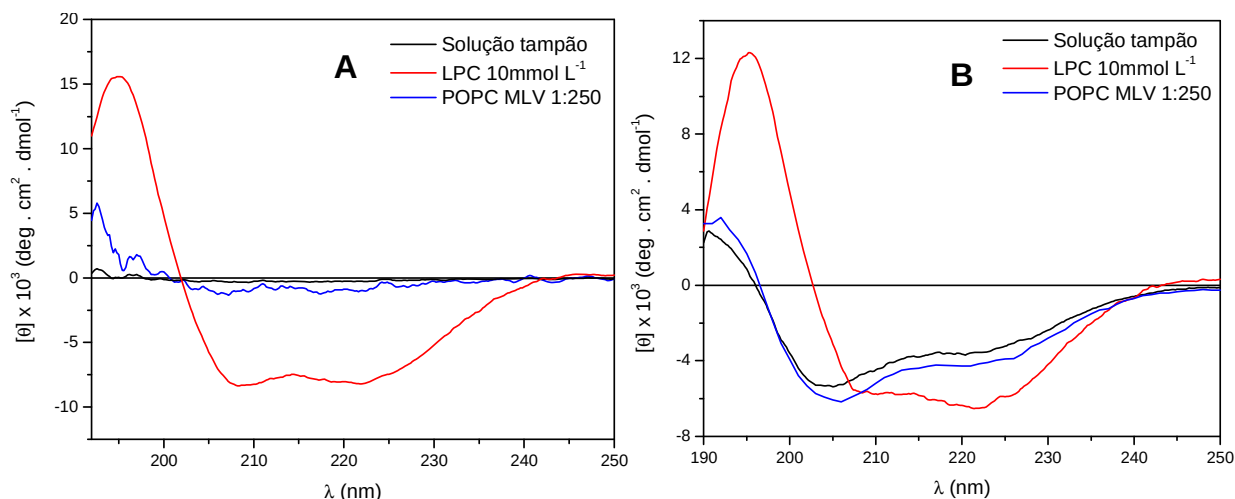


Figura 49: Espectros de CD dos análogos duplamente marcados do peptídeo N-t(DH) a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes condições. [Cys¹²⁻³⁵MTSSL]N-t(DH) (A) e [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH) (B).

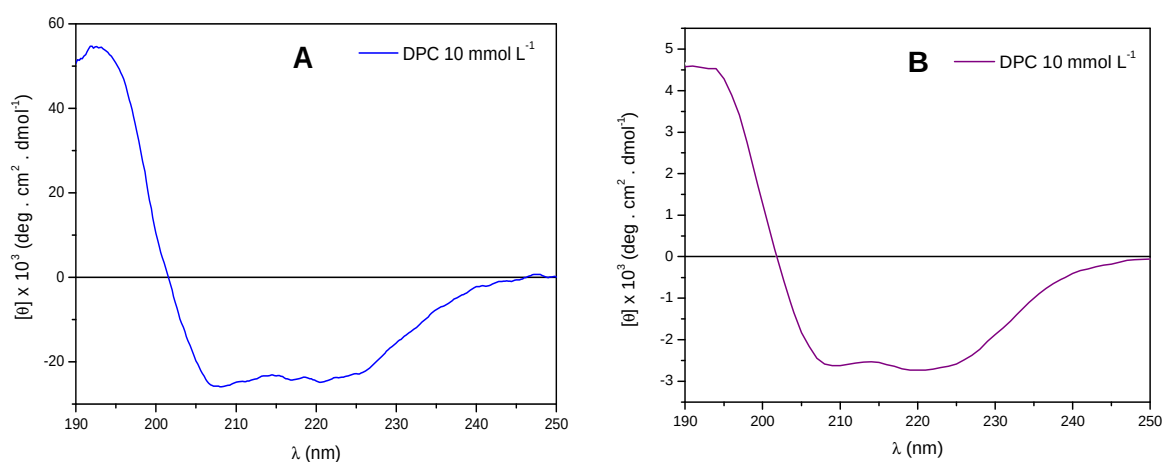


Figura 50: Espectros de CD dos peptídeos análogos duplamente marcados ao N-t(DH) a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em DPC a 10 mmol L^{-1} . [Cys¹²⁻³⁵MTSSL]N-t(DH) (A) e [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH) (B).

Os espectros de CD dos análogos duplamente marcados revelaram que, em linhas gerais, os peptídeos se estruturaram em α -hélice na presença de miméticos de membrana. Particularmente, em micelas de LPC e DPC o peptídeo se estruturou e particionou-se melhor, com maior estruturação em α -hélice quando comparado às vesículas. Para o análogo [Cys¹²⁻³⁵MTSSL]N-t(DH), o espectro contendo POPC encon-

Resultados e Discussão

tra-se com sinal muito fraco em relação aos outros espectros com micelas. Entretanto, uma análise mais acurada (figura 51) deste espectro pode-se identificar, mesmo em um baixo sinal, o formato de um espectro semelhante a de α -hélice, com bandas negativas em torno de 208 e 222 nm e positiva com máximo em 195 nm. Alguns fatores como turbidez e heterogeneidade da amostra são os motivos para a baixa qualidade do espectro e contribuíram para o impedimento de novas aquisições de espectros, nestas mesmas condições.

Para o análogo [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH), o peptídeo apresentou alto teor de α -hélice em micelas. Para a solução aquosa e vesículas, o análogo se comportou praticamente da mesma maneira, apresentando a estrutura em α -hélice como principal componente.

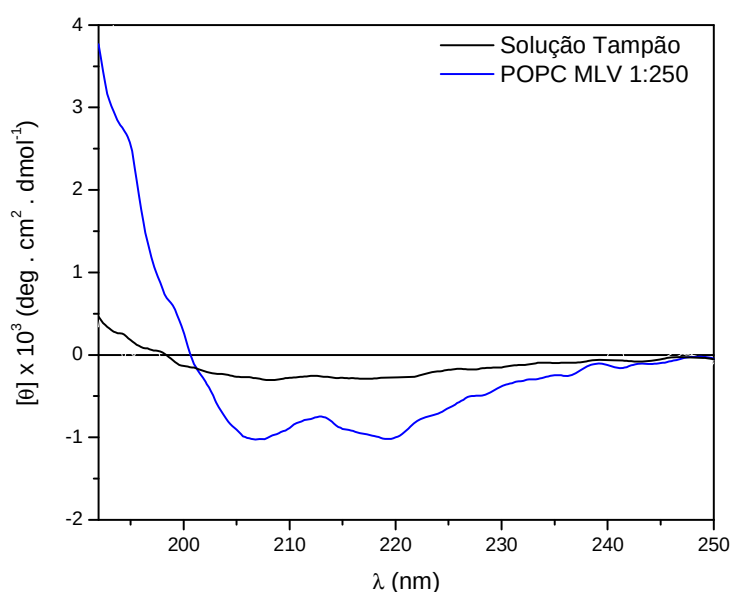


Figura 51: Espectros de CD do análogo [Cys¹²⁻³⁵MTSSL]N-t(DH) a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução aquosa e POPC.

De forma geral, estes dados são mais um indicativo de que o peptídeo mimetiza a estrutura da porção N-terminal da enzima DHODH humana descrita na literatura e se estrutura em α -hélice nos miméticos de membranas estudados. No entanto, a estruturação parecer depender do meio utilizado: em micelas, onde a estrutura é mais aberta devido à curvatura natural que este sistema apresenta, a estruturação

do peptídeo se mostrou mais fácil. Em contrapartida, em vesículas, a interação parece ser mais difícil de ocorrer, necessitando de uma maior concentração de lipídios.

Os resultados obtidos até o momento mostraram que o microdomínio estudado nesta tese apresenta uma alta mobilidade conformacional, interagindo com os miméticos de membrana estudados e apresentando estruturas diferentes em solução e nos diferentes miméticos estudados. Somado a isto, a interação com a membrana depende da estrutura da molécula utilizada; em nosso caso, da cabeça polar do lipídio.

Para obter maiores informações a nível molecular da interação peptídeo/membrana, a técnica da RPE foi utilizada.

4.7 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

4.7.1 ANÁLOGOS MARCADOS COM TOAC

Inicialmente, espectros de RPE foram obtidos para confirmar a manutenção da capacidade paramagnética dos peptídeos e obter informações sobre a mobilidade da região contendo o grupo TOAC.^{106,107} A figura 52 apresenta os espectros obtidos, confirmando a presença do sinal paramagnético em todos os peptídeos análogos sintetizados. Pode-se ainda observar que, com a adição do LPC, SDS e do indutor de estrutura TFE, os peptídeos exibiram uma maior imobilização, o que em conjunto com os dados de CD indicaram uma estruturação dos peptídeos. Esta observação é fundamentada no alargamento das linhas espectrais, quando comparadas ao espectro em solução aquosa. Linhas espectrais estreitas significam grande mobilidade na cadeia peptídica.^{27,29}

Os espectros obtidos para o análogo [TOAC⁰]N-t(DH) apresentam, em geral, linhas estreitas e bem definidas, o que indica alta mobilidade do spin no radical nítróxido. Estes resultados são coerentes com a posição ocupada pelo marcador paramagnético - extremidade N-terminal do peptídeo – que possui maior liberdade de movimento quando comparado a um marcador situado no meio da cadeia. Porém, observou-se no espectro obtido em micelas de LPC um ombro saliente à direita do

Resultados e Discussão

primeiro pico, o que indica a presença de uma segunda componente espectral. Isto significa que uma parte do peptídeo apresentou-se com uma mobilidade mais restrita, apontando que, neste mimético de membrana, uma parte das cadeias peptídicas interage ou particiona na micela com maior intensidade. Pode-se inferir que este marcador de spin ora interage com a membrana, ora está em solução (alta mobilidade), o que pode evidenciar uma acomodação da molécula na superfície deste mimético.

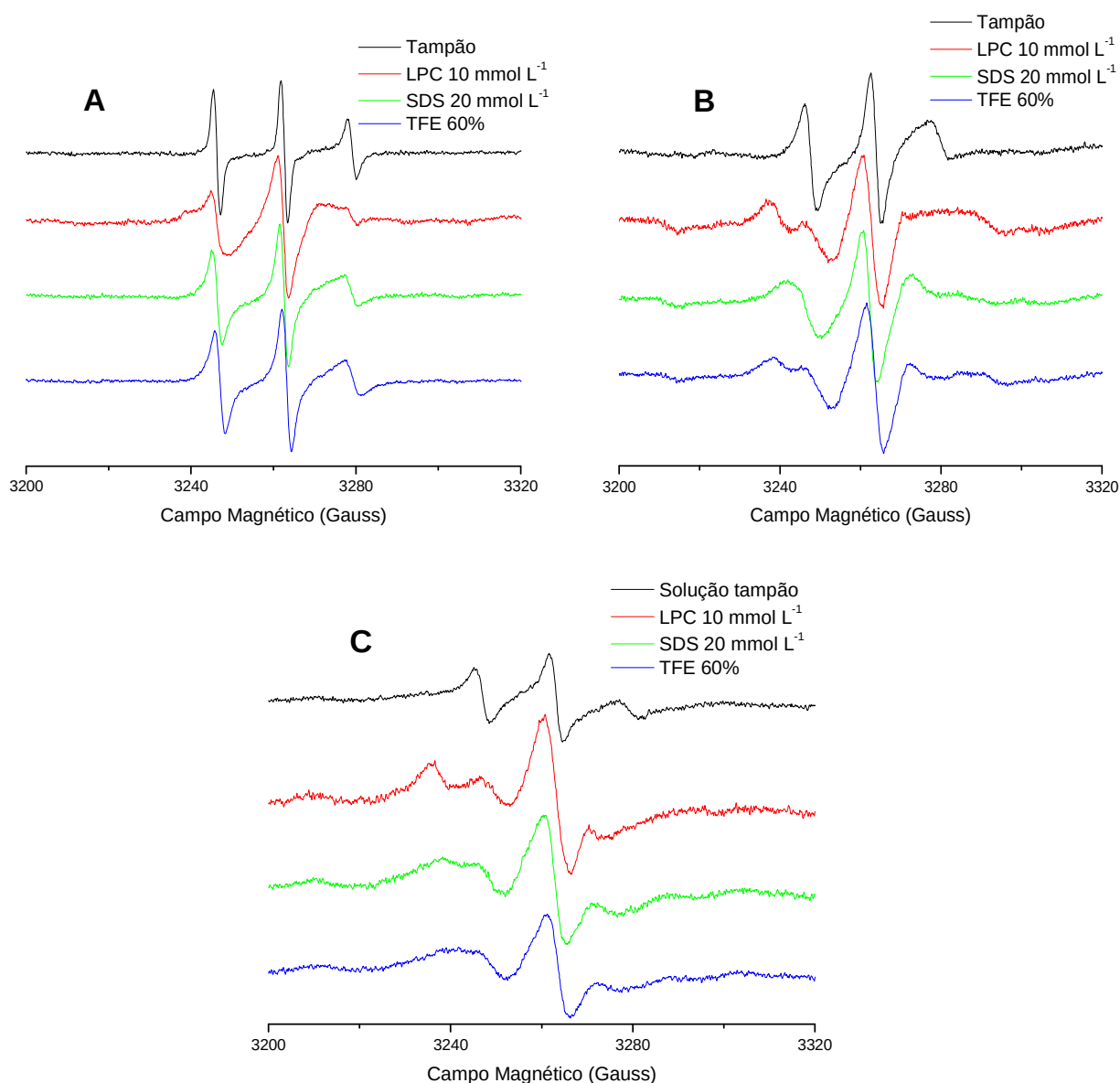


Figura 52: Espectros de RPE dos peptídeos análogos ao N-t(DH) contendo a sonda paramagnética TOAC na posição 0 ou N-terminal (A), na posição 20 (B) e na posição 12 (C) da cadeia peptídica, respectivamente, em solução tampão, em micelas de LPC 10 mmol L⁻¹, SDS 20 mmol L⁻¹ e TFE 60%.

Resultados e Discussão

O quadro 4 mostra as larguras do pico central (W_0) encontradas na figura 52.

Quadro 4: Valores das larguras do pico central (W_0) dos espectros de CW-RPE dos análogos contendo TOAC ao peptídeo N-t(DH).

Peptídeo	Largura do pico central (W_0) em Gauss			
	Solução Tampão	LPC	SDS	TFE
[TOAC ⁰]N-t(DH)	1,6	2,6	2,1	2,3
[TOAC ²⁰]N-t(DH)	2,4	4,8	3,6	4,2
[TOAC ¹²]N-t(DH)	2,9	5,7	4,9	5,1

O análogo [TOAC²⁰]N-t(DH) apresentou espectro em solução tampão com linhas estreitas, indicando uma grande mobilidade do elétron desemparelhado da sonda TOAC. No entanto, a mobilidade foi menor que a encontrada para o peptídeo [TOAC⁰]N-t(DH). A adição dos miméticos de membrana (micelas de LPC e SDS) promoveu um alargamento das linhas espectrais bem como o aparecimento de outros picos no espectro, demonstrando que o TOAC encontrava-se com uma dinâmica mais imóvel em relação àquela em solução tampão. Esta menor mobilidade pode ser interpretada como uma migração do peptídeo para o interior da micela. A maior interação ocorre em micelas de LPC. Este dado pode indicar uma diferença na afinidade do peptídeo em função do tipo de cabeça polar e da carga encontrada no mimético de membrana, como encontrado para o peptídeo original nos estudos realizados anteriormente. Considerando que o peptídeo possui um pI de 5,29, uma carga líquida de -1,8 em pH 7⁹⁹ e que os resíduos de Asp e Glu são vizinhos ao grupo TOAC na posição 20, esta menor interação pode estar ocorrendo devido a repulsão eletrostática entre a cabeça polar negativa do SDS (negativa) e o peptídeo. Este mesmo efeito não ocorre no caso do LPC, que é um surfactante zwitteriônico.

Em TFE a 60%, o peptídeo também apresentou um maior alargamento das linhas e uma menor mobilidade do que em solução. O TOAC inserido na posição 20 encontra-se no loop entre as duas hélices da predição de estrutura do peptídeo (figura 4); desta forma, a adição de TFE, além de aumentar a estruturação do análogo

Resultados e Discussão

(como observado pelos resultados de CD), pareceu diminuir a mobilidade do peptídeo.

Comparando-se os espectros obtidos para este peptídeo em TFE e em LPC, podemos verificar que em LPC o espectro está mais imóvel, indicando que somente a estruturação do peptídeo não explicaria o aumento da imobilidade da cadeia peptídica.

Quanto ao análogo [TOAC¹²]N-t(DH), os espectros mostraram linhas mais largas que o [TOAC²⁰]N-t(DH), indicando maior estruturação e interação com os miméticos de membrana. Este análogo em solução tampão possui linhas mais alargadas do que o análogo [TOAC²⁰]N-t(DH), provavelmente devido à posição da sonda neste análogo e da maior estruturação do peptídeo neste meio, como também mostrado pelos dados de CD. Uma maior estruturação promove uma menor mobilidade do peptídeo, principalmente porque a posição 12 situa-se no meio da primeira α -hélice ($\alpha 1$) do peptídeo. Comparativamente em solução, os espectros de RPE em LPC, SDS e TFE mostraram um aumento da imobilização do peptídeo: as linhas ficaram mais alargadas, evidenciando uma imobilidade da sonda neste análogo. Estes resultados indicaram que o peptídeo estava com a primeira hélice de sua estrutura voltada para dentro da membrana.

A fim de se averiguar em maiores detalhes a interação do peptídeo com a membrana, um modelo mais próximo a esta estrutura celular foi utilizado. Neste sentido, vesículas com os principais lipídios existentes na membrana interna da mitocôndria foram usados.

Inicialmente foi realizado um estudo para determinar a melhor relação peptídeo/vesícula para os demais experimentos. Os espectros de RPE dos peptídeos [TOAC¹²]N-t(DH) e [TOAC⁰]N-t(DH) em diferentes concentrações de lipídios estão na figura 53, além dos espectros em solução tampão.

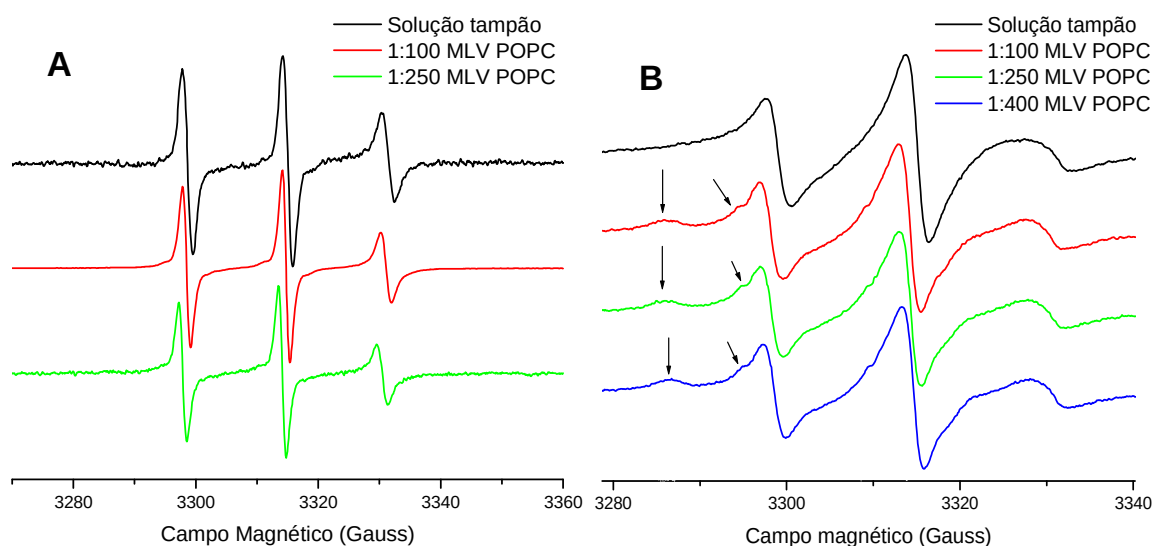


Figura 53: Espectros de RPE dos peptídeos análogos [TOAC⁰]N-t(DH) (A) e [TO-AC¹²]N-t(DH) (B), respectivamente, em diferentes concentrações de vesículas multilamelares de POPC e em solução tampão. As setas indicam as contribuições da segunda componente, mais imobilizada.

Para o peptídeo [TOAC¹²]N-t(DH) é possível verificar o aparecimento de outros componentes com a adição dos lipídios, evidenciado pela presença de ombros a esquerda do primeiro pico do espectro. No entanto, para o peptídeo [TOAC⁰]N-t(DH), nenhuma mudança foi observada, quando compara-se o espectro dos peptídeo em tampão com os espectros contendo lipídios. Estes dados são contrários aos obtidos com micelas. Somado a isto, como se pode notar, variando-se a composição lipídica de 1:100 a 1:400, não se verificou mudança na dinâmica destes peptídeos. A fim de seguir o protocolo padrão do laboratório do Prof. Lorigan e homogeneizar os estudos a serem realizados, adotou-se como padrão a razão peptídeo/lipídica de 1:250. Deste modo, foram feitos filmes de MLV em POPC, POPC:POPE, POPC:CL e POPC:POPE:CL, a fim de verificar se existiam mudanças significativas nas dinâmicas conformacionais dos análogos. Os espectros de CW-RPE em diferentes composições lipídicas para os peptídeos contendo TOAC estão representadas na figura 54.

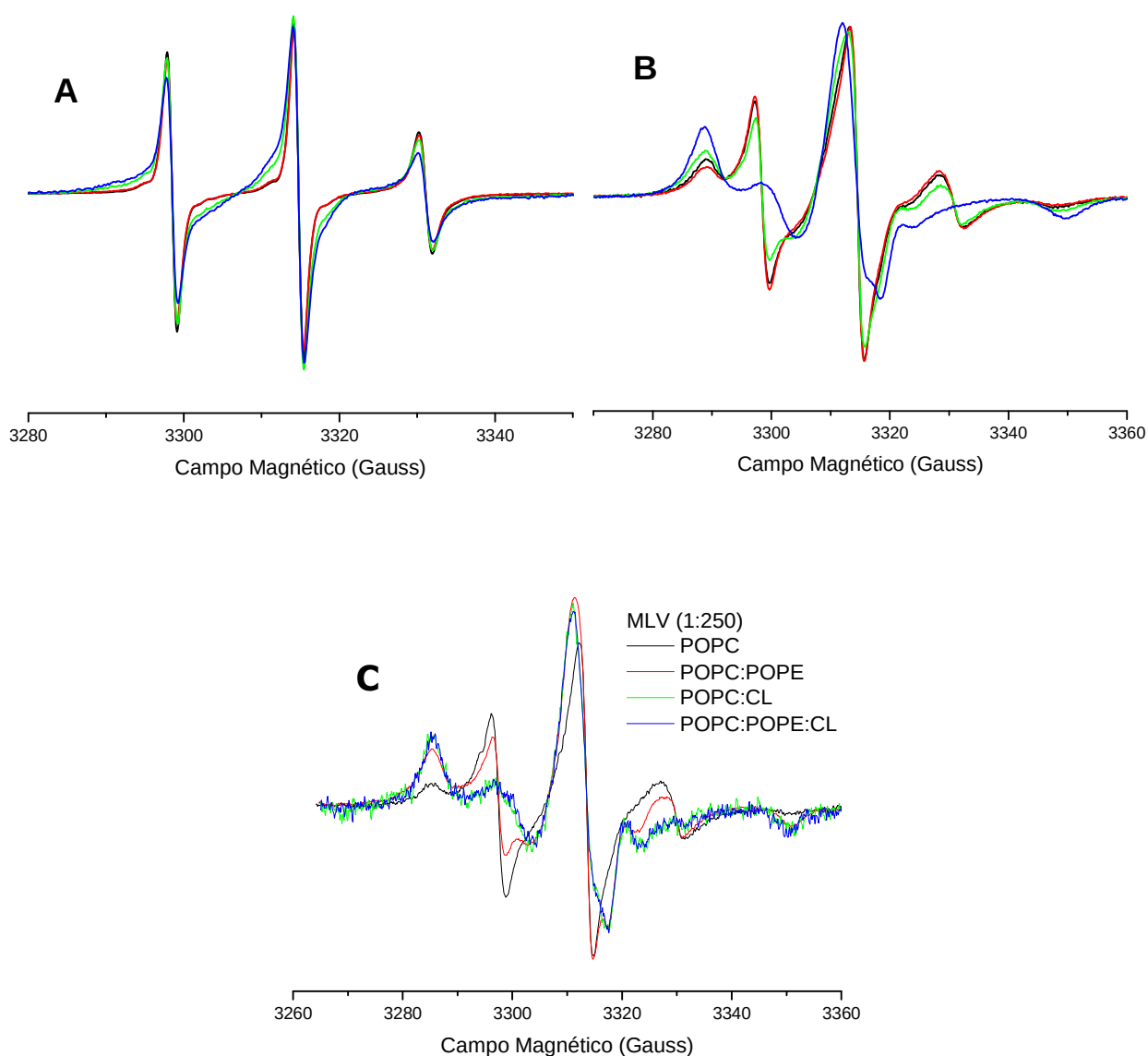


Figura 54: Espectros de RPE dos peptídeos análogos [TOAC⁰]N-t(DH) (A), [TO-AC²⁰]N-t(DH) (B) e [TOAC¹²]N-t(DH) (C), em diferentes composições de vesículas multilamelares.

Ao observar os espectros adquiridos, não é possível notar diferenças significativas nos espectros obtidos em POPC e POPC:POPE para o análogo [TOAC⁰]N-t(DH) (figura 54A). Entretanto, quando se compara os espectros obtidos em POPC:CL e POPC:POPE:CL, percebeu-se uma leve porém evidente mudança no formato das linhas espectrais. Além disso, notou-se o aparecimento de um ombro nos picos de campo médio e alto nos espectros, provavelmente devido ao aparecimento de uma segunda componente. Este resultado nos leva a crer que a cardiolipina provavelmente faz com que o peptídeo particione e interaja melhor em sistemas contendo este lipídio. A cardiolipina possui características únicas na classe dos lipídios: é literalmen-

Resultados e Discussão

te um "dímero" de um lipídio comum por conter quatro cadeias acilas, tendo a propriedade de formar estruturas que diferem das bicamadas lipídicas naturais, como as cristas das mitocôndrias, formadas pela membrana interna desta organela e local onde há alta concentração da cardiolipina.^{94,108} Estas propriedades podem explicar uma melhor particionamento do análogo [TOAC⁰]N-t(DH) aos miméticos de membrana que continham CL em sua composição pois, com a presença de cardiolipina nas vesículas, a fluidez pode diminuir e o peptídeo consegue interagir mais facilmente com este sistema. Este fato é interessante, pois evidencia mais uma vez que o tipo de lipídio influencia na interação do análogo com a membrana, corroborando nossos estudos anteriores em monocamadas de Langmuir e de compressibilidade, onde a interação do peptídeo foi suscetível à natureza do lipídio utilizado.

Os resultados de CW-RPE para o análogo [TOAC²⁰]N-t(DH) – figura 54B – mostraram a presença de duas componentes para todos os lipídios estudados, indicando uma maior interação deste com a bicamada lipídica. Este fato pode ocorrer devido à posição do TOAC na sequência ou devido a maior estruturação do peptídeo promovida pela presença do TOAC (ver resultados de CD), o que facilitaria a interação do peptídeo com a membrana. Novamente a presença de cardiolipina promove uma maior interação com a membrana, aumentando a presença da segunda componente, indicando uma maior partição com a membrana. Ao analisarmos o sistema contendo os três lipídios, pode-se observar uma alta imobilização do sistema, provocando uma maior imersão do marcador nesse modelo de membrana ou aumentando a sua afinidade por ela.

Os espectros de CW-EPR para o peptídeo [TOAC¹²]N-t(DH) estão apresentados na figura 54C. Como o peptídeo [TOAC²⁰]N-t(DH), este análogo apresenta menor mobilidade quando comparado ao análogo marcado na posição 0, apresentando a presença nítida de uma segunda componente. Estes dados mostram que esta região do marcador está parcialmente imersa na membrana ou voltado para ela nesta posição, e parte está ainda em solução, não interagindo com a membrana. Ao analisar os espectros, houve notadamente uma mudança das linhas espectrais quando se compara o peptídeo somente em vesículas de POPC com os outros modelos de membranas contendo mais de um componente lipídico. Todas as vesículas apresentam maior imobilização do radical nitróxido quando comparado ao POPC. No entanto, a maior

Resultados e Discussão

imobilização foi novamente obtida na presença de CL, onde os espectros se assemelham a um espectro de pó, com muito pouca mobilidade. Estes dados mostram que a cardiolipina, especificamente, é um lipídio essencial para uma melhor interação do peptídeo com as vesículas. Estes dados nos permitem salientar alguns pontos importantes sobre as dinâmicas e o comportamento conformacional do peptídeo frente aos diferentes modelos de membranas analisados:

- 1) o peptídeo possui interação diferente quando se alteram os componentes lipídicos da vesícula, indicando que a natureza do lipídio contribui de maneira diferente para a interação do peptídeo com a membrana; além disso, quando há o conjunto dos três componentes, parece haver um "sinergismo" na interação do mesmo - esse sistema mimetiza de maneira mais próxima à membrana mitocondrial interna das células.
- 2) o peptídeo possui a sua extremidade N-terminal com alta mobilidade, sendo levemente imobilizada quando se usa o modelo de membrana com três componentes lipídicos.
- 3) As posições 12 e 20 apresentam uma alta imobilização, indicando que estas posições estão imersas na membrana, no entanto, estas apresentam interações diferentes e dependentes do tipo de lipídio utilizado na confecção das vesículas; apresentando em POPC e POPC:POPE duas componentes bem visíveis, uma livre e outra mais imobilizada. Nas vesículas contendo CL, a interação foi muito maior ou por causa da afinidade por este tipo de vesícula, ou ainda devido a menor estruturação da vesícula contendo este tipo de lipídio. A segunda alternativa é a mais provável, considerando os dados obtidos pelas outras técnicas estudadas.

Estes dados são importantes para a descrição detalhada, ao nível molecular, da topologia da região N-terminal da enzima *HsDHODH*, onde a extremidade N-terminal está próxima da superfície da vesícula e as regiões 12 e 20 estão mais imersas na membrana.

4.7.2 ANÁLOGOS DUPLAMENTE MARCADOS

A fim de obter dados mais detalhados de como o peptídeo se comporta quando está interagindo com os diferentes miméticos de membrana empregados neste estudo, isto é, micelas e vesículas, experimentos de DEER foram realizados. Esta técnica permite determinar as distâncias entre dois marcadores de spin contidos em uma determinada molécula que, no nosso caso, foram representados pelos análogos duplamente marcados do peptídeo N-t(DH).

As primeiras análises foram realizadas com o análogo duplamente marcado [Cys^{12,35}MTSSL]N-t(DH) em micelas de DPC e LPC, e em vesículas multilamelares de POPC, POPC:POPE, POPC:CL e POPC:POPE:CL. Na figura 55 estão representados os espectros de CW-RPE obtidos.

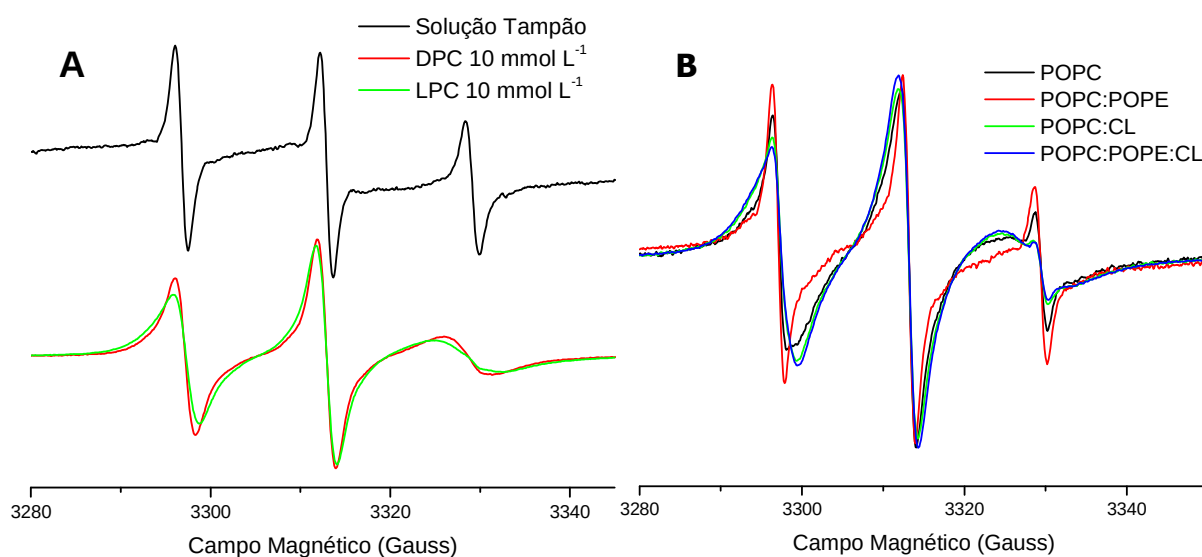


Figura 55: Espectros de CW-RPE do peptídeo análogo [Cys^{12,35}MTSSL]N-t(DH). (A) em solução tampão e em micelas de DPC e LPC; (B) em diferentes composições de vesículas multilamelares.

Pode-se observar pelos espectros das micelas que o peptídeo interage praticamente da mesma maneira em ambas as micelas estudadas, o que é importante para os experimentos de DEER. Espectros de CD em DPC também indicaram que este peptídeo está estruturado em α -hélice (figura 50). As medidas de CW para os análogos aqui descritos são de interpretação bem restrita, visto que os dois marcadores contribuem para a formação do espectro. Estes espectros serviram apenas para con-

Resultados e Discussão

firmar a dupla marcação do peptídeo e determinar a concentração do peptídeo utilizado.

Após estes estudos iniciais e seguindo o protocolo de laboratório do Prof. Lorigan, foram feitos os experimentos de DEER com micelas de DPC e vesículas nas composições anteriores descritas. Os resultados estão apresentados na figura 56.

Os dados obtidos permitiram calcular a distância entre os marcadores paramagnéticos nos diferentes sistemas obtidos. As distâncias determinadas nos experimentos de DEER estão apresentadas na quadro 5. Observou-se que, para vesículas em geral, as distâncias entre os centros paramagnéticos permaneceram praticamente constantes, indicando que as variações experimentadas pelo peptídeo foram mínimas em função da natureza do lipídio. Os resultados mostraram que em micelas a medida de distância obtida foi de aproximadamente 30 Å, sendo que para vesículas este valor foi de aproximadamente 40 Å. Estes valores indicaram que a estrutura obtida nestes dois sistemas são diferentes, em micelas a estrutura é mais fechada que em vesículas, devido à menor distância entre os centros paramagnéticos no análogo.

As mesmas análises de CW-RPE foram realizadas para o peptídeo [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH) (figura 57), a fim de se determinar as distâncias entre os dois centros paramagnéticos presentes na molécula (figura 58). Os valores das distâncias obtidas para este análogo também estão apresentadas no quadro 5. Para este análogo não foi medida a distância para o sistema lipídico POPC:CL, pois nos demais lipídios os valores obtidos foram bem parecidos. Os resultados obtidos mostraram que em micelas a medida obtida foi de aproximadamente 32 Å sendo que em vesículas este valor foi, em média, próximo de 48 Å. Estes valores indicaram novamente que a estrutura obtida nestes dois sistemas lipídicos são diferentes.

Os dados obtidos foram semelhantes para ambos os análogos, porém com uma maior distância encontrada para o peptídeo [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH). Este maior valor encontrado em vesículas é esperada, pois no peptídeo [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH) os dois marcadores estão nas extremidade do peptídeo. Estes dados revelaram uma informação importante da estrutura do peptídeo do microdomínio da N-terminal da HsDHODH, que é a flexibilidade entre as duas α -hélices que o peptídeo possui. Sugestivamente, a região do loop que conecta estas duas hélices pode exercer uma função de "dobradiça", a qual seria a responsável pelas mudanças con-

Resultados e Discussão

formacionais obtidas nos experimentos de DEER. Extrapolando, esta região pode ser a articulação ou a literalmente a "dobradiça" da porta de entrada para a regulação do fluxo de ubiquinonas ao sítio ativo da *HsDHODH*.

Resultados e Discussão

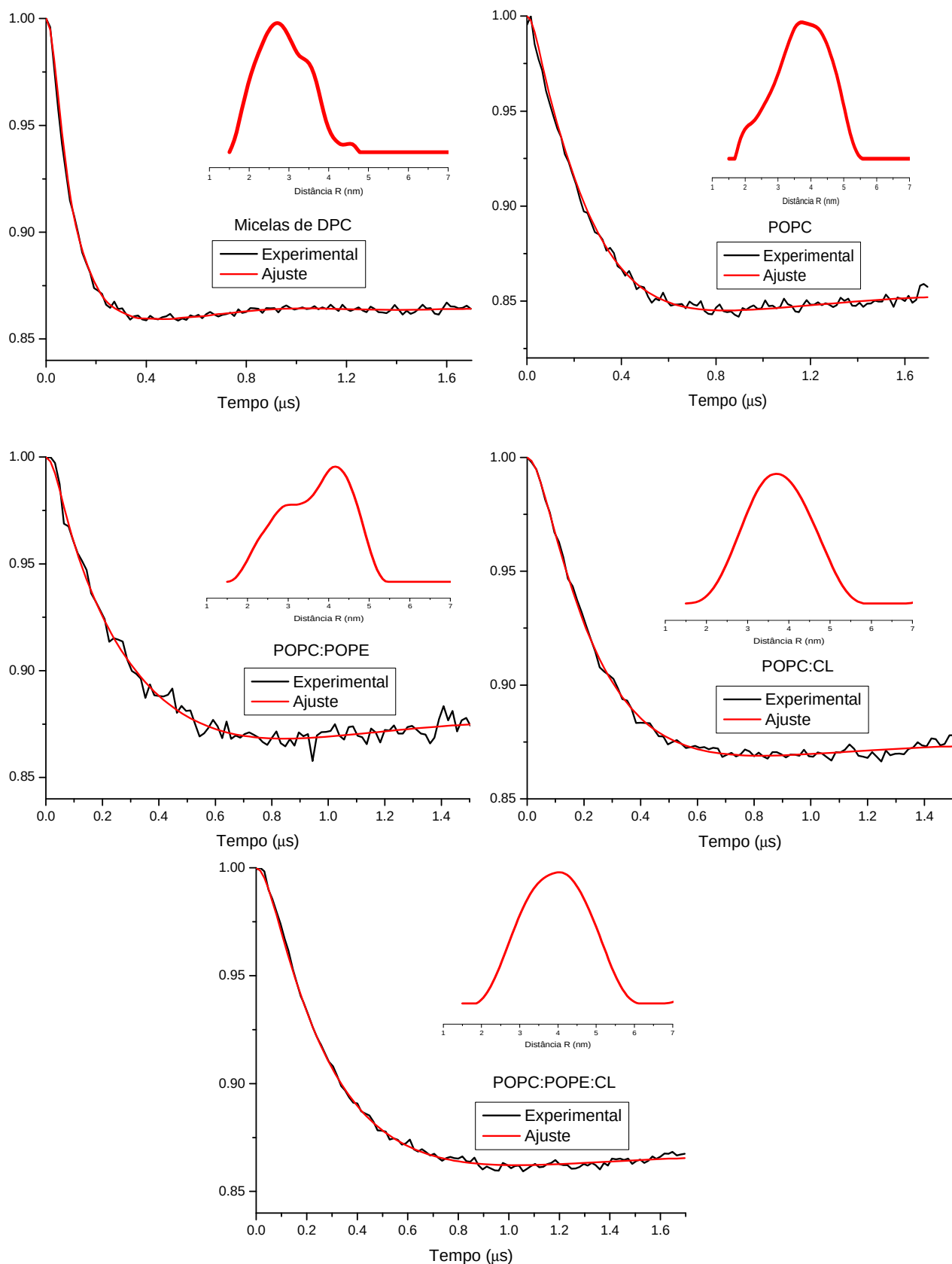


Figura 56: Sinal de DEER de domínio de tempo para o análogo [Cys^{12,35}MTSSL]N-t(DH) em diferentes miméticos de membrana. "Inset" estão representados as distribuições de distâncias obtidas a partir do domínio de tempo.

Resultados e Discussão

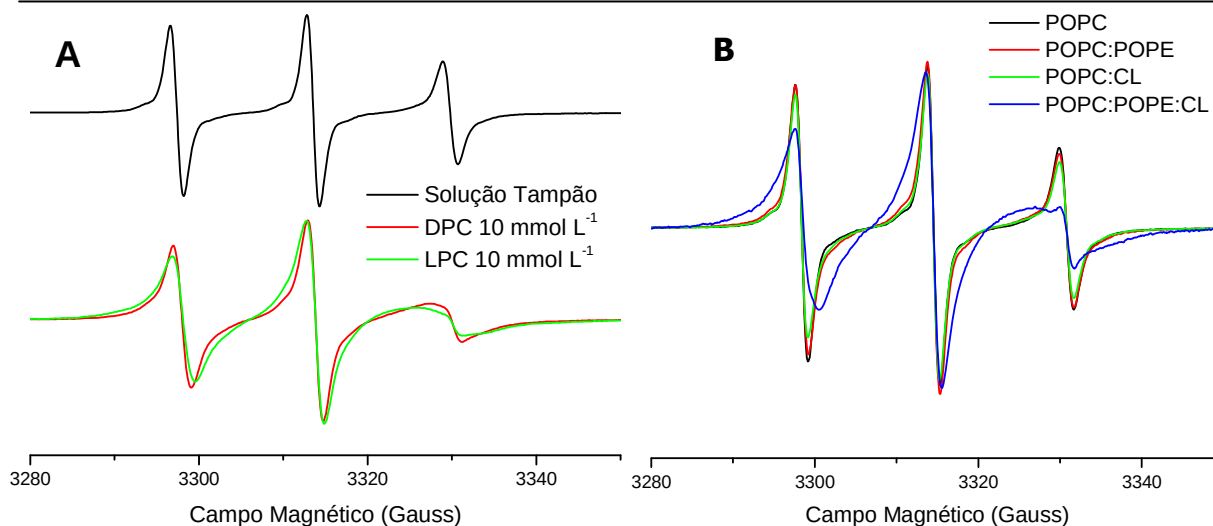


Figura 57: Espectros de CW-RPE do peptídeo análogo [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH). (A) em solução tampão e em micelas de DPC e LPC; (B) em diferentes composições de vesículas multilamelares.

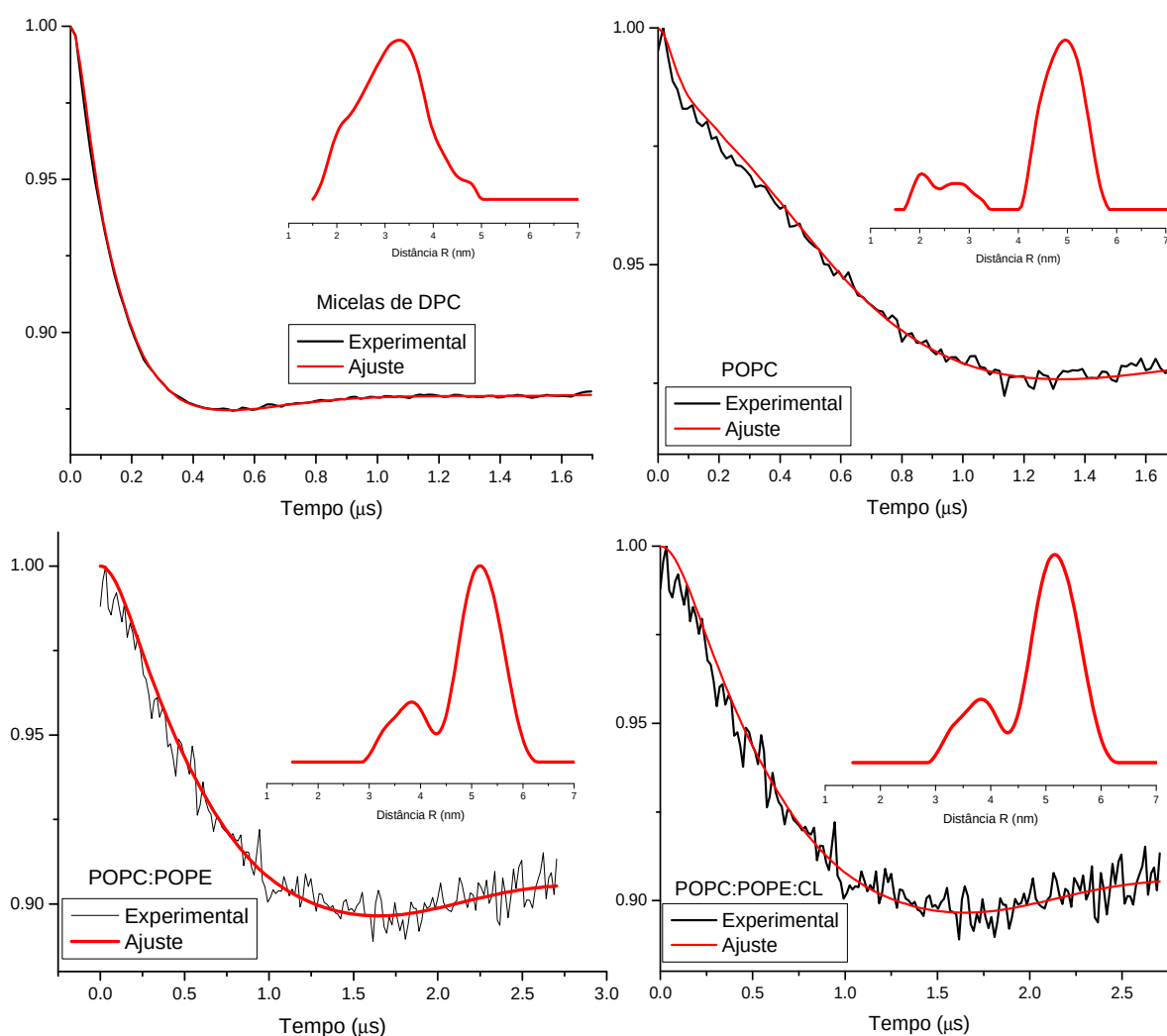


Figura 58: Sinal de DEER de domínio de tempo para o análogo [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH) em diferentes miméticos de membrana. "Inset" estão representados as distribuições de distâncias obtidas a partir do domínio de tempo.

Resultados e Discussão

Quadro 5: Distâncias entre os centros paramagnéticos dos análogos [Cys^{12,35}MTSSL]N-t(DH) e [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH).

Componentes lipídicos	Distâncias entre os centros paramagnéticos (Å)	
	[Cys ^{12,35} MTSSL]N-t(DH)	[Cys ³⁵ MTSSL-TOAC ⁰]N-t(DH)
DPC	29,6	31,7
POPC	38,0	47,2
POPC:POPE	37,9	43,3
POPC:CL	38,6	---
POPC:POPE:CL	39,9	51,5
POPC:POPE:CL:UBQ	40,9	47,7

O último experimento de DEER realizado foi a inserção no sistema lipídico trifásico da ubiquinona. A ubiquinona é fundamental para a catálise da enzima, pois tem por função a regeneração do grupo FMN, essencial para a manutenção da conversão do diidroorotato em orotato. Desta forma, este estudo visou verificar se a adição deste elemento afetaria a estrutura do peptídeo, determinado pela mudança nas distâncias dos centros paramagnéticos. Primeiramente, obtiveram-se os espectros de CW-RPE e comparou-se com o sistema lipídico trifásico na ausência da ubiquinona (figura 59). Posteriormente, foram realizados os experimentos de DEER utilizando a mesma amostra (figura 60). A adição da ubiquinona não promoveu alteração nas distâncias medidas.

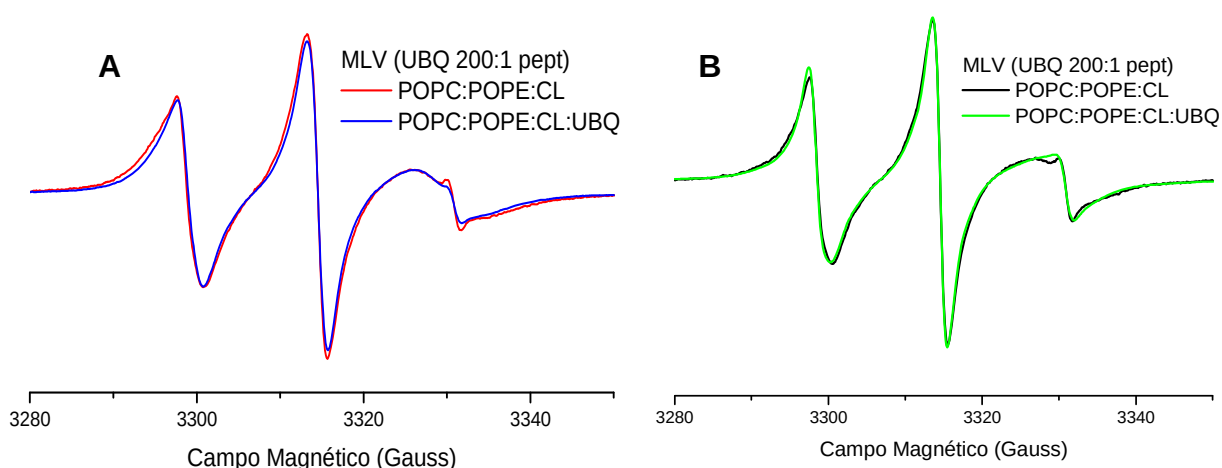


Figura 59: Espectros de CW-RPE dos análogos [Cys¹²⁻³⁵MTSSL]N-t(DH) (A) e [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH) (B). A figura traz a comparação entre as vesículas com componentes trifásicos (POPC:POPE:CL) com este mesmo sistema, porém com a adição da ubiquinona para os dois análogos.

Resultados e Discussão

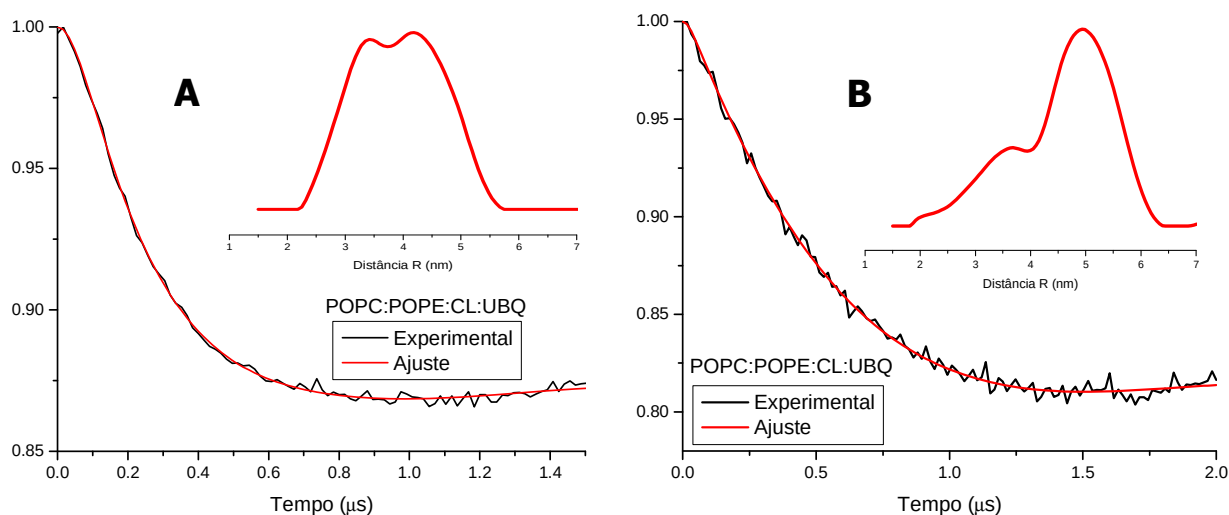


Figura 60: Sinal de DEER de domínio de tempo para os análogos [Cys^{12,35}MTSSL]N-t(DH) (A) e [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH) (B) em miméticos de membrana contendo POPC:POPE:CL:UBQ. "Inset" estão representados as distribuições de distâncias obtidas a partir do domínio de tempo.

As diferenças entre as distâncias obtidas em micelas e em vesículas para os dois análogos estudados indicam que o peptídeo interage de maneira diferente nestes dois miméticos de membrana e mais que isso, indica uma conformação diferente nestes sistemas.

Segundo Couto e colaboradores,¹⁴ o microdomínio corresponde ao peptídeo sintetizado para enzimas de classe 2, como de *E. coli*, possui mobilidade em relação às suas hélices, principalmente em relação à $\alpha 1$. Com os resultados obtidos, pode-se supor que o peptídeo também apresenta esta mobilidade em sua estrutura, apresentando-se em três conformações bem distintas: 1) a primeira não estruturada em solução; 2) uma mais "fechada" em micelas, provavelmente devido à curvatura que a micela apresenta em sua estrutura, quando comparada a uma bicamada lipídica; e 3) uma conformação mais "aberta" em vesículas, com uma diferença em torno de 10 Å em relação às micelas para o análogo [Cys^{12,35}MTSSL]N-t(DH) e em torno de 16 para o análogo [Cys³⁵MTSSL-TOAC⁰]N-t(DH). Considerando a alta sensibilidade do equipamento utilizado (banda Q) e um erro de aproximadamente ± 1 Å, a diferença de distâncias encontrada é representativa, o que se permite concluir que o peptídeo pode apresentar as três conformações colocadas acima.

Este resultado, inédito em relação às interações a nível molecular da estrutura do microdomínio da região N-terminal da HsDHODH, vem ao encontro com as descrições na literatura sobre esta porção da enzima. Esta região foi descrita em estu-

Resultados e Discussão

dos anteriores como fundamental para a reatividade desta enzima, atuando como uma fenda e "blindando" o FMN e o orotato da exposição aos solventes. Os dados obtidos podem permitir a suposição que quando a enzima está prestes a realizar a catálise, necessitando da ubiquinona como aceptor de elétrons, há uma mudança conformacional desta região, abrindo a "porta" do barril catalítico. A mudança conformacional permite a entrada da ubiquinona, dispersa na membrana para dentro da enzima. Este tipo de mudança conformacional já foi descrito como o aparecimento do "defeito" em vesículas de DOPC para enzimas de *E. coli*, que também são de classe 2.¹⁵ As duas componentes evidenciadas nos espectros de CW-RPE também corroboram o fato de que esta hélice está biparticionada na membrana.

Além disso, para as vesículas trifásicas contendo ubiquinona, não se notou nenhuma diferença nas distâncias interspins quando se compara às vesículas sem ubiquinona. Isto significa que as ubiquinonas não se ligam fortemente à estrutura peptídica.

5 CONCLUSÕES

- A metodologia de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida, utilizando-se a estratégia Fmoc, mostrou-se viável para a obtenção do peptídeo original N-t(DH) e dos peptídeos substituídos com o aminoácido TOAC, além dos análogos duplamente marcados. O principal problema foi o acoplamento do aminoácido após o grupo TOAC que se mostrou difícil, necessitando de condições mais agressivas e de agentes acoplantes mais reativos. A clivagem utilizando TFA causou a protonação do grupo NO existente no TOAC, necessitando da realização de uma etapa de reversão. Pela cromatografia líquida em alta performance utilizando-se de solventes diferentes dos usuais (menor acidez) foi possível purificar os materiais de interesse. Por meio da espectrometria de massas, os peptídeos foram caracterizados, confirmando sua obtenção.
 - Os experimentos de CD em solução aquosa, em TFE, SDS e LPC indicaram que os peptídeos sofrem alterações estruturais quando migram do meio aquoso para estes meios, passando de uma estrutura ao acaso para uma estrutura helicoidal, estruturação esta condizente com a literatura. Estes dados também sugerem que o peptídeo mimetiza em termos estruturais a região N-terminal da enzima *HsDHODH*. Somado a isto, interações diferentes do peptídeo com micelas e vesículas foram encontradas, resultado este sugerido pelos espectros diferentes, podendo indicar uma possível reorientação de hélices.
 - Os dados de fluorescência confirmaram que o peptídeo interage com os miméticos de membrana estudados (vesículas de DPPC e micelas de LPC).
 - Os resultados da interação do peptídeo N-t(DH) e as monocamadas constituídas pelos lipídios mais abundantes da membrana interna mitocondrial mostraram que o peptídeo apresentou a interação mais forte com o DPPE. A interação entre o peptídeo e todos os lipídios foi bem evidente, mas em altos valores de pressão de superfície (superiores a
-

Conclusões

30 mN m⁻¹, valor correspondente ao empacotamento lipídico da membrana) diferentes comportamentos foram evidenciados, dependendo do lipídio.

- A técnica de PM-IRRAS nos permitiu coletar informações sobre a orientação e conformação do peptídeo: este possui pouco ou nenhum efeito no empacotamento ou orientação da CL; em DPPC, ele muda sua orientação com a compressão da monocamada e em DPPE o peptídeo interage fortemente, mas devido ao alto empacotamento é expelido da monocamada com o aumento da compressão. Os dados de compressibilidade confirmam estes resultados. As mudanças de orientação do peptídeo nas monocamadas são também uma evidência da mobilidade estrutural do peptídeo.
 - Os dados de RPE indicam que todos os peptídeos análogos interagem com os miméticos de membrana estudados, sendo que a posição 12 apresenta a menor mobilidade. A posição 20 parece indicar duas populações, uma em solução e outra incorporada à membrana, mostrando provavelmente a mudança conformacional sentida por esta região quando ocorre a interação com o substrato. O análogo [TOAC⁰]N-t(DH) evidenciou a maior mobilidade do marcador de spin, sofrendo leves alterações nas linhas espectrais quando foi adicionada cardiolipina ao sistema, apresentando um pequeno aumento de imobilidade do sistema.
 - Os resultados obtidos de DEER mostraram que o peptídeo interage diferentemente com os lipídios existentes na membrana interna da mitocôndria e apresenta três conformações bem distintas: 1) a primeira não estruturada em solução; 2) uma mais "fechada" em micelas; e 3) uma conformação mais "aberta" em vesículas. Estas três diferentes afinidades e conformações podem estar relacionadas as mudanças conformacionais desta região na enzima e ligadas diretamente à acessibilidade do substrato ao sítio ativo desta proteína.
-

REFERÊNCIAS

- 1 FAIRBANKS, L. D.; BOFILL, M.; RUCKEMANN, K.; SIMMONDS, H. A. Importance of ribonucleotide availability to proliferating T-lymphocytes from healthy humans. Disproportionate expansion of pyrimidine pools and contrasting effects of de novo synthesis inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 50, p. 29682-29689, 1995.
 - 2 CUTOLO, M.; SULLI, A.; GHIORZO, P.; PIZZORNI, C.; CRAVIOTTO, C.; VILLAGGIO, B. Anti-inflammatory effects of leflunomide on cultured synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 4, p. 297-302, 2003.
 - 3 SIMMONDS, H. A. Enzymes of nucleotide biosynthesis: differences between intact and lysed cells as well as between species and tissues can be important. **Biochemical Society Transactions**, v. 23, n. 4, p. 877-879, 1995.
 - 4 LOFFLER, M.; FAIRBANKS, L. D.; ZAMEITAT, E.; MARINAKI, A. M.; SIMMONDS, H. A. Pyrimidine pathways in health and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 9, p. 430-437, 2005.
 - 5 JONES, M. E. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 253-279, 1980.
 - 6 NORAGER, S.; JENSEN, K. F.; BJORNBERG, O.; LARSEN, S. *E. coli* dihydroorotate dehydrogenase reveals structural and functional distinctions between different classes of dihydroorotate dehydrogenases. **Structure**, v. 10, n. 9, p. 1211-1223, 2002.
 - 7 HURT, D. E.; WIDOM, J.; CLARDY, J. Structure of *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase with a bound inhibitor. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 62, p. 312-323, 2006.
 - 8 ROWLAND, P.; NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. The crystal structure of the flavin containing enzyme dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis*. **Structure**, v. 5, n. 2, p. 239-252, 1997.
 - 9 PINHEIRO, M. P.; IULEK, J.; NONATO, M. C. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase from Y strain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, n. 3, p. 812-817, 2008.
 - 10 SORENSEN, P. G.; DANDANELL, G. A new type of dihydroorotate dehydrogenase, type 1S, from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. **Extremophiles**, v. 6, n. 3, p. 245-251, 2002.
-

Referências

- 11 LIU, S. P.; NEIDHARDT, E. A.; GROSSMAN, T. H.; OCAIN, T.; CLARDY, J. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. **Structure with Folding & Design**, v. 8, n. 1, p. 25-33, 2000.
- 12 COWEN, D.; BEDINGFIELD, P.; MCCONKEY, G. A.; FISHWICK, C. W. G.; JOHNSON, A. P. A study of the effects of substituents on the selectivity of the binding of N-arylaminoethylene malonate inhibitors to DHODH. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 3, p. 1284-1287, 2010.
- 13 BAUMGARTNER, R.; WALLOSCHKE, M.; KRALIK, M.; GOTSCHLICH, A.; TASLER, S.; MIES, J.; LEBAN, J. Dual binding mode of a novel series of DHODH inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 1239-1247, 2006.
- 14 COUTO, S. G.; NONATO, M. C.; COSTA FILHO, A. J. Site directed spin labeling studies of *Escherichia coli* dihydroorotate dehydrogenase N-terminal extension. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, n. 3, p. 487-492, 2011.
- 15 COUTO, S. G.; NONATO, M. C.; COSTA FILHO, A. J. Defects in vesicle core induced by *Escherichia coli* dihydroorotate dehydrogenase. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 5, p. 1746-1753, 2008.
- 16 PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- 17 RAWLS, J.; KNECHT, W.; DIEKERT, K.; LILL, R.; LOFFLER, M. Requirements for the mitochondrial import and localization of dihydroorotate dehydrogenase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 7, p. 2079-2087, 2000.
- 18 KNECHT, W.; BERGJOHANN, U.; GONSKI, S.; KIRSCHBAUM, B.; LOFFLER, M. Functional expression of a fragment of human dihydroorotate dehydrogenase by means of the baculovirus expression vector system, and kinetic investigation of the purified recombinant enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v. 240, n. 1, p. 292-301, 1996.
- 19 PAINTER, H. J.; MORRISEY, J. M.; MATHER, M. W.; VAIDYA, A. B. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 446, n. 7131, p. 88-91, 2007.
- 20 HANSEN, M.; LE NOURS, J.; JOHANSSON, E.; ANTAL, T.; ULLRICH, A.; LOFFLER, M.; LARSEN, S. Inhibitor binding in a class 2 dihydroorotate dehydrogenase causes variations in the membrane-associated N-terminal domain. **Protein Science**, v. 13, n. 4, p. 1031-1042, 2004.
-

Referências

- 21 McLEAN, J. E.; NEIDHARDT, E. A.; GROSSMAN, T. H.; HEDSTROM, L. Multiple inhibitor analysis of the brequinar and leflunomide binding sites on human dihydroorotate dehydrogenase. **Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 2194-2200, 2001.
- 22 CHEN, S. F.; PERRELLA, F. W.; BEHRENS, D. L.; PAPP, L. M. Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase activity by brequinar sodium. **Cancer Research**, v. 52, n. 13, p. 3521-3527, 1992.
- 23 ULLRICH, A.; KNECHT, W.; FRIES, M.; LOFFLER, M. Recombinant expression of N-terminal truncated mutants of the membrane bound mouse, rat and human flavoenzyme dihydroorotate dehydrogenase: a versatile tool to rate inhibitor effects? **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 6, p. 1861-1868, 2001.
- 24 WALSE, B.; DUFE, V. T.; SVENSSON, B.; FRITZSON, I.; DAHLBERG, L.; KHAIROULLINA, A.; WELLMAR, U.; AL-KARADAGHI, S. The structures of human dihydroorotate dehydrogenase with and without inhibitor reveal conformational flexibility in the inhibitor and substrate binding sites. **Biochemistry**, v. 47, n. 34, p. 8929-8936, 2008.
- 25 CHEN, J. J.; JONES, M. E. The cellular location of dihydroorotate dehydrogenase: relation to de novo biosynthesis of pyrimidines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 176, n. 1, p. 82-90, 1976.
- 26 MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.
- 27 CILLI, E. M.; VICENTE, E. F.; CRUSCA JUNIOR, E.; NAKAIE, C. R. EPR investigation of the influence of side chain protecting groups on peptide-resin solvation of the Asx and Glx model containing peptides. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 31, p. 5521-5524, 2007.
- 28 CILLI, E. M.; MARCHETTO, R.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R. Correlation between the mobility of spin-labeled peptide chains and resin solvation: an approach to optimize the synthesis of aggregating sequences. **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 25, p. 9118-9123, 1999.
- 29 CILLI, E. M.; MARCHETTO, R.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R. Use of spin label EPR spectra to monitor peptide chain aggregation inside resin beads. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n. 4, p. 517-520, 1997.
- 30 CESPEDES, G. F.; VICENTE, E. F.; CILLI, E. M.; JUBILUT, G. N.; NAKAIE, C. R. Use of FTIR in the obtention of resins and peptides synthesis in solid phase. **Quimica Nova**, v. 34, n. 4, p. 589-594, 2011.
-

Referências

- 31 VICENTE, E. F.; BASSO, L. G.; CESPEDES, G. F.; LORENZON, E. N.; CASTRO, M. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; COSTA FILHO, A. J.; CILLI, E. M. Dynamics and conformational studies of TOAC spin labeled analogues of Ctx(Ile²¹)-Ha peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60818, 2013.
 - 32 CESPEDES, G. F.; LORENZON, E. N.; VICENTE, E. F.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FONTES, W.; CASTRO, M. D. S.; CILLI, E. M. Mechanism of action and relationship between structure and biological activity of Ctx-Ha: a new ceratotoxin-like peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. **Protein and Peptide Letters**, v. 19, n. 6, p. 596-603, 2012.
 - 33 CRUSCA JUNIOR, E.; REZENDE, A. A.; MARCHETTO, R.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction and secondary structure of the antimicrobial peptide Hylin-a1. **Biopolymers**, v. 96, n. 1, p. 41-48, 2011.
 - 34 CILLI, E. M.; PIGOSSI, F. T.; CRUSCA JUNIOR, E.; ROS, U.; MARTINEZ, D.; LANIO, M. E.; ALVAREZ, C.; SCHREIER, S. Correlations between differences in amino-terminal sequences and different hemolytic activity of sticholysins. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1201-1204, 2007.
 - 35 CARPINO, L. A.; HAN, G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. **Journal of Organic Chemistry**, v. 37, n. 22, p. 3404-3409, 1972.
 - 36 HUBBELL, W. L.; GROSS, A.; LANGEN, R.; LIETZOW, M. A. Recent advances in site-directed spin labeling of proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, n. 5, p. 649-656, 1998.
 - 37 HUBBELL, W. L.; CAFISO, D. S.; ALTENBACH, C. Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 9, p. 735-739, 2000.
 - 38 HUBBELL, W. L.; ALTENBACH, C. Investigation of structure and dynamics in membrane-proteins using site-directed spin-labeling. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, n. 4, p. 566-573, 1994.
 - 39 CAMPBELL, I. D.; DWEK, R. A. **Biological spectroscopy**. San Francisco: Benjamin/Cummings Publishing, 1984. 404 p.
 - 40 MARSH, D.; TONIOLO, C. Polarity dependence of EPR parameters for TOAC and MTSSL spin labels: correlation with DOXYL spin labels for membrane studies. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 190, n. 2, p. 211-221, 2008.
 - 41 JEZEK, P.; BAUER, M.; TROMMER, W. E. EPR spectroscopy of 5-doxyl-stearic acid bound to the mitochondrial uncoupling protein reveals its competitive displacement by alkylsulfonates in the channel and allosteric displacement by ATP. **Febs Letters**, v. 361, n. 2/3, p. 303-307, 1995.
-

Referências

- 42 KARIM, C. B.; KIRBY, T. L.; ZHANG, Z. W.; NESMELOV, Y.; THOMAS, D. D. Phospholamban structural dynamics in lipid bilayers probed by a spin label rigidly coupled to the peptide backbone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 40, p. 14437-14442, 2004.
 - 43 BARBOSA, S. R.; CILLI, E. M.; LAMY-FREUND, M. T.; CASTRUCCI, A. M. L.; NAKAIE, C. R. First synthesis of a fully active spin-labeled peptide hormone. **Febs Letters**, v. 446, n. 1, p. 45-48, 1999.
 - 44 SCHREIER, S.; BOZELLI JUNIOR, J. C.; MARÍN, N.; VIEIRA, R. F. F.; NAKAIE, C. R. The spin label amino acid TOAC and its uses in studies of peptides: chemical, physicochemical, spectroscopic, and conformational aspects. **Biophysical Reviews**, v. 4, n. 1, p. 45-66, 2012.
 - 45 GHIMIRE, H.; HUSTEDT, E. J.; SAHU, I. D.; INBARAJ, J. J.; McCARRICK, R.; MAYO, D. J.; BENEDIKT, M. R.; LEE, R. T.; GROSSER, S. M.; LORIGAN, G. A. Distance measurements on a dual-labeled TOAC AChR M2 delta peptide in mechanically aligned DMPC bilayers via dipolar broadening CW-EPR spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 12, p. 3866-3873, 2012.
 - 46 GHIMIRE, H.; ABU-BAKER, S.; SAHU, I. D.; ZHOU, A.; MAYO, D. J.; LEE, R. T.; LORIGAN, G. A. Probing the helical tilt and dynamic properties of membrane-bound phospholamban in magnetically aligned bicelles using electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1818, n. 3, p. 645-650, 2012.
 - 47 LOPES, D. D.; POLETTI, E. F.; VIEIRA, R. F. F.; JUBILUT, G. N.; OLIVEIRA, L.; PAIVA, A. C. M.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R. A proposed EPR approach to evaluating agonist binding site of a peptide receptor. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 14, n. 2, p. 121-126, 2008.
 - 48 SCHREIER, S.; BARBOSA, S. R.; CASALLANOVO, F.; VIEIRA, R. D. F.; CILLI, E. M.; PAIVA, A. C. M.; NAKAIE, C. R. Conformational basis for the biological activity of TOAC-labeled angiotensin II and Bradykinin: electron paramagnetic resonance, circular dichroism, and fluorescence studies. **Biopolymers**, v. 74, n. 5, p. 389-402, 2004.
 - 49 JESCHKE, G. DEER Distance measurements on proteins. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 63, p. 419-446, 2012.
 - 50 MILOV, A. D.; PONOMAREV, A. B.; TSVETKOV, Y. D. Electron-electron double-resonance in electron-spin echo: model biradical systems and the sensitized photolysis of decalin. **Chemical Physics Letters**, v. 110, n. 1, p. 67-72, 1984.
 - 51 JESCHKE, G.; POLYHACH, Y. Distance measurements on spin-labelled biomacromolecules by pulsed electron paramagnetic resonance. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, n. 16, p. 1895-1910, 2007.
-

Referências

- 52 SCHIEMANN, O.; PRISNER, T. F. Long-range distance determinations in biomacromolecules by EPR spectroscopy. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 40, n. 1, p. 1-53, 2007.
- 53 BORBAT, P. P.; GEORGIEVA, E. R.; FREED, J. H. Improved sensitivity for long-distance measurements in biomolecules: five-pulse double electron-electron resonance. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 4, n. 1, p. 170-175, 2013.
- 54 PAKE, G. E. Nuclear resonance absorption in hydrated crystals: fine structure of the proton line. **Journal of Chemical Physics**, v. 16, n. 4, p. 327-336, 1948.
- 55 WOODY, R. W.; KOSLOWSKI, A. Recent developments in the electronic spectroscopy of amides and alpha-helical polypeptides. **Biophysical Chemistry**, v. 101, p. 535-551, 2002.
- 56 SCHELLMAN, J. A.; SCHELLMAN, C. The conformation of polypeptide chains in proteins. In: NEURATH, H. **The proteins composition, structure, and function**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1964. v. 2, cap. 7, p. 1-137.
- 57 NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274 p.
- 58 GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006.
- 59 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. New York: Plenum Press, 2006. 954 p.
- 60 OLYMPUS. Microscopic Resource Center. **Jablonski energy diagram**. Pensilvânia, 2012. Disponível em: <<http://www.olympusmicro.com/primer/java/jablonski/jabintro/index.html>>. Acesso em: 21 maio 2013.
- 61 KREIMER, D. I.; MALAK, H.; LAKOWICZ, J. R.; TRAKHANOV, S.; VILLAR, E.; SHNYROV, V. L. Thermodynamics and dynamics of histidine-binding protein, the water-soluble receptor of histidine permease: implications for the transport of high and low affinity ligands. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 13, p. 4242-4252, 2000.
- 62 FERREIRA, M.; CAETANO, W.; ITRI, R.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 502-510, 2005.
- 63 BUFFETEAU, T.; DESBAT, B.; TURLET, J. M. Polarization modulation FT-IR spectroscopy of surfaces and ultra-thin films: experimental procedure and quantitative analysis. **Applied Spectroscopy**, v. 45, n. 3, p. 380-389, 1991.
-

Referências

- 64 ULRICH, W. P.; VOGEL, H. Polarization-modulated FTIR spectroscopy of lipid/gramicidin monolayers at the water interface. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 3, p. 1639-1647, 1999.
- 65 YAMAMOTO, K.; ISHIDA, H. Optical theory applied to infrared spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 8, n. 1, p. 1-36, 1994.
- 66 CASALLANOVO, F.; OLIVEIRA, F. J. F.; SOUZA, F. C.; ROS, U.; MARTINEZ, Y.; PENTON, D.; TEJUCA, M.; MARTINEZ, D.; PAZOS, F.; PERTINHEZ, T. A.; SPISNI, A.; CILLI, E. M.; LANIO, M. E.; ALVAREZ, C.; SCHREIER, S. Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin sticholysin II. **Biopolymers**, v. 84, n. 2, p. 169-180, 2006.
- 67 PERTINHEZ, T. A.; KRYBUS, R.; CILLI, E. M.; PAIVA, A. C. M.; NAKAIE, C. R.; FRANZONI, L.; SARTOR, G.; SPISNI, A.; SCHREIER, S. Conformational flexibility of three cytoplasmic segments of the angiotensin II AT(1A) receptor: a circular dichroism and fluorescence spectroscopy study. **Journal of Peptide Science**, v. 8, n. 1, p. 23-35, 2002.
- 68 CARPINO, L. A.; ELFAHAM, A.; ALBERICIO, F. Racemization studies during solid phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents. **Tetrahedron Letters**, v. 35, n. 15, p. 2279-2282, 1994.
- 69 TONIOLO, C.; CRISMA, M.; FORMAGGIO, F. TOAC, a nitroxide spin-labeled, achiral C-alpha-tetrasubstituted alpha-amino acid, is an excellent tool in material science and biochemistry. **Biopolymers**, v. 47, n. 2, p. 153-158, 1998.
- 70 OLIVEIRA, E.; CILLI, E. M.; MIRANDA, A.; JUBILUT, G. N.; ALBERICIO, F.; ANDREU, D.; PAIVA, A. C. M.; SCHREIER, S.; TOMINAGA, M.; NAKAIE, C. R. Monitoring the chemical assembly of a transmembrane bradykinin receptor fragment: Correlation between resin solvation, peptide chain mobility, and rate of coupling. **European Journal of Organic Chemistry**, v. n. 21, p. 3686-3694, 2002.
- 71 FASMAN, G. D. **Handbook of biochemistry and molecular biology**: proteins. New York: Plenum Press, 1976. v. 3.
- 72 BLACK, M.; TRENT, A.; KOSTENKO, Y.; LEE, J. S.; OLIVE, C.; TIRRELL, M. Self-assembled peptide amphiphile micelles containing a cytotoxic T-cell epitope promote a protective immune response *in vivo*. **Advanced Materials**, v. 24, n. 28, p. 3845-3849, 2012.
- 73 BOZELLI JUNIOR, J. C.; SASAHARA, E. T.; PINTO, M. R. S.; NAKAIE, C. R.; SCHREIER, S. Effect of head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritrpticin to lipid membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, n. 4, p. 365-373, 2012.
- 74 DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta: Reviews on Biomembranes**, v. 822, n. 1, p. 1-42, 1985.
-

Referências

- 75 KREBS, J. J. R.; HAUSER, H.; CARAFOLI, E. Asymmetric distribution of phospholipids in the inner membrane of beef heart mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 12, p. 5308-5316, 1979.
- 76 BLAUDEZ, D.; BUFFETEAU, T.; CORNUT, J. C.; DESBAT, B.; ESCAFRE, N.; PEZOLET, M.; TURLET, J. M. Polarization modulation FTIR spectroscopy at the air-water interface. **Thin Solid Films**, v. 242, n. 1/2, p. 146-150, 1994.
- 77 CAPALDI, R. A. Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane. **Biochimica et Biophysica Acta: Reviews on Biomembranes**, v. 694, n. 3, p. 291-306, 1982.
- 78 MALMQUIST, N. A.; GUJJAR, R.; RATHOD, P. K.; PHILLIPS, M. A. Analysis of flavin oxidation and electron-transfer inhibition in *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. **Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 2466-2475, 2008.
- 79 MARCHETTO, R.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R. A novel spin-labeled amino acid derivative for use in peptide synthesis: (9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 23, p. 11042-11043, 1993.
- 80 NAKAIE, C. R.; SCHREIER, S.; PAIVA, A. C. M. Synthesis and properties of spin-labeled angiotensin derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 742, n. 1, p. 63-71, 1983.
- 81 HAYASHI, H.; YAMANAKA, T.; MIYAJIMA, M.; IMAE, T. Aggregation numbers and shapes of lysophosphatidylcholine and lysophosphatidylethanolamine micelles. **Chemistry Letters**, v. 23, n. 12, p. 2407, 1994.
- 82 HABERLAND, M. E.; REYNOLDS, J. A. Interaction of L-alpha-palmitoyl lysophosphatidylcholine with the AI polypeptide of high density lipoprotein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 17, p. 6636-6639, 1975.
- 83 NICHOLS-SMITH, S.; TEH, S. Y.; KUHL, T. L. Thermodynamic and mechanical properties of model mitochondrial membranes. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1663, n. 1/2, p. 82-88, 2004.
- 84 DUNCAN, S. L.; LARSON, R. G. Comparing experimental and simulated pressure-area isotherms for DPPC. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 8, p. 2965-2986, 2008.
- 85 GIDALEVITZ, D.; ISHITSUKA, Y. J.; MURESAN, A. S.; KONOVALOV, O.; WARING, A. J.; LEHRER, R. I.; LEE, K. Y. C. Interaction of antimicrobial peptide protegrin with biomembranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 11, p. 6302-6307, 2003.
- 86 SCHALKE, M.; KRUGER, P.; WEYGAND, M.; LOSCHE, M. Submolecular organization of DMPA in surface monolayers: beyond the two-layer model. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1464, n. 1, p. 113-126, 2000.
-

Referências

- 87 GEORGALLAS, A.; PINK, D. A. Phase transitions in monolayers of saturated lipids: exact results and Monte Carlo simulations. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 89, n. 1, p. 107-116, 1982.
- 88 GARIDEL, P.; BLUME, A. 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DMPG) monolayers: influence of temperature, pH, ionic strength and binding of alkaline earth cations. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 138, n. 1/2, p. 50-59, 2005.
- 89 LAVOIE, H.; BLAUDEZ, D.; VAKNIN, D.; DESBAT, B.; OCKO, B. M.; SALESSE, C. eSpectroscopic and structural properties of valine gramicidin A in monolayers at the air-water interface. **Biophysical Journal**, v. 83, n. 6, p. 3558-3569, 2002.
- 90 WEIS, M.; VANCO, M.; VITOVIC, P.; HIANIK, T.; CIRAK, J. Study of gramicidin A-phospholipid interactions in Langmuir monolayers: analysis of their mechanical, thermodynamical, and electrical properties. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 51, p. 26272-26278, 2006.
- 91 RUIZ-GARCIA, J.; MORENO, A.; BREZESINSKI, G.; MOHWALD, H.; MAS-OLIVA, J.; CASTILLO, R. Phase transitions and conformational changes in monolayers of human apolipoproteins CI and AII. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 40, p. 11117-11124, 2003.
- 92 NAKAHARA, H.; NAKAMURA, S.; LEE, S.; SUGIHARA, G.; SHIBATA, O. Influence of a new amphiphilic peptide with phospholipid monolayers at the air-water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 270/271, p. 52-60, 2005.
- 93 DYCK, M.; KERTH, A.; BLUME, A.; LOSCHE, M. Interaction of the neurotransmitter, neuropeptide Y, with phospholipid membranes: infrared spectroscopic characterization at the air/water interface. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 44, p. 22152-22159, 2006.
- 94 SCHLAME, M.; REN, M. D. The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. **Biochimica Et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1788, n. 10, p. 2080-2083, 2009.
- 95 MENDELSON, R.; MAO, G.; FLACH, C. R. Infrared reflection-absorption spectroscopy: principles and applications to lipid-protein interaction in Langmuir films. **Biochimica Et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1798, n. 4, p. 788-800, 2010.
- 96 MEINDERS, M. B. J.; VAN DEN BOSCH, G. G. M.; DE JONGH, H. H. J. Adsorption properties of proteins at and near the air/water interface from IRRAS spectra of protein solutions. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 30, n. 4, p. 256-267, 2001.
- 97 HUBNER, W.; BLUME, A. Interactions at the lipid-water interface. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 96, n. 1/2, p. 99-123, 1998.
-

Referências

- 98 BUI, T. T. T.; FORMAGGIO, F.; CRISMA, M.; MONACO, V.; TONIOLO, C.; HUSSAIN, R.; SILIGARDI, G. TOAC: a useful C-alpha-tetrasubstituted alpha-amino acid for peptide conformational analysis by CD spectroscopy in the visible region. Part I. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2**, v. 5, p. 1043-1046, 2000.
- 99 INNOVAGEN. **Peptide property calculator**. Lund, 2012. Disponível em: <<http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>>. Acesso em: 02 jun. 2013.
- 100 HOLZWARTH, G.; DOTY, P. The ultraviolet circular dichroism of polypeptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, n. 2, p. 218-228, 1965.
- 101 CORREA, D. H. A. A. R.; CARLOS, H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, n. 5, p. 164-173, 2009.
- 102 TABORSKY, G. Optical rotatory dispersion and circular dichroism of phosvitin at low pH. Reversible transition between unordered conformation and beta structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 22, p. 6014-6020, 1968.
- 103 BRADLEY, E. K.; THOMASON, J. F.; COHEN, F. E.; KOSEN, P. A.; KUNTZ, I. D. Studies of synthetic helical peptides using circular dichroism and nuclear magnetic resonance. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 4, p. 607-622, 1990.
- 104 ZHOU, N. E.; KAY, C. M.; HODGES, R. S. Synthetic model proteins. Positional effects of interchain hydrophobic interactions on stability of two-stranded alpha-helical coiled-coils. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 4, p. 2664-2670, 1992.
- 105 REINGEWERTZ, T. H.; SHALEV, D. E.; SUKENIK, S.; BLATT, O.; ROTEM-BAMBERGER, S.; LEBENDIKER, M.; LARISCH, S.; FRIEDLER, A. Mechanism of the interaction between the intrinsically disordered C-terminus of the pro-apoptotic ARTS protein and the Bir3 domain of XIAP. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24655, 2011.
- 106 HICKS, M. R.; HOLBERTON, D. V.; KOWALCZYK, C.; WOOLFSON, D. N. Coiled-coil assembly by peptides with non-heptad sequence motifs. **Folding & design**, v. 2, n. 3, p. 149-158, 1997.
- 107 KLARE, J. P.; STEINHOFF, H. J. Spin labeling EPR. **Photosynthesis Research**, v. 102, n. 2/3, p. 377-390, 2009.
- 108 CLAYPOOL, S. M. Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1788, n. 10, p. 2059-2068, 2009.
-