

## **PROJETO DE PESQUISA**

Belo Horizonte

2015

DR. ADOLFO HENRIQUE DE MORAES SILVA

## **PROJETO DE PESQUISA**

*Diversidade conformacional e estados excitados de proteínas carreadoras de esteroides e enzimas envolvidas na biossíntese de antibióticos por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear*

Belo Horizonte

2015

# Sumário

<b>Introdução</b> .....	4
Apresentação da superfamília das proteínas análogas a Bet v 1 .....	6
Diversidade Conformacional das proteínas da superfamília da Bet v 1 .....	7
Proteínas selecionadas para o início do projeto de pesquisa .....	8
Enzimas envolvidas na Biossíntese de antibióticos .....	9
Família das START (Sterogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer (START) .....	13
<b>Objetivos</b> .....	16
Objetivo Global .....	16
Objetivos Específicos e Metas .....	16
<b>Metodologia proposta</b> .....	18
Expressão e purificação das proteínas .....	18
Assinalamento dos espectros de RMN .....	18
Avaliação da dinâmica molecular e diversidade conformacional por espectroscopia de RMN .....	18
Correlação entre ligação e atividade das proteínas .....	19
<b>Justificativa do projeto</b> .....	20
<b>Meios de divulgação</b> .....	22
<b>Bibliografia</b> .....	23

## Introdução

No início da década de 1960 John Kendrew e Max Perutz obtiveram as estruturas tridimensionais das proteínas mioglobina e haemoglobina por cristalografia de proteínas e difração de raio-X [1,2], e graças a essas contribuições, dividiram o prêmio Nobel de Química de 1962. Utilizando essa mesma metodologia, milhares de estruturas de proteínas foram resolvidas, e a partir de 1971, organizadas no banco de dados “*Protein Data Bank*” (PDB). Na década de 80, Wüthrich e colaboradores desenvolveram a metodologia de assinalamento sequencial de cadeias polipeptídicas baseada em espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em duas dimensões, que juntamente com diversos métodos computacionais, proporcionaram o desenvolvimento da determinação estrutural de proteínas por RMN (Wüthrich, 1986). O grande número de informações estruturais de proteínas contribuiu para a identificação de funções de várias delas, e ajudou na compreensão de importantes processos biológicos. Esses estudos proporcionaram o desenvolvimento de vacinas, drogas e tratamentos contra grande quantidade de doenças.

Mas a estrutura estática de uma proteína ou de qualquer outra molécula, apesar de conter informações preciosas, não é suficiente para entendimento completo de suas propriedades físico-químicas e atividade. As proteínas, como as demais cadeias poliméricas, apresentam grande diversidade conformacional e por consequência, grande multiplicidade funcional. As proteínas experimentam mudanças conformacionais em diversas escalas de tempo. Por exemplo, movimentos de alças mais flexíveis, nas quais sítios ativos de proteínas podem estar localizados, regulam a atividade catalítica [3,4], eventos alostéricos que implicam na mudança de população de estados conformacionais podem modular a interação de proteínas com diferentes ligantes [5,6].

Além das informações estruturais, a espectroscopia de RMN permite mapear a dinâmica molecular de proteínas em diferentes escalas de tempo. Essa característica torna a espectroscopia de RMN bastante singular, uma vez ser possível caracterizar a estrutura e a dinâmica molecular de proteínas em escala atômica, utilizando para este fim, diferentes arranjos experimentais.

A caracterização de dinâmica molecular por espectroscopia de RMN é geralmente realizada monitorando as taxas de relaxação magnética. Após o fim da aplicação do pulso de radiofrequência, a magnetização resultante tende a voltar à condição de menor energia. Esse fenômeno é conhecido como relaxação. Os mecanismos de relaxação podem ser separados em relaxação transversal,  $R_2$ , e longitudinal,  $R_1$ . As velocidades de relaxação são dependentes das dinâmicas globais e internas e, portanto, são comumente utilizadas para caracterizar a dinâmica de proteínas e ácidos nucleicos. Diferentes configurações experimentais aliadas a modelos teóricos permitem o estudo da dinâmica molecular de proteínas em diferentes escalas de tempo, desde pico segundo até dias [4,7].

Nesse projeto de trabalho, propomos aplicar a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear ao estudo estrutural de conformações de mais alta energia e de diversidade conformacional de proteínas humanas carreadoras de lipídeos e enzimas envolvidas na biossíntese de antibióticos derivados de metabólicos secundários de plantas com alto interesse farmacêutico.

Nas próximas seções, abordaremos especificadamente a superfamília estrutural das proteínas análogas a Bet v 1, que compreendem tanto proteínas carreadoras de esteroides, ácidos graxos e lipídeos, quanto enzimas envolvidas na biossíntese de metabólicos secundários. Introduziremos as proteínas propostas para o início dos estudos, os impactos que tais estudos poderão produzir para a melhor compreensão da função dessas proteínas, e também, as metodologias experimentais que serão empregadas durante o desenvolvimento desse projeto de pesquisa.

## **Apresentação da superfamília das proteínas análogas a Bet v 1**

A superfamília estrutural das proteínas análogas a Bet v 1 possui um enovelamento ancestral formado por 7 ou 9 fitas beta e 3 ou 4 hélices alfa que, quando arranjadas tridimensionalmente, formam uma grande cavidade hidrofóbica. Essa cavidade constitui o sítio de ligação de uma variedade de compostos hidrofóbicos e anfipáticos como lipídios, esteroides, colesterol e ácidos graxos. Mas esse enovelamento não está presente somente em proteínas que participam do reconhecimento, transporte e liberação de lipídeos, ele também pode ser encontrado em diferentes enzimas que, por exemplo, catalisam reações químicas relacionadas a biossíntese de metabólitos secundários como policetídeos e alcaloides benzilisoquinolina [8].

A primeira proteína dessa superfamília a ter sua estrutura resolvida foi a proteína alergênica Bet v 1, oriunda do pólen da *Betula verrucosa* [9]. A Bet v 1 e suas diferentes isomorfias foram identificadas como os principais causadores de reações alérgicas em indivíduos atópicos a pólen. Do ponto de vista de similaridade sequencial, essas proteínas são classificadas como pertencentes à família das proteínas relacionadas a patógenos PR-10 (Classe 10 das proteínas relacionadas a patogênese em plantas). Elas apresentam similaridade de sequência primária de ~70%, e são compostas por sete fitas beta e três hélices alfa arranjadas de forma a constituir uma grande cavidade hidrofóbica, que no caso da Bet v 1, forma o sítio de ligação a diferentes compostos hidrofóbicos e anfipáticos [10]. Com o passar dos anos, outras proteínas foram relacionadas às PR-10, embora possuindo identidade de sequência primária inferiores a 30 %. Essas proteínas preservam o enovelamento característico da Bet v 1 e são, por exemplo, enzimas como a (S)-Norcoclaurina Sintase, proteína envolvida na síntese de alcaloides benzilisoquinolina (BIA's) [11].

Interessantemente, a proteína humana carreadora de colesterol 64 do linfonodo metastático (MLN64, sigla em inglês) possui domínio similar as proteínas Bet v 1, revelando assim, a existência de uma grande superfamília de proteínas, com membros oriundos de plantas, animais, fungos e bactérias. Essas proteínas podem ser classificadas como clã das proteínas análogas a Bet v 1, na base de dados de família de proteínas *PFAM* [PfamC:CL0209] e superfamília das análogas a Bet v 1, no banco de dados “*Structural*

*Classification of Proteins*” (SCOP). Essa grande superfamília estrutural é subdividida em duas famílias: (i) a das análogas a da Bet v 1 e (ii) a das START (Sterogenic Acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer).

O estudo de proteínas pertencentes a superfamília das análogas a Bet v 1 tem implicações no o entendimento de doenças, como patologias relacionadas a alergia do tipo 1, na compreensão de mecanismos moleculares envolvidos na síntese, no transporte e no armazenamento do colesterol, e também implicações biotecnológicas, já que enzimas pertencentes a essa superfamília de proteínas estão envolvidas na biossíntese de metabólicos secundários, importantes para o desenvolvimento de novos fármacos .

### **Diversidade Conformacional das proteínas da superfamília da Bet v 1**

As proteínas da superfamília da Bet v 1 possuem a capacidade de se ligar a uma diversidade de compostos hidrofóbicos e anfipáticos. Por exemplo, a proteína alergênica Bet v 1 pode se ligar a compostos como flavonoides, esteroides, hormônios e lipídios [10]. A formação do complexo causa grande impacto no seu equilíbrio conformacional e também em sua capacidade alergênica [12].

Atualmente, 15 genes humanos que codificam proteínas da superfamília da Bet v 1 e da família das START foram identificados. Como apresentado na Tabela 1, essas proteínas possuem diferente padrão de expressão, localização celular e estão envolvidas no metabolismo e no transporte de lipídios e em processos de sinalização celular [13]. O domínio START da proteína CERT /STARD11, por exemplo, participa do transporte de ceramidas entre as membranas do Complexo de Golgi (CG) e do Retículo Endoplasmático (RE). Porém, as mudanças conformacionais envolvidas no transporte de ceramidas e no reconhecimento das membranas lipídicas não são bem compreendidas. Estudos realizados com o domínio START da proteína CERT indicam que em pH ácido, típico de regiões mais próximas das membranas celulares, essa proteína adota um estado parcialmente desenovelado identificado como “molten globule”, e a formação desse estado parcialmente desenovelado poderia facilitar o recrutamento e a posterior liberação de lipídios em diferentes membranas celulares. Em outro modelo proposto a interação primária com membranas celulares poderia induzir as mudanças conformacionais necessárias para o recrutamento ou a liberação do ligante [14] .

A enzima TcmN ARO/CIC também possui um domínio START, que nessa proteína, forma o sítio capaz de ligar substratos de policetídeos de até aproximadamente 24 carbonos. O tamanho, a forma e a composição dessas cavidades são determinantes para a formação da estrutura final de policetídeos [15]. A enzima termofílica TTHA0849 encontrada em organismos *Thermus Thermophilus*, também é classificada como pertencente a família START e não possui função e ligantes caracterizados [16]. A enzima (S)-NCS ((S)-Norcoclaurina Sintase) oriunda de *Thalictrum flavum* é classificada como pertencente a família das análogas a Bet v 1. Ela está envolvida na biossíntese de alcaloides benzilisoquinolina. Mutações que causam mudança na estabilidade e na variedade de produtos obtidos por reações químicas catalisadas por essa enzima já foram identificados [11].

Apesar de apresentarem consideráveis diferenças em relação a sequência primária de aminoácidos, estabilidade, composição e tamanho das cavidades hidrofóbicas, as proteínas apresentadas acima possuem uma importante característica em comum: para se ligar a diferentes compostos, transportar, participar de atividades catalíticas e liberar os ligantes ou possíveis produtos de catálise enzimática, essas proteínas necessitam passar por mudanças conformacionais consideráveis. Alguns modelos já foram propostos. Dentre os quais, o envolvimento de estados conformacionais intermediários conhecidos como estados excitados ou de maior energia que podem ser “molten globule states” ou serem caracterizados pela perda de estrutura de regiões específicas. Porém, poucas informações experimentais que possibilitam o estudo dessas alterações conformacionais foram publicados.

### **Proteínas selecionadas para o início do projeto de pesquisa**

Quatro proteínas pertencentes a superfamília das proteínas análogas a Bet v 1 foram selecionadas para essa etapa do projeto de pesquisa. Três enzimas envolvidas na biossíntese de antibióticos: a (S)-Norcoclaurina Sintase, pertencente a família das análogas da Bet v 1, oriunda da planta *Thalictrum flavum* e envolvida na biossíntese de alcaloides benzilisoquinolina (BIAs, sigla em inglês para benzyloquinoline alkaloids); a Tetracenomicina ARO/CIC, cujo domínio catalítico foi classificado como pertencente a família das proteínas START, oriunda de *Streptomyces glaucescens* e envolvida na



ciclização, aromatização e enovelamento de policetídeos; e a proteína hipotética termofílica TTHA0849, oriunda do organismo *Thermus Thermophilus*, que ainda não possui função e ligantes identificados. Uma proteína humana pertencente a família das proteínas START: a CERT/STARD11 também foi selecionada. Essa proteína é responsável pelo transporte de ceradimas entre as membranas do Complexo de Golgi e do Retículo Endoplasmático, e portanto, regula a biossíntese de esfingomiéline presente nas membranas celulares.

## **Enzimas envolvidas na Biossíntese de antibióticos**

### ***(S)-Norcochlorine Sintase***

A enzima (S)-Norcochlorina Sintase, ((S)-NCS), oriunda de *Thalictrum flavum*, e de outras espécies de plantas, está envolvida na biossíntese de alcalóides benzilisoquinolina (BIAs, sigla em inglês para benzyloquinoline alkaloids). BIAs são metabólicos secundários de plantas derivados de tirosina com atividade farmacológica já muito bem conhecida. Como exemplos de drogas derivadas desses metabólicos secundários, pode-se citar a morfina, a berberina, a papaverina e a codeína. A (S)-NCS catalisa a condensação de 4-HPAA (4-hidroxifenilacetaldéido) e dopamina em (S)-norcochlorina, um importante precursor de todos os BIAs originários de plantas, por ciclização estereoespecífica de Pictet-Spengler, em pH neutro e sem a necessidade de cofatores [11].

A estrutura da (S)-NCS complexada com dopamina e com o análogo não reativo de 4-HPAA, 4-hidroxibenzaldéido (PHB), foi resolvida utilizando cristalografia de proteínas e difração de raios-X [11]. A (S)-NCS possui características comuns às outras enzimas que também realizam a reação de Pictet-Spengler, baixa similaridade de sequência primária em relação a outras sintases de alcalóides e estrutura terciária análoga a proteína alergênica Bet v 1 [17]. Contudo, a (S)-NCS possui terminal C mais alongado e composto por duas hélices alfa intercaladas por uma região flexível (resíduos 173-177) e também um terminal N com resíduos adicionais, que podem formar estrutura secundária em hélice alfa ou fita beta, dependendo do estado oligomérico visualizado na unidade assimétrica do cristal [11]. O sítio catalítico da (S)-NCS possui dimensão de aproximadamente 20 Å<sup>3</sup>, e é formada pelas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos lisina, tirosina, ácido aspártico e ácido glutâmico [11].

(S)-NCS oriunda das angiospermas *Thalictrum flavum* e *Coptis Japonicas* catalisam reação de Pictet-Spengler utilizando como substratos a dopamina e diferentes aldeídos, não somente com o 4-HPAA. (S)-tetrahidroisoquinolinas são os produtos dessas reações e são importantes substratos utilizados pela indústria farmacêutica. Variações dos substratos e mutações em alguns resíduos da (S)-NCS provocaram alteração dos produtos das reações e também afetaram a estabilidade e a eficiência catalítica da enzima [18].

Estudos de cinética enzimática da (S)-NCS de *Thalictrum flavum* apontaram ligação a dopamina e 4-HPAA sigmoide e hiperbólica, respectivamente. Sugerindo mecanismo de cooperativo de ligação ao substrato, característica comum encontrada em outras enzimas [18]. Dois mecanismos de catálise da reação exercida pela (S)-NCS da *Thalictrum flavum* foram propostos: (i) ligação inicial ao 4-HPAA e (ii) ligação inicial a dopamina [11,18].

A caracterização do mecanismo e da cinética da reação catalisada pela (S)-NCS é fundamental não somente para definir as etapas da biossíntese de BIAs, mas também para futuras manipulações introduzidas na (S)-NCS, com finalidade de aumentar o rendimento do processo catalítico de compostos com alto interesse farmacológico e comercial.

#### ***Terminal N da Tetracenomicina ARO/CIC e a biossíntese de policetídeos***

A Tetracenomicina ARO/CIC é uma enzima oriunda de *Streptomyces glaucescens* e envolvida na ciclização, aromatização e enovelamento de policetídeos [15]. Policetídeos são metabólicos secundários encontrados em bactérias, plantas, fungos e animais. Juntos, formam uma classe de produtos naturais com grande diversidade de estruturas químicas e de aplicações farmacêuticas, como a tetraciclina (antibiótico) e a doxorubicina (anticâncer). Esses compostos são sintetizados a partir dos precursores da enzima acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT) por enzimas sintetizadoras de policetídeos (PKS, sigla em inglês para Polyketide Synthases). Os estudos relacionados a enzimas PKS são encorajados pela grande potencialidade de policetídeos para o desenvolvimento de novas drogas e também na alta complexidade estrutural das PKS, o que torna essas enzimas excelentes modelos de estudo para: (i) a caracterização de mecanismo e reatividade catalíticas; (ii) interação proteína-proteína; e (iii) o desenvolvimento de novos compostos por biossíntese combinada, com difícil produção por outros métodos [19]. Até o momento, três tipos de PKS bacterianas foram identificados: do tipo I, II e III, respectivamente [20].

A Tcm ARO/CIC participa da ciclização específica de policetídeos e estruturalmente é classificada como pertencente a superfamília das proteínas análogas a Bet v 1 e a família dos domínios START. Ela participa da ciclização e aromatização específica de policetídeos por enzimas policetídeo-sintases do tipo II (PKS, sigla em inglês). A formação de anéis é uma estratégia comum para aumentar a diversidade dos produtos naturais, fazendo do estudo das bases moleculares para processos de ciclização específicos um importante tópico de pesquisa em produtos naturais [19,21]. As ciclizações específicas mais comuns obtidas por PKS do tipo II são a C9-C14 e C7-C12. A aromatase/ciclase mais bem estudada é a tetracenomicina ARO/CIC. In vivo e em in vitro a Tcm ARO/CIC catalisa a formação de primeiro anel (C9-C12) e de segundo anel (C7-C16) [22] [23].

A estrutura da Tcm ARO/CIC obtida por cristalografia e difração de raios-X [15] mostra que esse domínio possui cavidade capaz de ligar substratos de policetídeos de aproximadamente 20 carbonos. O tamanho, a forma e a composição dessas cavidades detêm grande influência sobre a formação de policetídeos. Outro ponto importante é a diversidade de policetídeos biosintetizados obtidos através de mutações específicas. Nenhum estudo de estabilidade, dinâmica molecular e de modificações conformacionais envolvidos nos processos de catálise por essa enzima foi publicado.

#### ***Proteína hipotética de *Thermus Thermophilus* HB8 TTHA0849***

A TTHA0849 de *Thermus Thermophilus* HB8 é uma proteína hipotética com 147 resíduos e com enovelamento típico das proteínas com o domínio START. A TTHA0849 possui estrutura na forma de semibarril  $\alpha+\beta$ , que implica na constituição de uma cavidade hidrofóbica em seu interior. Sua estrutura terciária é similar a de outras proteínas membro da superfamília da Bet v 1, que regulam a esteroidogênese e participam do transporte de lipídios [24].

Quando a estrutura da proteína TTHA0849 é comparada com a das proteínas Bet v 1, StARD4 e MLN64, ambas envolvidas no transporte de colesterol e de compostos análogos, duas características importantes são observadas: a primeira é a alta homologia estrutural entre as proteínas, e a segunda é a diferença considerável na organização dos resíduos que formam a cavidade hidrofóbica. A cavidade da proteína TTHA0849 possui mais resíduos com cadeias laterais hidrofóbicas e volumosas, como triptófano e

fenilalanina, e por consequência, menor volume disponível para a acomodação de possíveis ligantes. Além de indicar uma maior distância evolutiva, o volume consideravelmente menor da cavidade TTHA0849 pode indicar também diferença funcional entre essa proteína e as citadas acima (Bet v 1, StARD4 e MLN64) [9,25,26]. Sua cavidade, por exemplo, não possui volume necessário para se ligar a colesterol ou análogos.

As diferenças pontuadas acima, aliadas a sua propriedade termofílica, fazem da TTHA0849 um modelo bastante interessante. Já que estudos comparativos do equilíbrio conformacional entre as proteínas da superfamília da Bet v 1 podem indicar como a dinâmica molecular foi influenciada pela evolução, e qual foi o impacto desse processo nas funções exercidas por essas diferentes proteínas.

Enzimas sintetizadas por organismos termófilos ou hipo-termófilos são conhecidas como termoenzimas ou enzimas termofílicas. Essas enzimas são estáveis e funcionais em altas temperaturas (geralmente de 65 °C a 125 °C) [27]. A estabilidade dessas enzimas pode ser decodificada entre a estabilidade termodinâmica e cinética. As características que conferem as termoenzimas alta estabilidade em elevadas temperaturas variam de enzima para enzima. Na maioria dos casos, interações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, formação de pontes dissulfeto, ligação a metais, por exemplo, podem causar o aumento da estabilidade dessas proteínas. Uma característica importante das termoenzimas é a sua capacidade de ser expressa de forma heteróloga em organismos mesófilos, ou seja, aqueles estáveis somente em temperaturas inferiores a 65 °C. A partir dos estudos já realizados, as termoenzimas não possuem composição e estrutura distintas das observadas em mezoenzimas.

Vale ressaltar também, que o estudo de proteínas termofílicas, ou seja, aquelas que preservam suas estruturas e funcionalidade em altas temperaturas (tipicamente acima de 65 °C) tem encontrado bastante aplicação em processos biotecnológicos como, por exemplo, na biossíntese.

## **Família das START (Sterogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer (START))**

### ***Introdução as proteínas humanas da família START***

O domínio START difere dos análogos a Bet v 1 por uma hélice alfa extra presente no terminal N. O domínio START (sigla em inglês para Sterogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer) é um domínio com aproximadamente 210 resíduos de aminoácidos organizados em estrutura terciária conhecida como garra  $\alpha/\beta$ , cuja organização tridimensional dá origem a uma grande cavidade hidrofóbica. Essa cavidade confere aos domínios START a capacidade de se ligar a uma vasta variedade de lipídios e esteroides [28]. Em plantas, a maioria das proteínas compostas por domínios START são fatores de transcrição reguladores da expressão gênica. Em animais, 15 genes que expressam proteínas com domínios START foram identificados. Essas proteínas são divididas em seis famílias, baseando-se na semelhança da estrutura e na similaridade em relação a composição de resíduos de aminoácidos. Essas proteínas possuem diferente padrão de expressão, localização celular e estão envolvidas no metabolismo e no transporte de lipídios e em processos de sinalização celular [13]. As 15 proteínas que possuem o domínio START estão indicadas na Tabela 1, bem como os 6 respectivos grupos, localização celular, ligantes identificados, informação estrutural publicada e doenças correlacionadas.

**Tabela 1: Informações publicadas das proteínas com domínio START**

Grupo	Proteína	Ligante	PDB	Fonte	Método	Doenças correlacionadas
1-StAR	STARD1	colesterol	3POL; livre	humana		Desordem genética [29]
	STARD3/MLN 64	Colesterol	1EM2; livre	humana		Super – Câncer [30]
START	STARD4	colesterol	1JSS	rato	Raios-X	
	STARD5	colesterol, hidroxicoolesterol	2R55; livre	humana	Raios-X	Super-Câncer [31]
	STARD6	Colesterol	2MOU; livre	humana	RMN	
PCTP	STARD2/PCTP	fosfatidilcolina	1LN1; complexa da com DLP	humana		
	STARD7	fosfatidilcolina	-	humana		Super-Câncer [32]
	STARD10	Fosfatidilconina, etalonalina	-	humana		Super-Câncer [33]
	STARD11/ CERT	ceramidas	2E3R; ceramida C18; 2Z9Z (N504A); C10 diacilglicerol; 3 H3S; H15; 2E3M (C6); 2E3O (C16); 2E3P (C16); 2E3Q (C18); 2E3S (C24);	humana		Doenças autoimune [34]
Rho-GAP	STARD8	?	-			sub-Câncer [35]
	STARD12	?	-			sub-Câncer [36]
	STARD13	?	2PSO (livre)	humana		sub-Câncer [37]
Thioesterase	STARD14 (ACOT11)		3FO5 (PEG)	humana		Obesidade [29]
	STARD15	?	?	humana		sub-Câncer [38]
	STARD9	?	?	humana		sub-Câncer [39]

***Proteína Transportadora de Ceramida (CERT/STARD11)***

A Proteína Transportadora de Ceramidas, ou CERT (sigla em inglês para Ceramides Transporter Protein) é responsável pelo transporte não vesicular de ceramidas entre o Retículo Endoplasmático (ER) e o Complexo de Golgi (CG), onde esses lipídios são usados

como substrato na biossíntese da esfingomielina [40]. A proteína CERT possui um domínio homólogo a peckstrina (PH) e um domínio START contendo aproximadamente 100 e 230 resíduos, respectivamente. O domínio PH reconhece especificadamente o lipídeo fosfatidilinositol-4-monofosfato (PtdIns(4)P), característico do Complexo de Golgi, já o domínio START presente na CERT, é responsável pelo transporte de ceramidas entre RE e o CG. Entre os dois domínios, não há indicação de formação de estrutura secundária característica. Há, por outro lado, um motivo sequencial altamente conservado o FFDAXE (duas fenilalaninas em uma calda ácida). Esse motivo compõem o sítio de ligação a uma proteína de membrana do ER, a proteína associada a VAP [14,40].

Conjuntos de dados estruturais obtidos por Cristalografia de proteínas e Difração de raios-X contribuíram bastante para a identificação dos ligantes (ceramidas) e dos possíveis mecanismos de reconhecimento, ligação, transporte e liberação de ceramidas exercidos pelo domínio START da proteína CERT [14,41]. Kubo et al resolveram a estrutura do domínio START da proteína CERT ligada a um análogo sintético de ceramidas, o (1R-3R) – N – (3-hidroxi-1-hidroximetil-3-fenilpropilalcanamida) (HPA, sigla em inglês) com diferentes comprimentos de cadeia hidrocarbônica. A partir desses estudos, pode-se inferir que o domínio START da CERT liga-se a uma molécula de HPA, independentemente do seu tamanho (12 a 24 carbonos), e que a ligação provoca mudança conformacional na alça  $\Omega 1$ , e especialmente altera a orientação da cadeia lateral do resíduo W473. Graças a esse resultado, os autores postularam que o W473 poderia funcionar como uma “porta” para a entrada de lipídios na cavidade, já que sua cadeia lateral ocupa um dos possíveis sítios de entrada. Dados de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR, sigla em inglês) corroboraram essa ideia [42].

A cavidade anfipática da CERT é ocupada por cadeias laterais de resíduos localizados nas hélices alfa 3,  $\alpha 3$ , alfa 4,  $\alpha 4$  e na alça  $\Omega 1$ . Dessa forma, para que a interação com ceramidas ou compostos análogos ocorra, mudanças conformacionais devem ocorrer principalmente envolvendo esses resíduos. A  $\alpha 3$  e  $\Omega 1$  são postulados como as duas portas de entrada para as ceramidas, e mudanças conformacionais nessas duas regiões poderiam regular os processos de reconhecimento de membranas celulares

(especialmente do ER e do CG), de ligação a ceramidas e de liberação desses lipídios [14,42].

## **Objetivos**

### **Objetivo Global**

Caracterizar estruturalmente e termodinamicamente as mudanças conformacionais envolvidas nos processos de interação, transporte, liberação e catálise enzimática realizados por proteínas da superfamília da Bet v 1, utilizando para esse fim, a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear aliada a metodologias experimentais biofísicas e computacionais.

### **Objetivos Específicos e Metas**

O projeto de pesquisa abordado nesse documento, engloba a primeira etapa dos estudos relacionados a proteínas carreadoras de lipídios e enzimas envolvidas na biossíntese de antibióticos, pertencentes a superfamília da Bet v 1. Nessa primeira etapa, temos como objetivo, caracterizar as propriedades físico-químicas das proteínas abordadas. Esses estudos são necessários para o melhor entendimento dos processos de mudança conformacional que modulam a atividade dessas proteínas. Com essa caracterização feita, etapas mais avançadas do projeto poderão envolver testes biológicos de atividade e, no caso das 15 proteínas humanas da família START, desenvolvimento de tratamento contra doenças com as quais essas proteínas estão correlacionadas. No caso das enzimas envolvidas na síntese de antibióticos, estudos em colaboração com grupos de pesquisa na área de síntese orgânica e biossíntese, poderão ser realizados, a fim de correlacionar os dados estruturais e dinâmicos obtidos por esse projeto de pesquisa e as informações de atividade catalítica dessas enzimas obtidas por esses grupos de pesquisa. Logo abaixo, listamos os objetivos específicos desse projeto de pesquisa.

- Expressar as quatro proteínas apresentadas nesse projeto de trabalho de forma heteróloga e purificá-las utilizando diferentes metodológicas cromatográficas;
- Determinar o estado oligomérico de cada uma das proteínas utilizando as técnicas DLS (sigla em inglês para Dynamics Light Scattering), cromatografia analítica, SAXS (Small Angle X-ray Scattering);



- Caracterizar a estabilidade dessas proteínas sob variação de temperatura, pressão, e concentração de agentes desnaturantes como ureia e guanidina. Utilizando, para este fim, diferentes técnicas experimentais como: (a) Espectroscopia de Fluorescência, (b) Dicroísmo Circular (CD, sigla em inglês) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, sigla em inglês);
- Expressar as quatro proteínas apresentadas nesse projeto de trabalho enriquecidas com  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  a fim de obter os espectros de RMN de 3 ou mais dimensões. Esses espectros serão utilizados no assinalamento das cadeias polipeptídicas;
- Adquirir e assinalar os diferentes espectros de RMN necessários para análise de proteínas com mais de 100 resíduos de aminoácidos;
- Caracterizar a dinâmica molecular das proteínas por RMN utilizando os experimentos de relaxação abortados na seção de métodos.
- Caracterizar de forma estrutural e termodinâmica a interação das proteínas com seus respectivos ligantes conhecidos;
- Caracterizar o impacto da interação com os ligantes sobre a estabilidade e equilíbrio conformacional das proteínas, utilizando, para este fim, diferentes técnicas experimentais como: (a) Espectroscopia de Fluorescência, (b) Dicroísmo Circular (CD, sigla em inglês) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, sigla em inglês);
- No caso das enzimas, caracterizar a termodinâmica e a cinética das reações catalisadas pelas proteínas propostas, e compará-las aos dados obtidos de dinâmica molecular;
- Para as proteínas carreadoras de lipídios, caracterizar a interação dessas proteínas com os ligantes específicos e também com sistemas modelo de membrana lipídica, que mimetizem as membranas celulares alvo, tanto para o recrutamento dos ligantes quanto para a liberação desses compostos em alvos adequados.

## **Metodologia proposta**

### **Expressão e purificação das proteínas**

As amostras recombinantes isotopicamente enriquecidas com  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  das quatro proteínas apresentadas acima, as enzimas Tcm ARO/CIC, (S)-NCS, TTHA04849 e da transportadora de ceramidas, CERT/STARD11, utilizadas na caracterização estrutural e dinâmica das proteínas individuais por RMN, e as amostras triplamente enriquecidas com  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$ , utilizadas na caracterização dos complexos, serão inicialmente produzidas no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear, no Rio de Janeiro, em colaboração com o grupo liderado pelos professores Dra. Ana Paula Valente e Dr. Fábio C. L. Almeida e posteriormente utilizando as próprias instalações laboratoriais presentes na Universidade Federal de Minas Gerais. O enriquecimento isotópico via expressão heteróloga das proteínas segue as estratégias apresentadas por Tugarinov et. al [43].

### **Assinalamento dos espectros de RMN**

As quatro proteínas apresentadas não possuem assinalamentos depositados no banco de dados de ressonância magnética nuclear ou em outras. Devido a isso, o assinalamento dos espectros de RMN se faz necessário. Para realizar os assinalamentos da cadeia principal da proteína, serão coletados os experimentos de tripla-ressonância: HNCACB, HNCO, HNCA, HNCACO e CBCA(CO)NH. Através desses espectros é possível assinalar os átomos  $\text{C}_\beta$ ,  $\text{C}_\alpha$  e C da cadeia principal dos resíduos de aminoácidos que compõem as proteínas. Para o assinalamento dos átomos presentes nas cadeias laterais, serão coletados os seguintes espectros de tripla-ressonância: HBHA(CBCA)(CO)NH e H(CC)(CO)NHTOCSY. Para confirmar os assinalamentos e também obter os parâmetros de restrição espacial que futuramente poderão ser empregados no cálculo da estrutura em solução das proteínas apresentadas, serão coletados o espectro  $^{15}\text{N}$  NOESY-HSQC editado (100 ms de tempo de mistura) e o  $^{13}\text{C}$  NOESY-HSQC (100 ms de tempo de mistura).

### **Avaliação da dinâmica molecular e diversidade conformacional por espectroscopia de RMN**

A dinâmica molecular das proteínas da superfamília da Bet v 1 será analisada via espectroscopia de RMN através da análise das taxas de relaxação  $R_2$ ,  $R_1$  e NOE

heteronuclear, obtidas utilizando experimentos de relaxação de  $^{15}\text{N}$  [44–46]. Essas taxas de relaxação são comumente empregadas na descrição de movimentos atômicos que ocorrem entre ps-ns na escala de deslocamento químico de RMN. O modelo teórico que melhor descreve a relação entre as taxas de relaxação apresentadas acima e a dinâmica molecular de proteínas é o formalismo teórico de Lipari e Szabo [47], que permite extrair parâmetros dinâmicos globais, como o tempo de correlação rotacional, e internos, como o parâmetro de ordem relacionado a flexibilidade de orientação da ligação H-N, a partir das taxas de relaxação. Essa análise será realizada utilizando o programa TENSOR2 [48]. A dinâmica molecular na escala de  $\mu\text{s}$ -ms será monitorada através de experimentos de dispersão de relaxação do  $^{15}\text{N}$  [49], Relaxação Spin-Spin no Sistema de Coordenadas Girante (T1rho) [50] e de Transferência de Saturação via Troca Química (CEST, sigla em inglês) [7], juntamente com o tratamento dos dados experimentais usando modelos teóricos, que descrevem a contribuição das trocas químicas na taxa de relaxação transversal. Através desses experimentos, será possível caracterizar a diversidade conformacional de proteínas nos seus aspectos cinéticos, termodinâmicos e estruturais.

### **Correlação entre ligação e atividade das proteínas**

A interação das proteínas apresentadas acima com seus respectivos ligantes será feita inicialmente por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. Experimentos de correlação heteronuclear de  $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$  ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, sigla em inglês para “Heteronuclear Single Quantum Coherence”) serão adquiridos para cada uma das proteínas. A interação dessas com os respectivos ligantes será avaliada através das variações observadas nos valores de deslocamento químico das ressonâncias presentes nos espectros. As perturbações serão tratadas matematicamente utilizando equação que engloba variações de deslocamento químico ocorridas tanto na dimensão relacionada ao núcleo  $^1\text{H}$  quanto ao  $^{15}\text{N}$ . Os efeitos da formação do complexo na dinâmica molecular das proteínas na escala de ps-ns serão avaliados por experimentos de relaxação de  $^{15}\text{N}$ , já anteriormente apresentados. Os dados experimentais serão tratados utilizando o formalismo teórico de Lipari-Szabo, cujo resultado será a obtenção de parâmetros de ordem internos relacionados a diversidade de orientação da ligação  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  do grupo amídico. A partir dos parâmetros de ordem, é possível calcular a variação de entropia configuracional,  $\Delta S_{\text{conf}}$ . Os dados de entropia

podem ser correlacionados a variação dos parâmetros termodinâmicos globais relativos a formação do complexo (Variação de energia livre de Gibbs,  $\Delta G$ , variação de entalpia,  $\Delta H$ , e variação de entropia,  $\Delta S$ ), que serão obtidos, por exemplo, utilizando Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC, sigla em inglês para “Isothermal Titration Calorimetry”), fornecendo assim, a mais completa descrição termodinâmica da interação proteína-ligante.

A presença de estados conformacionais de mais alta energia, conhecidos na literatura como estados excitados, será aferida e quantificada, do ponto de vista cinético, termodinâmico e estrutural utilizando experimentos de relaxação de diferentes núcleos baseados em sequências de pulso com blocos de CPMG. Os mesmos experimentos serão repetidos com diferentes concentrações dos ligantes, em diferentes temperaturas, diferentes valores de pressão e de concentração de agentes desnaturantes como ureia e guanidina. Com esses experimentos, será possível caracterizar a diversidade conformacional das proteínas da superfamília da Bet v 1, o papel desse equilíbrio de conformações no reconhecimento de membranas lipídicas, na ligação específica ou promíscua a ligantes, no processo de liberação dos ligantes, na caracterização da hidratação das cavidades e na relação entre enovelamento e estabilidade. No caso das enzimas tratadas nesse projeto (Tcm ARO/CIC, (S)-NCS e TTHA0849), os experimentos de dispersão de relaxação de  $^{15}\text{N}$  proporcionarão a caracterização das trocas conformacionais, e também, a relação destas com a atividade catalítica das respectivas enzimas [51].

## **Justificativa do projeto**

Nesse projeto, visamos caracterizar os estados estruturais de mais alta energia em proteínas importantes para o transporte e regulação de colesterol, hormônios, esteroides e lipídios, bem como, enzimas envolvidas na biossíntese de antibióticos oriundos de metabólitos secundários de plantas como: policetídeos e alcaloides benzilisoquinolina. Apesar de possuírem origem, sequência primária e funções diferentes, as proteínas introduzidas nesse projeto de trabalho, apresentam enovelamento muito similar, portanto, são classificadas como pertencentes a mesma superfamília estrutural, das proteínas análogas a Bet v 1. Esse enovelamento ancestral é caracterizado pela formação de um semi-barril formado por 7 ou 9 fitas beta e 3 ou 4 hélices alfa, que quando arranjadas

tridimensionalmente, formam uma grande cavidade circundada por resíduos de aminoácidos com cadeia lateral hidrofóbica ou polar. Essas cavidades são responsáveis por conferir função a essas proteínas, pois formam sítios de ligação de diferentes moléculas hidrofóbicas e anfipáticas, no caso das proteínas transportadoras, e também, o sítio catalítico de diversas enzimas envolvidas na biossíntese de importantes antibióticos. Dessa forma, estudar o equilíbrio conformacional dessas proteínas e a caracterização dos estados estruturais de maior energia contribuirá consideravelmente para a caracterização das etapas envolvidas no reconhecimento, transporte e liberação de compostos e também da atividade catalítica de enzimas.

Até esse momento, 15 genes humanos que codificam proteínas que possuem os domínios START e que, portanto, pertencem a superfamília das análogas a Bet v 1, já foram identificados. Características dessas proteínas como ligantes, localização, informação estrutural e patologias relacionadas estão indicadas na Tabela 1. Além das informações presentes acima, é importante mencionar que, proteínas com o domínio START são encontradas em vários organismos e exercem várias funções, como transporte e metabolismo de diferentes lipídios, tradução de sinal e regulação da transcrição gênica. Apesar da especificidade das diferentes proteínas, todas estão envolvidas na troca de lipídeos entre diferentes membranas celulares. A compreensão dos fatores que coordenam o equilíbrio conformacional dessas proteínas e, portanto, a troca de lipídios por elas realizada, é essencial para a compreensão das funções exercidas pelas proteínas START. Além disso, o mau funcionamento dessas proteínas está correlacionado a várias patologias (Tabela 1), o que as torna possíveis alvos para o desenvolvimento racional de fármacos.

As enzimas apresentadas nesse trabalho, Tcm ARO/CIC e a (S)-NCS estão envolvidas da biossíntese de policetídeos e de alcaloides benzilisoquinolina, respectivamente. Para essas enzimas, nenhum estudo caracterizando o equilíbrio conformacional foi encontrado na literatura. Para as duas, mutações específicas em resíduos que compõem a cavidade e alteraram a estabilidade, o rendimento e a diversidade de produtos oriundos de reações catalisadas por ambas, já foram identificados. A caracterização dos estados conformacionais dessas enzimas poderá auxiliar na engenharia

de construções mais estáveis, que apresentem maior rendimento e que proporcionam a obtenção de maior diversidade de produtos.

## **Meios de divulgação**

Os dados obtidos serão apresentados em encontros científicos especializados e publicados em revistas científicas. O projeto poderá envolver estudantes de pós-graduação e iniciação científica. Assegurando a formação de recursos humanos em Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear aplicada a biomoléculas.

## Bibliografia

- [1] KENDREW, J. C. et al. A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. **Nature**, v. 181, n. 4610, p. 662–666, doi:10.1038/181662a0, 1958.
- [2] PERUTZ, M. F. et al. Structure of Hæmoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 5.5-Å. Resolution, Obtained by X-Ray Analysis. **Nature**, v. 185, n. 4711, p. 416–422, doi:10.1038/185416a0, 1960.
- [3] WHITTIER, S. K.; HENGGE, A. C. e LORIA, J. P. Conformational motions regulate phosphoryl transfer in related protein tyrosine phosphatases. **Science (New York, N.Y.)**, v. 341, n. 6148, p. 899–903, doi:10.1126/science.1241735, 2013.
- [4] EISENMESSER, E. Z. et al. Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. **Nature**, v. 438, n. 7064, p. 117–21, doi:10.1038/nature04105, 2005.
- [5] TZENG, S.-R. e KALODIMOS, C. G. Allosteric inhibition through suppression of transient conformational states. **Nature chemical biology**, v. 9, n. 7, p. 462–5, doi:10.1038/nchembio.1250, 2013.
- [6] TZENG, S.-R. e KALODIMOS, C. G. Protein activity regulation by conformational entropy. **Nature**, v. 488, n. 7410, p. 236–40, doi:10.1038/nature11271, 2012.
- [7] VALLURUPALLI, P.; BOUVIGNIES, G. e KAY, L. E. Studying “invisible” excited protein states in slow exchange with a major state conformation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 19, p. 8148–61, doi:10.1021/ja3001419, 2012.
- [8] RADAUER, C.; LACKNER, P. e BREITENEDER, H. The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. **BMC evolutionary biology**, v. 8, p. 286, doi:10.1186/1471-2148-8-286, 2008.
- [9] GAJHEDE, M. et al. X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. **Nature structural biology**, v. 3, p. 1040–1045, 1996.
- [10] MOGENSEN, J. E. et al. The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 26, p. 23684–92, doi:10.1074/jbc.M202065200, 2002.
- [11] ILARI, A. et al. Structural Basis of Enzymatic ( S ) -Norcochlorine Biosynthesis \* □. v. 284, n. 2, p. 897–904, doi:10.1074/jbc.M803738200, 2009.
- [12] ASAM, C. et al. Bet v 1--a Trojan horse for small ligands boosting allergic sensitization? **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 44, n. 8, p. 1083–93, doi:10.1111/cea.12361, 2014.

[13] CLARK, B. J. The mammalian START domain protein family in lipid transport in health and disease. **Journal of Endocrinology**, v. 212, n. 3, p. 257–275, doi:10.1530/JOE-11-0313, 2012.

[14] KUDO, N. et al. Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 488–493, doi:10.1073/pnas.0709191105, 2008.

[15] AMES, B. D. et al. Crystal structure and functional analysis of tetracenomycin ARO / CYC: Implications for cyclization specificity of aromatic polyketides. v. 105, n. 51, p. 20147–20148, doi:10.1073/pnas.0710524, 2008.

[16] NAKABAYASHI, M. et al. Structure of a conserved hypothetical protein, TTHA0849 from *Thermus thermophilus* HB8, at 2.4 Å resolution: a putative member of the StAR-related lipid-transfer (START) domain superfamily. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 61, n. Pt 12, p. 1027–1031, doi:10.1107/S1744309105035372, 2005.

[17] RADAUER, C. et al. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 121, n. 4, p. 847–52.e7, doi:10.1016/j.jaci.2008.01.025, 2008.

[18] LICHMAN, B. R. et al. “Dopamine-first” mechanism enables the rational engineering of the norcoclaurine synthase aldehyde activity profile. **FEBS Journal**, v. 282, n. 6, p. 1137–1151, doi:10.1111/febs.13208, 2015.

[19] SHEN, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 285–295, doi:10.1016/S1367-5931(03)00020-6, 2003.

[20] CORREIA, B. E. et al. Proof of principle for epitope-focused vaccine design. **Nature**, v. 507, n. 7491, p. 201–6, doi:10.1038/nature12966, 2014.

[21] CAFFREY, P. Dissecting Complex Polyketide Biosynthesis. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 3, n. 4, p. 1–8, doi:10.5936/csbj.201210010, 2012.

[22] CAFFREY, P. Dissecting Complex Polyketide Biosynthesis. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 3, n. 4, p. 1–8, doi:10.5936/csbj.201210010, 2012.

[23] KATZ, L. Manipulation of Modular Polyketide Synthases. **Chemical reviews**, v. 97, n. 7, p. 2557–2576, doi:10.1021/cr960025+, 1997.

[24] NAKABAYASHI, M. et al. Structure of a conserved hypothetical protein, TTHA0849 from *Thermus thermophilus* HB8, at 2.4 Å resolution: a putative member of the StAR-related lipid-transfer (START) domain superfamily. **Acta crystallographica. Section F**,



**Structural biology and crystallization communications**, v. 61, n. Pt 12, p. 1027–31, doi:10.1107/S1744309105035372, 2005.

[25] LÉTOURNEAU, D. et al. The binding site specificity of STARD4 subfamily: Breaking the cholesterol paradigm. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 408, p. 53–61, doi:10.1016/j.mce.2014.12.016, 2014.

[26] TSUJISHITA, Y. e HURLEY, J. H. Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. **Nature structural biology**, v. 7, n. 5, p. 408–414, doi:10.1038/75192, 2000.

[27] LI, W. F.; ZHOU, X. X. e LU, P. Structural features of thermozymes. v. 23, p. 271–281, doi:10.1016/j.biotechadv.2005.01.002, 2005.

[28] ALPY, F. e TOMASETTO, C. Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 13, p. 2791–2801, doi:10.1242/jcs.02485, 2005.

[29] ADAMS, S. H. et al. potential link to obesity. v. 142, p. 135–142, 2001.

[30] ALPY, F. et al. The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 6, p. 4261–9, doi:10.1074/jbc.M006279200, 2001.

[31] BHATTACHARJEE, a et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 24, p. 13790–5, doi:10.1073/pnas.191502998, 2001.

[32] DURAND, S. e ANGELETTI, S. GTT1 / StarD7 , a Novel Phosphatidylcholine Transfer Protein-like Highly Expressed in Gestational Trophoblastic Tumour : Cloning and Characterization. v. 4004, p. 37–44, 2004.

[33] OLAYIOYE, M. a et al. StarD10, a START domain protein overexpressed in breast cancer, functions as a phospholipid transfer protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 29, p. 27436–42, doi:10.1074/jbc.M413330200, 2005.

[34] RAYA, a et al. Goodpasture antigen-binding protein, the kinase that phosphorylates the goodpasture antigen, is an alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40392–9, doi:10.1074/jbc.M002769200, 2000.

[35] LATULIPPE, E. et al. Comprehensive Gene Expression Analysis of Prostate Cancer Reveals Distinct Transcriptional Programs Associated with Metastatic Disease 1. n. 212, p. 4499–4506, 2002.

- [36] YUAN, B. et al. Cloning, Characterization, and Chromosomal Localization of a Gene Frequently Deleted in Human Liver Cancer (DLC-1) Homologous to Rat RhoGAP. 1998.
- [37] CHING, Y.-P. et al. Deleted in liver cancer (DLC) 2 encodes a RhoGAP protein with growth suppressor function and is underexpressed in hepatocellular carcinoma. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 12, p. 10824–30, doi:10.1074/jbc.M208310200, 2003.
- [38] CHEN, X. et al. Gene Expression Patterns in Human Liver Cancers. v. 13, n. June, p. 1929–1939, doi:10.1091/mbc.02, 2002.
- [39] PACYNA-GENGELBACH, M. et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. v. 99, n. 2, 2002.
- [40] SUGIKI, T. et al. Structural basis for the Golgi association by the pleckstrin homology domain of the ceramide trafficking protein (CERT). **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 40, p. 33706–18, doi:10.1074/jbc.M112.367730, 2012.
- [41] YAMAJI, T. et al. Two sphingolipid transfer proteins, CERT and FAPP2: Their roles in sphingolipid metabolism. **IUBMB Life**, v. 60, n. 8, p. 511–518, doi:10.1002/iub.83, 2008.
- [42] KUDO, N. et al. Crystal structures of the CERT START domain with inhibitors provide insights into the mechanism of ceramide transfer. **Journal of molecular biology**, v. 396, n. 2, p. 245–51, doi:10.1016/j.jmb.2009.12.029, 2010.
- [43] TUGARINOV, V.; KANELIS, V. e KAY, L. E. Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy. **Nature protocols**, v. 1, n. 2, p. 749–754, doi:10.1038/nprot.2006.101, 2006.
- [44] FARROW, N. A. et al. Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by <sup>15</sup>N NMR relaxation. **Biochemistry**, v. 33, n. 19, p. 5984–6003, 1994.
- [45] KAY, L. E.; TORCHIA, D. a e BAX, a. Backbone dynamics of proteins as studied by <sup>15</sup>N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. **Biochemistry**, v. 28, n. 23, p. 8972–8979, doi:10.1021/bi00449a003, 1989.
- [46] BARBATO, G. Backbone Dynamics of Calmodulin Studied by <sup>15</sup>N. **Society**, p. 5269–5278, 1992.
- [47] SZABO, A. Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules . 1 . Theory and Range of Validity. **Society**, v. I, n. 1, p. 4546–4559, 1982.

[48] DOSSET, P. et al. Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. p. 23–28, 2000.

[49] KORZHNEV, D. M. e KAY, L. E. Probing invisible, low-populated states of protein molecules by relaxation dispersion NMR spectroscopy: An application to protein folding. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 3, p. 442–451, doi:10.1021/ar700189y, 2008.

[50] PALMER, A. G. e MASSI, F. Characterization of the dynamics of biomacromolecules using rotating-frame spin relaxation NMR spectroscopy. **Chemical reviews**, v. 106, n. 5, p. 1700–19, 2006.

[51] PALMER, A. G. Enzyme Dynamics from NMR Spectroscopy. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 2, p. 457–465, doi:10.1021/ar500340a, 2015.