



Título: Dinâmica do NADPH citocromo P450 oxido-reductase: Identificação de resíduos críticos

Autores: Diana Campelo, Francisco Esteves, Michel Kranendonk.1

Filiações: 1Centre for Toxicogenomics and Human Health (ToxOmics). NMS / FCM-UNL

Introdução

NADPH citocromo P450 oxido-reductase (CPR) é o fornecedor electrónico obrigatório para o citocromo P450 (CYP). O CPR desempenha um papel central na sustentação da actividade de CYPs microsossomais, que medeiam o metabolismo de hormonas esteróides e vitaminas mas também de fármacos e xenobióticos. Os electrões são transferidos entre os grupos prostéticos do CPR (FAD, FMN) para o heme do CYP. A estequiometria CPR:CYP (1: 5-10) implica uma competição individual dos CYPs para o CPR. Há escassez de informação relativamente às alterações estruturais do CPR que controlam a sua função de transferência electrónica (TE), bem como a dinâmica de abertura e fecho dos domínios e a interacção com as isoformas dos CYPs. Foi sugerido que uma secção específica da CPR, a região "*hinge*", desempenha um papel importante na dinâmica da proteína.

Objectivos

Identificar os resíduos da *hinge* que permitem as transições conformacionais aberto-fechado; desvendar o mecanismo molecular de TE e obter pistas moleculares adicionais para a dinâmica dos domínios da proteína.

Métodos

- i) Co-expressão de variantes de CPR com 4 isoformas representativas de CYPs humanos (modelo bi-plasmídico bacteriano BTC);
- ii) Caracterização de microsossomas bacterianos: concentração proteica (Bradford); conteúdo em CPR (ensaio de redução do citocromo c) e conteúdo em CYP (espectro diferencial de absorção de CO);



lii) Caracterização funcional dos modelos celulares: ensaio de redução do citocromo c; cinética enzimática do CYP e ensaios de bioativação/mutagenicidade.

Resultados

As variantes de CPR, substituições por alanina e prolina (G240, S243, I245 e R246), foram construídas e clonadas. Os CPR mutantes foram combinados com os CYP1A2 e 2A6, e o plasmídeo *mock* pCWAΔ. As condições de cultura, níveis de crescimento e indução da expressão foram testadas e optimizadas. A determinação do conteúdo em CYP em células inteiras e o isolamento de microsomas bacterianos foram optimizados. No presente, estão a ser realizados estudos de força iónica com diferentes concentrações de NaCl (titulação).

Perspectivas

O mapeamento dos resíduos críticos na *hinge* do CPR e a determinação do seu papel nos equilíbrios conformacionais contribuirão para a compreensão fundamental da dinâmica do CPR e dos sistemas de proteínas redox multidomínio em geral. Isso aumentará o conhecimento sobre o papel das interações do CPR com os seus parceiros redox no metabolismo de endo- e xenobióticos, uma questão fisiológica e clinicamente relevante.