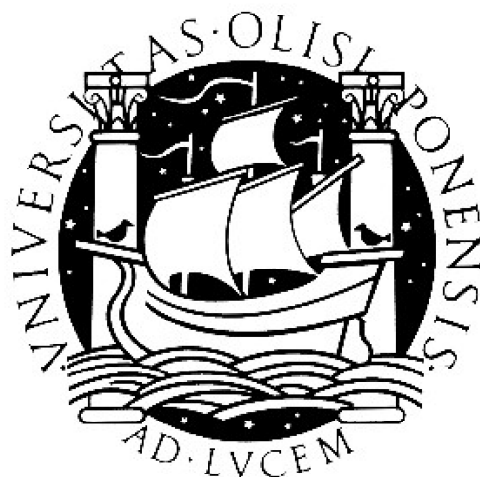


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Avaliação *in silico* da tioredoxina redutase como
alvo para terapia anti-tumoral**

Ana Sofia Cardoso Capacho

Dissertação
Mestrado em Química Inorgânica Biomédica
- Aplicações em Diagnóstico e Terapia

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Avaliação *in silico* da tioredoxina redutase como
alvo para a terapia anti-tumoral**

Ana Sofia Cardoso Capacho

Dissertação orientada pelo Prof. Doutor Miguel Machuqueiro
e pelo Prof. Doutor Vítor Teixeira

Mestrado em Química Inorgânica Biomédica -
Aplicações em Diagnóstico e Terapia

2012

Abstract

Thioredoxin reductase (TrxR) is a crucial enzyme in cellular protection by reducing oxygen reactive species. Its function depends on the transfer of reductive equivalents from NADPH to thioredoxin (Trx) by creating several disulfide bonds along the opposite way. The protein presents two main redox centres: the N-terminal close to FAD group and the C-terminal with the pair Cys497/Sec498, responsible for Trx coupling. Using a shuttle effect, C-terminal redox center is flexible enough to bring reductive equivalents from the N-terminal redox center almost 20 Å apart. The reduction of several electrophilic substrates is possible since the enzyme presents a highly reactive selenocysteine at this catalytic site. At different moments of its catalytic cycle, the general reactivities of Sec498 and Cys497 were studied by determining their pK_a values. The deprotonated species are the real nucleophilic agent and the pK_a values of these residues define the amount of thiolate/selenolate available at physiologic pH., Molecular Dynamics Simulations and pK_a value calculations were performed varying some protonation/redox features of FAD, Cys59/Cys64, Cys497/Sec498 and also histidine residues. MD Simulations with oxidized Sec498 through a Trx disulfide bond or a potential inhibitor were also performed. By introducing this auranofin derived inhibitor, we studied its mechanism and its effect on Cys497 pK_a , a pivotal residue in TrxR regeneration. The pK_a calculations were performed using linear response approximation (LRA) with Poisson-Boltzmann and Monte Carlo.

In all systems we followed the distance profiles between N and C-terminal redox centres. The system with a reduced N-terminal and an oxidized C-terminal presented the shortest distance. These results are in accordance with the known mechanism and shows an approximation between the two centres whenever there is a need to transfer electrons. Cys497 pK_a values when coupled with Trx or the inhibitor are quite similar, while Sec498 pK_a is significantly lower. The expected difference between Cys497 and Sec498 pK_a values represents a significant difference in the ionized species availability and therefore in its reactivity for substrate

Resumo

A Tioredoxina Redutase (TrxR) é uma enzima fundamental para a redução de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para a proteção celular. A sua ação passa pela transferência de equivalentes redutores do NADPH para a Tioredoxina (Trx) através da formação de várias pontes persulfureto e transferindo-as no sentido contrário. A proteína tem dois centros redox principais: o N-terminal junto ao grupo FAD; e o C-terminal onde se encontra a dupla Cys497/Sec498 que estabelece a ligação à Trx. O centro redox do C-terminal tem mobilidade suficiente para, através do efeito shuttle, ir buscar os equivalentes redutores ao centro redox N-terminal e trazê-los até à zona de interface com a TRx, numa distância de quase 20 Å. A presença de uma selenocisteína neste sítio catalítico permite à proteína reduzir uma grande variedade de substratos eletrofílicos usando a grande reatividade do grupo selenato. As reatividades genéricas da Sec498 e da Cys497 da TrxR foram avaliadas a partir dos seus valores de pK_a , em diferentes momentos do ciclo catalítico. Os valores de pK_a destes resíduos definem a quantidade de tiolato/selenato disponível a pH fisiológico, sendo que é esta espécie desprotonada o verdadeiro agente nucleofílico. O cálculo dos valores de pK_a foi realizado em conjunto com simulações de Dinâmica Molecular em que foram variados alguns estados de protonação/redox do FAD, Cys59/Cys64, Cys497/Sec498 e também nas histidinas. Foram também realizadas simulações onde a Sec498 se encontra oxidada com ligação persulfureto à Trx bem como a um possível inibidor da TrxR. Com a introdução neste estudo de um inibidor derivado da aurofosfina, pretendeu-se estudar o seu modo de ação e o seu efeito no pK_a da Cys497, resíduo essencial na regeneração da TrxR.

Os valores de pK_a da Cys497 quando acoplada à Trx ou ao inibidor são relativamente semelhantes, já o valor do pK_a da Sec498 é bastante mais baixo. A esperada diferença de valores de pK_a entre a Cys497 e a Sec498 traduz-se numa grande diferença na disponibilidade da espécie ionizada e conseqüentemente na

reatividade pelo substrato. Nas diferentes simulações foram analisados os perfis de distância entre os centros redox N- e C-terminais. O sistema em que se verifica a menor distância é o que corresponde ao centro N-terminal reduzido e o centro C-terminal oxidado. Este resultado está em excelente acordo com o mecanismo que se conhece e mostra a tendência para a aproximação entre os dois centros redox quando há necessidade em transferir elétrons.

Palavras-chave - tioredoxina redutase, tioredoxina, pK_a , selenocisteína, Dinâmica Molecular, inibidor, aurofosfina

Agradecimentos

Aos meus orientadores Doutor Miguel Machuqueiro e Doutor Vitor Teixeira, por terem acreditado que eu seria capaz de desenvolver este trabalho. Agradeço a forma dedicada como orientaram esta tese de mestrado, a grande generosidade que tiveram para comigo nos conhecimentos transmitidos, a total disponibilidade demonstrada e principalmente a enorme paciência.

À Professora Maria Helena Garcia por me ter aberto esta janela de oportunidade e ter dado a conhecer este grupo de elevada qualidade técnica e humana.

À Professora Maria José Calhorda por ser uma referência nesta área de investigação e ter generosamente contribuído para este trabalho em momentos críticos, dando as suas opiniões com base na sua grande experiência.

Ao João Henriques e Diogo Vila Viçosa por me terem proporcionado um ótimo ambiente de trabalho, a ajuda e companheirismo, especialmente no início em que tudo me parecia impossível.

À Julieta Cunha do Gabinete de Estudos Pós-graduados que ao longo de dois anos esteve sempre disponível para responder a todas as dúvidas.

A todo o Departamento de Química e Bioquímica da FCUL pelo enorme profissionalismo, simpatia e espírito de entreaajuda que está bem patente em todos os elementos, sem exceção.

Aos meus colegas do Hospital Garcia de Orta que sempre me apoiaram neste projeto, apoio esse fundamental para a concretização deste projeto.

Ao meu marido Miguel pelo apoio incondicional e pelas idas ao colégio e refeições improvisadas, ao meu querido filho Lourenço e à minha pequena Júlia cujo início de vida coincidiu com o início deste Curso de Mestrado.

Índice

Abstract	i
Resumo.....	iii
Agradecimentos	v
Lista de abreviaturas.....	viii
Capítulo 1 Introdução.....	1
a. Tiorredoxina redutase (superfamília).....	1
b. Tiorredoxina redutase (função).....	2
c. Tiorredoxina redutase (estrutura - mecanismo)	5
d. TrxR como alvo terapêutico	13
e. Particularidades dos inibidores com ouro (modo de ação)	16
f. Inibidores testados em Saragoça.....	21
g. Reatividade das cisteínas e selenocisteínas.....	23
h. Papel das técnicas computacionais como fonte de informação ao nível molecular	23
i. Objetivos da tese	24
Capítulo 2 Teoria e métodos	26
a. Mecânica Quântica	26
b. Mecânica Molecular/Dinâmica Molecular (MM/DM).....	29
c. Eletrostática de contínuo	45
Capítulo 3 Discussão e Resultados.....	56
a. RMSD.....	57
b. RMSF	60
c. Raio de giração	62

d. DSSP	64
e. Equilíbrio	70
f. Análise estrutural do sítio ativo e flexibilidade do C-terminal	71
g. Cálculos pKa (LRA)	74
Capítulo 4 Conclusões	77
Bibliografia	80

Lista de abreviaturas

TrxR	tioredoxina redutase
Trx	tioredoxina
GR	glutathione redutase
FAD	flavina adenina dinucleótido
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido hidreto
Sec	selenocisteína
Cys	cisteína
GPx	glutathioneperoxidase
ASK1	quinase sinalizadora da apoptose 1
ROS	espécies reativas de oxigénio
TXNIP	<i>tioredoxin interacting protein</i>
Grx	glutaredoxina
HIF	<i>hipoxia inducible factor</i>

Capítulo 1

Introdução

a. Tioredoxina redutase (superfamília)

O sistema Tioredoxina (Trx), constituído por Trx, Tioredoxina redutase (TrxR) (EC 1.8.1.9) e nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH), assume um papel fundamental na manutenção do estado redox do meio celular (Holmgren 1995, Nakamura 1997). Os primeiros trabalhos realizados com a enzima TrxR de mamíferos ocorreram a partir de fígado e timo de rato, em que foram isoladas e purificadas como um dímero com duas subunidades idênticas (Holmgren 1977, Luthman 1982). As TrxRs (Fig. 1.1) são flavoproteínas pertencentes à família da piridina-nucleótido dissulfureto oxidoreductase que inclui a glutatióno redutase (GR), a lipoamida desidrogenase e a redutase do ião mercúrico (Williams 1995). Os membros desta família são proteínas homodiméricas em que cada monómero inclui um grupo prostético flavina adenina dinucleótido (FAD), uma região de ligação ao NADPH e um sítio ativo contendo um persulfureto com propriedades redox (Mustacich 2000).

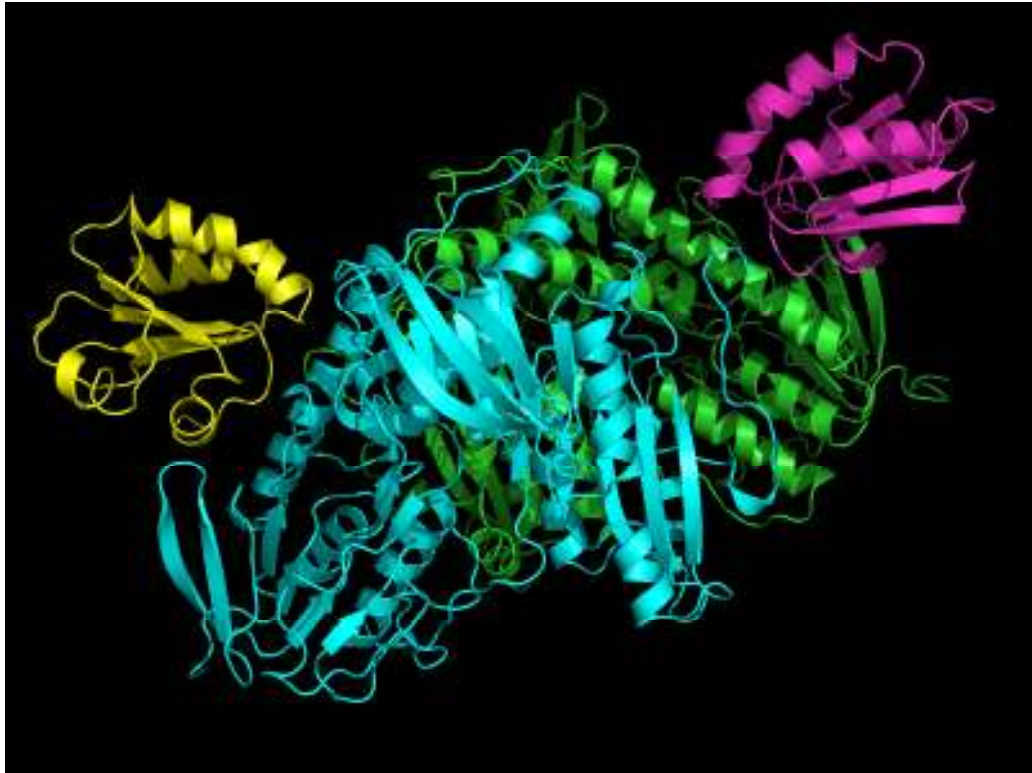


Figura 1. 1 Estrutura cristalográfica da tioredoxina redutase 1 humana em complexo com Trx (baseado no pdb 3FQB)

Nos mamíferos existem três tipos de TrxR: TrxR₁ - a forma citosólica (Holmgren 1995), TrxR₂ - a forma mitocondrial (Lee 1999, Turanov 2006) e a TrxR₃ - existente na fração microsomal do tecido testicular (Arner 2009). O seu principal substrato, a Trx, encontra-se nas células dos mamíferos sob duas formas - a citosólica e nuclear (Trx1, o substrato principal da TrxR1) e a mitocondrial (Trx2)(Holmgren 2005, Lillig 2007). As TrxRs são divididas em duas classes de acordo com o seu peso molecular: as TrxRs isoladas de eucariotas superiores com 55 kDa por subunidade (classe I) e as TrxRs isoladas de plantas, fungos e bactérias com peso molecular de 35 kDa por subunidade (classe II) (Ruggiero 2005).

As TrxRs dos mamíferos são homólogas da GR apresentando em alguns casos um maior grau de semelhança quando comparada com a TrxR de organismos mais simples (por exemplo, a TrxR1 citosólica de rato tem maior semelhança com a GR da mesma espécie que com a TrxR de *Escherichia coli*) (Kuriyan 1991). De facto, as TrxR dos mamíferos são bastante diferentes das TrxR dos organismos mais

simples, em que as primeiras apresentam subunidades maiores de 55 - 60 kDa (Becker 2000) e menor especificidade de substrato, reduzindo não só Trx de diferentes espécies mas também substratos não dissulfuretos como selenito (Kumar 1992), hidroperóxidos lipídicos e peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Zhong 2000).

Para além dos domínios de ligação FAD e NADH, as TrxRs apresentam um domínio de interface e um centro ativo discreto com um resíduo selenocisteína numa sequência C-terminal conservada - Gly-Cys-Sec-Gly. Na enzima oxidada da espécie humana e de rato existem 2 centros redox não flavinas:

- um dissulfureto com a sequência Cys59-Val-Asn-Val-Gly-Cys64 (igual à GR)(Sandalova 2001)
- um selenilsulfureto formado pela Cys497-Sec498, confirmado por espectrometria de massa (Zhong 2000)

b. Tioredoxina redutase (função)

As TrxR são assim chamadas pela sua capacidade de reduzir Trx oxidadas. As Trx são pequenas proteínas (10-12 kDa) com propriedades redox e um sítio catalítico conservado -Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys- que sofre oxidação/redução reversível das duas cisteínas.

O estado oxidativo das proteínas celulares difere consoante a sua localização: as proteínas na membrana celular são ricas em persulfuretos estruturais (refletindo condições oxidativas) enquanto o interior celular mantém-se reduzido com muitos grupos sulfidrilos livres com raros grupos persulfureto. A redutase responsável pela manutenção deste estado reduzido é, em grande parte, a Trx reduzida por eletrões do NADH via TrxR. Esta encontra-se presente na natureza em vários sistemas bioquímicos diferentes (Arner 2000). Outro fator responsável pelos altos níveis de tiol (SH) livre dentro das células é o glutatióno, presente em concentrações milimolares no citoplasma e igualmente mantido reduzido pelo NADH através da GR.

As reações de troca tiol-persulfureto são muito eficientes para o transporte de eletrões já que são rápidas e prontamente reversíveis. Estas são ideais para o controlo da função proteica através de alterações do estado redox de grupos tiol/persulfureto estruturais ou catalíticos. É frequente que a oxidação de um grupo

SH crítico promova a alteração de uma função biológica (Arner 2000). Estas reações funcionam também para proteção contra o stress oxidativo. Designa-se por stress oxidativo uma desregulação do controlo e sinalização redox devido a um desequilíbrio entre oxidantes e redutores (anti-oxidantes) em favor do primeiro (Jones 2006). O estado redox de uma célula depende dos níveis e/ou atividades de várias moléculas:

- anti-oxidantes de baixo peso molecular (ex: ascorbato e α -tocoferol)
- oxidantes (anião superóxido e H_2O_2)
- produtos de oxidação assim como o *ratio* dos pares redox anti-oxidantes/pró-oxidantes
- enzimas anti-oxidantes (ex: TrxR, Superóxido Dismutase, Superóxido redutase, Catalase, Peroxiredoxina, Glutathione Peroxidase ou sistemas relacionados com o glutathione (Nordberg 2001).

A Trx apresenta duas funções primordiais: é um transportador de eletrões necessários para os ciclos catalíticos de enzimas biosintéticas (ribonucleótido redutases, metionina sulfóxido redutases e sulfato redutases) e proteção das proteínas citosólicas da agregação/inativação através da formação de espécies oxidadas de persulfuretos intra ou intermoleculares. Um bom exemplo da sua utilidade é a ligação da $Trx(SH)_2$ à DNA polimerase: se a Trx se encontrar na sua forma oxidada ($Trx(S_2)$) a ligação à DNA polimerase não se realiza (Huber 1987). Também só a espécie $Trx(SH)_2$ forma um complexo inibitório com a quinase sinalizadora da apoptose 1 (ASK₁-quinase) (Saitoh 1998) contribuindo para uma regulação redox deste processo. A ASK₁-quinase é inibida quando a espécie predominante é a Trx (reduzida), ou seja quando existe um baixo stress oxidativo. No entanto, quando a espécie predominante é a Trx oxidada, a apoptose é estimulada (Arner 2000).

A TrxR₁ está envolvida em vários processos celulares essenciais, seja indiretamente através da tioredoxina reduzida, ou diretamente através da redução de substratos que atuam no ADN. A função de defesa antioxidante da TrxR nos mamíferos só adquire um papel importante para elevadas concentrações de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Zhong 2000). Basicamente é importante na regulação da homeostasia celular redox, crescimento e diferenciação celular (Fritz-Wolf 2011). A sua importância em várias doenças torna-a um alvo terapêutico interessante.

Contrariamente à TrxR que suporta a função da Trx, foi descoberta uma outra enzima, a *Tioredoxin interacting protein* (TXNIP) (Chen 1994), que se liga e inibe a forma reduzida da Trx, bloqueando a sua atividade assim como a sua interação com outros fatores incluindo ASK_1 . Esta é uma proteína pró-apoptótica que tem um papel importante na regulação redox, na defesa anti-oxidante, no metabolismo energético, no crescimento celular e sobrevivência (Cadenas 2010).

O resíduo de selenocisteína na tioredoxina redutase está conservado entre espécies de mamíferos numa sequência C-terminal -Gly-Cys-Sec-Gly, essencial para a atividade catalítica (Arner 2000). A atividade redox deste local é fundamental para a atividade biológica da Trx. Como já foi referido, as TrxR são a única classe de enzimas capazes de reduzir a Trx oxidada, sendo possível que alterações na atividade da TrxR regulem algumas atividades da Trx e outros substratos endógenos, tais como a Trx peroxidase, a ribonucleótido redutase entre outros (Fig. 1.2). No entanto, o papel fisiológico da TrxR na redução da maioria destes substratos não é conhecido (Sroka 2007).

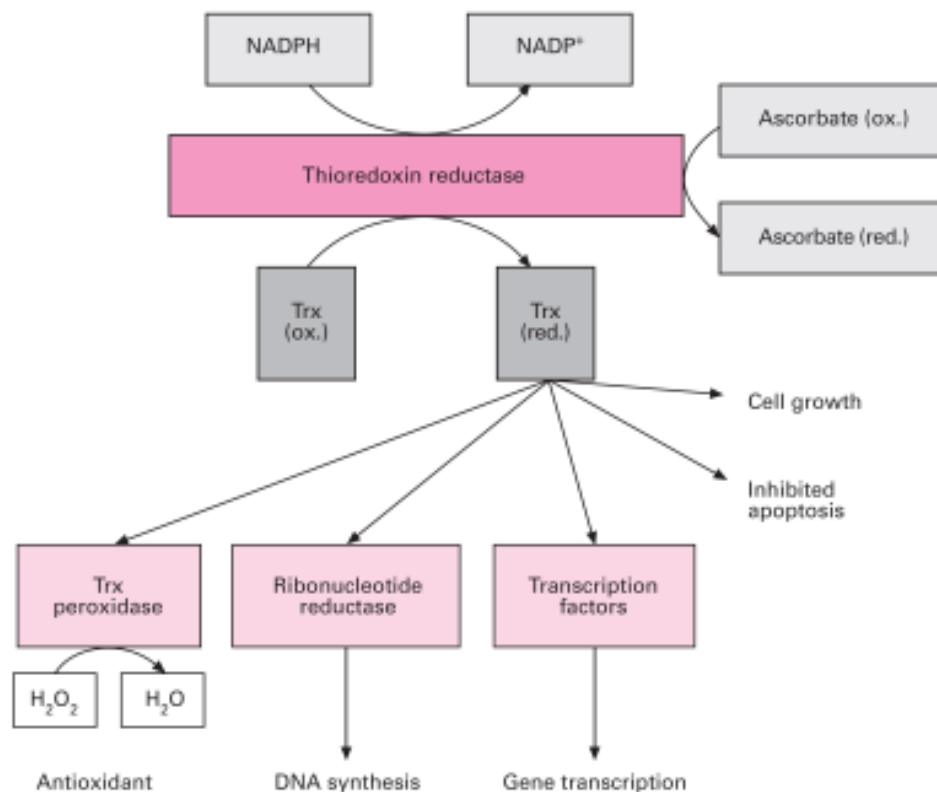


Figura 1.2 Funções da TrxR na célula (adaptado de Mustacich 2000)

Outro sistema redox tiol encontrado nas células é o glutathione redutase/glutathione que, tal como TrxR/Trx (Fig. 1.3) usa o NADPH como fonte de equivalentes redutores. Não existe interação conhecida entre os dois sistemas. O sistema glutathione tem um papel crucial em proteger as macromoléculas celulares de dano devido a ROS e espécies eletrofílicas. Tal como já foi referido apresentam algumas semelhanças: são ambas enzimas pertencentes à família piridina nucleótido-dissulfureto oxidoreductase, com um péptido/proteína redox e apresentam a possibilidade de troca tiol-persulfureto. A principal diferença é que a GR apresenta uma especificidade limitada ao glutathione.

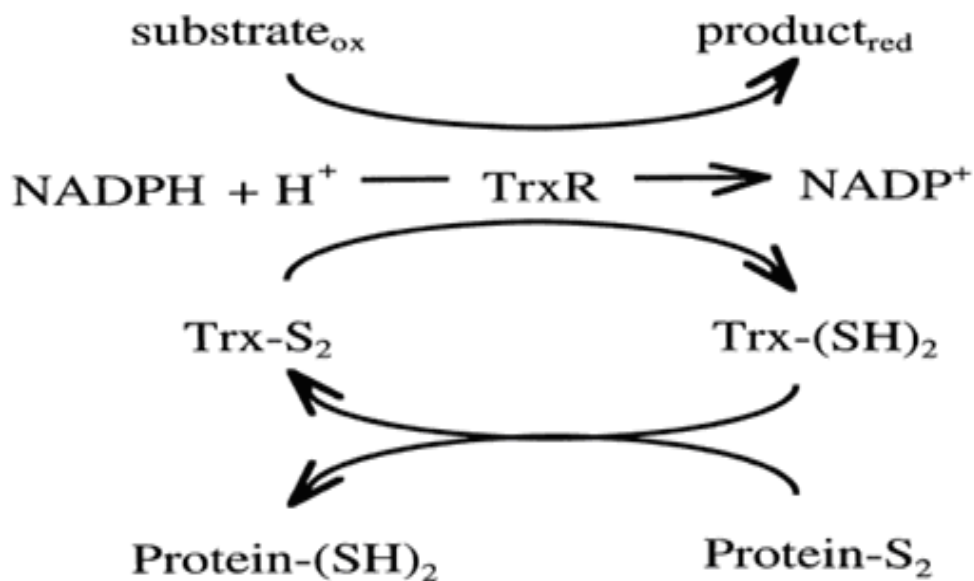


Figura 1.3 Esquema da atividade das oxidoreductases do sistema tioredoxina (Arner 2000)

c. Tioredoxina redutase (estrutura - mecanismo)

A TrxR é uma enzima que apresenta uma elevada homologia entre espécies de mamíferos e entre estas e a GR (Zhong 1998). Sendo as sequências de cDNA grandemente conservadas entre as espécies bovina, de rato e humana (Zhong 1998) e tendo a TrxR a capacidade de reduzir Trx de espécies diferentes (Sandalova 2001) é razoável considerar uma TrxR de mamífero estruturalmente comum às diversas espécies (Holmgren 1989). Assim, foi estudada a TrxR de rato como um representante da TrxR de mamífero (Fig. 1.4). e distinguidos os seguintes domínios (Sandalova 2001):

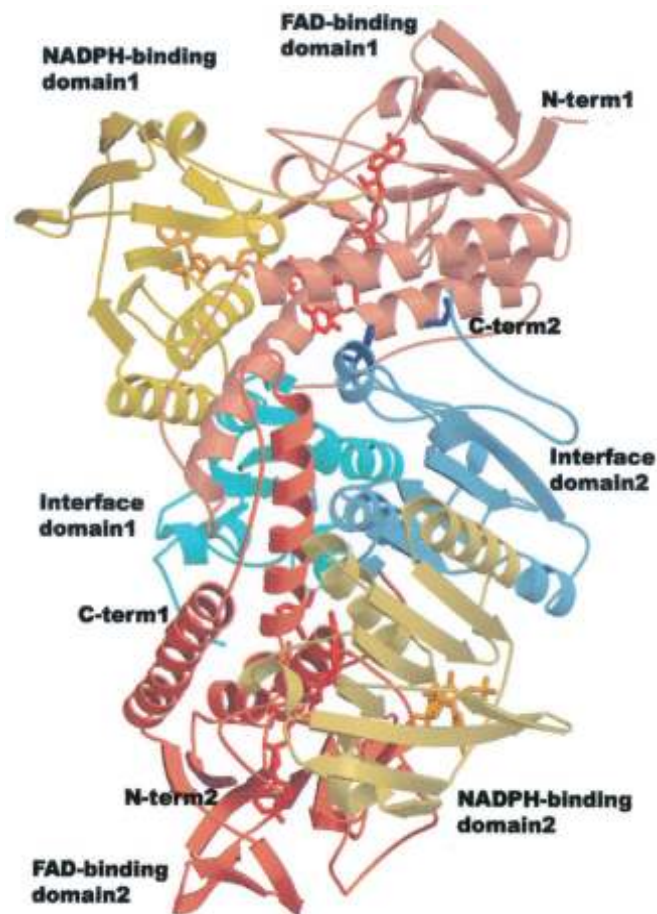


Figura 1.4 Representação em *ribbon* do TrxR de rato (escuro -Sub1, claro-Sub2; vermelho -domínio FAD; amarelo domínio de ligação ao NADP; azul-domínio de interface (Sandalova 2001)

- **Domínio FAD** - dos aminoácidos 1 a 163 e 297 a 367 Sandalova 2001 com *folds* semelhantes aos do domínio NADPH, uma folha β paralela central com cinco segmentos e uma curva β com três folhas empacotadas com uma folha β maior. O outro lado da folha paralela está coberta com várias hélices α , ligando NADP(H) e FAD (Schulz 1978). Há uma inserção no domínio FAD entre o segmento A2 e a hélice $\alpha 2$ que forma dois segmentos β pequenos. O par persulfureto ativo Cys59 e Cys64 na hélice $\alpha 2$ encontra-se no domínio FAD (tal como na GR) e não no NADP (como no TrxR procariota). O co-fator FAD está estreitamente fixado na enzima mas não covalentemente ligado, estando todos os átomos possíveis envolvidos em ligações de hidrogénio. O anel isoaloxazina do FAD empacota-se contra o persulfureto Cys59 e Cys64 (este último mais próximo a 3.6Å). Esta Cys64 é responsável pela formação do

complexo de transferência de cargas tiolato-flavina (Sandalova 2001).

- **Domínio NADP(H)** - dos aminoácidos 164 a 296 - a Coenzima NADP está ligada numa fenda entre FAD e o domínio do NADPH

- **Domínio interface** - dos aminoácidos 368 a 499 - tem 1 folha β antiparalela com cinco segmentos, flanqueada por 4 hélices α ; participa nas interações inter-subunidades e forma uma grande parte do interface do dímero. O braço C-terminal contém a sequência Gly-Cys-Sec-Gly onde se encontra o resíduo essencial selenocisteína que é exclusivo da TrxR dos mamíferos. Os resíduos 470 a 483 são iguais aos últimos da GR. O resíduo Sec é essencial para a atividade catalítica da TrxR porque a sua modificação ou remoção leva à inativação da enzima (Zhong 2000). Os primeiros 3 (Val484-Thr485-Lys486) resíduos do braço C-terminal dirigem-se para a superfície da molécula, antiparalelo à terminação da folha B no domínio da interface. Na Arg487 a cadeia faz uma curva apertada e é paralela a uma folha β externa. Outra curva na Ser495 dirige a última parte da cadeia para o centro redox da segunda subunidade. Os últimos resíduos formam sobretudo ligações de Van der Waals com grupos enzimáticos no sítio ativo. Existe uma ponte de hidrogénio entre o oxigénio da cadeia polipeptídica da Sec498 com o álcool da cadeia lateral da Tyr116. O último resíduo 499 (igual à GR) pode interagir com o glutationo. O grupo carboxílico C-terminal está ancorado à proteína por uma ponte salina com a cadeia lateral Lys-29.

Os sítios ativos estão na interface entre as 2 subunidades, sendo o dímero a unidade funcional da enzima. Na TrxR de rato, dos 30 resíduos que formam a região da interface, 10 são conservados na GR (Sandalova 2001). Comparativamente à TrxR de rato, a TrxR do homem apresenta esta mesma estrutura com a diferença de apresentar uma sequência inicial Asn²-Gly³-Pro⁴ e não Asn²-Asp³-Ser⁴ na região N-terminal (Liu 1996). Efetivamente existe alguma heterogeneidade na região N-terminal da TrxR dos mamíferos (Zhong 1998), pelo que existe a possibilidade da existência de isoenzimas. No entanto, é aceite que a TrxR com um penúltimo resíduo Sec na região C-terminal existe em ratos, bovinos e humanos (Zhong 1998).

O centro redox da região N-terminal da TrxR humana -Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys- é comum à GR e está localizado no domínio FAD; já o da TrxR da Escherichia coli -Cys-Ala-Thr-Cys- é parte do domínio NADPH (Fig. 1.5) (Mustacich 2000).

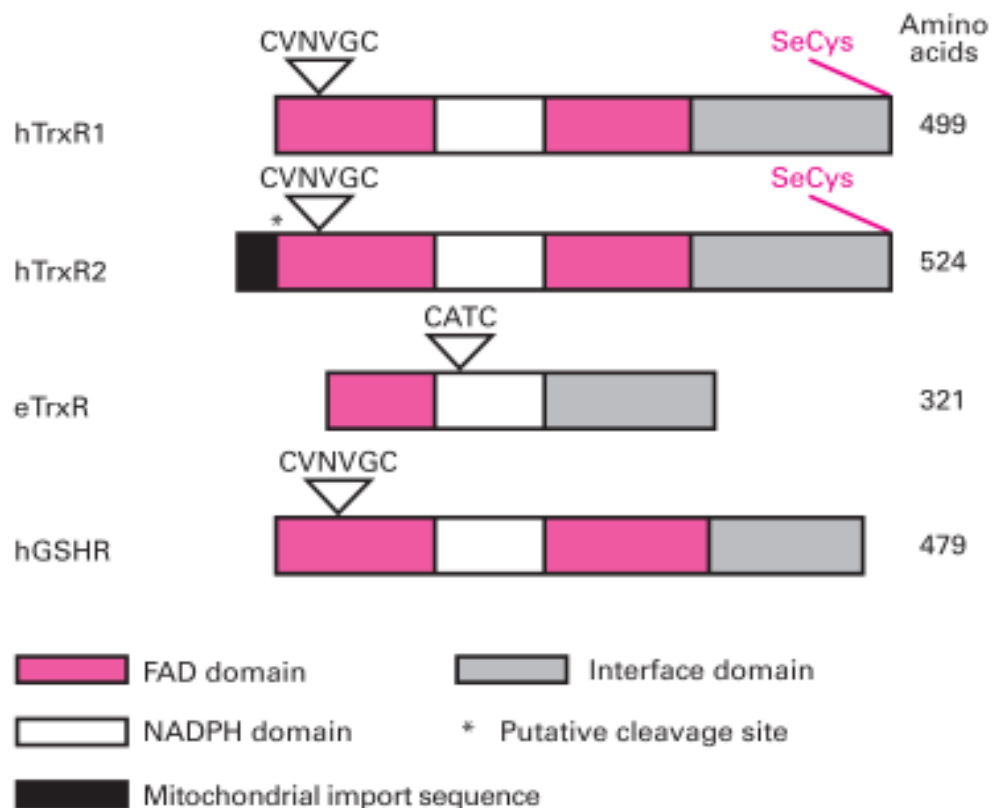


Figura 2.5 Domínios estruturais da TrxR1 humana (hTrxR1), TrxR2 humana (hTrxR2), TrxR de *E. coli* (eTrxR) e glutationato redutase humana (hGSHR) (adaptado de Mustacich 2000)

Como já anteriormente referido, as TrxR são enzimas "promíscuas" capazes de reduzir Trx de espécies diferentes (Oblong 1993), diversas proteínas (Andersson 1996, May 1998), uma grande variedade de substratos fisiológicos (Arner 1996) e vários compostos exógenos (Holmgren 1977). A reatividade da TrxR é conferida principalmente pelo C-terminal catalítico Sec permitindo à enzima reduzir uma miríade de substratos¹. O mecanismo catalítico proposto para a TrxR humana envolve o fato da terminação do C-terminal ser flexível, permitindo que o par -Cys-Sec- transporte equivalentes reduzidos dos resíduos Cys internalizados e mais próximos do grupo FAD (Mustacich 2000).

¹ A presença de Sec nas selenoproteínas é codificada pelo codão UGA, sendo esse frequentemente um codão de terminação da síntese proteica.

Como já foi referido anteriormente, o sistema tioredoxina é composto pela TrxR, NADPH, e o seu substrato principal a Trx. A TrxR reduz a ligação/ponte persulfureto da Trx usando NADH como fonte de eletrões. Durante a catálise, foi proposto um mecanismo de transferência eletrónica (Zhong 2000) com início no NADPH (Fig. 1.6). Os eletrões seriam transferidos do NADPH para o FAD (Fig. 1.6A) e daí reduzindo a ligação persulfureto Cys59-Cys64 na região N-terminal (Fig. 1.6B). Quando necessário, estes eletrões serão transferidos para o par catalítico Cys497-Sec498. O grupo selenato que se mantém desprotonado devido ao seu relativamente baixo pK_a é nucleofílico o suficiente para atacar as cisteínas oxidadas da Trx à superfície da TrxR (Fig. 1.6C). O segundo equivalente redutor é obtido do tiolato da Cys497 (Fig. 1.6C). Após redução da Trx, o par Cys497-Sec498 é novamente regenerado pelo ataque nucleofílico da Cys59 (Fig. 1.6D), com a concomitante formação da ligação persulfureto Cys59-Cys64 (Fig. 1.6E). O ciclo é mantido com a transferência de mais eletrões a partir do NADPH. Assim, os resíduos do C-terminal Cys497-Sec498 de um monómero estão acessíveis aos resíduos N-terminal Cys59 e Cys64 do segundo monómero (Zhong 2000). Isto é apenas possível porque as duas subunidades da TrxR rearranjam-se numa forma "head-to-tail".

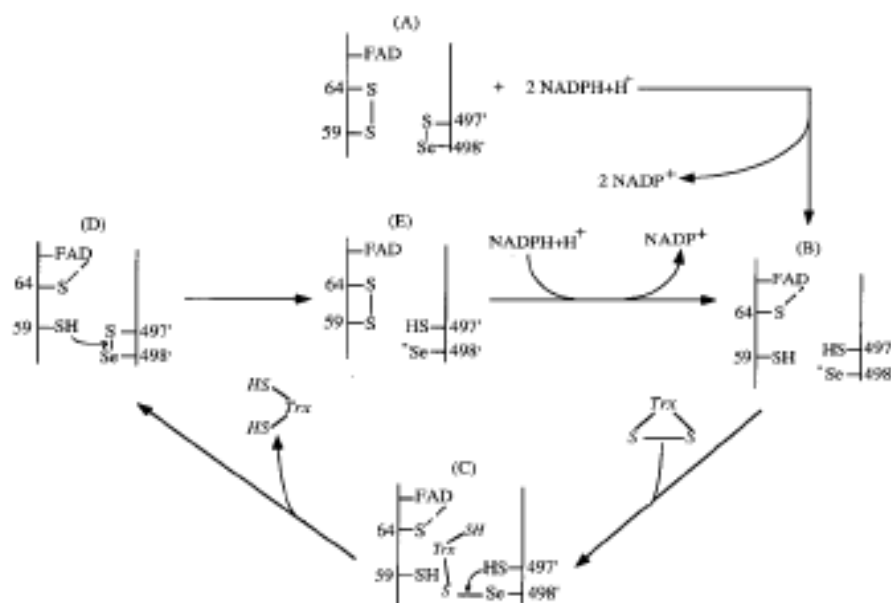


Figura 1.6 Mecanismo proposto da redução da Trx pela TrxR dos mamíferos (Zhong 2000)

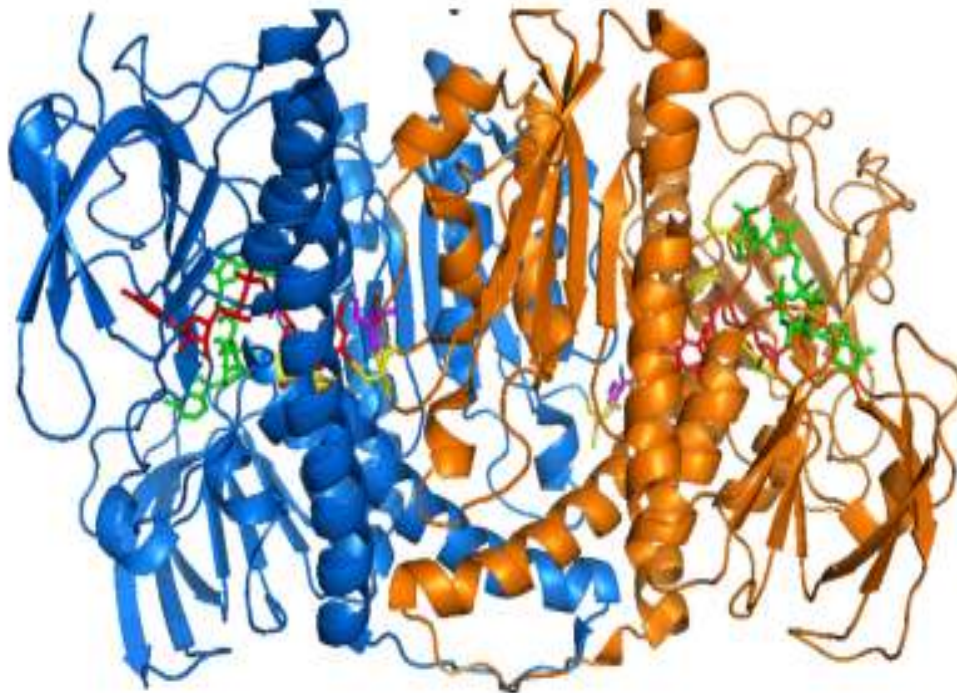


Figura 1.7 Representação de hTrx (PDB 2J3N). As duas subunidades estão representadas a azul e laranja; Cys59, Cys64 e Cys497 estão representadas a amarelo; Sec 498 a magenta; FAD a vermelho e NADP⁺ a verde (adaptado de Bindoli 2009)

A TrxR1 apresenta dois centros redox, ambos necessários para a catálise. O centro N-terminal da TrxR humana (Cys59-Val-Asn-Val-Gly-Cys64) está enterrado na proteína, enquanto o segundo centro, o C-terminal (Cys497 e Sec498) está posicionado num braço da outra subunidade, bastante acessível (Bindoli 2009) (Fig. 1.7). O braço C-terminal da TrxR contém uma extensão de 16 resíduos com um penúltimo resíduo de Sec numa sequência conservada Gly-Cys-Sec-Gly em todos os mamíferos². Este braço C-terminal ondulante tem 2 funções:

- Estender a cadeia de transporte eletrónico da fonte de eletrões do centro catalítico para a superfície enzimática onde pode reagir com a Trx;
- Prevenir o acesso do glutationo ao centro catalítico através de um impedimento estérico.

² A introdução de mais um centro redox foi resultado de uma evolução a partir da GR e não da TrxR dos procariotas. Este salto evolutivo torna o crescimento celular dependente do selénio.

Este braço no C-terminal da TrxR pode adotar diferentes conformações consoante a fase do ciclo catalítico em que se encontra (Fritz-Wolf 2007). Quando ocorre a formação do tetrâmero (TrxR-Trx)₂ (Fig. 1.4), o braço C-terminal da TrxR desloca-se de uma conformação, que Fritz-Wolf (Fritz-Wolf 2011) designou de "posição de espera reduzida" para a superfície da TrxR. Nesta conformação foi sugerido que os três últimos resíduos (497 a 499) orientam-se para a superfície e, após rearranjo, os resíduos 495 a 499 formam uma *turn* β. Nesta estrutura (Fig. 1.8) o centro redox C-terminal da TrxR encontra-se a 20Å do seu centro redox N-terminal.

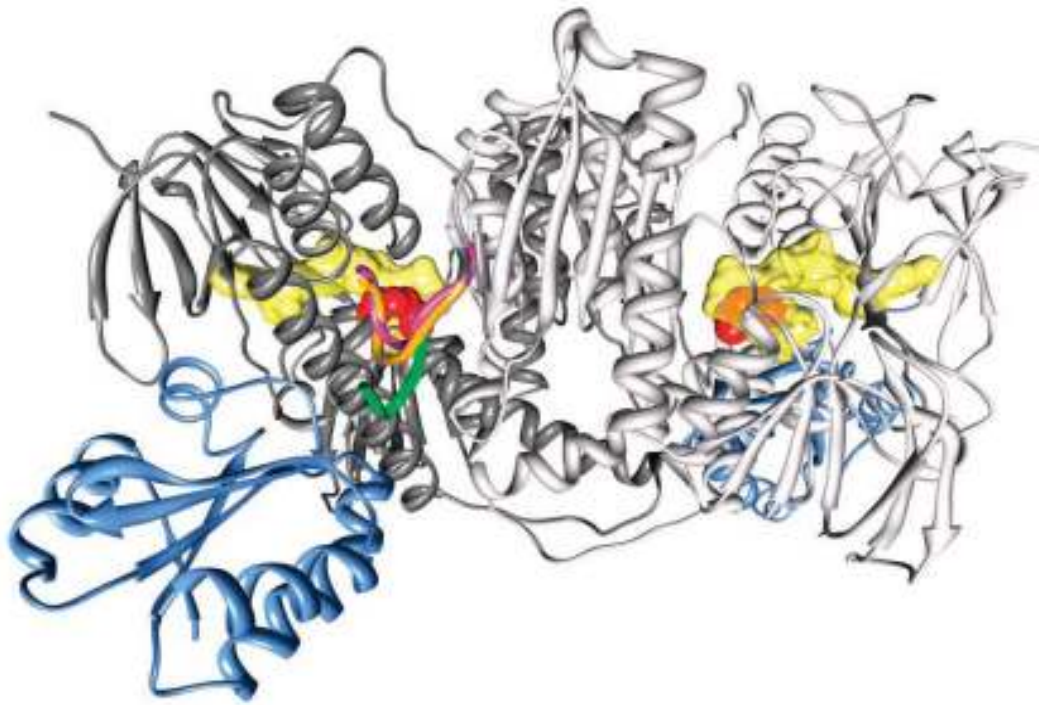


Figura 1.8 Representação do complexo hTrxR1-hTrx1. hTrxR1 a cinzento e hTrx1 a azul; FAD a amarelo, centro redox N-terminal a vermelho. Os últimos 8 resíduos representados nas posições de espera oxidada (magenta), reduzida (laranja) e no complexo hTrxR1-hTrx1 (verde) (Fritz-Wolf 2011)

Os resíduos do braço C-terminal formam um conjunto de folhas β intra (495 a 499) e intermoleculares (498 e Cys32). O resíduo Sec 498 ataca a ligação intramolecular persulfureto da Trx (Cys32-Cys35), mais propriamente a Cys32 formando uma ponte dissulfureto entre Trx e TrxR durante a catálise. Após a desprotonação do resíduo Cys não atacante (Cys497), ocorre a formação de uma ponte persulfureto entre os resíduos Cys497 e

Sec498 e a ponte persulfureto intermolecular quebra-se ocorrendo a libertação da Trx reduzida.

Por oposição à designada "posição de espera reduzida" em que o centro C-terminal se encontra reduzido pronto para, após ligação à Trx, dar origem à transferência eletrónica, o autor (Fritz-Wolf 2011) designou uma outra conformação - a "posição de espera oxidada" - em que o centro C-terminal oxidado está a 13Å do centro redox N-terminal. O par de cisteínas Cys59-Cys64 localizado na região N-terminal é reduzido pelo NADPH, e supõe-se que o C-terminal se oriente para o tiol localizado na região N-terminal reduzindo-se. Após a redução o braço move-se para a posição de interface TrxR-Trx. Com a ligação ao substrato ocorre a transferência dos eletrões e o C-terminal oxidado volta à conformação inicial, terminando o ciclo catalítico (Fritz-Wolf 2011). Existe, no entanto, um terceiro par de cisteínas localizado numa posição intermédia aos dois centros redox que poderá ou não servir de intermediário.

O átomo de selénio está muito próximo da Cadeia lateral da His472 e o grupo imidazol pode participar na transferência de protões para Cys497 (Sandalova 2001). Após redução do centro C-terminal da TrxR este afasta-se do centro redox localizado na região N-terminal para a superfície da enzima e interage com a Trx, consistente com o cenário mecanístico ditiol-persulfureto (Fig. 1.6) (Zhong 2000). Aqui o anião selenato ataca o persulfureto da Trx. Este complexo Trx-selenilsulfureto é depois atacado pela Cys497 para regenerar o selenilsulfureto. Esta alternância entre uma forma oxidada menos acessível e uma reduzida, exposta ao solvente é patente nestas estruturas.

Finalmente, a formação do complexo TrxR1 com Trx1 envolve a criação de uma ponte persulfureto intermolecular entre os resíduos catalíticos Cys32 (Trx) (Fig. 1.9) e Sec498 (TrxR), suportado pelos resíduos vizinhos (Fritz-Wolf 2011).

A Trx1 humana apresenta 5 cisteínas que podem ser modificadas sob stress oxidativo ou nitrosativo de formas diferentes, afetando tanto a sua estrutura como a atividade (Hashemy 2008). A ligação a outras proteínas através da formação de pontes persulfureto entre grupos SH, e suas repercussões ainda não é clara (Hashemy 2008). No entanto, após ocorrida a transferência eletrónica da TrxR, o par Cys32/Cys35 localizado no sítio ativo da Trx1, é oxidado para formar uma ponte persulfureto e assim a Trx é libertada (Mitchell 2005).

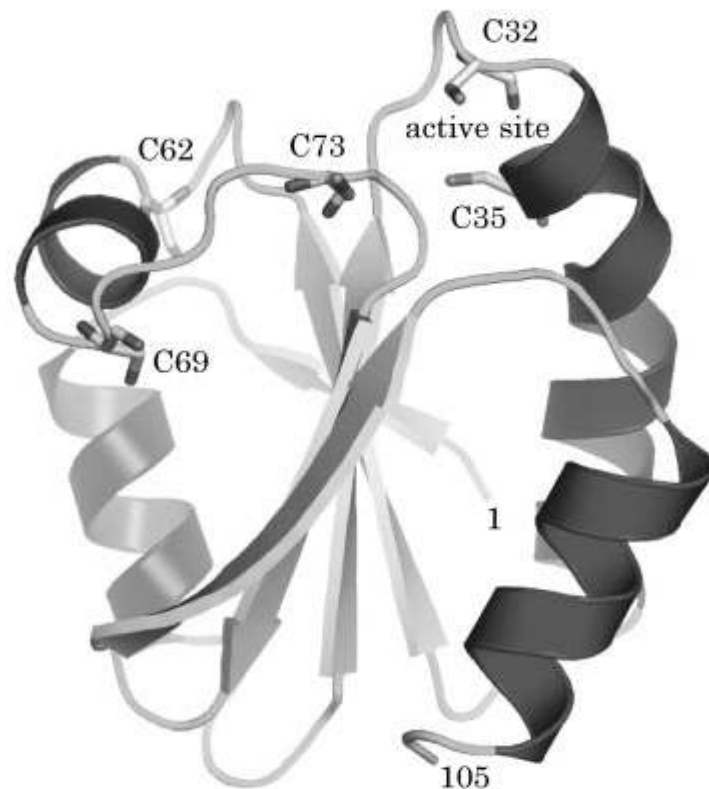


Figura 1.9 Estrutura tridimensional da Trx1 humana reduzida (Hashemy 2008)

d. TrxR como alvo terapêutico

A TrxR tem como principal função a redução da Trx, uma enzima que mantém o ambiente celular reduzido e impede o stress oxidativo. Desta forma, a inibição da TrxR leva ao stress oxidativo por incapacidade da Trx realizar a sua função, o que leva à diminuição da multiplicação celular e à consequente diminuição da viabilidade celular. O sistema tioredoxina tem sido apontado como um alvo terapêutico para a terapia oncológica, baseado no fato da TrxR estar sobreexpressa em vários tumores agressivos (Gandin 2010). Estudos em ratos demonstram que a supressão do RNA de TrxR implica um decréscimo na progressão tumoral e metástases (Yoo 2006). Vários inibidores do sistema tioredoxina mostraram ter atividade anti-tumoral em ratos com enxertos de cancro da mama, cólon e rim (Cadenas 2010). Também no homem existe uma relação provável entre o prognóstico da doença oncológica e a atividade da TrxR (Kim 2005).

A relação inversa da TrxR com intervalo livre de metástases encontrado no estudo realizado por Cadenas (Cadenas 2010), suporta a hipótese de um sistema tioredoxina ativo vantajoso para as células tumorais já que limita o dano oxidativo e permite a sua sobrevivência.

O espectro alargado da TrxR1, o seu envolvimento numa enorme quantidade de processos celulares e portanto, a sua importância numa variedade de doenças torna-o um bom candidato ao desenvolvimento de fármacos (Tab. 1.1), especialmente se for possível diminuir a síntese de DNA e a defesa anti-oxidante das células tumorais através da inativação de um só enzima. Uma quantidade de agentes de quimioterapia, complexos de ouro e platina e compostos que atuam na interface do dímero mostraram eficazmente uma ação inibitória do TrxR (Fritz-Wolf 2011).

A inibição da TrxR e Trx é possível através de agentes de quimioterapia em neoplasias humanas como glioblastoma, cólon, pulmão e mama. Além disso, este sistema tem um papel importante nos processos de desnitrosilação que controlam a apoptose. Pode-se antecipar que o ditiol na hélice- α 2, o grupo selenato no C-terminal, a interface e os domínios FAD e NADPH representam sítios chave para o desenho de inibidores seletivos e potentes. Da mesma forma, os sítios de ligação prováveis e os modos de interação de inibidores conhecidos da TrxR podem ser retrospectivamente identificados.

Tabela 1.1 Inibidores da TrxR (adaptado de Urig 2006)

Classe de substâncias	Potência da inibição da TrxR (dados <i>in vitro</i>)
Nitrosoureas	IC ₅₀ ~ 50 μ M para carmustina
Complexos Platina (II)	IC ₅₀ ~ 15 μ M para cisplatina
Complexos Fosfol	IC ₅₀ ~ 2 nM para fosfol-Pt
Organocalcogenidos	IC ₅₀ ~ 0,26 μ M para um diorganiltelurido
Flavonóides polifenol	IC ₅₀ ~ 3,6 μ M para curcumina
Texafirinas	IC ₅₀ ~ 6 μ M para gadolínio de motexafina
Compostos quinóides	IC ₅₀ ~ 6,3 μ M para 9,10 quinona fenantreno
Derivados de naftoquinonas espiroquéticas	IC ₅₀ ~ 0,35 μ M para palmarumicina

O sistema Trx tem um papel fundamental na indução e progressão de tumores já que as células cancerígenas sobreexpressam a Trx e TrxR, sendo candidatos alvo da terapêutica antitumoral. Como já foi referido anteriormente a TrxR tem uma

selenocisteína muito acessível no seu C-terminal e por isso vários compostos eletrofílicos podem modificar seletiva e irreversivelmente este resíduo (Tab.1.1) (Bindoli 2009). A TrxR pode ser fácil e eficientemente inibida por uma grande variedade de compostos:

- a carmustina - um citostático dialquilante com ação direta no DNA
- a curcumina - inibidor da TrxR e agente anti-tumoral que alquila os grupos cisteína e selenocisteína e converte a enzima numa oxidase com alta produção de ROS (Fang 2005) exercendo um efeito semelhante ao dinitroclorobenzeno (Nordberg 1998); a Trx transforma-se na sua forma oxidada Trx-S₂ e libertada pela célula exercendo um efeito imunomodulador.
- compostos sintéticos (dinitrohalobenzenos, quininas)
- arsénico sob a forma de As₂O₃ (trióxido de arsénio) induz a inibição do crescimento celular e apoptose em várias linhas celulares com produção de ROS (Engman 1997) ; o arsénio interage com glutathione e tióis proteicos ligando-se ao selenato da TrxR1 (Lu 2007).
- organocalcogenidos que formam ligações diretas com o Se (As-Se ou Te-Se) (Engman 2003).
- quinonas - é um inibidor da TrxR e grande produtor de anião superóxido e peróxido de hidrogénio com marcado efeito citotóxico (Cenas 2004)
- antraciclina e naftoquinonas com interação direta com o domínio FAD (Powis 2006)
- 4-hidroxi-2-nonenal, aldeído saturado muito reativo, produto da degradação por stress oxidativo de cadeias de ácidos gordos; inativa TrxR e Trx nas suas formas reduzidas (Fang 2005)

- acroleína - poluente que forma adutos covalentes com resíduos cisteína e selenocisteína da TrxR e Trx de forma irreversível (Myers 2011)

- laromustina- um pró-fármaco sulfonilhidrazina alquilante do DNA eficaz em leucemia mas com ação também GR e TrxR; apresenta baixa toxicidade (Vey 2010)

- etaseleno - um novo composto de selênio orgânico com atividade anticancerígena que se liga especificamente ao par redox selenocisteína-cisteína no sítio ativo do C-terminal da TrxR1 mamífera agindo como um potente inibidor. Em células de cancro do pulmão humanas suprime a viabilidade celular em paralelo com a inibição direta da atividade da TrxR1 sem afetar a Trx ou a GR (Wang 2012).

- complexos de rutênio (III) com marcada atividade antitumoral em particular para metástases; inibe especificamente a isoforma citosólica da TrxR sendo pouco efetivos contra a isoforma mitocondrial, alguns compostos de rutênio ligam-se aos resíduos de histidina (Bindoli 2009)

- cisplatina e terpiridina de platina (II) inibe irreversivelmente a atividade da TrxR sugerindo uma interação covalente com o tiol/selenol do sítio ativo. Cisplatina é vulgarmente o ponto de referência em estudos de viabilidade celular.

- gadolinio motexafino - foi sugerido que, através de mecanismos oxidativos, bloqueiam o acesso do NADPH ao seu local de ligação; existe a possibilidade da TrxR ser danificada por processos redox (Hashemy 2008).

- platina (II) e ouro (I); metais macios de Lewis em que a coordenação direta do metal à função selenato representa o principal mecanismo de inibição da enzima (Bindoli 2009).

e. Particularidades dos inibidores com ouro (modo de ação)

Nos anos 80 surgiram os primeiros estudos com vários metais entre eles o rutênio, paládio, titânio, cobre e estanho. Entre os metais estudados, os compostos de ouro revelaram as suas propriedades anti-proliferativas para a artrite reumatóide. Vários estudos sugerem que os alvos celulares de vários compostos metálicos capazes de induzir stress oxidativo envolvem o metabolismo redox e a mitocôndria, pelo que foi sugerido que estas propriedades anti-proliferativas envolvem processos independentes do ADN sendo compostos seletivos anti-mitocondriais. De facto, a mitocôndria tem, entre outros, um papel importante na apoptose devido à capacidade de manter o estado redox intracelular (Bindoli 2009). Uma vez que os compostos de ouro são inibidores muito específicos da TrxR mitocondrial, estes irão influenciar, para além do estado redox, outras funções mitocondriais tais como a permeabilidade da membrana (Bindoli 2009). Devido a este compromisso da permeabilidade membranar, ocorre a libertação de fatores proapoptóticos e simultaneamente dá-se a produção sustentada e duradoura de H_2O_2 . O H_2O_2 passa livremente a membrana mitocondrial e concentra-se no citoplasma levando à apoptose através das MAP quinases. A Trx, sem a TrxR1 ativa e permanentemente oxidada, não tem a capacidade de, em conjunto com a ASK_1 prevenir a apoptose (Fig. 1.10) (Bindoli 2009).

Os compostos de ouro apresentam IC_{50} muito variados e todas as concentrações inibitórias da TrxR são subletais para a atividade mitocondrial, o que significa que diversos tipos de compostos podem ser inibidores da TrxR. Nestas concentrações que não suprimem a atividade mitocondrial a inibição pode ser otimizada alterando o ligando nos compostos e as suas configurações (Bindoli 2009). A escolha dos ligandos a acoplar ao centro de ouro deverá estar relacionada com as suas características de modo a exercer o seu efeito tóxico somente nas células cancerígenas. Algumas propriedades dos ligandos como dimensão, carga, lipofilia e toxicidade determinam a sua atividade biológica e biodistribuição. Como exemplo, sabe-se que os compostos de ouro neutros e lipofílicos são internalizados mais eficientemente que os carregados (Gandin 2010).

Na generalidade, os compostos de Au(I) podem ser potentes inibidores enzimáticos já que os que têm estado de oxidação +1 são ácidos de Lewis macios sendo assim espécies reativas com tióis. O exato mecanismo de ação dos complexos de ouro ainda não está esclarecido mas pensa-se que esteja relacionado com a troca fácil de

ligandos com grupos tiol proteicos, em particular com os que têm baixos valores de pK_a (Yan 2010).

Os tiois celulares têm reatividades diferentes consoante o seu impedimento estérico e a sua acidez; os selenatos são mais macios quando comparados com os tiolatos e assim melhores substratos para os compostos de Au(I). É muito provável que os grupos -SH (Cys497) e -SeH (Sec 498) no sítio ativo C-terminal da TrxR, torne a enzima vulnerável ao ataque pelo Au(I), envolvendo a modificação do resíduo Sec/Cys via coordenação com Au(I) e leve a uma efetiva supressão da atividade celular da redutase (Yan 2010) formando adutos de Au(I) selenol estáveis.

Os compostos de Au(I) são muito dinâmicos à temperatura ambiente com rotação livre à volta da ligação C-C interanéis (Fave 2003) e esta flexibilidade facilita o seu acesso ao local de ligação, o mesmo não acontecendo com análogos de platina.

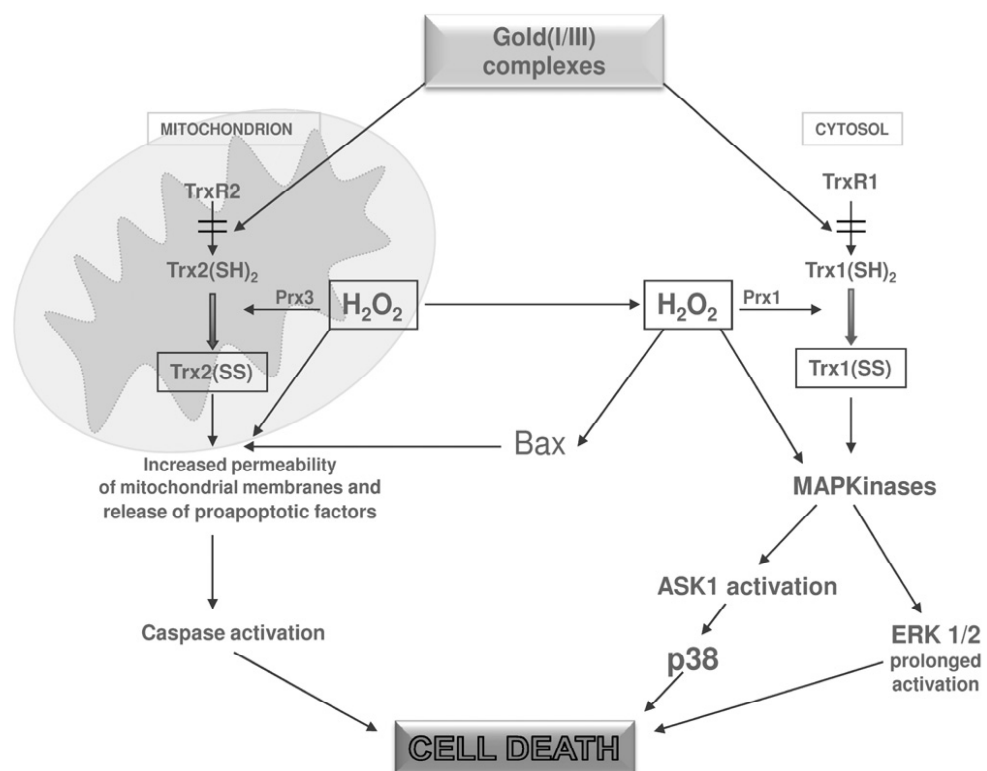


Figura 1.10 Modelo do mecanismo de ação da indução da morte celular pelos compostos de Au (I/III) (adaptado de Bindoli 2009)

Têm sido testados vários complexos de Au(I) entre eles encontra-se um anti-artrítico com propriedades anti-cancerígenas, a Auranofina ([AuI (PEt₃) (SR)] com uma capacidade significativa de

inibição da TrxR. Este composto interfere na permeabilidade das membranas mitocondriais apresentando uma alta citotoxicidade (Gromer 1998) e é utilizado frequentemente como um padrão de eficácia em estudos *in vitro*. Com concentrações 1000 vezes superior à da concentração necessária para reduzir a TrxR, a auranofina inibe a glutationato redutase humana e a selenoenzima glutationato peroxidase (Bindoli 2009). A auranofina apresenta uma estrutura linear em que o Au(I) está ligado, por um lado ao ligando trietilfosfina que confere permeabilidade à membrana e por outro a tetraacetiltioglucose, monoaniônica que é libertada rapidamente *in vivo* sendo um ótimo grupo abandonante (Gandin 2010). Os grupos membranares sulfidrílo exercem um efeito shuttle³ da ouro-trietilfosfina para os grupos sulfidrílo citosólicos (Snyder 1986).

Os complexos de Au(I) são lineares, caracterizados por um íon de ouro monocatiônico coordenado por dois ligandos (um neutro e um mononegativo). A TrxR1 é mais sensível a compostos de Au que a mitocondrial sendo o grupo selenol o primeiro sítio de ligação dos compostos de ouro. Estes compostos de ouro tem que ter pelo menos um ligando lábil para a formação de uma ligação Au-Se (Bindoli 2009). Os ligandos mononegativos têm como exemplo o ditiocarbamato e xantogenato com formas de ressonância mesomérica favoráveis que só inibem a TrxR citosólica e mitocondrial sendo, tal como a auranofina, necessárias concentrações muito maiores para exercer um efeito inibitório sobre GR e GPx (Gandin 2010). Os compostos devem ser estáveis para atingir o seu alvo molecular mas não demasiado estáveis que impeçam a sua reação com a TrxR.

Também o Au(III) mereceu interesse por parte da comunidade científica. No entanto, alguns destes compostos revelaram-se ativos *in vitro* mas não *in vivo*, sendo o Au(III) tóxico em modelos animais (Marcon 2004). Os compostos de Au(I) são muito mais eficazes que os de Au(III), porque estes são menos macios e têm menor potência inibitória embora ainda assim considerável; como já foi referido, os íons de Au macios formam ligações fortes com doadores de Lewis macios como o Se (Deponte 2005).

Outros complexos metálicos como a tioureia cíclica N,N'-disubstituída exercem citotoxicidade significativa em relação às células cancerígenas, principalmente o complexo de Au(I) tioureia, que exibe uma forte inibição em relação às selenoenzimas como é o

³ Efeito shuttle refere-se à transferência dirigida de eletrões para um determinado resíduo em detrimento de todos os outros

caso da TrxR. As Au(I)-tioureias apresentam uma constante inibitória ao nível nanomolar essencialmente irreversível (Yan 2010).

Alguns grupos como o fosfol de Au(I) com efeito na hGR, TrxR, no DNA e no crescimento celular têm como alvo a Sec; o anel fosfol é pouco aromático e possui um átomo central P nucleofílico (Urigo 2006).

Tabela 1.2 Efeito inibitório de alguns compostos de Au (I/III) em isoformas Trx diferentes (adaptado de Bindoli 2009)

Composto	TrxR1 citosólica humana	TrxR1 citosólica de rato	TrxR2 mitocondrial de rato
Au(I)			
Auranofina	0,02	0,0007	0,002
Au(trietilfosfina)Cl		0,0012	0,0058
Aurotiomalato		0,005	0,028
Aurotioglucose	0,065		
Aurotiosulfato		0,05	
Au(trifenilfosfina)Cl		0,1	
(Dimetilsulfureto)AuCl			0,584
Au fenil(di(2-piridil)fosfol)Cl	0,0008		
Au(III)			
Tetracloroaurato	0,0058	0,012	0,1
Au(OAc) ₃		4,0	
[Au(2,2' - dietilenodiamina)]Cl ₂	0,2		
[Au(2,2' - dietilenotriamina)Cl]Cl ₂		0,0028	0,42
(Au(py ^{dmb} -H)(OAc) ₂		0,0147	1,42
(Au(bipy ^{dmb} -H)(OH))(PF ₆)		0,0043	0,28
(Au(bipy ^{dmb} -H)(2,6-xilidina))(PF ₆)		0,0041	0,21
Au(2,2-bipiridina)Cl ₂	0,012		
Au(2-fenilpiridina)Cl ₃	0,03		
Au(2-fenilpiridina)Cl ₂	0,036		
Au(damp)Cl ₂	0,18		
Au(damp)(OAc) ₂	0,03		
Au(damp)(fenil)Cl	0,0022		
Au(dimetil)(damp)	1,8		
Au(trimetil)(trifenilfosfina)	0,68		
Au(DMDT)Cl ₂		0,0057	0,0247
Au(DMDT)Br ₂		0,0077	0,0284
Au(ESDT)Cl ₂		0,017	0,0346
Au(ESDT)Br ₂		0,0139	0,0359

Valores IC₅₀ em μ M. Abreviaturas: py^{dmb} - 2-(1,1-dimetilbenzil)-piridina; bipy^{dmb} - 6-2-(1,1-dimetilbenzil)-2,2'-bipiridina; damp - 2-[dimetilamino)metil]-fenil; DMDT - N,N-dimetilditiocarbamato; ESDT - etilsarcosinaditiocarbamato

Os ligandos fosfol são internalizados pelo chamado efeito sulfidrilo *shuttle* em que os espaços intracelulares, a lipofilia para alguns grupos SH de membrana, a afinidade dos metais pelo S e alguns fatores estéreos os tornam bons candidatos farmacológicos. Foram já realizados estudos com sucesso em células de glioblastoma. Os complexos fosfina Au(I), com efeito direto ao nível da mitocôndria, podem ser lineares (ex: auranofina) ou tetrahedros (Bindoli 2009). As fosfinas hidrossolúveis complexadas com Au(I) (Vergara 2010), apresentam uma inibição citosólica e mitocondrial específica da TrxR sendo a inibição da TrxR1 quatro vezes superior à da TrxR2. É uma alternativa possível ao tratamento de tumores resistentes à cisplatina, sem mecanismos que envolvam o dano de DNA. As fosfinas de Au inibem a TrxR citosólica e mitocondrial mas não a GR ou GPx. Por outro lado, compostos como a trietilfosfina de ouro e o ourotiomalato são muito eficientes como inibidores da TrxR com valores IC50 de 0.02 a 1.42 μM . Sem o metal revelam-se muito menos eficientes (Bindoli 2009). A tabela 1.2 descreve os efeitos inibitórios de alguns compostos de Au(I/III) em isoformas de TrxR diferentes.

Também os complexos de Au(I) lipofílico e catiónico de carbenos N-heterocíclicos demonstram uma acumulação mitocondrial e uma inibição seletiva de TrxR. A troca de ligandos com a Cys e Sec faz-se em dois passos com libertação dos ligandos carbenos (Hickey 2008).

f. Inibidores testados em Saragoça

Em parceria com o Departamento de Química Inorgânica da Faculdade de Ciências da Universidade de Saragoça, baseei-me nos trabalhos de Semeco (Semeco 2011) e Cañaveras (Cañaveras 2011) para selecionar quais os eventuais inibidores promissores da TrxR neste contexto. O principal objetivo destes projetos consistiu no desenho e preparação de novos compostos inorgânicos que pudessem ter atividade biológica. Começaram pela síntese de ligandos com atividade biológica intrínseca ou apenas pela sua capacidade de transportar o metal (Au ou Ag).

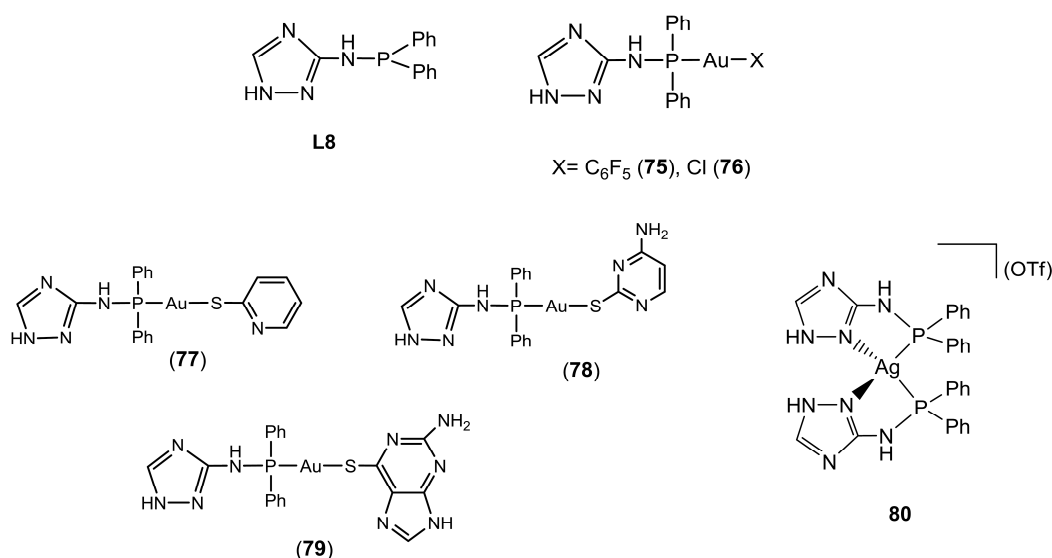


Figura 1.11 Variantes estudadas do ligando L8 (adaptado de Cañaveras 2011). A numeração original dos compostos foi mantida.

Tabela 1.3 Valores de IC₅₀ em μM para os complexos de Ouro e Prata com o ligando L8 (Fig. 1.11) em 6 linhas celulares (A-549 - adenocarcinoma do pulmão; Hep-G2 - carcinoma hepatocelular; NIH-3T3 - fibroblasto; HeLa - cancro colo do útero; MCF-7 - cancro da mama; RPE - células da retina) (adaptado de Cañaveras 2011)

Complexo	A-549	Hep-G2	NIH-3T3	HeLa	MCF-7	RPE
L8	> 50	> 50	> 50	> 50		
75	> 50	> 50	6.65 ± 1.54	> 50		
76	> 50	> 50	> 50	> 50		
77	25.80 ± 0.47	10.28 ± 0.40	11.15 ± 0.39	4.34 ± 0.03	5.55 ± 0.34	3.00 ± 0.4
78	25.34 ± 0.42	> 50	> 50	18.96 ± 3.09	2.89 ± 1.07	> 100
79	4.83 ± 0.58	25.05 ± 0.52	> 50	0.34 ± 0.08	17.38 ± 1.22	> 100
80	> 50	> 50	> 50	> 50		
Auranofina	4.65 ± 0.30	1.57 ± 0.24	4.49 ± 0.38	5.99 ± 0.014	1.11 ± 0.30	
Cisplatina	29.21 ± 1.92	21.50 ± 1.41	-----	10.50 ± 1.51	19.04 ± 1,51	

Os complexos de Au(I) com ligandos difosfinas mostram, em geral boa atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* contra as linhas celulares estudadas (Tab. 1.3). Ainda que alguns apresentem graves efeitos secundários, a atividade citotóxica dos complexos de ouro com ligandos fosfinas e tiolatos é efetiva.

Um dos compostos mais efetivo nos testes de citotoxicidade foi o 79. Assim, decidimos investigar o papel deste inibidor na interação com a TrxR.

g. Reatividade das cisteínas e selenocisteínas

O aumento da produção de ROS está relacionado com o stress oxidativo e deverá ser controlado por agentes anti-oxidantes. Estas espécies, em baixas concentrações, têm um papel fisiológico importante; no entanto, em altas concentrações causam lesões irreversíveis nos lípidos, proteínas e ADN celulares. O selénio é um dos agentes que funciona como agente antimutagénico, prevenindo transformações malignas em células normais. Este selénio está presente em enzimas como a glutathione peroxidase (GPx) e TrxR, conhecidas por proteger o DNA e outros componentes celulares do dano oxidativo (Almondes 2010).

Observou-se que a substituição de Sec498 por Cys na TrxR de rato mutante recombinante levou a uma redução da catálise num fator de 100 (Zhong 2000). Desta forma, o átomo de selénio com o seu maior raio e que constitui o único selenilsulfureto parece dar origem a uma estrutura favorável à reação com Trx. Já a formação de um ditiol Cys-Cys em Cisteínas adjacentes como o encontrado na enzima mutada não parece originar uma estrutura favorável à formação de um persulfureto (Zhong 2000) fundamental para a libertação da Trx.

As selenoproteínas na sua forma reduzida, têm o grupo selenato ionizado a pH fisiológico, uma vez que o seu pK_a é de 5.47 (Arnold 1986) tornando-o muito reativo (Stadtman 1992). O pH ótimo da enzima mutada (Sec para Cys) é 9 em comparação com 7 da selenoproteína (*wild type*) compatível com o envolvimento de um selenato no mecanismo catalítico (Zhong 2000).

h. Papel das técnicas computacionais como fonte de informação ao nível molecular

As simulações de dinâmica molecular fazem parte de um conjunto de técnicas computacionais que dão pistas entre a estrutura e dinâmica permitindo a exploração do espaço conformacional acessível à proteína. A primeira simulação (Mccammon 1977) foi relatada em 1977 e consistiu numa trajetória

de 9.2 picosegundos para uma pequena proteína em vácuo. Onze anos depois (Levitt 1988), foi feita uma simulação de 210 ps para a mesma proteína em água. Em 2005 já era possível a realização de simulações 10^4 - 10^6 vezes mais longas em que a proteína está rodeada de água e iões (Karplus 2005).

Este progresso nas técnicas computacionais deve-se a dois aspetos fundamentais: por um lado foram desenvolvidos algoritmos computacionais mais eficientes, por outro o poder computacional aumentou consideravelmente, sobretudo a velocidade de processamento. O desenvolvimento destes fatores permitiu que os resultados das simulações possam ser mais realistas e simultaneamente mais rápidos.

As técnicas computacionais são também uma ponte entre teoria e experimentação. Pode ser testada uma teoria usando uma simulação baseada no mesmo modelo e o modelo pode ser testado comparando com resultados experimentais. Estas técnicas permitem igualmente a execução de simulações difíceis ou impossíveis de realizar no laboratório (ex: temperaturas ou pressões extremas) (Allen 2004).

Nos últimos anos têm sido vários os autores que se têm dedicado ao estudo da TrxR através de técnicas de Mecânica Molecular, sobretudo as oriundas de espécies mais simples, como é o caso da E. coli (Banerjee 2009, Negri 2010, Wang 2009). Até à data, não foi publicado nenhum estudo da TrxR humana através de técnicas de Dinâmica Molecular.

i. Objetivos da tese

A tioredoxina redutase 1 é um enzima presente nas células do citoplasma de várias espécies, entre elas a humana, e tem sido exhaustivamente estudado por métodos experimentais e teóricos. Esta enzima tem como função principal a regulação do estado redox celular contribuindo para uma eficaz neutralização de ROS ou, pelo contrário permitir a acumulação das mesmas induzindo mecanismos de apoptose. Assim, esta enzima poderá constituir um alvo para a terapêutica de diversas patologias, entre as quais o cancro.

A TrxR1 humana é uma enzima de grandes dimensões (60KDa por subunidade) constituída por duas subunidades, cada uma delas contendo dois centros redox conhecidos (Fritz-Wolf 2011). No entanto, o mecanismo de transferência eletrónica na molécula, com origem NADPH até ao substrato final é complexo e envolve vários

passos (Zhong 2000) para além da existência de um braço C-terminal ondulante (Fritz-Wolf 2011).

Devido à complexidade desta estrutura pretende-se avaliar e entender os fenómenos físico-químicos que estarão na base da função biológica da TrxR. Através de simulações de dinâmica molecular pretende-se obter conformações em equilíbrio da TrxR em diferentes estados redox e diferentes estados de protonação de resíduos-chave. Das simulações podemos retirar informação estrutural bem como determinar valores de pK_a de resíduos protonáveis chave no mecanismo da enzima. De igual forma e a partir dos trabalhos desenvolvidos na Universidade de Saragoça (Cañaveras 2011, Semeco 2011), pretendemos investigar um inibidor seletivo da TrxR, preferencialmente com grande especificidade para a TrxR e baixa especificidade para GR. Após a escolha desse inibidor iremos proceder aos mesmos estudos de DM e avaliar a TrxR ligada covalentemente ao inibidor.

Capítulo 2

Teoria e Métodos

a. Mecânica Quântica

A Química Computacional aplica princípios de Mecânica Quântica (MQ) para resolver vários problemas. No entanto neste trabalho utilizámos a MQ principalmente para determinar as cargas atômicas parciais de algumas moléculas a partir do seu potencial eletrostático.

Ao contrário da Mecânica Clássica, a MQ descreve mais pormenorizadamente a maioria dos fenómenos. No entanto, estes modelos são computacionalmente muito exigentes e o número de átomos passíveis de ser tratados é limitado.

Uma das equações mais importantes da MQ é a equação de Schrödinger independente do tempo:

$$\mathbf{H}\Psi = E\Psi \tag{1}$$

em que H é o operador Hamiltoniano, E é a energia do sistema e Ψ é a função de onda do sistema, que nas moléculas consiste em eletrões e núcleos. A solução da equação de Schrödinger (Eq. 1) só é possível para sistemas muito simples, sendo necessário recorrer a aproximações. A aproximação de Born e Oppenheimer permite que os núcleos e os eletrões sejam tratados em separado (Levine 2000).

Cálculo de cargas atômicas pontuais

Para proceder à realização de cálculos de Mecânica Molecular/Dinâmica Molecular (MM/DM) é necessário atribuir cargas pontuais aos núcleos. Existem principalmente dois métodos para o cálculo de cargas atômicas: análise de população natural e potencial eletrostático (ESP). Uma das propriedades a ser calculada pela equação de Schrödinger é o potencial eletrostático no ponto $P(r_p)$. $\Phi(r_p)$ é o trabalho necessário para trazer uma carga pontual do infinito para r_p . Se o sistema for constituído por uma só carga pontual q_i , localizada em r_i , o potencial no ponto r_p é:

$$\Phi_i(r_p) = \frac{q_i}{4\pi\epsilon_0 k r_i - r_p k} \quad (2)$$

Se o sistema for uma molécula, o potencial eletrostático no ponto r_p tem várias contribuições provenientes dos eletrões e dos núcleos e pode ser calculada desta forma:

$$\Phi_i(r_p) = \sum_i \frac{eZ_i}{4\pi\epsilon_0 |r_i - r_p|} - \frac{\int e\rho(r)}{4\pi\epsilon_0 |r - r_p|} dr \quad (3)$$

O primeiro termo representa o núcleo e o último os eletrões. O integral considera todo o espaço, Z_i é a carga nuclear, $\rho(r)$ é a carga e e é a carga do eletrão (Levine 2000). O Φ pode ser ajustado para cargas atômicas parciais q_i . Uma vez que o potencial eletrostático da molécula não é afetado de forma significativa pelo uso de diferentes parametrizações (Levine 2000), as cargas ESP parecem ser uma boa opção. Para o cálculo de cargas ESP, o Φ é primeiro calculado num número considerável de pontos numa grelha fora do raio de Van der Waals de cada átomo. É então obtido o conjunto de cargas atômicas parciais sendo aquele que gera o potencial que melhor se ajusta aos valores determinados nesses pontos da grelha (Bayly 1993).

Estudos de reatividade do inibidor

A inibição da TrxR por inibidores baseados em Au(I) é já bem conhecida (Urig 2006). Os nossos colaboradores de Saragoça sintetizaram um inibidor muito promissor e pediram-nos para identificar os detalhes moleculares da sua ação. O inibidor em questão (Figura 2.1, à esquerda) apresenta dois grupos ligados linearmente a um átomo de Au que podem ser substituídos por cisteínas ou por selenocisteínas. Assumiu-se que o grupo abandonante do inibidor foi a base com o tiol, visto a ligação Au-P ser muito estável (Bindoli 2009). Independentemente do estado de protonação da espécie nucleofílica (tiol/selenol vs. tiolato/selenato), os reagentes e os produtos são inevitavelmente os apresentados na Figura 2.1. Tendo isso em conta, foi realizado no nosso grupo um estudo preliminar desta reação de substituição através do cálculo das energias livres dos substratos e dos produtos. Os diferentes substratos/produtos foram sujeitos a uma otimização de geometria com DFT/B3LYP usando funções base LAN2TZ(f) para o ouro, 6-311G(d,p) para o enxofre e selénio, e 6-31G(d,p) para os restantes átomos. As energias obtidas após as otimizações encontram-se na Tabela 2.1. O facto da diferença de energia entre produtos e reagentes ser negativa para o caso do selénio (-1.7 kcal/mol) e positiva para o enxofre (+3.9 kcal/mol) indica que a reação de substituição apenas é favorável no caso da presença de selenocisteína e que, à partida, este inibidor será seletivo para a TrxR em detrimento de muitas outras enzimas que tenham cisteínas nos sítios ativos e que não tenham selenocisteínas, como é o caso da glutathione reductase. Esta selectividade poderá ter vantagens aquando do desenvolvimento de uma droga anti-tumoral que ataque especificamente o crescimento celular sem apresentar níveis de toxicidade muito elevados que a tornariam letais para os pacientes. Estes resultados também nos ajudaram a decidir sobre a estrutura do aduto final formado pela reação entre o inibidor e a TrxR. Este aduto foi construído e simulado através de dinâmica molecular.

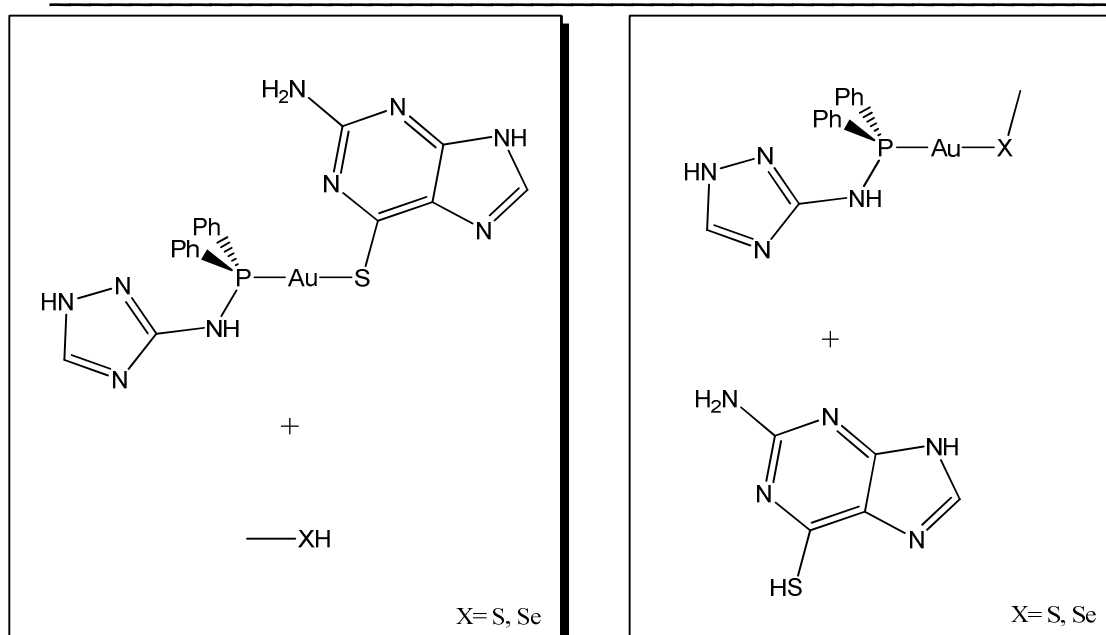


Figura 2.1 Esquema da reatividade do tiolato/selenato perante o inibidor de Au(I): material de partida com o metiltiol(selenol) (esquerda); produto da substituição (direita).

Tabela 2. 1 Tabela com os valores de energia calculados para os materiais de partida e os produtos descritos na Figura 2.1. Energias encontram-se em kcal/mol.

	Material de partida	Produtos de substituição	Diferença
Enxofre	- 1619111.7	- 1619107.8	+3.9
Selénio	- 2876221.9	- 2876223.6	- 1.7

b. Mecânica Molecular/Dinâmica Molecular (MM/DM)

As simulações de Mecânica Molecular/Dinâmica Molecular (MM/DM) são técnicas que permitem analisar alterações conformacionais. Neste tipo de simulações é possível considerar um maior número de átomos que em MQ devido às aproximações consideradas no ponto anterior. Estas simulações permitem calcular as forças que atuam em cada átomo do sistema e simular os movimentos moleculares.

A energia de uma molécula numa dada conformação pode ser obtida a partir das interações que resultam da contribuição de vários componentes. A função de energia potencial de um sistema numa dada configuração pode ser expressa da seguinte forma:

$$V = V_{\text{bonds}} + V_{\text{bondangles}} + V_{\text{dlhe}} + V_{\text{imp}} + V_{\text{vanderWaals}} + V_{\text{electrostatics}} \quad (4)$$

Esta equação (Eq.4), em conjunto com os parâmetros necessários para descrever o comportamento dos vários átomos, é função da energia potencial e é normalmente designada de campo de forças (CF). Os CF apresentam geralmente os componentes da equação em cima (Eq.4). Uma das variações do CF que permite diminuir consideravelmente o tempo de simulação é a chamada filosofia do átomo unido. Aqui, os hidrogénios apolares são incorporados no átomo de carbono a que estão ligados e os parâmetros eletrostáticos e de Van der Waals e a massa do carbono são alterados considerando os hidrogénios acoplados. Os hidrogénios polares e aromáticos são representados de forma explícita. O CF usado neste trabalho foi o GROMOS 54A7 (Schmid 2011), que utiliza a abordagem do "átomo unido".

O primeiro termo da equação 4 representa o estiramento da ligação de dois átomos covalentemente ligados i e j , representado desta forma:

$$v_b(r_{ij}) = \frac{1}{4} k_{ij}^b (r_{ij}^2 - (r_{ij}^0)^2)^2 \quad (5)$$

em que k_{ij}^b é a constante de força de ligação que controla a estirabilidade da ligação e r_{ij}^0 define o comprimento de equilíbrio para um par particular de átomos (Fig. 2.2). Estes parâmetros, k^b e r^0 são específicos de cada par de átomos (ex. C - C, C - H, O - H). Uma vez que as ligações são modeladas por um potencial quadrático não haverá dissociação da ligação nem formação de novas ligações.

O segundo termo da equação é o ângulo de ligação entre átomos i - j - k e é modelado usando uma função semelhante à usada para o estiramento da ligação (Fig. 2.3)

$$v_\alpha(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ijk}^\theta (\cos(\theta_{ijk}) - \cos(\theta_{ijk}^0))^2 \quad (6)$$

em que

$$\cos(\theta_{ijk}) = \frac{\mathbf{r}_{ij} \cdot \mathbf{r}_{kj}}{r_{ij} r_{kj}} \quad (7)$$

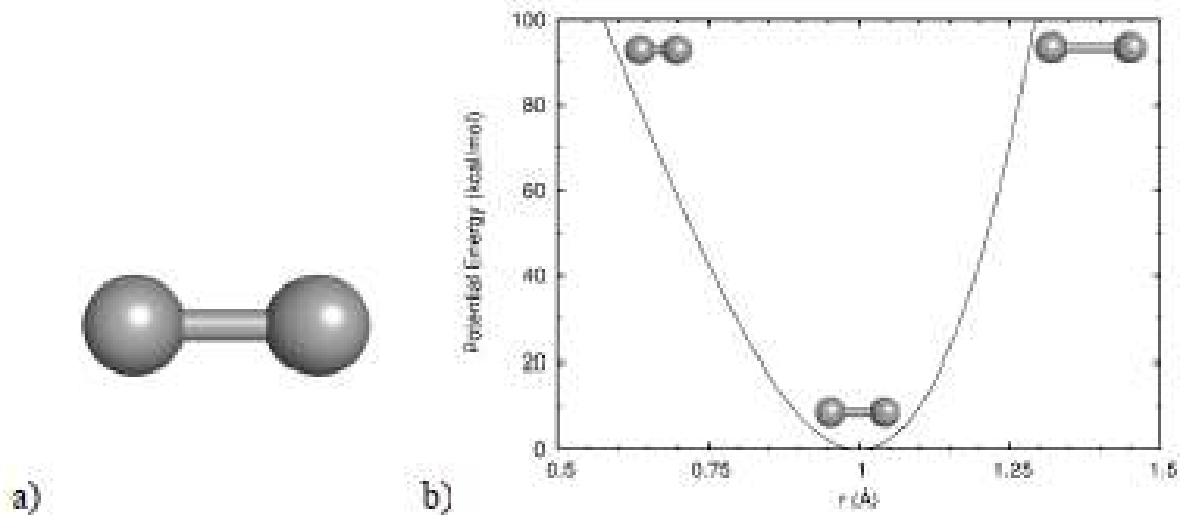


Figura 2.2. a) Representação esquemática de uma ligação entre dois átomos
b) Potencial de estiramento usando equação 5.

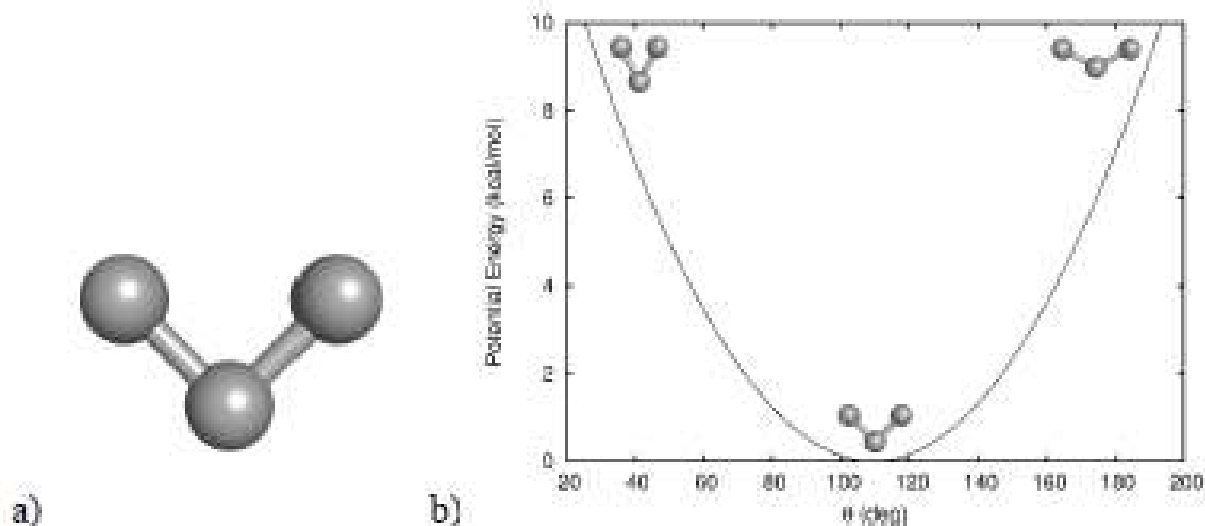


Figura 2.3 a) Representação esquemática de um ângulo de ligação entre três átomos b) Vibração do ângulo de ligação usando equação 6 (neste caso uma molécula de água).

Esta equação (Eq. 6) representa a energia associada à vibração de um ângulo de referência. Tal como o estiramento de ligação, a energia aumenta à medida que θ se afasta e o parâmetro que controla o ângulo é k^θ .

Cada tripleto de átomos tem um conjunto específico de parâmetros para k^θ_{ijk} e θ^0_{ijk} (ex: C-C-H, N-C-C, C-O-H). Tal como em k^b , o parâmetro k^θ controla a derivada da parábola, em que valores superiores requerem mais energia para distorcer o ângulo do seu valor de referência.

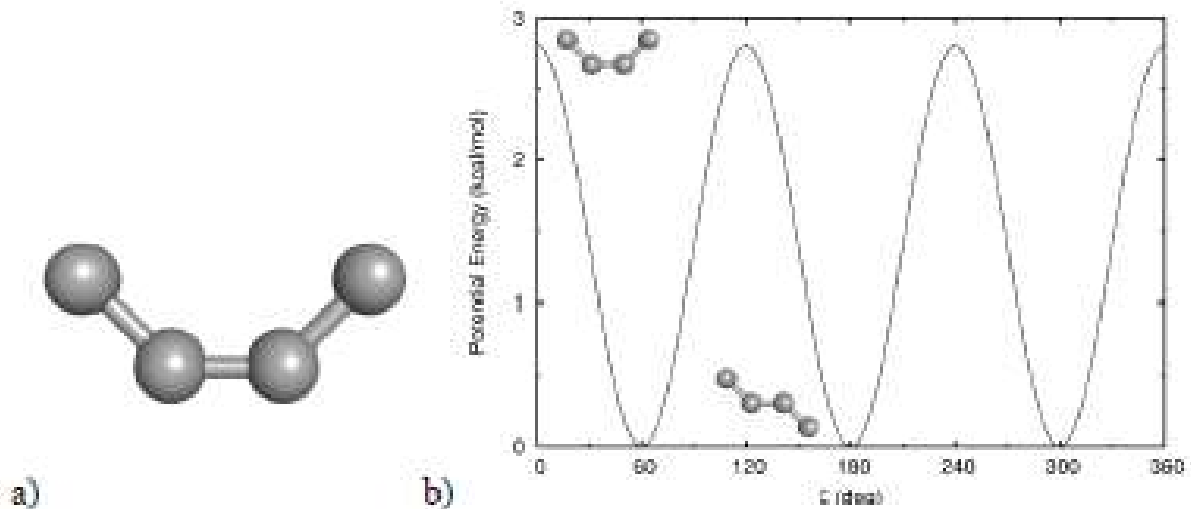


Figura 2.4 Representação esquemática de um ângulo diedro entre quatro átomos (na forma *cis*). O potencial de ângulo diedro é representado pela função periódica simples (neste caso para o grupo C-C-C-C)

O terceiro termo da equação 4 é o potencial de dihedros próprios, e modela a forma como a energia se altera à medida que uma ligação simples roda. Pode ser descrito pela função periódica simples (Fig. 2.4) sob a forma:

$$V_d(\zeta_{ijkl}) = k^{\zeta} \left[1 + \cos(n\zeta_{ijkl} - \zeta_{ijkl}^0) \right] \quad (8)$$

em que k^{ζ} é a constante de força que controla a amplitude da curva, n é a multiplicidade do diedro, $n\zeta_{ijkl}$ é o ângulo diedro, e ζ_{ijkl}^0 é o fator fase (Fig. 2.4). Tal como nos componentes anteriores, cada quadripleto de átomos tem um conjunto de parâmetros específico para cada tipo de átomos (ex. C-C-C-C, C-O-C-N, H-C-C-H). Os ângulos simples podem rodar livremente mas a energia de cada extensão de rotação é diferente.

O quarto termo da equação 4 é a do termo dihedros impróprios, usado para manter uma determinada geometria/quiralidade ou manter os grupos planares com essa conformação (ex. anéis aromáticos).

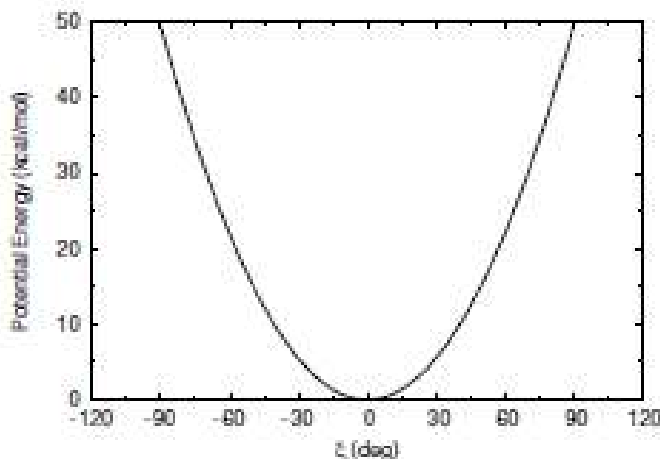


Figura 2.5 Potencial dos dihedros impróprios representado pelo potencial harmônico simples (neste caso para grupos planares)

Tal como para a função potencial de ligações e ângulos de ligações, os dihedros impróprios são descritos pelo potencial harmônico (Fig. 2.5 e Eq. 9):

$$v_{id}(\xi^{ijkl}) = \frac{1}{2} k_{\xi} (\xi^{ijkl} - \xi_{ijkl}^0)^2 \quad (9)$$

Os dihedros impróprios têm também um ângulo de referência ξ_{ijkl}^0 e uma constante de força k_{ξ} dependentes do tipo de dihedro.

Todos os componentes descritos até ao momento envolvem átomos covalentemente ligados. No entanto, moléculas maiores apresentam também interações que não envolvem ligações. Estas interações são calculadas entre pares de átomos separados por, pelo menos, três ligações. As interações que não envolvem ligações covalentes não dependem de uma determinada ligação e são válidas no espaço. Os dois termos de *não ligação* são normalmente as interações de van der Waals e as interações eletrostáticas.

O quinto componente da equação 4 corresponde às interações de Van der Waals que, por sua vez apresenta dois termos: um de atração e o outro de repulsão. A atração ocorre num raio curto e desaparece rapidamente à medida que os átomos envolvidos se afastam. Já as repulsões ocorrem quando a distância entre os átomos envolvidos é ligeiramente inferior à soma dos seus raios de contato. O termo energético que descreve a atração/repulsão dá origem a uma transição

gradual entre os dois regimes. Estes efeitos são muitas vezes modelados através do potencial Lennard Jones (Fig. 2.6)

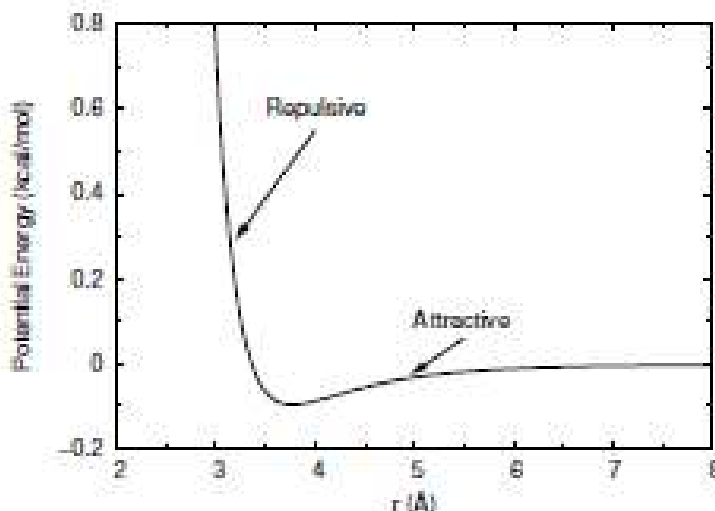


Figura 2.6 Interações de van der Waals modeladas pelo potencial de Lennard Jones a partir de um componente atrativo r^{-6} e repulsivo r^{-12} (neste caso para um par de átomos de carbono)

$$v_{LJ}(r_{ij}) = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

(10)

Existem dois parâmetros ajustáveis nesta equação (Eq. 10), a distância de colisão σ e a profundidade ε , única para cada par de átomos (ex: C:C, C:O, N:H). Normalmente o raio de *cut-off* é usado de modo a que os pares de átomos cuja distância seja maior que o *cut-off* têm energia de interação de van der Waals zero. Esta estratégia tem o objetivo de reduzir o custo computacional.

A última componente da equação 4 é a interação eletrostática modelada pelo potencial de Coulomb (Fig. 2.7).

$$V_C(r_{ij}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}} \quad (11)$$

A energia de interação eletrostática é função das cargas atômicas q_i e q_j de átomos não ligados, a distância inter-atômica (r_{ij}), constante dielétrica relativa ϵ_r e da permissividade elétrica do vácuo (ϵ_0). Ao contrário das ligações de van der Waals, estas interações não desaparecem rapidamente com a distância, mas diminuem gradualmente. O cálculo de todos os pares possíveis é muito exigente computacionalmente, sendo por isso também usado um *cut-off*, para além do qual é usado.

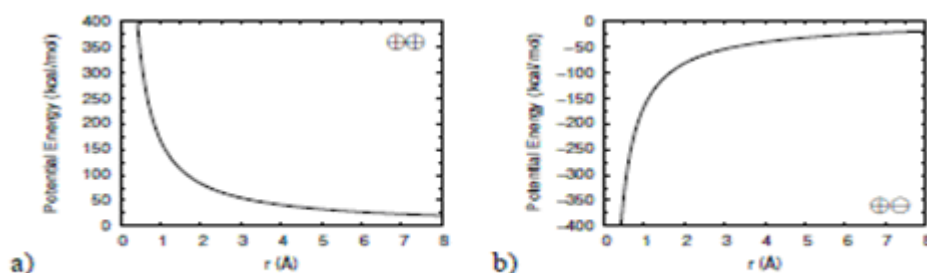


Figura 2.7 Potencial de interação de Coulomb para partículas com a) cargas de sinal igual b) cargas de sinal oposto

Solvatação

Um aspeto importante nas simulações de dinâmica molecular é o ambiente da proteína importante para a determinação correta das suas propriedades.

Na maioria das simulações, o ambiente escolhido é o solvente aquoso. Uma vez que uma parte significativa do tempo computacional é gasto na avaliação das interações solvente-solvente, existem alguns métodos em que a solvatação é implícita, mas na maioria dos casos é usada uma solvatação explícita. Um fator importante são as interações eletrostáticas de longo alcance muito importantes na estabilidade estrutural da proteína e determinante em vários processos reacionais. A introdução de um valor de *cut-off* anteriormente referido nas interações eletrostáticas para poupança de tempo computacional introduz uma descontinuação energética que pode originar simulações instáveis. Alguns métodos foram desenvolvidos para ultrapassar este problema como soma Ewald, *particle*

mesh Ewald (PME) (método usado nesta tese) (Darden 1993) e *reaction field*.

Minimização de energia

A função de energia potencial é uma função multidimensional das coordenadas de um sistema e, em conjunto com os parâmetros do campo de forças, permite calcular o valor da energia potencial para cada conformação do sistema. A procura de mínimos de energia para esta função é muito útil em simulações moleculares porque correspondem a estados do sistema de elevada probabilidade e são bons pontos de partida para simulações de Dinâmica Molecular. Um mínimo energético é a combinação de r^N coordenadas que minimizam a função $v_b(r^N)$, ou seja é o ponto em que o gradiente $v_b(r^N)$ é zero ou não existe. Uma vez que a função tem um grande número de variáveis, a gama energética é muito complexa e o número de mínimos e máximos são também muito elevados, tornando-se muito difícil encontrar um mínimo absoluto. São usados algoritmos de minimização para procurar um mínimo de energia local dentro do sistema global de energias. Existem vários métodos para realizar minimizações de energia.

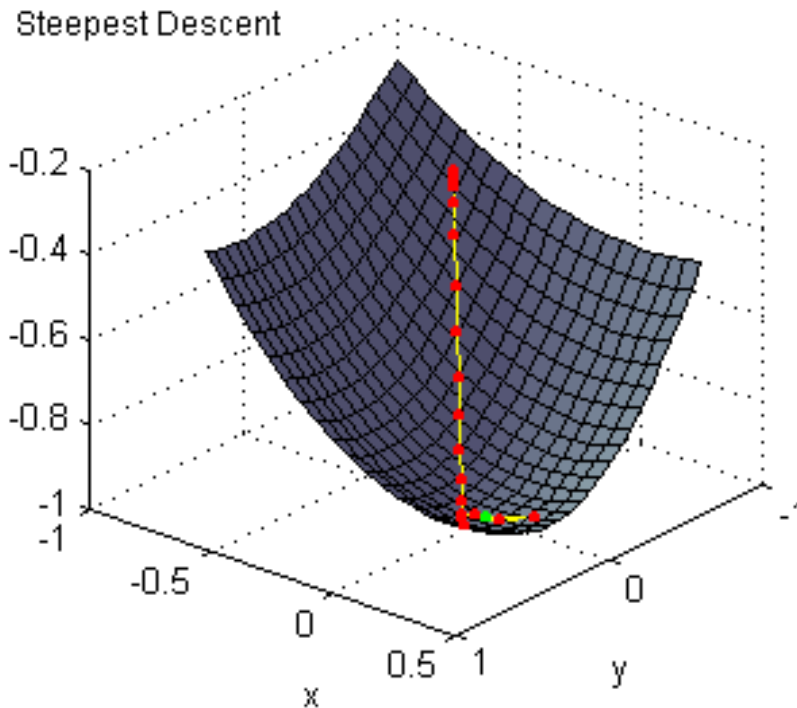


Figura 2.8 Representação 3D do percurso do algoritmo *Steepest Descent*

O algoritmo *Steepest Descent* é simples, robusto e fácil de implementar. Basicamente o algoritmo faz a energia descer abruptamente na gama energética, ou seja na direção da componente máxima da força. A Fig. 2.8 é uma representação do caminho possível percorrido por este algoritmo em três dimensões. Após o cálculo da energia potencial e das forças, as próximas posições dos elementos do sistema $r_i = (n + 1)$ pode ser obtido através da equação 12:

$$r_i(n + 1) = r_i(n) + \frac{F_i(n)}{\max(|F_i(n)|)} h_n \quad (12)$$

$\max(|F_i(n)|)$ é o maior valor absoluto do componente da força, h_n é a maior deslocação definida pelo utilizador. Após o cálculo das posições novas, é possível calcular o novo valor de energia e tratar as forças computacionalmente. Se $v(n+1) < v(n)$ as novas posições são aceites e h_{n+1} torna-se $1.2 h_n$; se $v(n+1) > v(n)$ as novas posições são rejeitadas e h_{n+1} torna-se $0.2 h_n$. O algoritmo pára após um número de ciclos definidos pelo utilizador ou quando $|F_i(n)|$ é inferior ao valor de convergência selecionado. A última conformação não é necessariamente a de menor energia do sistema mas apresenta um valor inferior ao primeiro valor energético. Apesar de

este método não permitir saltar entre mínimos locais, converge muito rapidamente para um mínimo local (ou próximo dele). É um método muito útil para corrigir conformações estranhas ou como primeiro passo para minimizações mais complexas.

Simulações de dinâmica molecular

A dinâmica molecular (DM) simula o movimento atômico através do cálculo iterativo numérico de forças num sistema de Mecânica Molecular (MM). O sistema é composto por um grupo de partículas cujas posições atômicas são calculadas de acordo com as interações entre elas usando a equação do movimento de Newton (Adcock 2006). Estas equações são integradas em passos de curta duração (entre 1 e 10 femtosegundos). Em cada passo as forças (Eq. 13) em cada átomo i são calculadas pela seguinte equação (van der Spoel 2001):

$$F_i = -\frac{\delta V}{\delta r_i} \quad (13)$$

em que F_i é a força atômica no átomo i e r_i é a posição do átomo i . Com as forças e posições atuais e considerando as velocidades em cada átomo, é possível gerar novas coordenadas (Eq. 14) e velocidades (Eq. 15) (van der Spoel 2001).

$$\frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i / m_i \quad (14)$$

$$\frac{dv_i}{dt} = \frac{F_i}{m_i} \quad (15)$$

em que m_i é a massa e v_i é a velocidade do átomo i . É assumido que a força exercida em cada átomo é constante num dado intervalo de tempo. Depois, os átomos são movidos para as novas coordenadas e novas forças são calculadas. Sabendo as forças atômicas e massas podem ser calculadas as posições para cada átomo ao longo de uma trajetória. Existem vários algoritmos numéricos para integrar as equações do movimento, e muitos deles são métodos de diferença finita. O algoritmo *leap-frog* é uma abordagem numérica comum e também a usada nos programas GROMOS (van Gunsteren 1987) e GROMACS (Lindahl 2001) (usado nesta tese). Este método usa as posições no tempo t e velocidades no tempo $t-(\Delta t/2)$ para a atualização das coordenadas e velocidades via as forças calculadas $F(t)$, atuando nos átomos no tempo t .

Inicialização

Como já foi referido anteriormente antes de realizar uma simulação de DM é necessário realizar uma minimização de energia do sistema. Existe outro procedimento essencial a fazer após a minimização de energia chamado inicialização. As simulações de inicialização têm dois objetivos: gerar velocidades e iniciar movimentos nos sistemas sem introduzir demasiada instabilidade que possa dar origem a artefatos. As velocidades podem ser geradas de forma aleatória. No entanto, a magnitude do vetor velocidade depende da temperatura escolhida. Uma semente para gerar velocidades é escolhida pelo utilizador. Para evitar alguns artefatos, existem algumas estratégias tais como o uso de *position restrains* (contenção de posições).

Normalmente a inicialização começa com todos os átomos da proteína contidos para permitir que as moléculas de água se adaptem à proteína. Depois a proteína é libertada de forma gradual: primeiro as cadeias laterais e finalmente toda a proteína é libertada. Existem vários procedimentos para realizar uma simulação de DM de inicialização, embora o objetivo seja o mesmo. As *restrains* são forças externas aplicadas a alguns ou todos os átomos do sistema para limitar o seu movimento. Este método serve para evitar conformações anormais ou incluir informação experimental. É realizado através da adição de um novo termo à função de energia potencial responsável pela limitação do movimento do átomo pretendido com uma força constante k_{pr} . Esta nova função de energia potencial é dada pela equação:

$$v_{pr}(r_i) = \frac{1}{2}k_{pr} \|r_i - R_i\|^2 \quad (16)$$

onde R_i são as posições de referência e r_i é a posição atual. Este método é normalmente utilizado para evitar rearranjos drásticos devido a um solvente não equilibrado que daria origem a grandes forças nos átomos da proteína. Quando os movimentos da proteína parecem normais, o passo da inicialização pode ser parado e a simulação DM pode ser iniciada.

Condições de fronteira periódicas

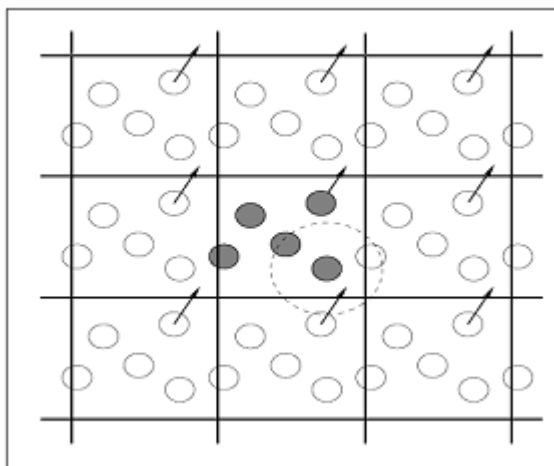


Figura 2.9 Representação de um sistema periódico de acordo com as condições Periódicas de Fronteira (adaptado de Allen 2004)

Em sistemas MM/MD a proteína é normalmente rodeada por moléculas de solvente, limitadas a um número finito que não reproduz a realidade. Este problema é resolvido através da utilização de Condições de Fronteira Periódicas ou *Periodic Boundary Conditions* (PBC) (Fig. 2.9). Este método tenta reproduzir o efeito de uma quantidade macroscópica de moléculas e consiste em rodear o sistema com cópias de si próprio o que tornará o sistema infinito. As coordenadas das cópias são calculadas pela adição ou subtração de múltiplos de vetores que descrevem a caixa de simulação. Durante as simulações, quando um átomo se move na caixa original, a sua imagem periódica em todas as caixas imagem, move-se da mesma maneira. Se um átomo sai da caixa original, a sua imagem entra pela face oposta da caixa original com a mesma velocidade. Assim, o

número total de átomos na caixa central e no sistema como um todo é conservado. A principal aproximação de um sistema usando PBC é simular uma diluição infinita, não completamente coerente com a realidade.

Temperatura

A temperatura é uma propriedade termodinâmica dada pela energia cinética média do sistema ao longo do tempo de simulação. A forma de manter a temperatura do sistema constante é acoplando-a a um banho térmico externo. Este banho externo é uma fonte externa de energia térmica que pode fornecer ou retirar energia do sistema. A variação de velocidade é proporcional à diferença entre a temperatura do banho e a temperatura do sistema (Eq.17)

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{T_{\text{banho}} - T(t)}{\tau} \quad (17)$$

τ é a constante de acoplamento que determina a forma como a temperatura do banho e a temperatura do sistema são acoplados. Com este método a temperatura do sistema decai exponencialmente para a temperatura desejada. A diferença de temperatura entre os dois passos é dada pela Eq. 18.

$$\Delta T = \frac{\Delta t}{\tau} (T_{\text{banho}} - T(t)) \quad (18)$$

Finalmente o fator de graduação (λ) aplicado às velocidades é dado pela Eq. 19.

$$\lambda = \left[1 + \frac{\Delta t}{\tau} \left(\frac{T_{\text{banho}}}{T(t)} - 1 \right) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (19)$$

A força de acoplamento depende do valor de τ . Um alto valor de τ significa uma baixa temperatura de acoplamento e vice-versa. Normalmente, um baixo valor de τ é usado nos primeiros passos da simulação para assegurar que a temperatura converge rapidamente para o valor desejado.

Pressão

No caso da pressão o objetivo é aproximadamente o mesmo: acoplar o sistema a um banho externo de pressão. Basicamente, se o sistema apresenta um valor mais elevado de pressão que o desejado, o volume da caixa de simulação devia ser aumentado e vice-versa. A velocidade da variação de pressão é dada pela seguinte equação (Eq. 20)

$$\frac{dP(t)}{dt} = \frac{P_{banho} - P(t)}{\tau_p} \quad (20)$$

τ_p é a constante de acoplamento em analogia com τ presente na temperatura. O volume da caixa de simulação é dado pelo fator μ (Eq. 21)

$$\mu = 1 - \beta \frac{\Delta t}{3\tau_p} (P_{banho} - P(t)) \quad (21)$$

β é a compressibilidade isotérmica do sistema. As novas posições dos átomos são dadas pela Eq. 22

$$\mathbf{r}'_i = \mu^{\frac{1}{3}} \mathbf{r}_i \quad (22)$$

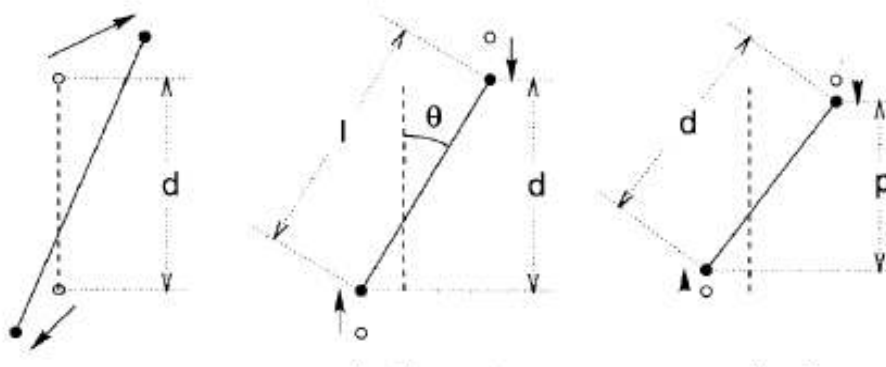
Mais uma vez, quanto maior o valor de τ_p , menor é a pressão acoplada ao valor desejado e vice-versa.

Para uma simulação correta de proteínas solvatadas, é necessário ter em consideração fatores externos como a temperatura e pressão de forma a mimetizar as condições fisiológicas. Para lidar com estas condições é necessário usar algoritmos específicos. O propósito destes algoritmos é corrigir as velocidades e posições dos átomos para reproduzir, respetivamente, a temperatura e pressão desejada. Existem diferentes

métodos para lidar com a pressão e temperatura entre eles o banho de temperatura e pressão de Berendsen (Berendsen 1984).

Constraints

Um dos problemas mais comuns neste tipo de simulações prende-se com o fato de serem muito morosas. Assim, algumas aproximações são normalmente utilizadas para minimizar o tempo computacional. Uma forma de acelerar as simulações é utilizar um passo de integração elevado. No entanto este envolve vários riscos porque existem vários fenómenos que acontecem em períodos de tempo muito curtos, tais como o estiramento de ligações. Uma forma de aumentar o tempo de integração sem perder exatidão de forma significativa é a utilização de algoritmos de *constraints*. Existem vários métodos para realizar *constraints* de ligações e ângulos, entre os quais LINCS (Hess 1997) e o SHAKE (Ryckaert 1977). O SETTLE (Miyamoto 1992) é uma solução analítica do SHAKE desenvolvida especificamente para moléculas de água. O algoritmo LINCS é uma ferramenta muito útil para fixar comprimentos de ligação. Este, após um passo de integração sem *constraints*, restaura os comprimentos de ligação aos valores de equilíbrio. O algoritmo funciona em dois passos (Fig. 2.10): primeiro, as novas ligações são projetadas nas antigas e depois é aplicada uma correção para ajustar o comprimento de ligação ao mínimo de referência.



Atualização sem *constraints* → projeção de forças aplicadas às ligações → correção para comprimento rotacional

Figura 2.10 Algoritmo LINCS para *constraints* do comprimento de ligações (Hess 1997)

O algoritmo SETTLE é normalmente usado para fixar comprimentos de ligação e ângulos em moléculas de água. Tal como no LINCS, o algoritmo SETTLE restaura os comprimentos de ligações e ângulos aos valores de equilíbrio após um passo de integração sem restrições.

c. Eletrostática de contínuo

As simulações de Poisson-Boltzmann e Monte Carlo podem ser usadas para analisar as alterações no estado de protonação e/ou grupos redox pela influência do pH da solução e/ou potencial eletrostático. Com estas técnicas é possível calcular curvas de titulação para grupos protonáveis e redox, e consequentemente as suas constantes de dissociação (pK_a) e potenciais de redução (Baptista 1999).

Equação de Poisson-Boltzmann

As propriedades eletrostáticas das macromoléculas (como proteínas ou DNA) podem ser calculadas através das equações de Poisson (Eq. 23) ou Poisson-Boltzmann (Eq. 24). Nestes cálculos, o soluto é tratado como uma região com baixa constante dielétrica e considerados alguns detalhes atômicos (coordenadas de cargas atômicas parciais e forma da superfície molecular) e o solvente é modelado como um contínuo com alta constante dielétrica (80 para a água). Num meio em que a constante dielétrica não é uniforme, a equação de Poisson (Eq. 23) é escrita da seguinte forma:

$$\nabla \cdot [\epsilon_0 \epsilon(r) \nabla \phi(r)] = -\rho(r) \quad (23)$$

em que ϵ_0 é a permitividade elétrica do vácuo, $\epsilon(r)$ é a constante dielétrica, $\phi(r)$ é o potencial em r e $\rho(r)$ é a densidade de carga em r . O campo elétrico produzido pela molécula depende não só da distribuição de cargas mas também da forma da superfície, e a constante dielétrica é função de r . A equação de Poisson é usada para tratar sistemas sem iões. Na presença de iões, é utilizada a equação de Poisson-Boltzmann (Eq. 24)

que considera a redistribuição de iões em solução como resposta ao potencial elétrico sendo os contra-íões explicitamente incluídos, e pode ser escrita assim:

$$\nabla \cdot [\epsilon_0 \epsilon(r) \nabla \phi(r)] - \epsilon_0 \epsilon(r) k^2(r) \phi(r) + \rho(r) = 0 \quad (24)$$

em que

$$k^2(r) = \frac{2I}{\epsilon \epsilon_0 k_B T} \quad (25)$$

onde k é o comprimento inverso de Debye-Huckel, I é a força iónica, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura. Quando não existem iões em solução ($I=0$), k é zero e a equação transforma-se na equação de Poisson. ϵ e k são função de r , indicando que contribuem para a forma da superfície molecular (dentro $\epsilon = \epsilon_{in}$, fora $\epsilon = \epsilon_{out}$) e para a região de exclusão iónica (dentro $k = 0$, fora $k = eq.$)

Energia livre eletrostática de ligação ($\Delta G(n)$)

Um centro protonável é um grupo aniónico ou catiónico que pode (des)protonar num certo intervalo de pH. Nesta tese, foi considerado um centro protonável qualquer aminoácido com uma cadeia lateral protonável e os grupos C- e N-terminal. Devido ao uso de equações lineares, é possível decompor as diferentes contribuições energéticas numa soma de termos que dependem apenas de um centro, e aqueles que dependem de pares de centros. Para os termos que só dependem de um centro, onde $i = j$, a energia de solvatação corresponde à diferença de energia devido à transferência de um grupo de um meio dielétrico para outro (ex. da água para a proteína). As contribuições energéticas relativas aos termos que dependem de pares de centros, onde $i \neq j$, correspondem às interações diretas entre os grupos carregados i e j da proteína. Agrupando todas as contribuições, temos então que a diferença de energia livre entre o estado de protonação n e o estado completamente desprotonado pode ser escrita como:

$$\Delta G(n) = -2.3\beta \sum_i n_i pK_i^{int} + \frac{1}{2} \sum_i \sum_j (n_i n_j + n_i z_j^0 + n_j z_i^0) W_{ij} \quad (26)$$

onde o pK_i^{int} é o pK intrínseco do centro i , e z_i^0 é a carga do centro i na forma desprotonada (Schaefer 1997). A energia de solvatação pode ser calculada com a ajuda de um ciclo termodinâmico, como o do esquema da figura 2.11 (Bashford 1990) que envolve o carregamento e descarregamento do centro em diferentes meios.

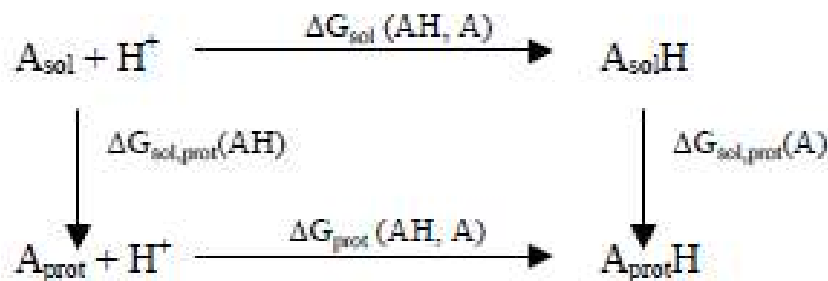


Figura 2. 11 Ciclo termodinâmico usado para calcular a energia livre de solvatação.

Neste esquema, $A_{sol}H$ e A_{sol} representam o centro na forma protonada e desprotonada em solução, e de forma análoga $A_{prot}H$ e A_{prot} representam, na proteína, o centro na forma protonada e desprotonada. A energia livre de solvatação inclui a interação da carga com a polarização que a carga induz na sua vizinhança, e a interação da carga com a densidade de carga iônica que ela induz no solvente. Quando o resíduo isolado da proteína é usado como modelo (Fig. 2.12), a constante de ligação do próton em solução - pK^{mod} , é assumida como sendo o pK da reação horizontal superior da Figura 2.11 ($\Delta G_{sol}(AH,A)$), obtido experimentalmente. A constante de ligação do próton no interior da proteína, reação horizontal inferior da Figura 2.11 ($\Delta G_{prot}(AH,A)$), pode ser determinada tendo em conta as restantes três reações do ciclo termodinâmico

$$pK^{int} = pK^{mod} + \frac{\beta}{2.3} (\Delta G_{sol,prot}(A) - \Delta G_{sol,prot}(AH))$$

Através do ciclo termodinâmico (Fig. 2.11) obtemos então o termo para a diferença de energia após transferência de um grupo do solvente para a proteína (Schaefer 1997).



Figura 2.12 Modelo usado no cálculo das energias livres eletrostáticas (adaptado de Bashford 1990)

O segundo termo da equação 26 descreve-nos as interações diretas entre diferentes grupos carregados da proteína

$$W_{ij} = w_{ij}^p(1,1) - w_{ij}^p(1,0) - w_{ij}^p(0,1) - w_{ij}^p(0,0) \quad (28)$$

onde $W_{ij}(n_i, n_j)$ é a energia de interação eletrostática entre os centros i e j no estado de ligação n_i e n_j , respectivamente (a dedução do W_{ij} pode ser encontrada na literatura) Schaefer 1997.

Os quatro termos da equação 28 representam as combinações dos possíveis estados de protonação do par de centros (ex: $w_{ij}(1,1)$ dá-nos a energia de interação eletrostática quando os dois centros estão protonados).

Método das diferenças finitas

O método utilizado pela grande parte dos programas para resolver a equação de Poisson-Boltzmann na sua forma linear, é o método das diferenças finitas. Neste método usa-se uma grelha cúbica regular de espaçamento h (Klapper 1986), e a precisão do cálculo é tanto melhor quanto menor é o h . A cada ponto é atribuído um valor para a densidade de carga, constante dielétrica e força iónica segundo a equação PB (Eq. 24) (Sharp 1990). Integrando a equação de Poisson-Boltzmann ao longo do volume de um cubo de lado h (fig. 2.13), obtemos

$$h \sum \varepsilon_i (\phi_i - \phi_0) - h^2 k_{\infty 0}^2 \phi_0 + 4\pi q_0 = 0 \quad (29)$$

onde q é a carga total fixa dentro do elemento volume. Se resolvermos a Eq. 29 em ordem a ϕ_0 obtém-se

$$\phi_0 = \frac{\sum \varepsilon_i \phi_i + 4\pi q_0}{\sum \varepsilon_i + k_{\infty 0}^2 h^2} \quad (30)$$

É feita uma estimativa inicial para o potencial em todos os pontos da grelha e seguidamente fazem-se iterações até que a variação do potencial seja mínima (Klapper 1986), e portanto o procedimento numérico tenha convergido.

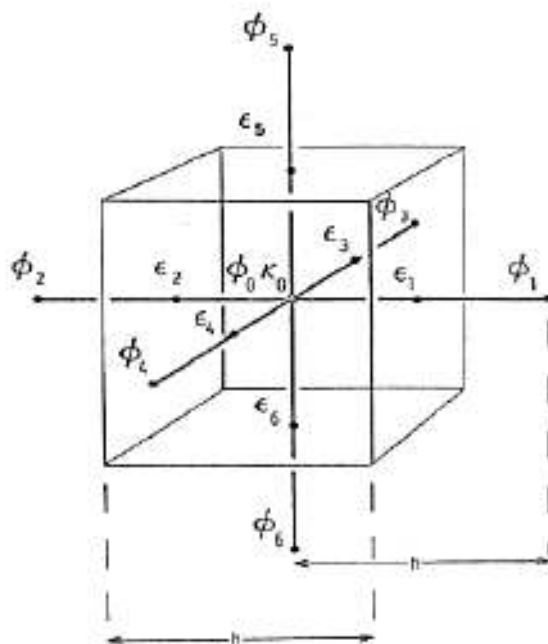


Figura 2.13 Elemento de volume cúbico associado a um ponto da grelha (subscrito 0). No ponto médio de cada face, está um valor de constante dielétrica ϵ . O potencial ϕ e o parâmetro Debye-Huckel k estão associados com o centro do cubo (Klapper 1986)

Cálculo dos pK^{int} e das interações entre resíduos

Os valores para os pK^{ints} e interações são calculados pelo programa MEAD Bashford 1990, que usa o método das diferenças finitas descrito anteriormente para resolver a equação de PB. Este programa requer os valores de pK^{mod} para cada centro.

A constante dielétrica usada para a região do solvente foi 80. Para simular o interior da proteína, usou-se uma constante dielétrica de 4 (Machuqueiro 2010). A força iônica usada foi 0.1 M e a temperatura foi 300 K. Para fazer os cálculos, foi usado um sistema de focagem em três passos (Gilson 1988): no primeiro usamos uma grelha cúbica de 81 pontos de lado e espaçamento entre pontos 1.5 Å centrado na proteína. No segundo passo foi usada uma grelha com 81 pontos de lado e espaçamento entre pontos de 1.0 Å e centrada na proteína e o terceiro passo usou uma grelha com 61 pontos de lado, com espaçamento entre pontos de 0.25 Å e centrado no centro titulável. O composto modelo utiliza uma focagem em dois passos em que o primeiro tem uma grelha cúbica com 61 pontos espaçados por 1.0 Å e o segundo uma grelha cúbica com 61 pontos de lado espaçados por 0.25 Å. Ambas as grelhas são centradas no centro titulável.

Cálculos de Monte Carlo

Depois de calculados os pK^{int} e as energias de interação entre pares de centros carregados, podemos calcular a probabilidade de cada estado de ligação ao longo de um intervalo de pH. Esta amostragem vai permitir-nos obter todos os dados termodinâmicos para caracterizar o sistema, como por exemplo, a curva de titulação de um centro protonável. Quando se tratam proteínas com muitos centros tituláveis, os cálculos tornam-se muito demorados, dada a dependência exponencial do tempo relativamente ao número de centros. Para ultrapassar esta limitação, foi proposto um método de Monte-Carlo (MC), capaz de tratar um elevado número de centros e, no entanto, com erros de amostragem muito baixos. Neste método, os estados são amostrados com probabilidade dada pelo fator de Boltzmann normalizado

$$p_a = \frac{\exp[-\beta G_{(a)}]}{z} \quad (31)$$

em que

$$z = \sum \exp[-\beta G_{(a)}] \quad (32)$$

Desta forma, apenas os estados mais prováveis são amostrados, diminuindo consideravelmente o seu número relativamente à quantidade total de estados.

Os valores de pK^{int} e W_{ij} calculados pelo MEAD são usados pelo programa PETIT para calcular a energia de estados (Baptista 1999). Este método de MC segue o critério de Metropolis (Metropolis 1953) para aceitar ou rejeitar alterações de estado.

Os cálculos foram realizados num intervalo de pH e potencial eletrostático que variaram entre -5 e 25 com intervalos de 0.2 em 0.2. As simulações foram feitas à temperatura de 300 K, e cada corrida de MC consistiu em 200 000 passos, onde cada passo é definido como um ciclo completo de trocas sobre todos os centros individuais e pares acoplados.

Tabela 2.2 Lista de simulações executadas neste trabalho

Simulação	FAD, Cys59, Cys64	His	Cys497	Sec498	Cys cat32 (Trx)	Cys75 Cys73 (Trx)
1 OxS0Se-H0	Ox	0	0	-		
2 OxS-Se-H0	Ox	0	-	-		
3 OxS0Se0H+	Ox	+	0	0		
4 OxS0Se-H+	Ox	+	0	-		
5 RedS0Se-H0	Red	0	0	-		
6 RedSOxSeOxH0	Red	0	Ox	Ox		
7 TetraS0	Ox	0	0	Ox	Ox	Red
8 TetraS-	Ox	0	-	Ox	Ox	Red
9 InibS0	Ox	0	0	Ox	Ligando Ligando	
10 InibS-	Ox	0	-	Ox		

Ox- Oxidado, Red-Reduzido, 0-neutro,- aniônico, + catiônico

Os cálculos de pK_a foram realizados para as conformações obtidas de Dinâmica Molecular com os resíduos protonados ou desprotonados e usando uma aproximação de resposta linear (Machuqueiro 2010), foi possível obter o valor final tomando a média sobre todas as conformações.

Simulações - *set-up* e parâmetros

As simulações de MM/DM foram realizadas com o programa GROMACS versão 4.0.7 (Hess 2008). Foi usado o *force field* GROMOS 54A7 (Schmid 2011, van Gunsteren 1987) juntamente com as cargas atômicas parciais calculadas para o FAD e o inibidor usado neste estudo. As simulações partiram de estruturas de raio-X (código pdb: 3QFA para o dímero TrxR1 e 3QFB para o tetrâmero TrxR1-TRx1. As estruturas foram limpas e corrigidas em relação a átomos omissos e à estrutura das cadeias. O grupo FAD foi mantido como co-fator e a selenocisteína foi tratada na Dinâmica Molecular como uma cisteína normal de modo a simplificar as alterações ao campo de forças.

Os sistemas foram solvatados usando caixas dodecaédricas em que foi imposta uma distância mínima de 8 Å entre a proteína e as paredes da caixa. O sistema final tinha 46937 moléculas de água e um total de 150677 átomos no dímero e 54514 moléculas de água e um total de 175503 átomos no tetrâmero. O sistema foi minimizado energeticamente em três passos (*Steepest Descent*/*l-BFGS*/*Steepest Descent*). Foram aplicados *restrains* iguais a todos os passos de minimização.

Foi usada uma constante de força de position restraining de 103 kJ/mol nm² em todos os passos de minimização. As simulações de dinâmicas moleculares foram realizadas através de banhos térmicos usando o algoritmo v-rescale a 310 K e constantes de acoplamento de 0.1 ps. Já o banho de pressão foi realizado através do acoplamento de Berendsen (Berendsen 1984). O algoritmo LINCS (Hess 1997) foi usado em todas as ligações (incluindo os centros metálicos). As equações do movimento foram integradas usando um tempo de 0.002 ps. As interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas utilizando o método Particle Mesh Ewald (PME) (Darden 1993).

A inicialização de cada simulação de DM foi feita em três passos. O primeiro consistiu numa simulação de 100 ps com todos os átomos restringidos com uma constante de força de 10³ kJ/mol nm² e velocidades iniciais retiradas da distribuição de Maxwell-Boltzmann a 310 K. A constante de acoplamento de temperatura foi de 0.01 ps. O segundo passo consistiu numa simulação de 150 ps à mesma temperatura com as *position restrains* em todos os átomos à exceção dos hidrogénios com uma constante de acoplamento de temperatura de 0.1 ps e banho de pressão com constante de acoplamento de 1.0 ps. O último passo consistiu numa simulação de 200 ps à mesma temperatura e as posições de todos os Ca restringidos e constante de acoplamento de temperatura de 0.1 ps e pressão de 1.0 ps.

De modo a obter informação conformacional importante sobre o funcionamento da TrxR foram escolhidas 10 condições de simulação (Tabela 2.2).

Existem dois grupos principais de simulações: as simulações onde a TrxR se encontra livre e as simulações onde a TrxR está ligada a um parceiro, a Trx ou o inibidor.

Simulações com TrxR livre:

- Simulação 1 (OxS⁰Se⁻H⁰) (3 replicados): o centro redox do N-terminal (FAD + Cys59 + Cys64) encontra-se oxidado, enquanto que o par catalítico Cys497-Sec498 está reduzido e no estado de protonação típico do pH neutro.
- Simulação 2 (OxS⁻Se⁻H⁰): semelhante à anterior embora a Cys497 se encontre desprotonada típica de um pH bastante elevado.

Este conjunto de simulações permitem-nos fazer posteriormente o cálculo de pK_a da Cys497 estando a Sec498 livre.

- Simulação 3 ($\text{OxS}^0\text{Se}^0\text{H}^+$) (3 replicados): o centro redox N-terminal encontra-se oxidado, e os restantes resíduos (inclusive as histidinas) estão protonadas, típicas de um pH muito baixo.
- Simulação 4 ($\text{OxS}^0\text{Se}^-\text{H}^+$) (3 replicados): semelhante à anterior, mas com a Sec498 desprotonada

Com estas simulações podemos obter um valor de pK_a da Sec498.

- Simulação 5 ($\text{RedS}^0\text{Se}^-\text{H}^0$): semelhante à simulação 1 mas com o centro redox N-terminal reduzido.

Esta simulação permite-nos descrever a TrxR no seu estado totalmente reduzido e pronto a ligar-se a um parceiro.

- Simulação 6 ($\text{RedS}^{\text{Ox}}\text{Se}^{\text{Ox}}\text{H}^0$): semelhante à simulação 5 mas com o par catalítico Cys497-Sec498 oxidados.

Esta simulação representa a TrxR imediatamente após a transferência de dois eletrões para a Trx e pronta para que o braço C-terminal faça a aproximação ao centro redox N-terminal para se regenerar.

Simulações da TrxR ligada a um parceiro:

- Simulação 7 (TetraS^0): a TrxR encontra-se totalmente oxidada e ligada à Trx.

Esta simulação descreve o estado catalítico em que faltam os equivalentes redutores vindos do NADH gerando uma estrutura totalmente oxidada e que ainda não libertou a Trx.

- Simulação 8 (TetraS^-): simulação do tetrâmero equivalente à anterior mas com a Cys497 desprotonada.

Através dos dois sistemas anteriores 7 e 8 será possível obter o pK_a da Cys497 quando a Trx se encontra ligada à TrxR e no ambiente correto para se dar o ataque nucleofílico da Cys497 à Sec498 que permitirá a libertação da Trx.

- Simulação 9 (InibS^0) e 10 (InibS^-): simulações nas mesmas condições que a 7 e 8 embora usando um inibidor de Au(I) em vez da Trx.

Este sistema descreve o aduto obtido após a inibição provavelmente irreversível da TrxR. O inibidor usado é baseado em Au(I) Cañaveras 2011, Semeco 2011 onde o grupo tiol foi substituído pela Sec498 (Fig. 2.1). A partir destas duas simulações podemos também obter o pK_a da Cys497, agora na presença de um inibidor.

Capítulo 3

Resultados e discussão

Tendo em vista que o mecanismo de ação da TrxR envolve a associação da enzima ao seu substrato foram realizadas simulações por DM dos sistemas da enzima livre, com a Trx ou com um inibidor. Estas simulações possibilitam o conhecimento das propriedades dinâmicas destes sistemas e contribuem para a elucidação dos eventos moleculares envolvidos nos mecanismos de ação desta enzima. Cada um dos 10 sistemas descritos na tabela 2.2, foram simuladas durante de 50 ns. Das trajetórias finais obtidas foram feitas análises estruturais, bem como vários cálculos de pK_a de modo a elucidar os estados de protonação preferenciais de determinados resíduos chave na proteína.

Normalmente as medidas feitas ao longo do tempo de simulação contêm algum ruído. Por isso, e para facilitar a interpretação dos resultados, usamos uma média de janelas flutuante com a dimensão de 0.5 ns. Esta técnica de "suavização" consiste no cálculo duma série de valores locais de médias ao longo do tempo de simulação. Estes valores médios são usados nas representações em substituição das originais. Também é muito útil olhar para as conformações obtidas da DM e conferir visualmente as propriedades gerais do sistema durante as simulações. O software PyMOL (DeLano 2004) foi usado na visualização destas conformações resultantes das simulações e os gráficos foram gerados com o programa GNUPLOT.

Uma das análises mais úteis é a medida dos desvios médios quadráticos das posições atômicas (RMSD - *root mean square deviations*). O RMSD dos sistemas permite identificar mudanças conformacionais que ocorrem nestes sistemas ao longo das suas trajetórias. Desta forma, as estruturas instantâneas geradas nas simulações são sobrepostas a uma estrutura de referência (geralmente a estrutura cristalográfica) e o

desvio em relação a esta referência é calculado como forma de comparação entre as duas estruturas. O RMSD é assim um indicador de alterações estruturais importantes, tais como, em situações extremas, o *unfolding* da proteína. O acompanhamento do RMSD dos sistemas ao longo das trajetórias em função do tempo foi também um parâmetro importante utilizado para a avaliação da estabilidade das simulações.

A medida dos desvios médios quadráticos de flutuação (RMSF) permite medir as flutuações para um resíduo específico, o que nos dá informação também sobre estabilidade conformacional, mas localizada no espaço, ignorando a informação temporal.

O raio de giração é outra análise que fornece parâmetros estruturais importantes, sendo indicativo da forma como a estrutura da macromolécula varia em função do tempo no ambiente de simulação. O raio de giração, definido com a média ponderada da distribuição das massas atômicas em relação ao centro de massa da macromolécula, mede a compactação da mesma e, em última instância, fornece uma estimativa da variação do tamanho da proteína durante as simulações.

A análise DSSP pode mostrar rapidamente onde estão a ocorrer numa simulação, as alterações na estrutura secundária. Como esta perda ou ganho em estrutura estão associadas a eventos muito significativos na trajetória, esta medida é valiosa para avaliar a estabilidade das simulações (Benson 2012).

a. RMSD

A medida mais comum para avaliar a semelhança entre duas estruturas é o RMSD. O valor RMSD pode ser calculado usando a Eq. 33. Antes do cálculo, as duas estruturas são alinhadas uma em relação à outra por rotação e translação até ser atingido um mínimo. Normalmente, é selecionada uma estrutura de referência e toda a trajetória da simulação é alinhada a ela, seguido do cálculo do RMSD para cada conformação. A escolha da estrutura de referência deve ser criteriosa já que uma má escolha pode originar maus resultados. Outra decisão a tomar prende-se com a escolha dos átomos a usar no cálculo do RMSD (todos os átomos, só a cadeia principal, etc). A escolha depende do propósito do cálculo do RMSD. Assim, se o objetivo é a comparação de todos os átomos das duas estruturas tendo as duas o mesmo número de átomos, podem ser escolhidos todos os átomos. Normalmente é esta a abordagem nas simulações de DM já que a única variável são as coordenadas do sistema. Já se o objetivo é a

comparação de sequências homólogas devem ser escolhidos os carbonos alfa para o fit e cálculo do RMSD.

O RMSD pode ser calculado a partir da equação:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{t=1}^N d_t^2} \quad (33)$$

em que N é o número total de átomos a comparar, d_t é a distância entre o átomo i e o mesmo átomo na estrutura de referência.

A Figura 3.1 mostra o RMSD da simulação do Sistema 1 (OxS^-SeH^0).

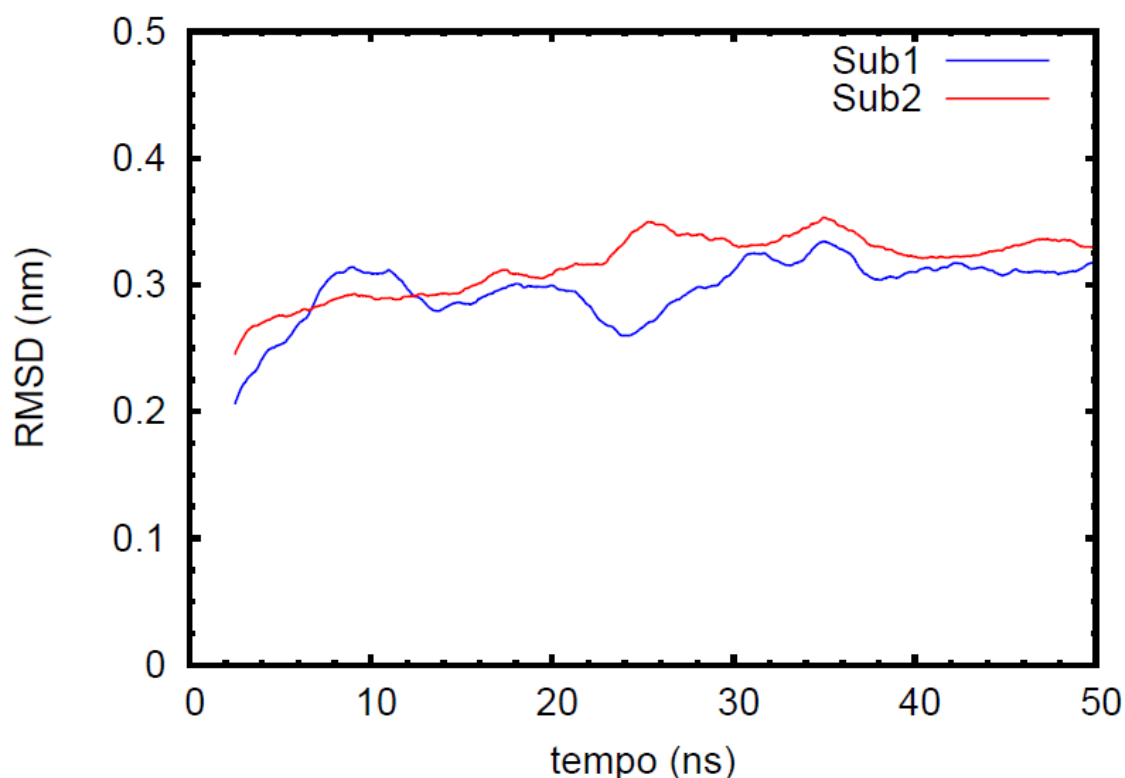


Figura 3.1 Gráfico de RMSD dos carbonos alfa em função do tempo para as trajetórias das Subunidades 1 (azul) e Subunidade 2 (vermelho) da simulação 1 (OxS^-SeH^0). O RMSD foi calculado em relação à estrutura cristalina 3QFA.

As duas subunidades mantêm-se estáveis e muito semelhantes. As duas curvas confirmam que é bastante seguro admitir a equilibração da simulação a partir dos 10 ns.

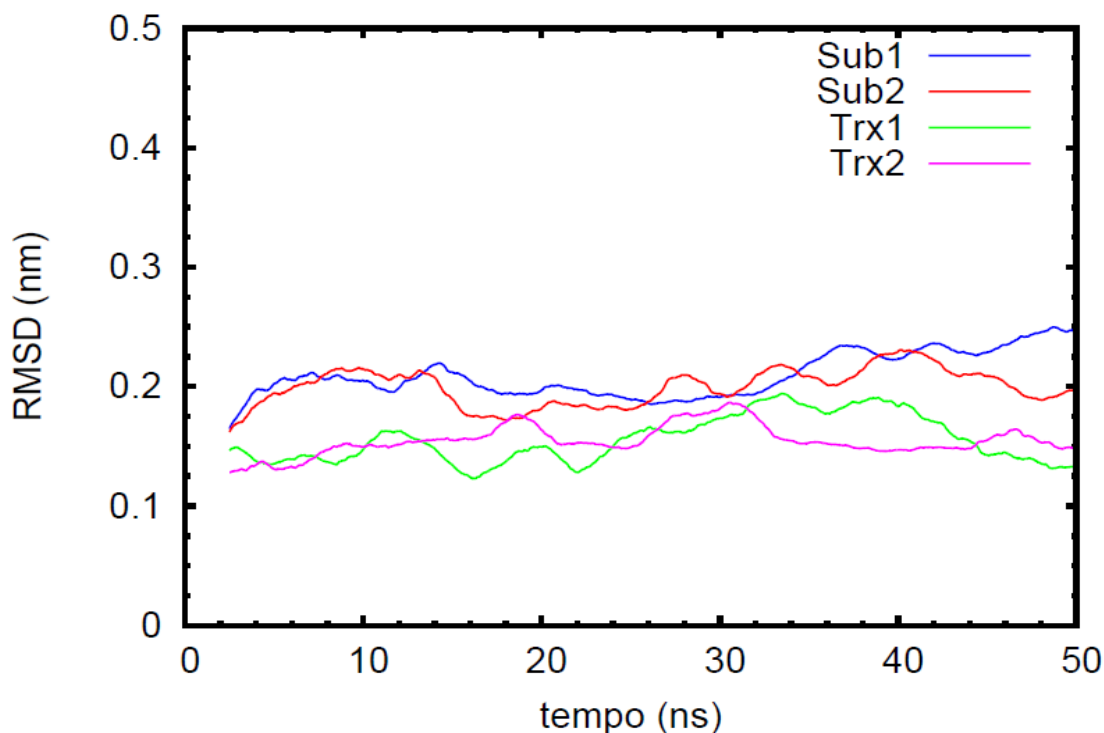


Figura 3.2 Gráfico de RMSD dos carbonos alfa em função do tempo para as trajetórias das Subunidades 1 (azul), Subunidade 2 (vermelho), Trx associada à Subunidade 1 (verde) e Trx associada à Subunidade 2 (rosa) da simulação 7 (TetraS⁰). RMSD calculado em relação à estrutura cristalina 3QFB.

A análise do tetrâmero demonstra um sistema bastante estável, com as 2 subunidades da TrxR a apresentarem variações muito semelhantes por volta dos 0,2 nm. As duas Trx apresentam um rms médio de 0,14 nm, consistentemente mais baixos que os das duas subunidades. Comparando os dois gráficos (Fig. 3.1 e Fig. 3.2) parece haver uma estabilização das subunidades na presença do substrato Trx (RMS médios de 0,3 nm para 0,2 nm).

Estes parâmetros foram acompanhados para todas as trajetórias dos sistemas em estudo. No entanto para efeito de várias análises, apenas os últimos 40 ns das trajetórias são apresentados, visto só após os primeiros 10 ns os sistemas foram considerados estáveis de acordo com os critérios

de convergência utilizados. Assim, estes primeiros 10 ns das simulações foram ignorados. Por uma questão de simplificação, nesta secção, apenas serão apresentados resultados de duas das simulações que descrevem a equilibração do sistema, uma do dímero e outra do tetrâmero.

b. RMSF

Root mean square fluctuation (RMSF) também designado desvio padrão, é a medida do desvio da posição de um átomo i e a sua posição média durante um período de tempo t . Apresenta semelhanças com RMSD, mas o RMSF é um valor relativo aos átomos e o RMSD é relativo ao tempo. O RMSF pode ser calculado pela Eq. 34.

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{t} \sum_{t_j=1}^t \|r_i(t_j) - r_i\|^2} \quad (34)$$

Os cálculos RMSF são feitos usando o `G_RMSF` ferramenta presente no programa `GROMACS` (Hess 2008).

O RMSF é uma estratégia complementar ao RMSD. Normalmente é realizado como uma média dos átomos de um resíduo de aminoácidos e o seu valor pode ser entendido como uma medida da flexibilidade do sistema analisado. RMSF e RMSD permitem identificar o grau de mudança conformacional, flexibilidade e equilibração para cada região da macromolécula em estudo. A análise RMSF foi feita para o dímero e para o tetrâmero, à semelhança das análises anteriores.

Considerando o gráfico RMSF relativo à TrxR sem a presença de Trx (Fig. 3.3) são encontrados dois picos máximos, correspondentes às porções N-terminal e C-terminal expostas ao solvente.

O segundo conjunto de resíduos que apresenta maiores flutuações nas duas subunidades corresponde aos resíduos 250 a 270. Este conjunto de resíduos corresponde a um domínio de 3 folhas beta separadas das restantes estruturas por estruturas *coil*, o que lhe permite uma grande flutuação. Esta flutuação é observada em ambas as subunidades.

O resíduo Ile140 também apresenta uma elevada flutuação e como se encontra na vizinhança dos resíduos que estabelecem a ligação à Trx, é possível que a flutuação advenha da ausência deste parceiro. É também verificado um pico no Val40, visível na Subunidade 2 e menos na

Subunidade 1. Este resíduo encontra-se nas imediações do resíduo Ile140 e pode muito bem estar sujeito a um ambiente semelhante ou ser afetado pela Ile140.

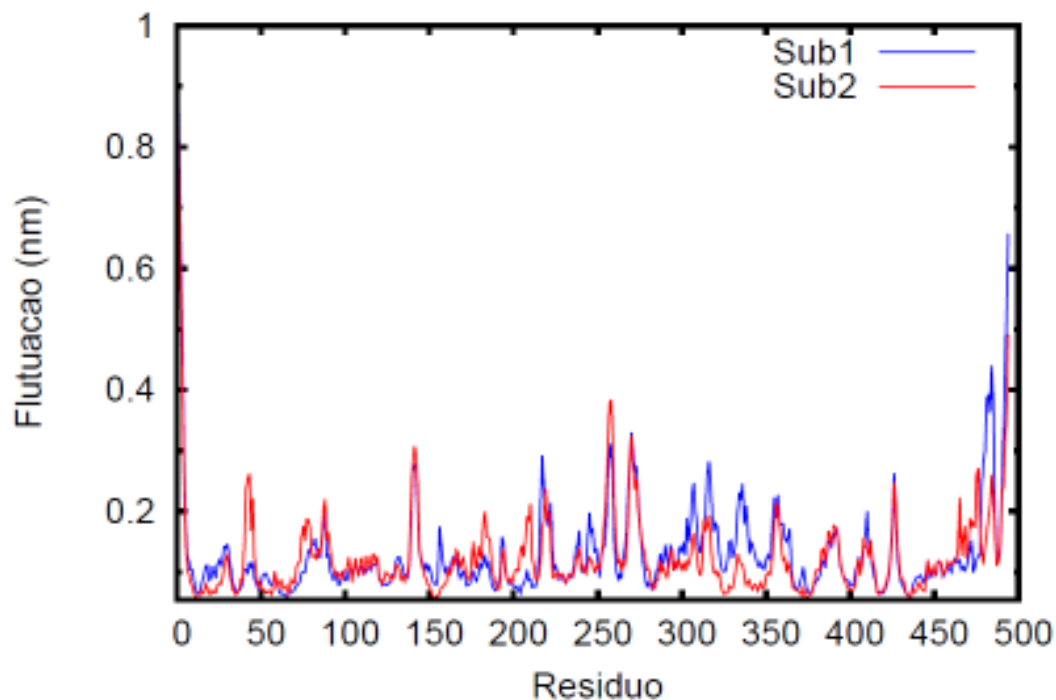


Figura 3.3 Representação gráfica de RMSF das subunidades do Sistema 1 ($OxS^0Se^{-}H^0$)(réplica2)

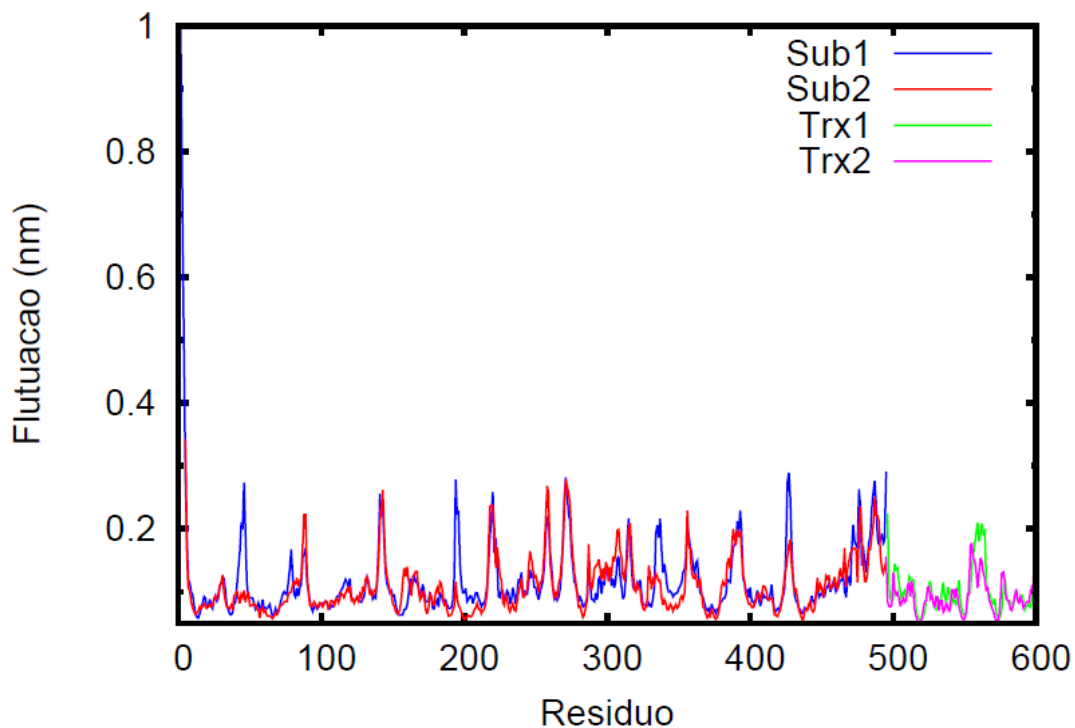


Figura 3.4 Representação gráfica de RMSF das subunidades do Sistema TetraS⁰.

No sistema constituído pelo tetrâmero (Fig. 3.4) os valores de RMSF são mais equilibrados e menores em valor absoluto. O braço N-terminal exposto ao solvente corresponde ao valor máximo observado. É interessante observar a perda de flutuações no C-terminal da TrxR, região onde ocorre a ligação à Trx.

Quanto à Trx (do resíduo 500 ao resíduo 612 no gráfico 3.4) aparenta ser bastante estável na estrutura global. No entanto, especialmente no aa 70, existe um pico de flutuação concordante com a região de ligação da Trx à TrxR.

c. Raio de giração

Para se ter uma ideia do grau de compactação da proteína, é muitas vezes usado o raio de giração (Eq.35)

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N r_i^2 m_i}{\sum_{i=1}^N m_i}} \quad (35)$$

em que N é o número de átomos, r é a distância entre o átomo i e o centro de massa da molécula e m_i é a massa da partícula i . Esta propriedade permite também detetar grandes alterações conformacionais. O raio de giração normalmente é útil para o estudo do *fold*ing das proteínas. Os cálculos do raio de giração foram feitos usando a ferramenta *g_gyrate* do programa *GROMACS* (Hess 2008).

As análises do raio de giração (Fig. 3.5 e Fig.3.6) mostraram, de um modo geral, sistemas bastante estáveis e também que a equilibração é atingida dentro dos primeiros 10 ns.

Curiosamente não existe uma variação significativa do raio de giração devido ao fato do braço C-terminal estar exposto ao solvente sem a presença de Trx. O braço C-terminal parece tomar uma posição na fenda intersubunidades correspondente à posição de espera oxidada o que lhe confere uma maior compactação.

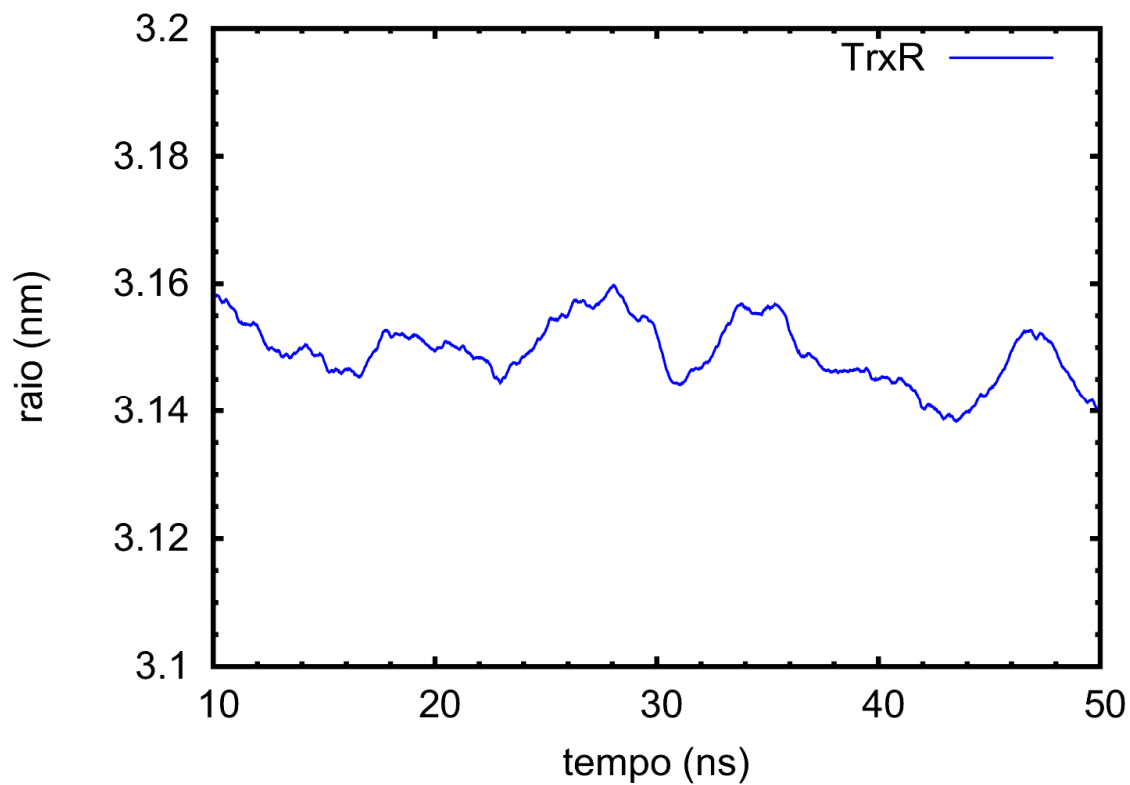


Figura 3.5 Representação gráfica do raio de giração do Sistema 1 (OxS^0Se-H^0) (réplica 2).

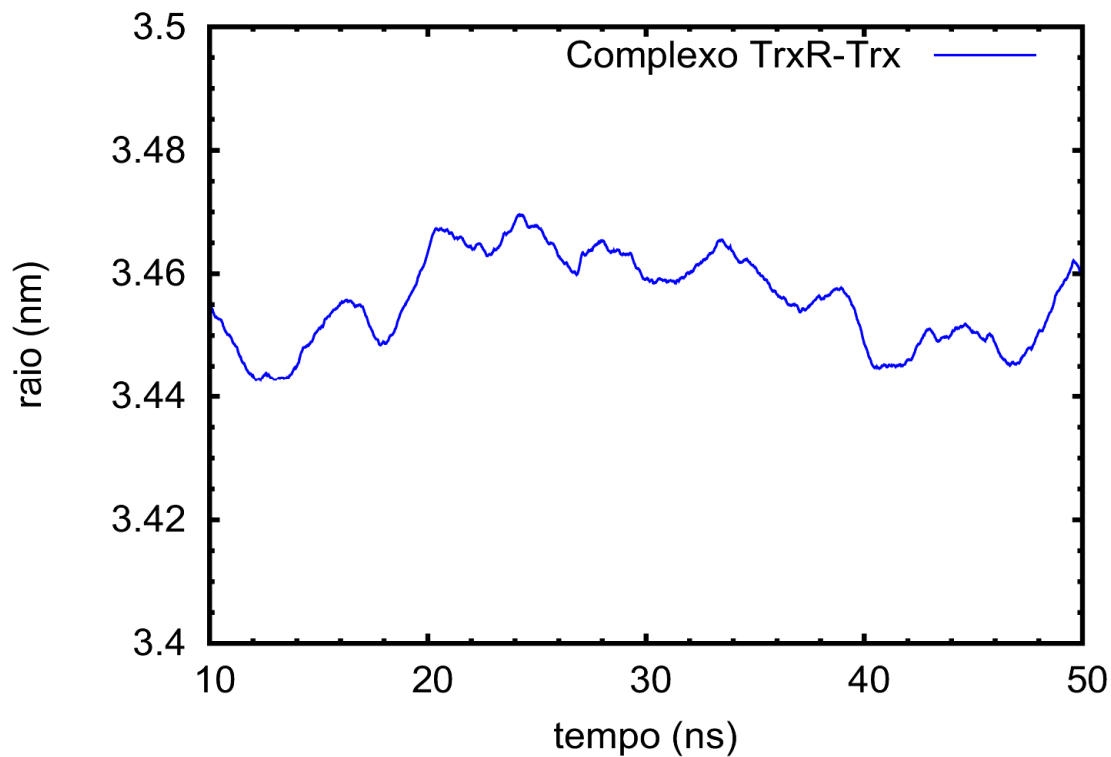


Figura 3.6 Representação gráfica do raio de giração do Sistema 7 ($TetraS^0$).

d. DSSP

O critério de atribuição da estrutura secundária de uma proteína baseia-se nos ângulos e distâncias específicos que caracterizam os elementos da estrutura secundária (Kabsch 1983). Uma das limitações do método prende-se com o fato de pequenas variações na conformação da proteína poder levar a grandes variações nos elementos da estrutura secundária. Ainda assim, não existem métodos mais satisfatórios para atribuição de estrutura secundária, pelo que o usámos neste trabalho. Os cálculos DSSP foram realizados usando a ferramenta `do_dssp` do GROMACS (Hess 2008) e o programa DSSP (Kabsch 1983).

As análises DSSP foram realizadas a partir dos 10 ns de simulação altura em que se deu a estabilização do sistema, como verificado pelas análises anteriores.

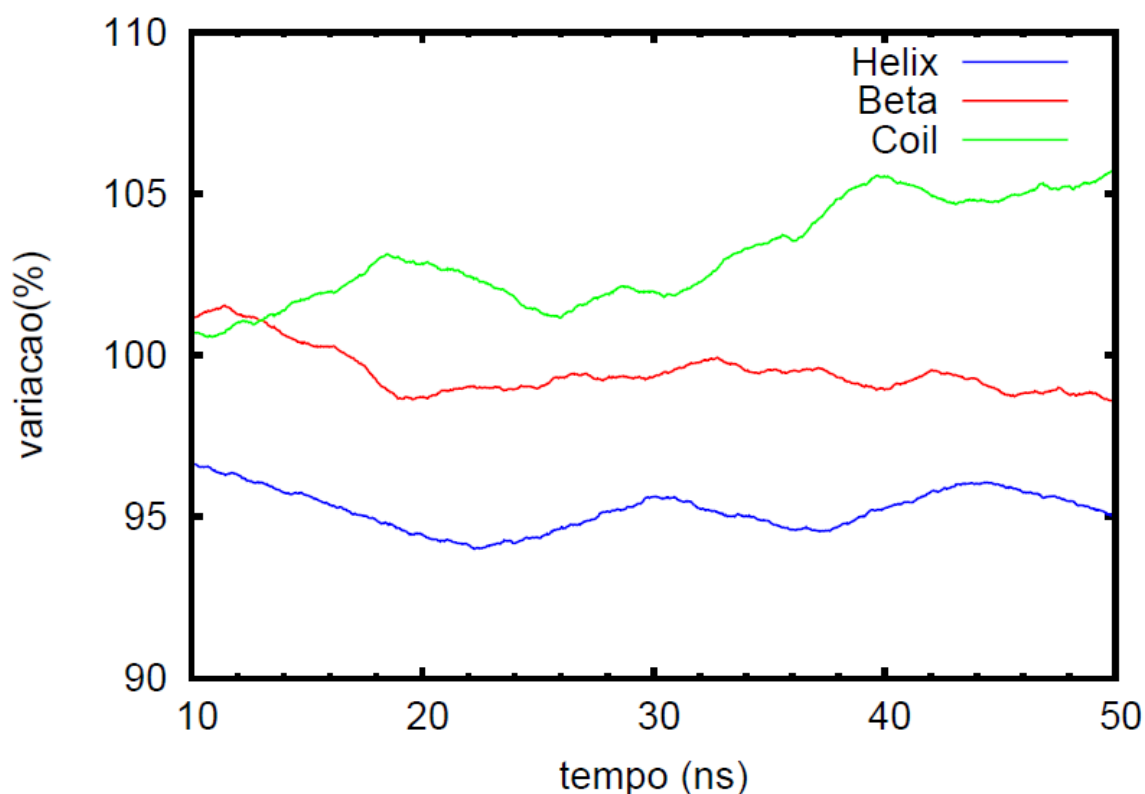


Figura 3.7 Representação gráfica da variação (%) de Hélice - α , β -sheet, coil do

Sistema $\text{OxS}^0\text{Se}^- \text{H}^0$ (réplica 2). A variação é calculada em relação à estrutura cristalográfica 3QFA.

Pela análise da variação em estrutura secundária do dímero (Fig. 3.7) existe uma perda muito ligeira em estrutura de hélice alfa assim como de folhas beta até sensivelmente os 20 ns de simulação. A partir deste momento o teor nestas estruturas mantém-se sensivelmente constante com pequenas oscilações. Esta ligeira perda de estrutura está associada a um desempacotamento do cristal mais lento por parte da proteína, bem como às flutuações normais da TrxR a 310 K.

Os mapas de DSSP das duas subunidades (Fig. 3.8 e 3.9) confirmam a grande estabilidade da estrutura secundária desta proteína. Outro ponto de relevo é que há uma grande simetria entre as duas subunidades da proteína.

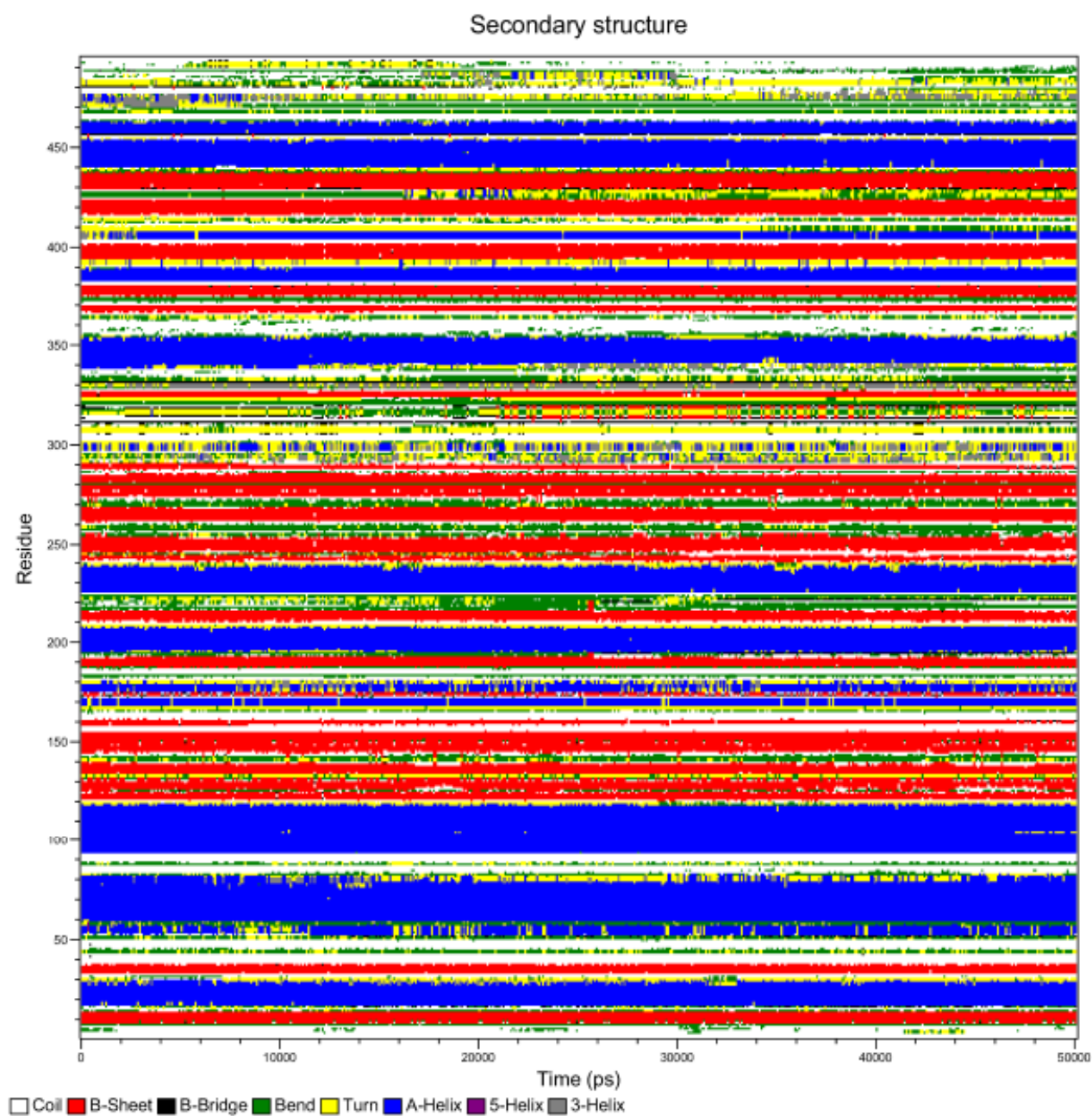


Figura 3.8 Mapa DSSP da subunidade 1 da TrxR do Sistema 1 ($OxS^0Se^{-}H^0$) (réplica 2)

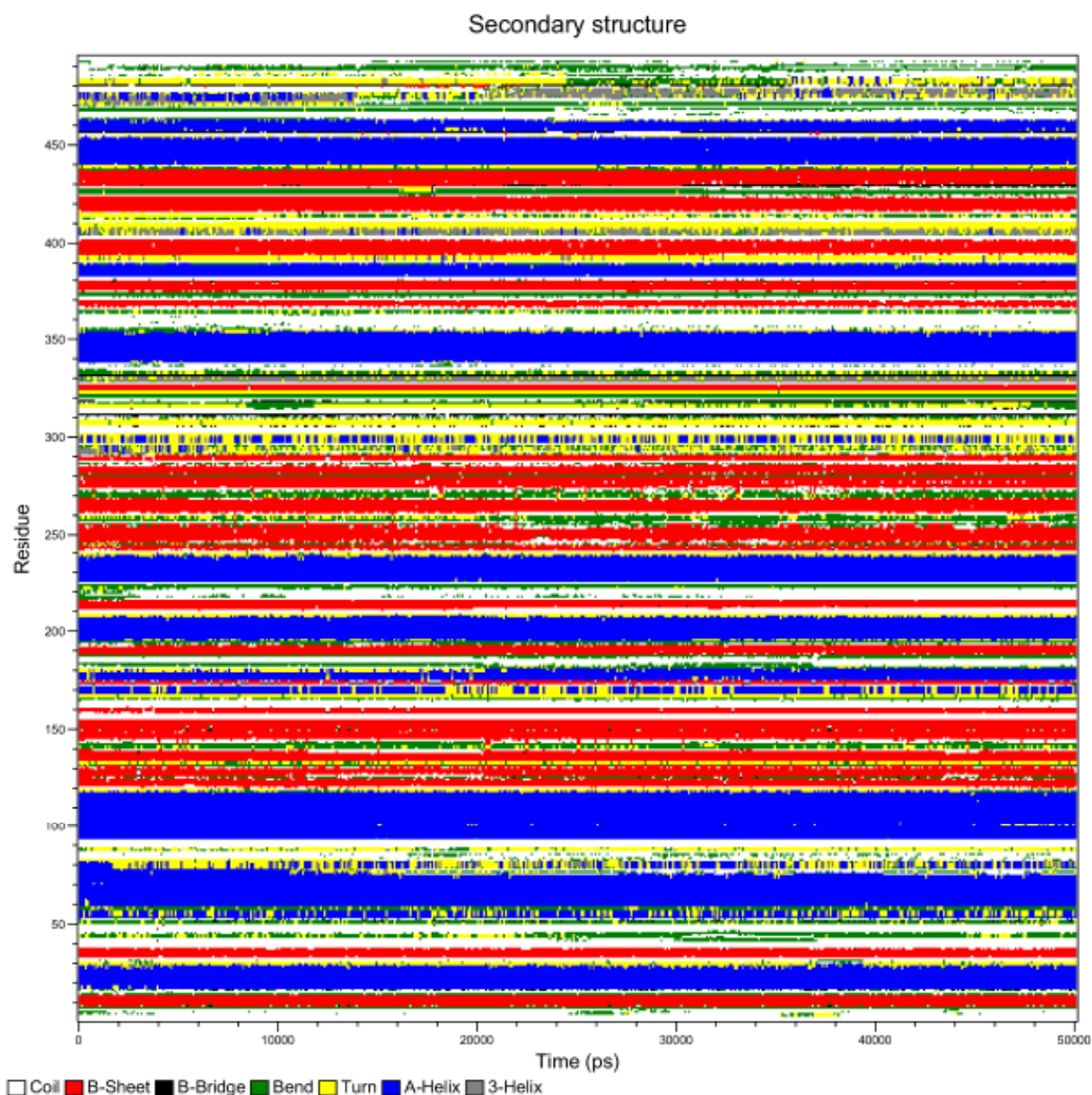


Figura 3.9 Mapa DSSP da subunidade 2 da TrxR do Sistema 1 ($OxS^0Se^-H^0$) (réplica 2)

Foi realizada uma análise semelhante mas desta vez para o tetrâmero. Como se vê na Figura 3.10 há uma maior alteração na estrutura secundária no tetrâmero que no dímero. Há uma perda de helicidade até aos 22 ns, momento em que estabiliza com algumas flutuações.

Aparentemente, a ligação ao substrato Trx induz também um ligeiro aumento nas estruturas Beta ao longo da simulação. Indubitavelmente, o tetrâmero está mais suscetível a variações na estrutura secundária que o dímero. No tetrâmero (Fig.3.11 e Fig. 3.12) a partir do resíduo 465 existem algumas variações da estrutura secundária, também presentes no dímero. Esta região é referente ao braço do C-terminal e seria de esperar alguma estabilização quando na presença da Trx.

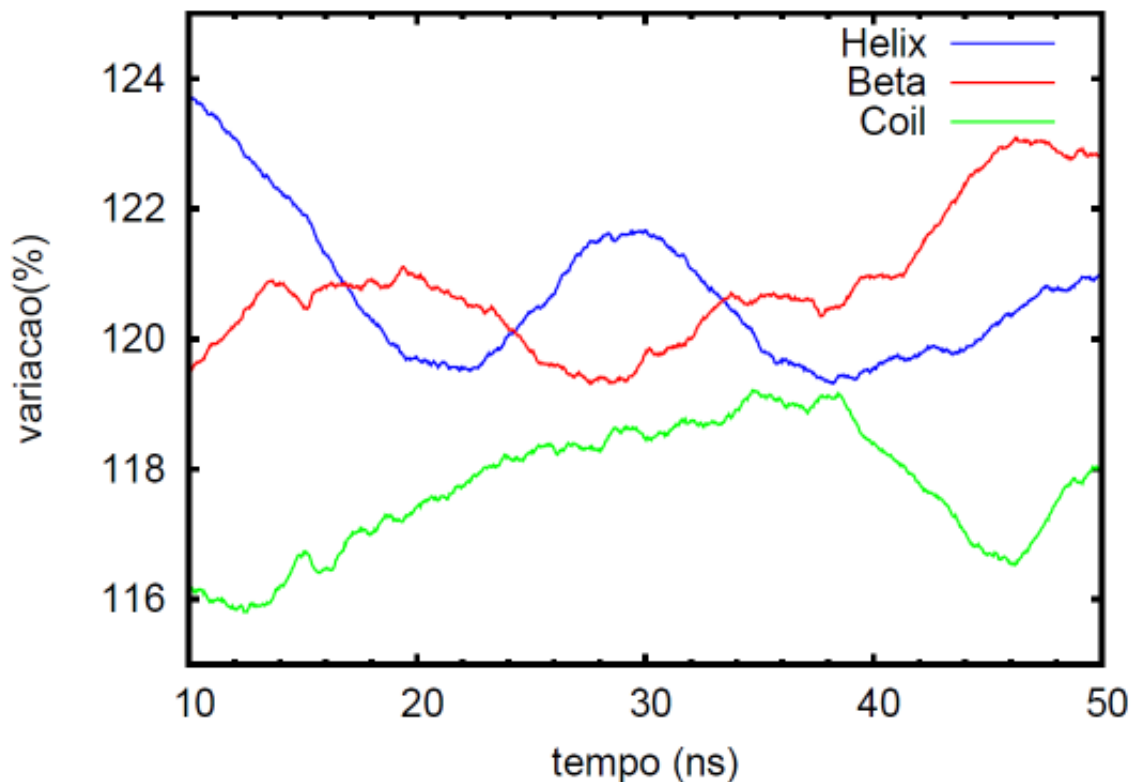
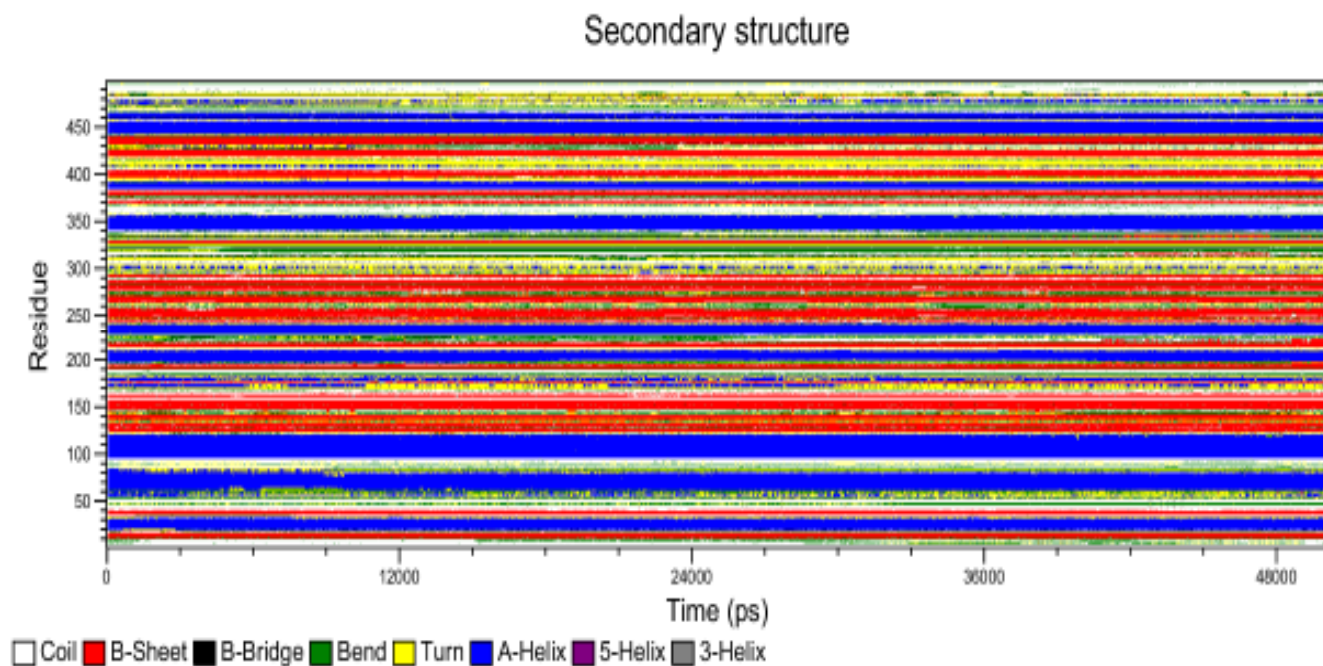
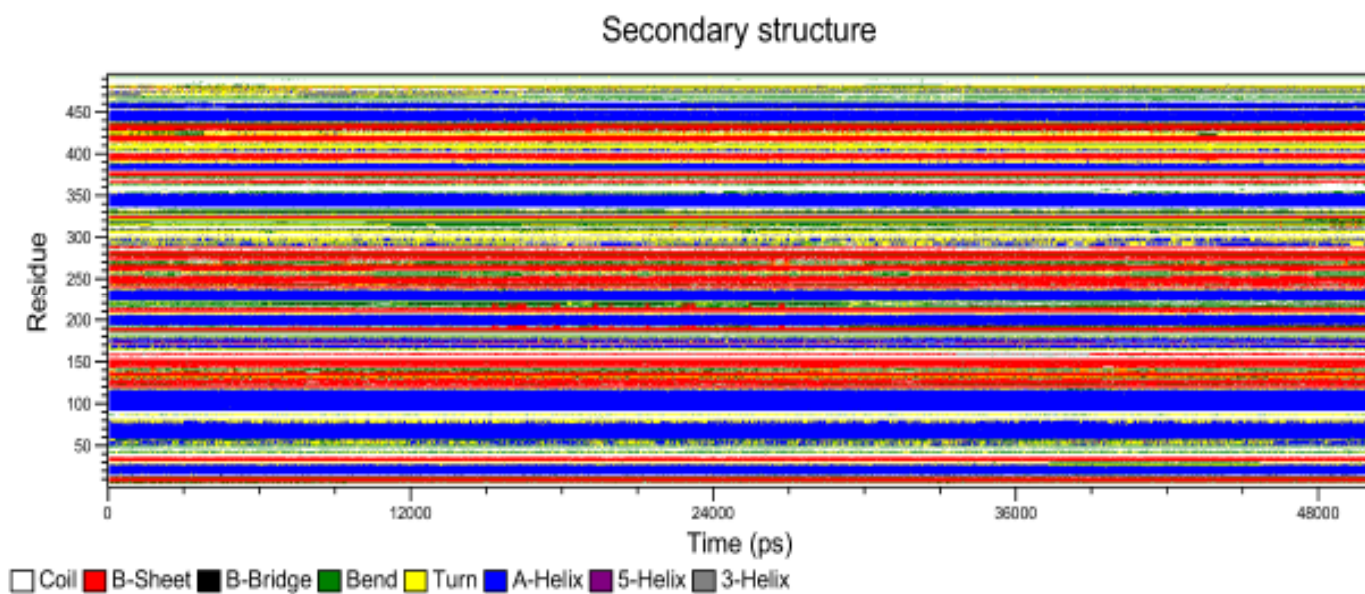


Figura 3.10 Representação gráfica da variação (%) de teor em Hélice - alfa, folha Beta e coil do Sistema 7 (TetraS⁰). A variação é calculada em relação à estrutura cristalográfica 3QFB.

Figura 3.11 Mapa DSSP da Subunidade 1 da TrxR no Sistema 7 (TetraS⁰).Figura 3.12 Mapa DSSP da Subunidade 2 da TrxR no Sistema 7 (TetraS⁰).

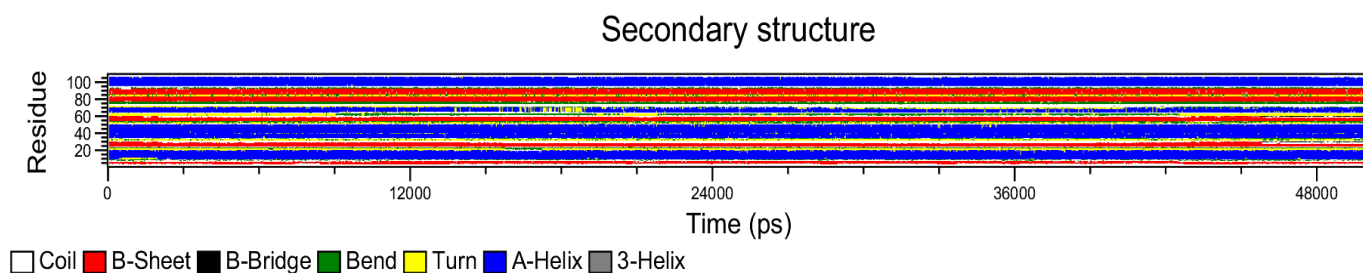


Figura 3.13 Mapa DSSP da Trx1 do Sistema TetraS⁰.

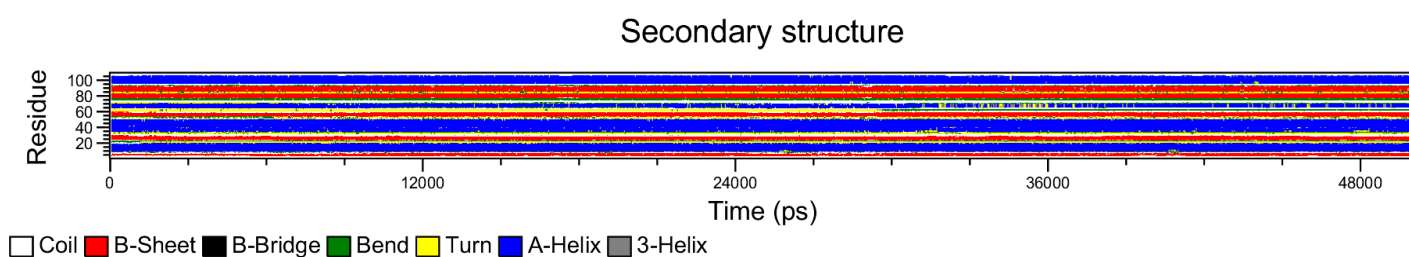


Figura 3.14 Mapa DSSP da Trx2 do Sistema TetraS⁰.

O mapa DSSP da Trx (Fig. 3.13 e 3.14) não indicia alterações relevantes ao longo das simulações. A região do resíduo da Trx diretamente ligado ao braço C-terminal da Subunidade catalítica (Cys32) não apresenta uma alteração de conformação digna de registo. Aparentemente não existem diferenças importantes entre as estruturas secundárias das duas Trx.

e. Equilibração

Todas as análises realizadas não mostram desvios significativos ou variações após o tempo de equilibração de 10 ns. Também a estrutura secundária é muito estável ao longo das simulações o que nos dá a confiança necessária para fazermos análises estruturais mais detalhadas.

f. Análise estrutural do sítio ativo e flexibilidade do C-terminal

O braço C-terminal da TrxR assume um papel determinante na atividade catalítica da enzima. Apesar da distância que o separa do centro-redox N-terminal (cerca de 20 Å) como obtido da estrutura de raio-X (Fritz-Wolf 2011) este braço apresenta uma flexibilidade que lhe permite receber equivalentes redutores deste centro N-terminal e transferi-los para o seu substrato principal a Trx. Importa portanto detalhar as ligações que os últimos resíduos deste braço catalítico estabelecem com o substrato, os resíduos da sua própria Subunidade e os resíduos da Subunidade adjacente. O processo catalítico propriamente dito dá-se entre o penúltimo resíduo Sec498 do braço C-terminal que forma uma ligação persulfureto com a Cys32 da Trx. Os restantes resíduos que constituem a porção terminal deste braço são estabilizados por ligações de hidrogénio que se estabelecem por um lado com resíduos da Trx e por outro com resíduos de ambas as subunidades. Assim, o braço C-terminal da TrxR estabelece ligações sobretudo ao nível dos seus 6 últimos resíduos em que, para além da ligação catalítica já mencionada (Sec498-Cys32) existe a formação de uma ligação de hidrogénio da Cys497 ao resíduo Pro75 da Trx. Na realidade, os resíduos 495-499 formam uma interface de ligação à região da Trx que corresponde aos resíduos 72-75, com um conjunto de ligações intra e inter-moleculares. Para além da ligação à Trx, existem ligações que se estabelecem entre resíduos da mesma Subunidade (como os resíduos Trp407, Asn419 e Asn418) que constituem a *guiding bar* para uma transferência eletrónica controlada ou ligações que se estabelecem com resíduos da Subunidade adjacente como o Glu122 e Arg117.

O dímero, na ausência de Trx, apresenta uma estrutura bastante semelhante. No entanto, o *loop* formado pelo braço C-terminal é menos estabilizado que no caso do tetrâmero, perdendo-se um componente importante de estabilização da estrutura.

Estando o mecanismo de transferência eletrónica diretamente relacionado com a possibilidade de estabelecer ligações persulfureto, é pertinente calcular os perfis de distâncias entre a Cys59/Cys64 do centro redox N-terminal e a Cys497/Sec498 do braço C-terminal. Estas distâncias foram calculadas para os sistemas que representam etapas do mecanismo de transferência de equivalentes redutores nomeadamente $OxS^0Se^-H^0$, $OxS^0Se^-H^+$, $RedS^0Se^-H^0$, $RedS^-Se^-H^0$, $TetraS^0$, $InibS^0$. Foram selecionadas as distâncias mínimas das quatro possíveis (Cys59/Cys497, Cys59/Sec498, Cys64/Cys497, Cys64/Sec498)

encontradas em cada tempo de simulação e os resultados foram representados na forma de histograma (Fig. 3.15). Como seria de esperar, o sistema do tetrâmero (TetraS^0) apresenta o histograma com a menor largura de banda dado que a distância entre este grupo de cisteínas está restringida a um valor de ≈ 1.9 nm e varia muito pouco.

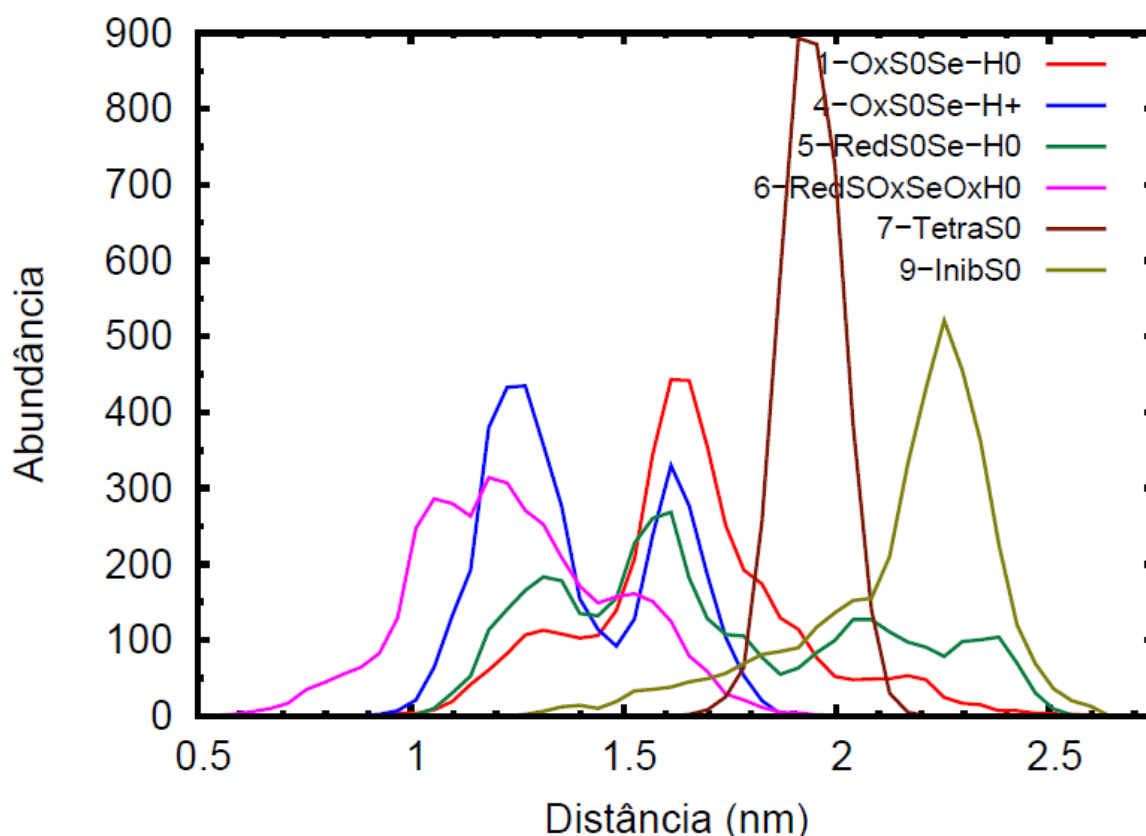


Figura 3.15 Histogramas da distância mínima entre Cys59/Cys64 e Cys497/Sec498 para os Sistemas $\text{OxS}^0\text{Se}^- \text{H}^0$, $\text{OxS}^0\text{Se}^- \text{H}^+$, $\text{RedS}^0\text{Se}^- \text{H}^0$, $\text{RedS}^{\text{Ox}}\text{Se}^{\text{Ox}}\text{H}^0$, TetraS^0 , InibS^0 .

Os histogramas relativos aos sistemas diméricos, ou seja sem a presença de parceiros ligados apresentam um intervalo de distâncias mais amplo do que o observado no tetrâmero. O sistema $\text{RedS}^0\text{Se}^- \text{H}^0$ apresenta a maior diversidade de distâncias entre o braço C-terminal e o centro redox N-terminal, de 10 a 25 Å. A distância observada de 20 Å neste sistema corresponde à mesma distância descrita em trabalhos anteriores correspondente à chamada posição de espera reduzida (Fritz-Wolf 2011).

Neste sistema o FAD, o centro redox N-terminal e o centro catalítico estão reduzidos com possibilidade de transferir elétrons para a Trx, pelo que há uma menor apetência do grupo Cys497-Sec498 pelo centro N-terminal rico em elétrons, favorecendo a amostragem de distâncias relativamente longas. O sistema $\text{OxS}^0\text{Se}^- \text{H}^0$ representa o

centro redox N-terminal oxidado, ainda sem elétrons transferidos provenientes do NADH. Como o par Cys497/Sec498 encontra-se reduzido, seria de esperar uma menor apetência do braço C-terminal para popular a região próxima do centro N-terminal. Isto é corroborado pelo histograma deste sistema onde se vê um pico mais populado a uma distância ≈ 1.65 nm. O sistema $OxS^0Se^-H^+$ é semelhante ao anterior, embora apresente todas as histidinas protonadas. Dada a presença de várias histidinas numa região mais próxima do centro N-terminal e como a Sec498 está desprotonada, observa-se uma alteração no histograma, aparecendo uma nova região (≈ 1.2 nm) bastante populada. O sistema 6 ($RedS^{Ox}Se^{Ox}H^0$) é o sistema onde se verifica uma distância mais curta de entre todos os sistemas analisados (mínimo de 0.5 nm). De facto, estando a Cys497 e a Sec498 oxidada numa ligação persulfureto com perda significativa de dipolo, ocorre uma clara perda de preferência por grupos polares como a água. Desta forma, o braço C-terminal é internalizado e estes grupos terão uma avidez pelo centro redox N-terminal reduzido com elétrons disponíveis. Também aqui as distâncias observadas estão de acordo com as observadas em trabalhos anteriores (Fritz-Wolf 2011) que neste caso corresponde à chamada posição de espera oxidada com uma distância de 1.3nm

Por último, temos o sistema correspondente à TrxR com o inibidor, que representa o histograma com as maiores distâncias de todos os sistemas. O inibidor estudado tem uma estrutura baseada nos trabalhos desenvolvidos em Saragoça. O sistema $InibS^0$ mantém-se por regra mais longe do centro N-redox, mas consegue ainda assim aproximar-se para regiões totalmente inacessíveis ao sistema $TetraS^0$. O inibidor apresenta um grupo aurofosfina que se liga covalentemente ao selénio da Sec498 (Fig. 3.16). Os dois grupos fenil apolares e hidrofóbicos formam um conjunto que estabelece ligações de Van der Waals com o Trp114, localizado na hélice alfa mais próxima do braço C-terminal. Este tipo de interações é ainda favorecido pelo fato do grupo triazol ser polar e ter preferência pelo solvente. Também a Ser111, um resíduo polar que habitualmente faz pontes de hidrogénio com a Trx, é capaz de criar ligações com o grupo triazol do inibidor.

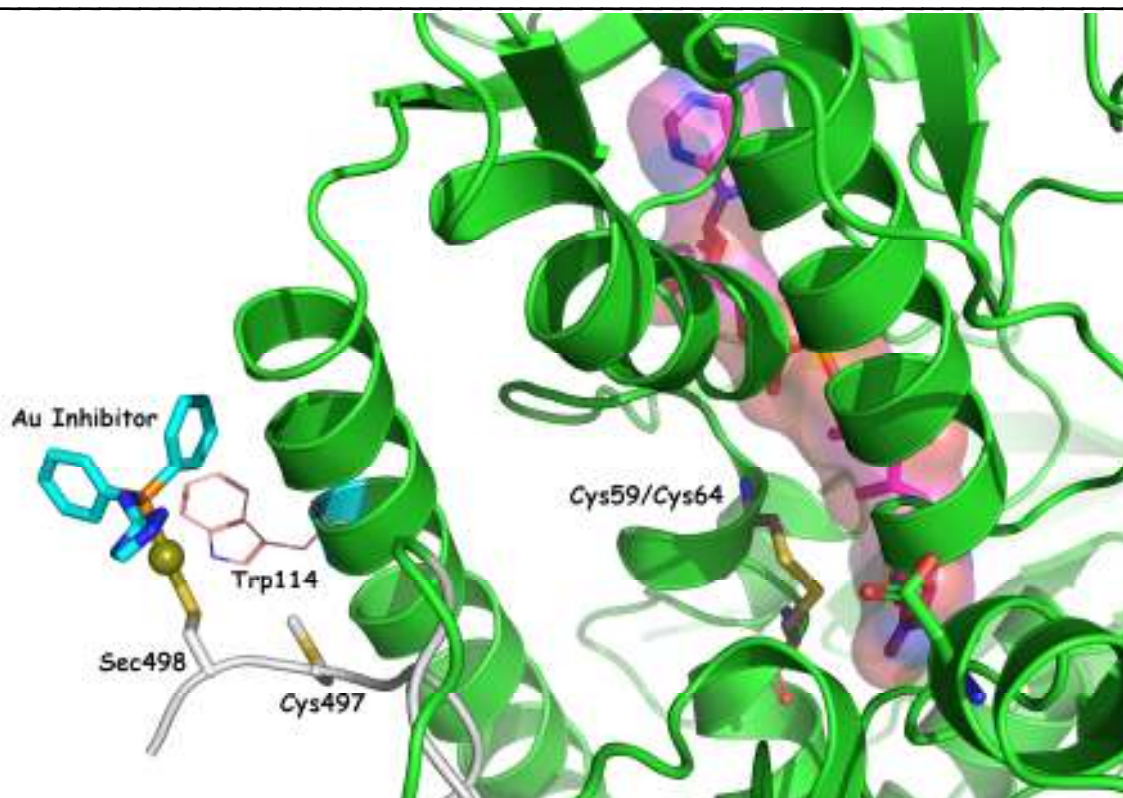


Figura 3.16 Estrutura do inibidor (grupos fenilo e triazol a azul e ouro a amarelo) ligado covalentemente a Sec498. Os anéis do resíduo Trp114 estão representados a rosa, próximos do inibidor. O centro redox N-terminal está identificado pelo par Cys59/Cys64 e o grupo FAD está representado com uma superfície vermelha

g. Cálculos pK_a (LRA)

A reatividade dos resíduos chave na interação da TrxR com um parceiro foi avaliada a partir do cálculo de valores de pK_a . Os valores obtidos estão representados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Valores de pK_a calculados para cada um dos sistemas considerados.

Resíduo estudado	Simulações	Sub1		Sub2		Sub1 + Sub2	
		$\langle pK_a \rangle$	LRA	$\langle pK_a \rangle$	LRA	$\langle pK_a \rangle$	LRA
Cys497 (dímero)	1 ($OxS^0Se^0H^0$)	13,0	8,7	15,6	11,4	14,3	10,0
	2 ($OxS^-Se^0H^0$)	4,4		7,2		5,8	
Sec498	3 ($OxS^0Se^0H^+$)	8,2	6,2	10,3	3,8	9,2	5,0
	4 ($OxS^0Se^0H^+$)	4,2		-2,6		0,8	
Cys497 (TrxR-Trx)	7 (Tetra S^0)	11,4	10,1	13,1	10,9	12,3	10,5
	8 (Tetra S^-)	8,7		8,7		8,7	
Cys497 (TrxR-Inib)	9 (Inib S^0)	12,6	10,4	11,8	10,4	12,2	10,4
	10 (Inib S^-)	8,3		9,0		8,7	

Os valores de pK_a da Cys497 quando acoplada à Trx ou ao inibidor são relativamente semelhantes (10.5 e 10.4, respetivamente) apesar da grande diferença física que existe entre estes dois parceiros. É possível que o fator determinante esteja relacionado com a perda de liberdade conformacional induzida pela ligação ao parceiro, tal como já observámos nos histogramas de distâncias entre centros catalíticos (Figura 3.15). Esta hipótese é também suportada pelo facto do pK_a da Cys497 descer ~ 0.5 unidades para a TrxR livre. Na verdade, em termos eletrostáticos, com a perda do parceiro e a recuperação do anião selenato, seria de esperar um aumento do pK_a da Cys497 induzido por uma destabilização da sua forma ionizada. Ao acontecer exatamente o contrário, sugere-nos que o par catalítico Cys497/Sec498 tem liberdade suficiente e procura resíduos carregados positivamente para estabilizar os seus aniões, baixando desse modo os valores de pK_a .

O valor de pK_a da Sec498 é bastante mais baixo, como seria de esperar de um selenol comparativamente a um tiol. A diferença de 5 unidades de pK entre a Cys497 e a Sec498, significam que ao pH fisiológico a cisteína encontra-se quase completamente protonada e a selenocisteína, pelo contrário, se encontra completamente desprotonada. Tendo em consideração que a nucleofilicidade do tiolato/selenato é muito superior à do tiol/selenol, é possível estabelecer um paralelismo entre a reatividade destes resíduos e os seus valores de pK_a . Esta diferença explica o porquê de ser a Sec498 a atacar a ligação persulfureto Cys32-Cys35 da Trx (Gorlatov 1998). O ataque do selenato resulta na formação de um grupo tiol numa das Cys da Trx e a formação de uma ligação persulfureto Sec498(TrxR)-Cys32(Trx). A Cys497 estando preferencialmente protonada terá maior dificuldade em atacar a nova ligação persulfureto e assim transferir o segundo eletrão à Trx. No entanto, a proximidade física entre a cisteína e a selenocisteína sugere que mesmo havendo uma quantidade pequena de tiolato, este reage de imediato sem grandes penalizações entrópicas.

A diferença de valores de pK_a entre a Cys497 e a Sec498 traduz-se, na prática, numa grande diferença de cinéticas de reação que é bastante aproveitada pela TrxR para reduzir eficientemente o seu parceiro, a Trx. Esta diferença está provavelmente na base também da seletividade de muitos inibidores para a TrxR (Carvalho 2008).

Capítulo 4

Conclusões

A Tio redoxina Redutase 1 é uma enzima importante para a função celular dos mamíferos, controlo redox e defesa anti-oxidante (Arner 2000) constituindo provavelmente um alvo importante para terapia oncológica (Gromer 2004). Desta forma tem evidente valor científico a caracterização do seu comportamento no que respeita ao seu sítio ativo assim como a compreensão dos detalhes moleculares do seu mecanismo catalítico. Esta enzima tem algumas particularidades estruturais que a torna única entre as proteínas. Em primeiro lugar, a TrxR não possui um pocket "clássico" que se identificaria como o sítio ativo de ligação ao seu principal substrato a Trx. Em seu lugar tem um braço C-terminal flexível em que o antepenúltimo e penúltimo aminoácidos são respetivamente uma cisteína e uma selenocisteína que formam uma ligação persulfureto. Esta característica é única, não se encontrando em mais nenhuma selenoproteína dois resíduos adjacentes Sec/Cys na extremidade C-terminal (Kryukov 2003).

O mecanismo de ação da TrxR envolve a associação da enzima ao seu substrato, pelo que a simulação por DM dos sistemas da enzima com e sem a Trx, assim como a presença de um possível inibidor parece ser uma alternativa apropriada para a investigação das principais interações entre a TrxR e a Trx e/ou um inibidor. Estas simulações possibilitaram o conhecimento das propriedades dinâmicas destes sistemas e contribuíram para a elucidação dos eventos moleculares envolvidos nos mecanismos de ação desta enzima. Realizámos simulações de Dinâmica Molecular de 50 ns para a enzima com vários estados de protonação, livre ou ligada à Trx ou a um inibidor. Todas as análises realizadas confirmaram que os sistemas equilibraram após os primeiros 10 ns. A estrutura secundária revelou-se muito estável ao longo das simulações o que nos permitiu fazer algumas análises estruturais mais detalhadas.

O processo catalítico da TrxR com a Trx propriamente dito dá-se entre o penúltimo resíduo Sec498 do braço C-terminal e a Cys32 da Trx formando uma ligação persulfureto. A presença de uma selenocisteína neste sítio catalítico permite reduzir uma grande variedade de substratos eletrofílicos pela grande reatividade do grupo selenato. Os restantes resíduos que constituem a porção terminal deste braço são estabilizados por ligações de hidrogénio que se estabelecem por um lado com resíduos da Trx e por outro com resíduos de ambas as subunidades. Os resíduos 495-499 formam uma interface de ligação à região da Trx que corresponde aos resíduos 72-75, com um conjunto de ligações intra e inter-moleculares. Para além da ligação à Trx, existem ligações que se estabelecem entre resíduos da mesma Subunidade que constituem a *guiding bar* para uma transferência eletrónica controlada ou ligações que se estabelecem com resíduos da Subunidade adjacente. A partir das conformações obtidas foram analisados os perfis de distâncias encontradas entre a Cys59/Cys64 do centro redox N-terminal e a Cys497/ Sec498 do braço C-terminal. Como seria de esperar, a distância entre estes grupos de cisteínas no tetrâmero (TetraS⁰) está restringida a um valor de ≈ 1.9 nm.

Os sistemas diméricos apresentaram uma variação diferente da observada no tetrâmero. O sistema RedS⁰Se⁻H⁰ apresenta uma distância com grande variação, atingindo valores > 20 Å, de acordo com a chamada posição de espera reduzida (Fritz-Wolf 2011). Com a oxidação do par Cys497/Sec498 (RedS^{Ox}Se^{Ox}H⁰) o braço catalítico C-terminal aproxima-se da região N-terminal populando a região da posição de espera oxidada, chegando mesmo a distâncias suscetíveis de transferências eletrónicas (< 5 Å). O sistema correspondente à TrxR com o inibidor apresenta as maiores distâncias de todos os sistemas. Este inibidor estudado tem uma estrutura baseada nos trabalhos desenvolvidos em Saragoça com um grupo aurofosfina que se liga covalentemente ao selénio da Sec498.

A reatividade dos resíduos chave na interação da TrxR com um parceiro foi avaliada a partir do cálculo dos seus valores de pK_a. Os valores de pK_a da Cys497 quando acoplada à Trx ou ao inibidor são relativamente semelhantes (10.5 e 10.4, respetivamente) apesar da grande diferença física existente entre estes dois parceiros. O valor de pK_a da Sec498 é bastante mais baixo, como seria de esperar de um selenol comparativamente a um tiol. A diferença de 5 unidades de pK entre a Cys497 e a Sec498 explica o motivo de ser a Sec498 a atacar a ligação persulfureto Cys32-Cys35 da Trx (Gorlatov 1998), traduzindo-se numa grande diferença de cinéticas de reação com consequente ganho de eficiência na redução do seu parceiro, a Trx. A diferença no estado de

protonação dos dois resíduos está provavelmente na base também da seletividade de muitos inibidores para a TrxR (Carvalho 2008).

A DM e os cálculos de pK_a foram realizados com protocolos "state of the art" devidamente validados (Roos 2009, Machuqueiro 2011). Estas abordagens permitem-nos obter informação com detalhe molecular geralmente inacessível aos métodos experimentais.

Bibliografia

Adcock and McCammon. Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chem. Rev.*, 106: 1589-1615, 2006

Allen. *Introduction to Molecular Dynamics Simulation in Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins*, Lecture Notes, K. B. Norbert Attig, Helmut Grubmüller, Kurt Kremer, 2004

Almondes, Leal, Cozzolino, Philippi and Rondo. The Role of Selenoproteins in Cancer. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 56: 484-488, 2010

Andersson, Holmgren and Spyrou. NK-lysin, a disulfide-containing effector peptide of T-lymphocytes, is reduced and inactivated by human thioredoxin reductase - Implication for a protective mechanism against NK-lysin cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 271: 10116-10120, 1996

Arner. Focus on mammalian thioredoxin reductases - Important selenoproteins with versatile functions. *Bba-Gen Subjects*, 1790: 495-526, 2009

Arner and Holmgren. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.*, 267: 6102-6109, 2000

Arner, Nordberg and Holmgren. Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 225: 268-274, 1996

Arnold, Tan and Rabenstein. Nuclear-Magnetic-Resonance Studies of the Solution Chemistry of Metal-Complexes .23. Complexation of Methylmercury by Selenohydryl-Containing Amino-Acids and Related Molecules. *Inorg. Chem.*, 25: 2433-2437, 1986

Banerjee, Arora and Murty. Structural model of the Plasmodium falciparum Thioredoxin reductase: a novel target for antimalarial drugs. *J. Vector Borne Dis.*, 46: 171-183, 2009

Baptista, Martel and Soares. Simulation of electron-proton coupling with a Monte Carlo method: Application to cytochrome c(3) using continuum electrostatics. *Biophys. J.*, 76: 2978-2998, 1999

Bashford and Karplus. Pk_as of Ionizable Groups in Proteins - Atomic Detail from a Continuum Electrostatic Model. *Biochemistry*, 29: 10219-10225, 1990

Bayly, Cieplak, Cornell and Kollman. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges - the Resp Model. *J. Phys. Chem.*, 97: 10269-10280, 1993

Becker, Gromer, Schirmer and Muller. Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur. J. Biochem.*, 267: 6118-6125, 2000

Benson and Daggett. A Comparison of Multiscale Methods for the Analysis of Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B*, 116: 8722-8731, 2012

Berendsen, Postma, Vangunsteren, Dinola and Haak. Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.*, 81: 3684-3690, 1984

Bindoli, Rigobello, Scutari, Gabbiani, Casini and Messori. Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.*, 253: 1692-1707, 2009

Cadenas, Franckenstein, Schmidt, Gehrman, Hermes, Geppert, Schormann, Maccoux, Schug, Schumann, Wilhelm, Freis, Ickstadt, Rahnenfuhrer, Baumbach, Sickmann and Hengstler. Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 12: 2010

Cañaveras. *Síntesis de Complejos del grupo 11 con ligandos derivados de aminoácidos e aminofosfinas. Estudios biológicos.* Doctor, Departamento de Química Inorgánica da Faculdade de Ciências, Universidad de Zaragoza, 2011

Carvalho, Chew, Hashemy, Lu and Holmgren. Inhibition of the human thioredoxin system - A molecular mechanism of mercury toxicity. *J. Biol. Chem.*, 283: 11913-11923, 2008

Cenas, Nivinskas, Anusevicius, Sarlauskas, Lederer and Arner. Interactions of quinones with thioredoxin reductase - A challenge to the antioxidant role of the mammalian selenoprotein. *J. Biol. Chem.*, 279: 2583-2592, 2004

Chen and Deluca. Isolation and Characterization of a Novel Cdna from HL-60 Cells Treated with 1,25-Dihydroxyvitamin D-3. *Bba-Gene Struct Expr*, 1219: 26-32, 1994

Darden, York and Pedersen. Particle Mesh Ewald - an N.Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.*, 98: 10089-10092, 1993

DeLano. Use of PYMOL as a communications tool for molecular science. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.*, 228: U313-U314, 2004

Deponte, Urig, Arscott, Wolf, Reau, Herold-Mende, Koncarevic, Meyer, Davioud-Charvet, Ballou, Williams and Becker. Mechanistic studies on a novel, highly potent gold-phosphole inhibitor of human glutathione reductase. *J. Biol. Chem.*, 280: 20628-20637, 2005

Engman, Al-Maharik, McNaughton, Birmingham and Powis. Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells. *Bioorg. Med. Chem.*, 11: 5091-5100, 2003

Engman, Cotgreave, Angulo, Taylor, Paine-Murrieta and Powis. Diaryl chalcogenides as selective inhibitors of thioredoxin reductase and potential antitumor agents. *Anticancer Res.*, 17: 4599-4605, 1997

Fang, Lu and Holmgren. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin - A novel molecular mechanism for its anticancer activity. *J. Biol. Chem.*, 280: 25284-25290, 2005

Fave, Cho, Hissler, Chen, Luh, Wu and Reau. First examples of organophosphorus-containing materials for light-emitting diodes. *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 9254-9255, 2003

Fritz-Wolf, Kehr, Stumpf, Rahlfs and Becker. Crystal structure of the human thioredoxin reductase-thioredoxin complex. *Nat. Commun.*, 2: 2011

Fritz-Wolf, Urig and Becker. The structure of human thioredoxin reductase 1 provides insights into C-terminal rearrangements during catalysis. *J. Mol. Biol.*, 370: 116-127, 2007

Gandin, Fernandes, Rigobello, Dani, Sorrentino, Tisato, Bjornstedt, Bindoli, Sturaro, Rella and Marzano. Cancer cell death induced by phosphine gold(I) compounds targeting thioredoxin reductase. *Biochem. Pharmacol.*, 79: 90-101, 2010

Gilson, Sharp and Honig. Calculating the Electrostatic Potential of Molecules in Solution - Method and Error Assessment. *J. Comput. Chem.*, 9: 327-335, 1988

Gorlatov and Stadtman. Human thioredoxin reductase from HeLa cells: Selective alkylation of selenocysteine in the protein inhibits enzyme activity and reduction with NADPH influences affinity to heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95: 8520-8525, 1998

Gromer, Urig and Becker. The thioredoxin system - From science to clinic. *Med. Res. Rev.*, 24: 40-89, 2004

Gromer, Wissing, Behne, Ashman, Schirmer, Flohe and Becker. A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase. *Biochem. J.*, 332: 591-592, 1998

Hashemy and Holmgren. Regulation of the catalytic activity and structure of human thioredoxin 1 via oxidation and S-nitrosylation of cysteine residues. *J. Biol. Chem.*, 283: 21890-21898, 2008

Hess, Bekker, Berendsen and Fraaije. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.*, 18: 1463-1472, 1997

Hess, Kutzner, van der Spoel and Lindahl. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.*, 4: 435-447, 2008

Hickey, Ruhayel, Barnard, Baker, Berners-Price and Filipovska. Mitochondria-targeted chemotherapeutics: The rational design of gold(I) N-heterocyclic carbene complexes that are selectively toxic to cancer cells and target protein selenols in preference to thiols. *J. Am. Chem. Soc.*, 130: 12570-+, 2008

Holmgren. Bovine Thioredoxin System - Purification of Thioredoxin Reductase from Calf Liver and Thymus and Studies of Its Function in Disulfide Reduction. *J. Biol. Chem.*, 252: 4600-4606, 1977

Holmgren. Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *J. Biol. Chem.*, 264: 13963-13966, 1989

Holmgren. Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. *Method Enzymol*, 252: 199-208, 1995

Holmgren, Johansson, Berndt, Lonn, Hudemann and Lillig. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem. Soc. Trans.*, 33: 1375-1377, 2005

Huber, Tabor and Richardson. Escherichia-Coli Thioredoxin Stabilizes Complexes of Bacteriophage-T7 DNA-Polymerase and Primed Templates. *J. Biol. Chem.*, 262: 16224-16232, 1987

Jones. Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.*, 8: 1865-1879, 2006

Kabsch and Sander. How Good Are Predictions of Protein Secondary Structure. *FEBS Lett.*, 155: 179-182, 1983

Karplus and Kuriyan. Molecular dynamics and protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102: 6679-6685, 2005

Kim, Miyoshi, Taguchi, Tamaki, Nakamura, Yodoi, Kato and Noguchi. High thioredoxin expression is associated with resistance to docetaxel in primary breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11: 8425-8430, 2005

Klapper. *Focusing of Electric Fields in the Active Site of Cu-Zn Superoxide Dismutase: Effects of Ionic Strength and Amino-Acid Modification in Proteins*; and *S. F. Genet.*, 1986

Kryukov, Castellano, Novoselov, Lobanov, Zehtab, Guigo and Gladyshev. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300: 1439-1443, 2003

Kumar, Bjornstedt and Holmgren. Selenite Is a Substrate for Calf Thymus Thioredoxin Reductase and Thioredoxin and Elicits a Large Nonstoichiometric Oxidation of Nadph in the Presence of Oxygen. *Eur. J. Biochem.*, 207: 435-439, 1992

Kuriyan, Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes 1991

Lee, Kim, Kwon, Yoon, Levine, Ginsburg and Rhee. Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 274: 4722-4734, 1999

Levine, Quantum Chemistry, 2000

Levitt and Sharon. Accurate Simulation of Protein Dynamics in Solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85: 7557-7561, 1988

Lillig and Holmgren. Thioredoxin and related molecules - From biology to health and disease. *Antioxid. Redox Signal.*, 9: 25-47, 2007

Lindahl, Hess and van der Spoel. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J Mol Model*, 7: 306-317, 2001

Liu and Stadtman. Two types of selenium-containing thioredoxin reductase from human lung tumor and HeLa cell lines. *FASEB J.*, 10: 2208-2208, 1996

Lu, Chew and Holmgren. Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104: 12288-12293, 2007

Luthman and Holmgren. Rat-Liver Thioredoxin and Thioredoxin Reductase - Purification and Characterization. *Biochemistry*, 21: 6628-6633, 1982

Machuqueiro and Baptista. Is the prediction of pK(a) values by constant-pH molecular dynamics being hindered by inherited problems? *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 79: 3437-3447, 2011

Machuqueiro, Campos, Soares and Baptista. Membrane-Induced Conformational Changes of Kyotorphin Revealed by Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B*, 114: 11659-11667, 2010

Marcon, Metal ions in biological systems, 2004

May, Cobb, Mendiratta, Hill and Burk. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.*, 273: 23039-23045, 1998

Mccammon, Gelin and Karplus. Dynamics of Folded Proteins. *Nature*, 267: 585-590, 1977

Metropolis, Rosenbluth, Rosenbluth, Teller and Teller. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *J. Chem. Phys.*, 21: 1087-1092, 1953

Mitchell and Marletta. Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nat. Chem. Biol.*, 1: 154-158, 2005

Miyamoto and Kollman. Settle - an Analytical Version of the Shake and Rattle Algorithm for Rigid Water Models. *J. Comput. Chem.*, 13: 952-962, 1992

Mustacich and Powis. Thioredoxin reductase. *Biochem. J.*, 346: 1-8, 2000

Myers, Myers, Kufahl, Forbes and Szadkowski. The effects of acrolein on the thioredoxin system: Implications for redox-sensitive signaling. *Mol. Nutr. Food Res.*, 55: 1361-1374, 2011

Nakamura, Nakamura and Yodoi. Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 351-369, 1997

Negri, Rodriguez-Larrea, Marco, Jimenez-Ruiz, Sanchez-Ruiz and Gago. Protein-protein interactions at an enzyme-substrate interface: Characterization of transient reaction intermediates throughout a full catalytic cycle of Escherichia coli thioredoxin reductase. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 78: 36-51, 2010

Nordberg and Arner. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.*, 31: 1287-1312, 2001

Nordberg, Zhong, Holmgren and Arner. Mammalian thioredoxin reductase is irreversibly inhibited by dinitrohalobenzenes by alkylation of both the redox active selenocysteine and its neighboring cysteine residue. *J. Biol. Chem.*, 273: 10835-10842, 1998

Oblong, Gasdaska, Sherrill and Powis. Purification of Human Thioredoxin Reductase - Properties and Characterization by Absorption and Circular-Dichroism Spectroscopy. *Biochemistry*, 32: 7271-7277, 1993

Powis, Wipf, Lynch, Birmingham and Kirkpatrick. Molecular pharmacology and antitumor activity of palmarumycin-based inhibitors thioredoxin reductase. *Mol. Cancer Ther.*, 5: 630-636, 2006

Roos, Foloppe, Van Laer, Wyns, Nilsson, Geerlings and Messens. How Thioredoxin Dissociates Its Mixed Disulfide. *PLoS Comput. Biol.*, 5: 2009

Ruggiero, Ruocco, Grimaldi, Arcari, Masullo, Zagari and Vitagliano. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Sulfolobus solfataricus thioredoxin reductase. *Acta Crystallogr F*, 61: 906-909, 2005

Ryckaert, Ciccotti and Berendsen. Numerical-Integration of Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints - Molecular-Dynamics of N-Alkanes. *J. Comput. Phys.*, 23: 327-341, 1977

Saitoh, Nishitoh, Fujii, Takeda, Tobiume, Sawada, Kawabata, Miyazono and Ichijo. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.*, 17: 2596-2606, 1998

Sandalova, Zhong, Lindqvist, Holmgren and Schneider. Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: Implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98: 9533-9538, 2001

Schaefer, Sommer and Karplus. pH-dependence of protein stability: Absolute electrostatic free energy differences between conformations. *J. Phys. Chem. B*, 101: 1663-1683, 1997

Schmid, Eichenberger, Choutko, Riniker, Winger, Mark and van Gunsteren. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur Biophys J Biophys*, 40: 843-856, 2011

Schulz, Schirmer, Sachsenheimer and Pai. Structure of Flavoenzyme Glutathione Reductase. *Nature*, 273: 120-124, 1978

Semeco. *Diseño de complejos de oro y plata con propiedades antitumorales*. Doctor, Departamento de Química Inorgánica da Faculdade de Ciências, Universidad de Zaragoza, 2011

Sharp and Honig. Electrostatic Interactions in Macromolecules - Theory and Applications. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 19: 301-332, 1990

Snyder, Mirabelli and Crooke. Cellular-Association, Intracellular-Distribution, and Efflux of Auranofin Via Sequential Ligand-Exchange Reactions. *Biochem. Pharmacol.*, 35: 923-932, 1986

Sroka, Antosik, Czyz, Nalvarte, Ollsson, Spyrou and Madeja. Overexpression of thioredoxin reductase 1 inhibits migration of HEK-293 cells. *Biol. Cell*, 99: 677-687, 2007

Stadtman. Protein Oxidation and Aging. *Science*, 257: 1220-1224, 1992

Turanov, Su and Gladyshev. Characterization of alternative cytosolic forms and cellular targets of mouse mitochondrial thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.*, 281: 22953-22963, 2006

Urig, Fritz-Wolf, Reau, Herold-Mende, Toth, Davioud-Charvet and Becker. Undressing of phosphine gold(I) complexes as irreversible inhibitors of human disulfide reductases. *Angew Chem Int Edit*, 45: 1881-1886, 2006

van der Spoel, Gromacs user manual version 3.1, 2001

van Gunsteren, Gromos-87 manual, 1987

Vergara, Casini, Sorrentino, Zava, Cerrada, Rigobello, Bindoli, Laguna and Dyson. Anticancer Therapeutics That Target Selenoenzymes: Synthesis, Characterization, in vitro Cytotoxicity, and Thioredoxin Reductase Inhibition of a Series of Gold(I) Complexes Containing Hydrophilic Phosphine Ligands. *ChemMedChem*, 5: 96-102, 2010

Vey and Giles. Laromustine (cloretazine). *Expert Opin. Pharmacother.*, 11: 657-667, 2010

Wang, Yang, Fu, Yin, Xiong, Tan, Jin, Li, Wang, Tang, Yin, Cai, Liu, Kehr, Becker and Zeng. Ehaselen: a potent mammalian thioredoxin reductase 1 inhibitor and novel organoselenium anticancer agent. *Free Radic. Biol. Med.*, 52: 898-908, 2012

Wang, Zhang, Liu, Ai, Mo and Zeng. Expression, Purification and Molecular Structure Modeling of Thioredoxin (Trx) and Thioredoxin Reductase (TrxR) from Acidithiobacillus ferrooxidans. *Curr. Microbiol.*, 59: 35-41, 2009

Williams, *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* 1995

Yan, Lok, Bierla and Che. Gold(I) complex of N,N'-disubstituted cyclic thiourea with in vitro and in vivo anticancer properties-potent tight-binding inhibition of thioredoxin reductase. *Chem. Commun.*, 46: 7691-7693, 2010

Yoo, Xu, Carlson, Gladyshev and Hatfield. Thioredoxin reductase 1 deficiency reverses tumor phenotype and tumorigenicity of lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 281: 13005-13008, 2006

Zhong, Arner and Holmgren. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: The active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97: 5854-5859, 2000

Zhong, Arner, Ljung, Aslund and Holmgren. Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. *J. Biol. Chem.*, 273: 8581-8591, 1998