

TDUP
92
2006



MECANISMO DE INIBIÇÃO DE ENZIMAS RADICALARES

Susana Rodrigues Pereira

**Departamento de Química
2006**

QD455.3
PERs M
2006



FC

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto



D000119344

U. PORTO

FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

MECANISMO DE INIBIÇÃO DE ENZIMAS RADICALARES

Susana Rodrigues Pereira

*Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
para obtenção do grau de Doutor em Química*



Departamento de Química

2006

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar aos meus supervisores: à Dra. Maria João por ter possibilitado e orientado com perspicácia a realização deste trabalho e ao Dr. Pedro pelo acompanhamento constante e pelas discussões sempre optimistas.

Agradeço também aos restantes elementos da QT, em particular os da sala 3.28, e à Cristina e ao Nelson, o companheirismo e a amizade demonstrados desde o início do meu “desterro tripeiro”, com uma referência especial à Rute, pela partilha de aventuras nas viagens de trabalho.

Uma nota de reconhecimento às pessoas com quem posso sempre contar, o Luís, o David e, em especial, os meus pais, que me deram a liberdade e os meios para seguir o meu caminho e nunca deixaram de me apoiar e de confiar nas minhas capacidades.

E um agradecimento final à Anabela, que me ajudou a tomar a decisão de responder ao anúncio que resultou na minha vinda para o Porto, sem o que nada disto teria acontecido.

O trabalho apresentado nesta tese foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, através de uma bolsa de doutoramento (BD/6564/2001).



Aos meus pais

If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?

Albert Einstein

Resumo

O trabalho apresentado nesta tese compreende uma série de estudos que tiveram por objectivo a elucidação do mecanismo de inibição de uma enzima radicalar – a Ribonucleótido Redutase ou RNR – por vários compostos análogos dos substratos. O estudo da interacção de cada inibidor com o centro activo da enzima foi realizado com métodos computacionais baseados em modelos quânticos.

O primeiro grupo de análogos estudado foi o dos 2'-azido-2'-desoxirribonucleótidos. Sendo um dos inibidores suicidas mais estudados e um dos primeiros a ter sido identificado, a quantidade de informação experimental disponível possibilitara o que parecia ser a elucidação quase completa do respectivo mecanismo de inibição. O estudo computacional permitiu esclarecer a estrutura de um intermediário radicalar estável detectado experimentalmente e propor um novo mecanismo cineticamente mais favorável, que está de acordo com todos os dados experimentais.

O mecanismo de inibição da 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina ou gemcitabina foi o segundo a ser estudado. Este composto apresenta as particularidades de, por um lado, ser o inibidor suicida da RNR mais eficaz em termos clínicos, com utilização aprovada para o tratamento de vários tipos de cancro, e, por outro, induzir a inibição da RNR de duas maneiras diferentes, dependendo da disponibilização de espécies redutoras ao centro activo da enzima. O estudo computacional realizado levou à primeira proposta de um mecanismo para a inibição da RNR pela gemcitabina na ausência de redutores.

O terceiro grupo de análogos estudado foi o dos 3'- β -etnil-ribonucleótidos, cuja actividade anti-tumoral foi sugerido estar relacionada, pelo menos parcialmente, com a inibição da RNR, através da formação de um aducto cíclico no centro activo. Os cálculos computacionais realizados indicam que o mecanismo proposto é plausível mas foram inconclusivos quanto à existência de uma correlação entre a estabilidade do produto cíclico formado e o grau de actividade diferenciada dos vários análogos (com diferentes bases azotadas).

O último grupo de inibidores estudado, o dos 2'-mercapto-2'-desoxirribonucleótidos, apresenta a particularidade de inibir a RNR apenas na presença de O₂. Como resultado do estudo computacional, foi possível clarificar o mecanismo proposto para a inibição da enzima, nessas condições, assim como fazer uma primeira proposta para os eventos químicos na ausência de oxigénio, que não afectam a actividade da RNR.

Abstract

The work presented in this thesis comprises a series of studies which aimed to elucidate the inhibition mechanism of a particular radical enzyme – Ribonucleotide Reductase or RNR – by several substrate analogues. In order to thoroughly understand the interaction of each inhibitor with the enzyme active site, computational methods based on quantum mechanics models were used.

2'-azido-2'-deoxyribonucleotides was the first group of substrate analogues addressed in this study. Having been one of the first RNR suicide inhibitors to be identified and constituting the one most studied, the amount of experimental information available had permitted what seemed to be the almost complete elucidation of its inhibition mechanism. The computational study allowed the clarification of a stable intermediary's structure, detected experimentally, and the proposal of a different, kinetically more favourable, mechanism, which is in agreement with all experimental data.

The second substrate analogue studied was the 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine-5'-diphosphate or gemcitabine-5'-diphosphate. This compound is the RNR suicide inhibitor with the highest clinical efficacy, already approved for the treatment of several types of cancer. Interestingly, earlier experimental studies had showed its ability to induce RNR inhibition by two different ways depending on the availability of reducing species to the enzyme's active site. The computational study led to the first proposal of a mechanism for RNR inhibition by gemcitabine in the absence of reductants.

3'- β -etnil-ribonucleotides was the third group of substrate analogues studied computationally. Their anticancer activity was suggested to be related, at least partially, with RNR inactivation through the formation of a stable cyclic adduct in its active site. The results of this study indicate that the proposed mechanism is plausible but are inconclusive regarding the existence of a correlation between the stability of the cyclic product and the degree of activity of the different analogues (with different bases).

The last group of substrate analogues addressed in this work, the 2'-mercapto-2'-deoxyribonucleotides, leads to RNR inhibition only in the presence of O₂. As a result of the study, it was possible to confirm/clarify the mechanism that had been proposed to occur in that situation and make a first proposal for the chemical events in the absence of oxygen, which do not affect RNR's activity.

Résumé

Le travail présenté dans cette thèse comporte une série d'études qui ont visé à élucider le mécanisme d'inhibition d'une enzyme radicalaire – la ribonucléotide réductase ou RNR – par quelques composés qui sont des analogues du substrat. Afin de comprendre en détail l'interaction de chaque inhibiteur avec le site actif de l'enzyme, des méthodes informatiques basées sur des modèles de chimie quantique ont été employées.

Le premier groupe d'analogues étudié a été celui des 2'-azido-2'-desoxy nucléotides. Ayant été un des premiers inhibiteurs suicides de la RNR à être identifiés et étant l'un des plus étudiés, la quantité d'information expérimentale disponible avait rendu possible ce qui semblait être l'élucidation presque complète de son mécanisme d'inhibition. Les résultats obtenus ont permis, non pas seulement d'établir la structure d'un intermédiaire radicalaire détecté expérimentalement, mais aussi de proposer un nouveau mécanisme qui est le plus favorable cinétiquement et qui est en cohérence avec toutes les données expérimentales.

Ensuite, le mécanisme d'inhibition de la 2',2'-difluoro-2'-desoxycytidine ou gemcitabine a été considéré. Ce composé est l'inhibiteur suicide de la RNR le plus efficace cliniquement, son utilisation ayant été déjà autorisée pour la thérapie de certaines formes de cancer. Des études expérimentales antérieures avaient révélé que l'inhibition de la RNR par la gemcitabine peut résulter de deux chemins réactionnels différents, selon l'existence ou non d'agents réducteurs accessibles au site actif. L'étude théorique a permis de proposer pour la première fois, un mécanisme pour l'inhibition de la RNR par la gemcitabine en l'absence d'agents réducteurs.

Le troisième groupe d'analogues du substrat étudié a été celui des 3'- β -étinil-ribonucléotides. Leur activité antitumorale avait été proposée d'être liée, au moins partiellement, à l'inhibition de la RNR, ce qui découlerait d'une réaction de cyclisation dans le site actif. Les résultats théoriques indiquent que le mécanisme proposé est raisonnable mais ils ne sont pas conclusifs sur l'existence d'une corrélation entre la stabilité du produit cyclique et le degré d'activité de l'analogue respectif.

Les 2'-mercapto-2'-desoxy nucléotides constituent le dernier groupe d'inhibiteurs suicides de la RNR étudié dans ce travail. Ces composés présentent la particularité d'inhiber la RNR seulement en présence d'O₂. L'étude théorique a permis de clarifier le mécanisme d'inhibition dans ces conditions et aussi de faire une première proposition d'un chemin réactionnel en l'absence d'oxygène, ce qui n'affecte pas l'activité de la RNR.

Lista de artigos

Uma vez que parte do trabalho apresentado nesta tese já havia sido publicado, optou-se por incorporar os vários artigos no texto da dissertação, integrando dois artigos de revisão no capítulo referente à enzima e três artigos relativos ao estudo de três inibidores suicidas da RNR no capítulo dos resultados e conclusões. Eis os artigos, por ordem de inserção na tese:

Artigo I

“Overview of Ribonucleotide Reductase Inhibitors: an Appealing Target in Anti-tumour Therapy”

Nuno M.F.S.A. Cerqueira, Susana Pereira, Pedro A. Fernandes e Maria J. Ramos

Current Medicinal Chemistry, 2005, 12, 1283-1294

Artigo II

“Computational Studies on Class I Ribonucleotide Reductase: Understanding the Mechanisms of Action and Inhibition of a Cornerstone Enzyme for the Treatment of Cancer”

Susana Pereira, Nuno M.F.S.A. Cerqueira, Pedro A. Fernandes e Maria J. Ramos

European Biophysical Journal, 2006, 35, 125-135

Artigo III

“Theoretical Study of Ribonucleotide Reductase Mechanism-Based Inhibition by 2'-Azido-2'-Deoxyribonucleoside-5'-Diphosphates”

Susana Pereira, Pedro Alexandrino Fernandes e Maria João Ramos

Journal of Computational Chemistry, 2004, 25, 227-237

Artigo IV

“Mechanism for Ribonucleotide Reductase Inactivation by the Anticancer Drug Gemcitabine”

Susana Pereira, Pedro Alexandrino Fernandes e Maria João Ramos

Journal of Computational Chemistry, 2004, 25, 1286-1294

Artigo V

“Theoretical Study on the Inhibition of Ribonucleotide Reductase by 2'-Mercapto-2'-Deoxyribonucleoside-5'-Diphosphates”

Susana Pereira, Pedro Alexandrino Fernandes e Maria João Ramos

Journal of the American Chemical Society, 2005, 127, 5174-5179

Índice

Introdução	1
1. Ribonucleótido Redutase.....	5
1.1. Estrutura e Mecanismo Catalítico	8
1.2. Inibição (Artigo I).....	11
1.3. Estudos Computacionais sobre a RNR (Artigo II).....	27
Referências	40
2. Métodos Computacionais	43
2.1. Teoria de Hartree-Fock.....	45
2.2. Bases de Funções.....	48
2.3. Métodos Semiempíricos	52
2.4. Teoria do Funcional da Densidade	55
2.5. ONIOM.....	58
2.6. Modelos Contínuos.....	60
2.7. Optimização de Geometria	61
Referências	67
3. Resultados e Conclusões	71
3.1. 2'-azido-2'-desoxirribonucleótidos (Artigo III).....	77
3.2. Gemcitabina-5'-difosfato.....	95
Ausência de redutores (Artigo IV)	96
Presença de redutores	115
3.3. 3'- β -etnil-ribonucleótidos.....	117
3.4. 2'-mercapto-2'-desoxirribonucleótidos (Artigo V)	125
Referências	135
4. Considerações Finais	137
Referências	142

Introdução

A Química Teórica combina métodos matemáticos com as leis fundamentais da Física, clássica e quântica, para estudar processos de relevância química. Embora apenas se consigam obter soluções exactas para sistemas constituídos por uma ou duas partículas, é possível obter soluções numéricas para sistemas maiores, com um maior ou menor grau de exactidão, à custa de um número muito grande de operações matemáticas, que só a recente evolução tecnológica a nível de computadores veio tornar praticável. Surgiu assim uma nova área da Química, a *química computacional* que utiliza os modelos desenvolvidos pelos químicos teóricos, implementando-os em algoritmos computacionais com o objectivo de obter resultados relevantes para problemas químicos específicos.

A química computacional tornou-se uma ferramenta fundamental para o estudo de sistemas químicos, complementando em larga escala e por vezes mesmo substituindo, os estudos

experimentais. A aplicação dos métodos de química computacional ao estudo de sistemas biológicos torna-os particularmente úteis para a investigação na área da saúde. A sua utilização nesta área permite compreender de forma mais célere, quer os mecanismos bioquímicos envolvidos no desenvolvimento de patologias, quer os responsáveis pelo mecanismo de acção de fármacos de eficácia já reconhecida, contribuindo deste modo para o desenho de fármacos novos e/ou mais eficazes.

O trabalho aqui apresentado insere-se neste tipo de aplicação: pretendeu-se compreender melhor o mecanismo de acção de moléculas já reconhecidas como inibidoras da enzima radicalar Ribonucleótido Redutase (RNR), de modo a providenciar informação relevante para o desenvolvimento racional de inibidores mais eficazes. Ao longo do doutoramento foram estudados, por métodos computacionais, os mecanismos de inibição de quatro análogos dos substratos da RNR, tendo os estudos resultado na proposta de novos mecanismos ou na confirmação/clarificação dos que já haviam sido propostos na literatura com base em dados experimentais.

A tese está organizada em quatro capítulos principais: (1) ribonucleótido redutase, (2) métodos computacionais, (3) resultados e conclusões e (4) considerações finais.

No primeiro capítulo é apresentada uma descrição do sistema biológico estudado. Começam por ser abordados a função fisiológica da RNR, contextualizada no metabolismo geral dos nucleótidos, e os mecanismos de regulação que controlam a sua actividade. Segue-se a descrição da estrutura e do mecanismo catalítico da RNR da *Escherichia coli* (semelhante à humana e utilizada como seu protótipo nos mais variados estudos) e, por fim, a discussão dos vários tipos de inibição de que a enzima pode ser alvo. Este capítulo inclui dois artigos de revisão: o primeiro aborda os vários inibidores da RNR e está incorporado precisamente na secção que descreve a inibição da enzima; o segundo refere-se aos estudos computacionais baseados em cálculos quânticos que foram devotados ao estudo da RNR e encontra-se integrado numa secção própria.

O segundo capítulo corresponde a uma breve descrição dos métodos computacionais utilizados neste trabalho. Nele são aflorados os métodos semiempíricos, a Teoria do Funcional da Densidade, o ONIOM e os modelos contínuos, assim como alguns conceitos relacionados com optimização de geometria e identificação dos pontos estacionários da

superfície de energia potencial.

Os resultados do trabalho são apresentados no terceiro capítulo, que se encontra organizado em quatro secções, correspondentes aos quatro inibidores estudados. Na primeira secção e na última, relativas aos 2'-azido-2'-desoxirribonucleótidos e aos 2'-mercapto-2'-desoxirribonucleótidos, respectivamente, os estudos são apresentados através dos artigos que haviam sido publicados. A segunda secção está dividida em duas partes, referentes a dois aspectos do estudo da gemcitabina-5'-difosfato, encontrando-se o primeiro deles igualmente descrito através de um artigo. Apenas na terceira secção, onde se descreve o estudo dos 3'- β -etnil-ribonucleósidos, não foi integrada qualquer publicação.

Por fim, no último capítulo, são tecidas algumas considerações sobre a relevância do trabalho, a importância dos resultados obtidos para uma melhor caracterização da RNR, em termos de catálise e de inibição, e a influência desses resultados em potenciais trabalhos futuros.

1. Ribonucleótido Redutase

A Ribonucleótido Redutase (RNR) é a enzima responsável pela redução dos ribonucleótidos a 2'-desoxirribonucleótidos, reacção que constitui o passo limitante na síntese dos monómeros do Ácido Desoxirribonucleico (ADN) (Reichard 1993; Stubbe e van der Donk 1998).

Todos os nucleótidos são compostos por um açúcar (ribose ou desoxirribose), uma base azotada (ligada ao carbono 1 do açúcar) e um ou mais grupos fosfato (geralmente no carbono 5 do açúcar). Os que fazem parte integrante da molécula de ADN possuem a desoxirribose como açúcar, apresentam um grupo fosfato no carbono 5 e podem conter uma das quatro bases azotadas seguintes: adenina, guanina, citosina ou timina. A molécula de ADN é constituída por duas cadeias de desoxirribonucleótidos unidos sequencialmente através do grupo fosfato por ligações éster (ligações 3',5'-fosfodiéster); as duas cadeias dispõem-se no espaço de forma antiparalela e helicoidal, interagindo entre si através de pontes de hidrogénio

estabelecidas entre as bases azotadas (a adenina estabelece ligações de hidrogénio com a timina e a citosina com a guanina). Na figura 1 estão representadas a estrutura geral dos desoxirribonucleótidos e parte de uma cadeia de ADN.

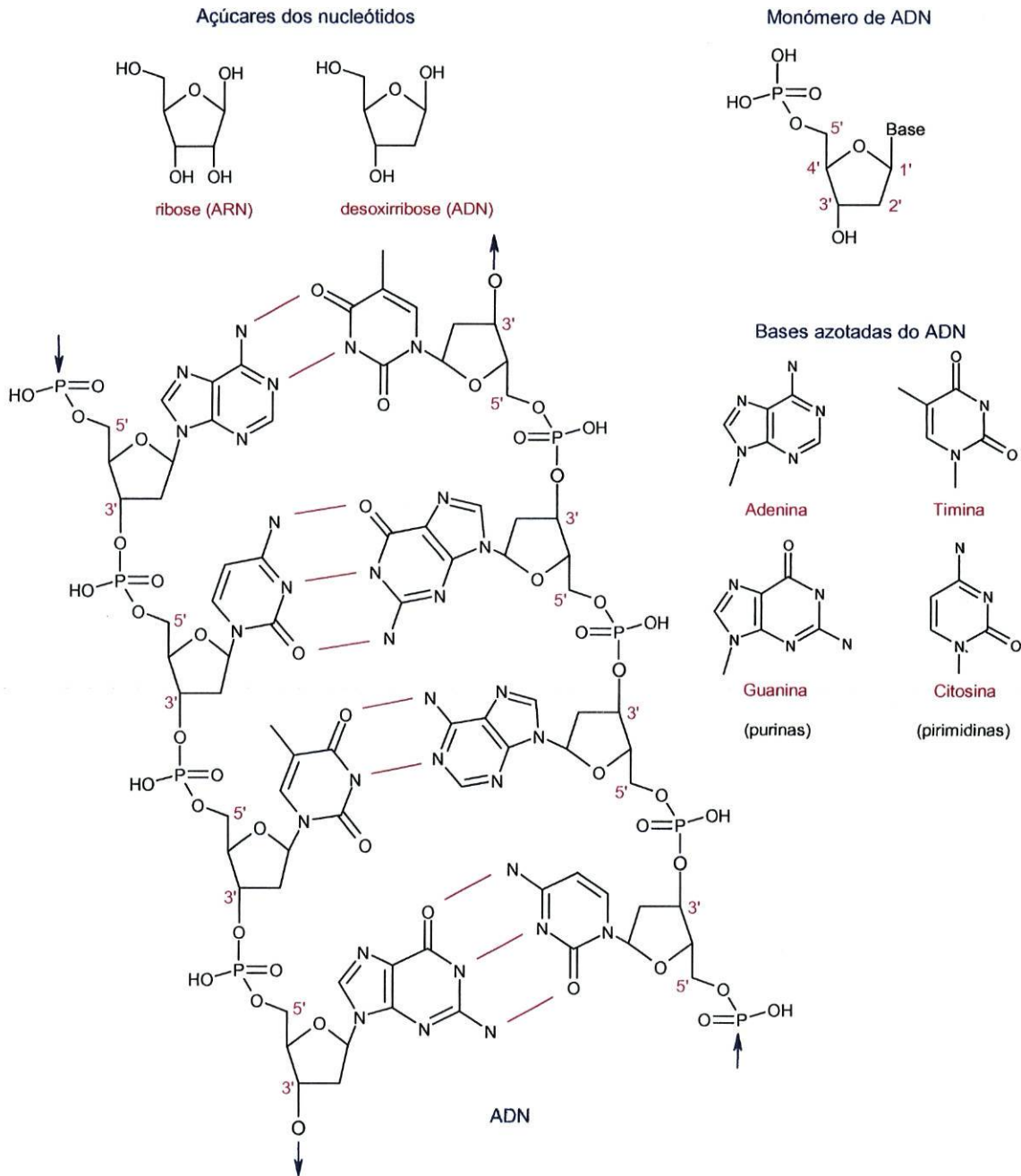


Figura 1. Estrutura geral dos desoxirribonucleótidos e detalhe da cadeia de ADN.

Todas as células do organismo possuem uma cópia da molécula de ADN, que é característica e definidora de cada indivíduo. Sempre que uma célula se divide, é necessário que tenha ocorrido uma replicação prévia do seu ADN, de modo a que cada uma das duas células resultantes receba uma cópia idêntica da molécula. Por outro lado, uma vez que a integridade da molécula de ADN é essencial para o correcto funcionamento celular, sempre que o ADN

sofre mutações, a sequência correcta de nucleótidos tem de ser reposta, de modo a prevenir a produção de proteínas anómalas que possam descontrolar o metabolismo celular e conduzir eventualmente à morte da célula. É portanto essencial assegurar a disponibilização dos desoxirribonucleótidos necessários, tanto para o processo de replicação do ADN, que antecede cada divisão da célula, como para a reparação de quaisquer alterações fortuitas na sua sequência, ao longo do ciclo de vida celular.

Existem duas vias alternativas para a produção de nucleótidos no organismo: enquanto uma inclui a síntese de raiz a partir de precursores de baixo peso molecular (“*de novo synthesis*”), a outra utiliza os componentes de nucleótidos entretanto desintegrados ou obtidos da dieta (“*salvage pathway*”). Nos dois casos, o açúcar é incorporado através do mesmo intermediário, o 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP), pelo que ambas as vias resultam na produção de ribonucleótidos; a transformação destes nos desoxirribonucleótidos respectivos será feita posteriormente pela RNR, à medida das necessidades celulares. A figura 2 apresenta um esquema bastante simplificado do metabolismo dos nucleótidos.

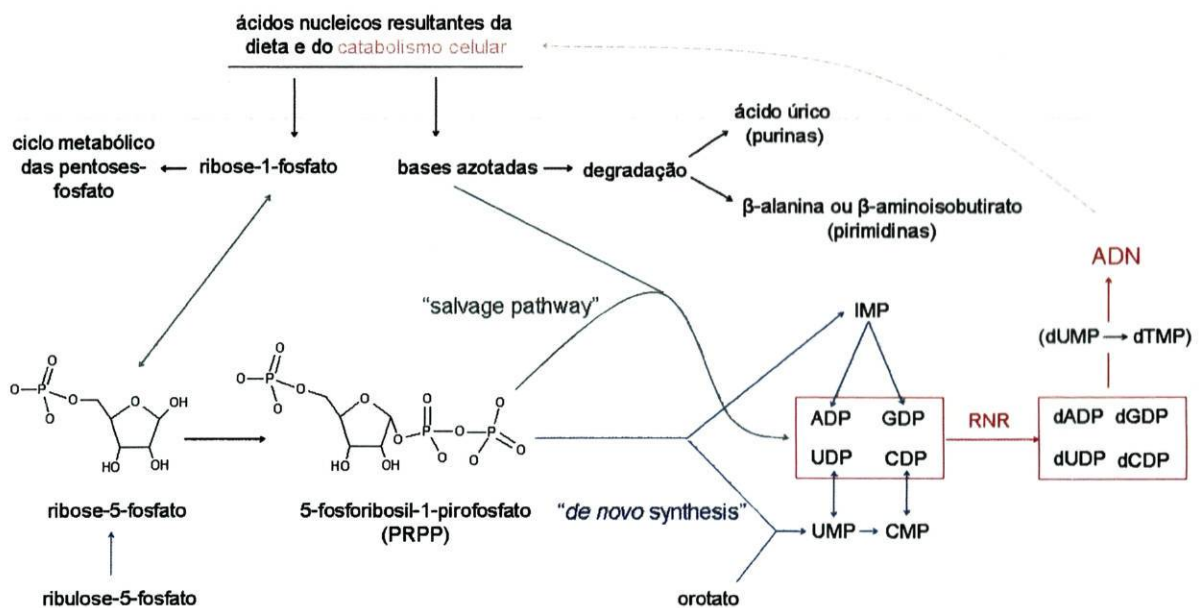


Figura 2. Esquema geral simplificado do metabolismo dos nucleótidos.

Uma vez que a mesma enzima é responsável pela redução dos quatro ribonucleótidos, a sua actividade geral e a especificidade do centro activo para cada um dos substratos, são alvo de regulação apertada, de modo a que seja assegurada uma produção equilibrada dos vários desoxirribonucleótidos. A regulação é feita através da interacção de nucleósidos-trifosfato com os centros alostéricos da RNR (Eriksson *et al.* 1997). A actividade geral da enzima, que

depende do ciclo celular, é controlada pela interação da adenosina-trifosfato (ATP – efector positivo) e da desoxiadenosina-trifosfato (dATP – efector negativo) com o centro alostérico adequado. Os efectores que interagem com o centro regulador da especificidade são o ATP, o dATP, a desoxiguanosina-trifosfato (dGTP), e a desoxitimidina-trifosfato (dTTP): a ligação de um destes compostos ao centro alostérico provoca o ajuste da afinidade do centro activo para um determinado substrato, naturalmente aquele que se encontrar em menor abundância na célula. Estes mecanismos permitem a manutenção de uma pequena “pool” celular de desoxirribonucleótidos e tornam os processos de replicação e reparação do ADN fortemente dependentes do desempenho da RNR, características que fizeram da enzima um alvo bastante interessante para terapias que combatam patologias baseadas na proliferação celular.

1.1. Estrutura e Mecanismo Catalítico

A RNR é uma enzima ubíqua, que existe praticamente em todas as células de todos os seres vivos; embora existam três classes diferentes de RNR, todas apresentam um mecanismo catalítico mediado por radicais livres e aparentam ter evoluído de um ancestral comum (Kolberg *et al.* 2004). As principais diferenças entre os três tipos de RNR estão compiladas na tabela 1 e relacionam-se entre outros com os seguintes aspectos: o cofactor necessário para a produção do radical orgânico essencial para a actividade; os resíduos de aminoácido onde o radical é gerado; a existência ou não de um centro alostérico regulador da actividade geral da enzima e o grau de fosforilação dos substratos.

Tabela 1. Principais diferenças entre as três classes de RNR (adaptado de Jordan e Reichard 1998).

	Classe I	Classe II	Classe III
Dependência em O ₂	aeróbica	aeróbica/anaeróbica	anaeróbica
Estrutura	$\alpha_2\beta_2$	α (ou α_2)	$\alpha_2\beta_2$
Centro Metálico	Fe-O-Fe	Co	Fe-S
Radical	Tir...Cis	AdB12...Cis	AdoMet...Gli...Cis
Substrato	NDP	NDP/NTP	NTP
Inibição por dATP	sim	não	sim
Redutor	tio-redoxina glutaredoxina	tio-redoxina	formato
Ocorrência	eucariotas eubactérias vírus	arqueobactérias vírus	arqueobactérias vírus

A RNR da *Escherichia coli* é semelhante à dos mamíferos – ambas pertencem à classe I – e tem servido como seu protótipo em estudos experimentais e computacionais. A estrutura geral da enzima bem como o respectivo centro activo estão esquematizados na figura 3. A enzima consiste num tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ que resulta da associação de dois homodímeros cataliticamente inactivos, R1 (α_2) e R2 (β_2); a determinação da estrutura cristalográfica por raios X de ambas as subunidades foi um passo importante para a elucidação do mecanismo catalítico e para o desenvolvimento de novos inibidores (Nordlund *et al.* 1990; Uhlin e Eklund 1994).

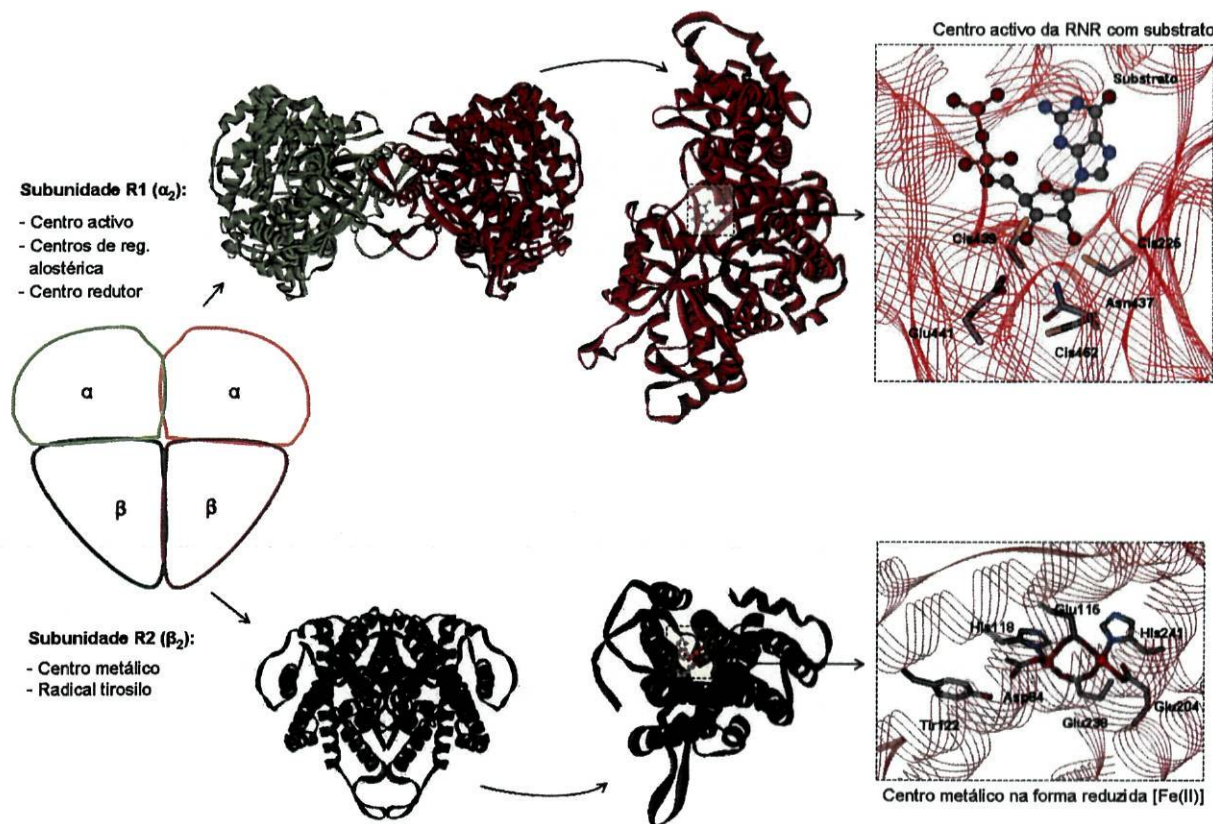


Figura 3. RNR da *Escherichia coli*, com o centro activo em detalhe (Nordlund e Eklund 1993; Eriksson *et al.* 1997).

A subunidade R2, com um peso de 87 kDa, é a mais pequena das duas e contém um centro metálico composto por dois átomos de ferro, que está envolvido na formação e estabilização do radical essencial para a actividade catalítica da enzima; o radical, localizado num resíduo de tirosina (Tyr122), é produzido através da dissociação de uma molécula de O_2 pelo complexo ferroso [Fe(II)] e é estabilizado pelo complexo diférrico [Fe(III)] resultante. O centro activo da enzima, bem como os centros alostéricos que regulam a sua actividade e especificidade, estão localizados na subunidade R1, que possui um peso molecular de 171 kDa. Os resíduos do centro activo que parecem estar directamente envolvidos na redução dos

substratos consistem em três resíduos de cisteína, um de glutamato e um de asparagina – Cis225, Cis439, Cis462, Glu441 e Asn437 (Mao *et al.* 1992; Persson *et al.* 1997; Kasrayan *et al.* 2002).

Para que a reacção catalítica se inicie, após a entrada do substrato no centro activo, é necessário que o radical localizado no resíduo de tirosina (Tir122), na subunidade R2, seja transferido para a Cis439 da subunidade R1, a cerca de 35 Å de distância; este processo parece ocorrer através da transferência de átomos de hidrogénio ao longo de uma cadeia de resíduos conservados, ligados por pontes de hidrogénio (Ekberg *et al.* 1996; Siegbahn *et al.* 1998). O enxofre radicalar da Cis439 inicia a catálise abstraindo o átomo de hidrogénio da posição 3' da ribose (Stubbe *et al.* 1983). Durante o processo de redução, os grupos tióis dos dois outros resíduos de cisteína do centro activo são oxidados, formando uma ponte dissulfureto e é libertada uma molécula de H₂O; o mecanismo catalítico actualmente aceite como o mais favorável está representado na figura 4 (Cerqueira *et al.* 2004; Stubbe e van der Donk 1998).

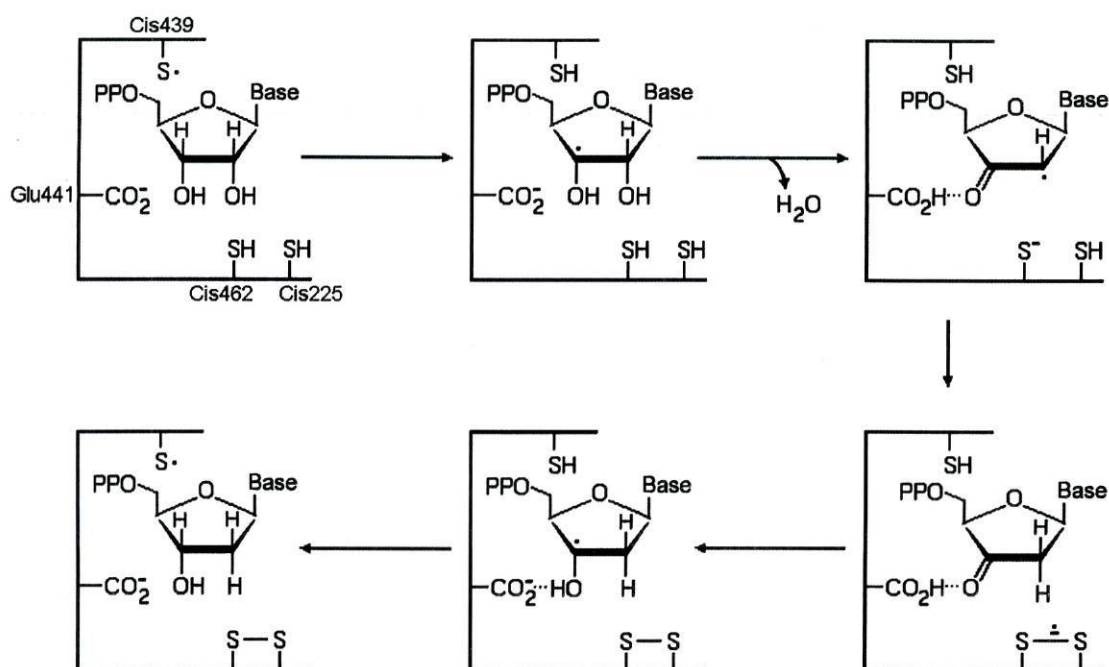


Figura 4. Mecanismo catalítico da RNR.

O último passo, que consiste na transferência do átomo de hidrogénio do enxofre do resíduo Cis439 de volta para o carbono 3' da ribose, resulta na regeneração do radical tirosilo. Para que a enzima fique pronta para um novo ciclo catalítico é necessário apenas que a ponte dissulfureto entre os resíduos Cis225 e Cis462 seja reduzida aos grupos tióis respectivos;

estudos bioquímicos e mutagénicos indicam que esta redução é mediada por dois outros resíduos de cisteína (Cis754 e Cis759), localizados num braço flexível da R1 que permite o contacto com o centro activo e com espécies redutoras exteriores à enzima, fornecidas pela tioredoxina ou pela glutaredoxina (Åberg *et al.* 1989).

1.2. Inibição

A inibição da RNR origina a produção de proteínas disfuncionais e a perturbação do funcionamento e da proliferação celulares, consequências que podem ser aproveitadas vantajosamente para o tratamento das situações patológicas relacionadas com o desenvolvimento de tumores malignos, que têm origem no crescimento descontrolado de determinadas linhas celulares. Adicionalmente, podem também ser úteis em terapias combinadas para interferir com a proliferação de determinados parasitas (onde se pode tirar partido de pequenas diferenças que existam entre a enzima do parasita e a do hospedeiro de modo a atacar selectivamente a primeira) ou para travar a replicação de vírus que usam a maquinaria celular do hospedeiro para sintetizar o próprio ADN (tais como o responsável pelo SIDA).

A utilização dos inibidores da RNR hidroxiureia e gemcitabina está actualmente autorizada para as seguintes indicações terapêuticas: melanoma, leucemia mielocítica crónica resistente, carcinoma do ovário, cancro do pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma do pâncreas, cancro da mama e cancro da bexiga (cf. FDA e EMEA). Para além disso, um número crescente de ensaios clínicos tem vindo a decorrer com estes e outros inibidores da RNR para avaliar a sua eficácia em diferentes situações clínicas e/ou diferentes combinações terapêuticas (Balzarini 2000; Bunn 2004; Choy 2004; Orr e Dorr 2005; Romanelli *et al.* 1999; Seley 2000; Tsimberidou *et al.* 2002).

A inibição da RNR pode ser conseguida de diversas maneiras. Um grupo importante de inibidores, a que pertence a gemcitabina, é o dos análogos dos substratos ou inibidores suicidas: ao serem reconhecidos pela enzima como substratos normais, estes compostos reagem com o centro activo e originam produtos anómalos que alquilam a proteína e/ou impedem a regeneração do radical tirosilo. Na figura 5 estão representados vários inibidores suicidas da RNR: quase todos apresentam um grupo químico diferente a substituir o hidroxilo da posição 2' da ribose (que é reduzido a H na reacção natural); apenas um dos compostos

representados tira partido de outro aspecto da catálise, ao apresentar um grupo bastante reactivo na posição do hidrogénio que deveria ser abstraído pelo enxofre radicalar no primeiro passo do mecanismo.

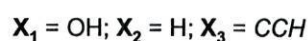
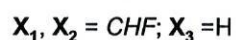
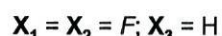
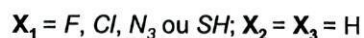
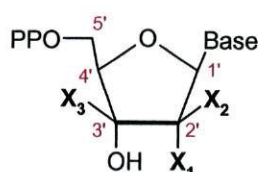


Figura 5. Estrutura de vários inibidores suicidas da RNR.

No trabalho apresentado nesta tese, foram estudados os mecanismos de inibição de quatro análogos dos substratos, cuja actividade como inibidores da RNR já havia sido reconhecida experimentalmente: os 2'-azido-2'-desoxirribonucleósidos-5'-difosfato (N₃dNDP), os 3'-β-etinil-ribonucleósidos-5'-difosfato (EtNDP), a 2',2'-difluoro-2'-desoxicidina-5'-difosfato (dFdCDP ou gemcitabina-5'-difosfato) e os 2'-mercapto-2'-desoxirribonucleósidos-5'-difosfato (SHdNDP).

O conhecimento detalhado da estrutura e dos mecanismos catalítico e de regulação da RNR permitiu o desenvolvimento de inibidores eficazes que actuam de formas muito diferentes. A abordagem mais precoce consiste em interferir com a síntese das subunidades que constituem a RNR ou em impedir que estas interajam, para o que se utilizam, respectivamente, sequências de nucleótidos complementares do mRNA ou pequenos péptidos que mimetizam parte da interface. Quando a enzima já se encontra na sua forma activa, é possível inibi-la através de moléculas que interagem com a subunidade R2, provocando a destruição do radical tirosilo – mecanismo de acção da hidroxiureia –, ou através da utilização de compostos análogos dos substratos (os já referidos inibidores suicidas) e análogos dos efectores alostéricos que interferem, respectivamente, com o centro activo e com os centros de regulação alostérica, na subunidade R1.

O artigo apresentado de seguida consiste numa revisão dos inibidores conhecidos da RNR, independentemente da forma de interacção de que tirem partido. Para estruturar o artigo, os inibidores foram classificados em três grupos principais: *inibidores da tradução*, que impedem a síntese da enzima, *inibidores da dimerização*, que previnem a complexação das

duas subunidades constituintes da RNR (R1 e R2), e *inibidores catalíticos* que interferem com uma das duas subunidades quando estas se encontram complexadas no seu estado funcional. Os inibidores catalíticos da RNR foram ainda subdivididos em dois grupos consoante interajam especificamente com as subunidades R1 ou R2: os primeiros incluem os análogos dos substratos, os análogos dos efectores alostéricos e algumas moléculas que se ligam covalentemente aos resíduos de cisteína do centro activo impedindo-os de desempenhar a sua função catalítica; os segundos consistem em compostos que interferem com o radical tirosilo, destruindo-o por reacção directa ou impedindo a sua formação através de interacção quelante com os átomos de Ferro (em solução ou já depois de incorporados na enzima). Para cada grupo de inibidores são enumerados os compostos conhecidos, descritas as utilizações terapêuticas e discutidos as vantagens e os inconvenientes da sua utilização.

Overview of Ribonucleotide Reductase Inhibitors: An Appealing Target in Anti-Tumour Therapy

Nuno M.F.S.A. Cerqueira, Susana Pereira, Pedro A. Fernandes and Maria J. Ramos*

REQUIMTE / Faculdade de Ciências do Porto, Rua Campo Alegre, 687, 4169-007 Porto - Portugal

Abstract: This review provides up-to-date information on the inhibition of ribonucleotide reductase (RNR), the enzyme that catalyses the reduction of ribonucleotides into deoxyribonucleotides. Taking in account that DNA replication and repair are essential mechanisms for cell integrity and are dependent on the availability of deoxyribonucleotides, many researchers are giving special attention to this enzyme, since it is an attractive target to treat several diseases of our time specially cancer. This investment has already given some benefits since some of these inhibitors show potent chemotherapeutic efficacy against a wide range of tumours such as non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of pancreas, bladder cancer, leukaemia and some solid tumours. In fact a few of them have already been approved for the clinical treatment of some kinds of cancer.

All aspects of RNR inhibition and corresponding inhibitors are the subjects of this review. The inhibitors are divided in three main groups: translation inhibitors, which unable the formation of the enzyme; dimerization inhibitors that prevent the complexation of the two RNR subunits (R1 and R2); and catalytic inhibitors that inactivate subunit R1 and/or subunit R2, leading to RNR inactivity. In this last group special focus will be addressed to substrate analogues.

Keywords: Ribonucleotide Reductase, Inhibitors, Translation, Dimerization, radical-scavengers, Iron Chelators, Substrate analogues, Allosteric.

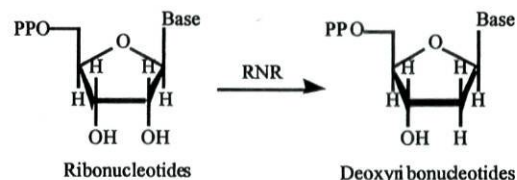
1. INTRODUCTION

DNA integrity is constantly challenged by the damaging effect of numerous chemical and physical agents. DNA damage interferes with the primary metabolic DNA processes, i.e. transcription and replication, which can lead to loss of heterozygosity, mutations, deletions, genomic rearrangements or chromosome loss. Fortunately most of these insults are inconsequential since there is a set of mechanisms that appeared early in the evolution and serve to restore damaged DNA. However, repeated insults can eventually result in altered gene expression in key genes (oncogenes and tumour-suppressor genes) and lead to tumour formation.

In normal cells, when conditions such as age or state of cell health dictate, programmed cell death (apoptosis) is triggered by the nucleus to prevent the development of abnormal cells. However, cancerous cells are unable to experience this mechanism, which promotes the proliferation of abnormal cells and the development of tumours in the neighbour tissues.

The complex mechanisms involved in these processes and the absence of an effective treatment for tumour suppression makes this a subject of common interest and all aspects of apoptosis are now under intense investigation in order to clarify and try to manipulate the specific pathways that are involved in the process. A key point in this pathway was found by Irwin Rose [1] when he first observed that deoxyribonucleotides (dNTPs) cannot be directly obtained from cell metabolism, but are synthesized from

ribonucleotides (NTPs) through catalytic reduction performed by a specific enzyme. As DNA replication and repair are dependent on the availability of deoxyribonucleotides, the inhibition of this enzyme (ribonucleotide reductase - RNR) became one of the most interesting and studied key points in order to induce cell apoptosis. In fact, this key role makes it an attractive target not only for anti-tumour therapies but also for anti-viral and anti-bacterial therapies allowing more effective combat against proliferation-based diseases, in the near future [2].



Scheme 1. Ribonucleotide reduction catalysed by RNR.

A number of RNRs of different species have been discovered since then, pointing out a common radical-based reaction mechanism [3]. Intriguingly, despite their central and common metabolic functions, these enzymes have different amino acid sequences and different metallic cofactors to accomplish the same chemistry [4,5]. Their classification in three classes was based on the cofactor required to initiate the radical-dependent nucleotide reduction process [6]. Class I RNRs have a tyrosyl radical that is stabilized by an oxo-bridged binuclear Fe(III) complex and requires oxygen for its generation, although some micro-organisms have ribonucleotide reductases that can function in anaerobic environments. Class II RNRs utilize adenosylcobalamine to generate a free radical in both anaerobic and aerobic surroundings. Class III RNRs only function in anaerobic conditions and require a glycyl radical generated by a process

*Address correspondence to this author at the REQUIMTE / Faculdade de Ciências do Porto, Rua Campo Alegre, 687, 4169-007 Porto - Portugal; Fax: 351-22-6082959; Email: mjramos@fc.up.pt

that involves an [Fe-S] cluster and S-adenosyl methionine [7].

The *E. coli* Class Ia ribonucleotide diphosphate reductase has been the most widely investigated enzyme since it serves as the prototype for the mammalian protein. The reduction mechanism has been studied extensively during the last two decades, through site-directed mutagenesis experiments [8-11], isotopic labelling and kinetics [12-15], spectroscopic measurements [16,17], small organic model approaches [18,19] and theoretical calculations [20-26].

The enzymatic activity was shown to be dependent on the formation of a complex between two different dimers named subunit R₁ and subunit R₂ [27-29]. The X-ray structures of each subunit have already been determined [30]. The larger subunit named R₁ controls the overall enzyme activity and is composed of two identical monomers (761 residues per monomer) each one lodging one active site (for reduction of purines and pyrimidines), constituted by five conserved residues, Cys439, Cys225, Cys462, Glu441 and Asn437, and three independent allosteric sites named s-site (specificity site), a-site (adenine specific site) and h-site (hexamerization site) [31,32]. The other subunit, named R₂ has 375 residues in each monomer, each one containing a stable neutral tyrosyl free radical at position 122, coupled to a binuclear iron (Fe₂O₂) cluster required for generation and stabilization of the radical [33,34]. The tyrosyl radical is deeply buried, *c.a.* 10Å from the surface of the protein [35], which assures its protection from the surrounding environment. Subsequently, and after receiving the radical from Tyr122 the catalytic cycle is initiated by Cys439, upon substrate binding. The radical is transferred from Tyr122 to Cys439 through a ~35Å long hydrogen bonds network [36-38] (Fig. 1).

RNR is also regulated by allosteric control: i) binding of ATP, dATP, dGTP, or dTTP to the s-site drives the formation of R₁₂ dimer (whose monomers are inactive) that

complexes with R₂ dimer generating an active form, R₁₂R₂ [39,40], depending on the nature of the nucleotide it will also dictate which substrate will bind into the active site [41]; ii) binding of ATP or dATP to the a-site drives the formation of a tetramer named R₁₄ [42], that isomerizes into an inactive form named R₁_{4b} [32,43]; iii) if the concentration of ATP is sufficiently high it will bind to the h-site which favours the conversion of R₁_{4b} into a R₁₆ hexamer. This hexamer will complex with an R₂₆ protein generating an R₁₆R₂₆ complex, which is believed to be the major active form of RNR in the cytosol of normal cells *in vivo* [44,45].

During the cell cycle the functionality of RNR is also controlled by transcription of the R1 and R2 genes [46,47]. The concentration of R1 is in excess and almost constant throughout the cell cycle, due to its long half-life (>24h) [48,49]; the half-life of R2 is rather short (3h), its synthesis starts in early S phase, and it slowly accumulates in the cell up to late mitosis when it is rapidly degraded [50,51].

Taking in account these regulatory processes that control RNR activity, the best targets to induce RNR inhibition should be related to the processes that can preclude the formation of an active RNR, as for example the transcription of RNR genes. Although an inhibitor capable of precluding RNR genes transcription is not known, there are several molecules capable of inhibiting or even destroying the messenger RNA (mRNA), produced during the transcription process, which prevents the formation of an active RNR. These inhibitors are called translation inhibitors and although they are not new, they only started to be developed very recently, and therefore their application is still limited.

The majority of the known and deeply studied RNR inhibitors act when the enzyme is already formed and active. These inhibitors consist on substrate analogues, radical scavengers, metal chelators and some small molecules or peptides that will directly or indirectly inhibit subunits R1

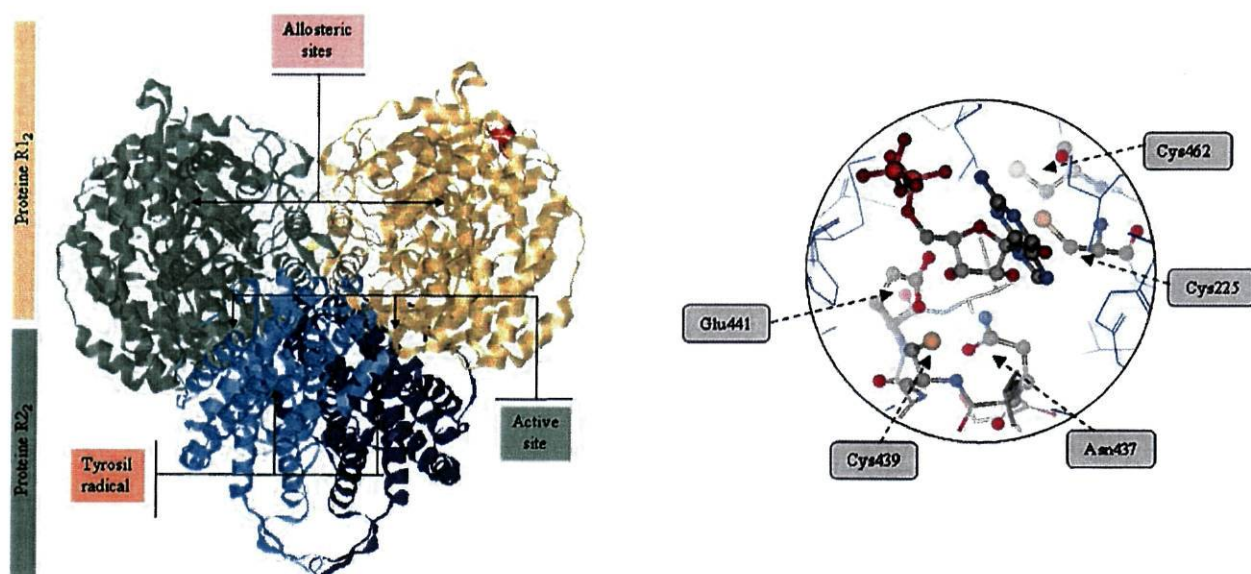


Fig. (1). Left: Schematic representation of an RNR with both subunits R1 and R2, each one composed by two equal monomers (R₁₂R₂). Right: X-ray structure of the active site located in R1 subunit of RNR with the bound substrate.

or R2, inactivating by this way the enzyme and leading to cell apoptosis. Most of these inhibitors are being tested in clinical trials and some of them have already been approved for the treatment of sickle cell anaemia and certain forms of cancer such as non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of pancreas, bladder cancer, leukaemia and solid tumours [52]. Although less studied these inhibitors can also be used in anti-viral, anti-bacterial and anti-parasite therapies, and may be applied in the near future in the treatment of diseases such as AIDS [53] and malaria [54].

2. RNR INHIBITORS

The inhibitors discussed in this review are grouped in three different categories: translation inhibitors, dimerisation inhibitors and catalytic inhibitors.

The catalytic inhibitors are further sub-divided in two sub-categories, depending on their main binding site, i.e., subunit R2 (specific R2 binding inhibitors) or subunit R1 (specific R1 binding inhibitors) (Scheme 2).

2.1. Translation Inhibitors

Translation inhibition is characterized by the binding of antisense oligonucleotides (ODNs) to the mRNA chain. These ODNs are generally complementary sequences of specific regions of a certain mRNA chain or even to the

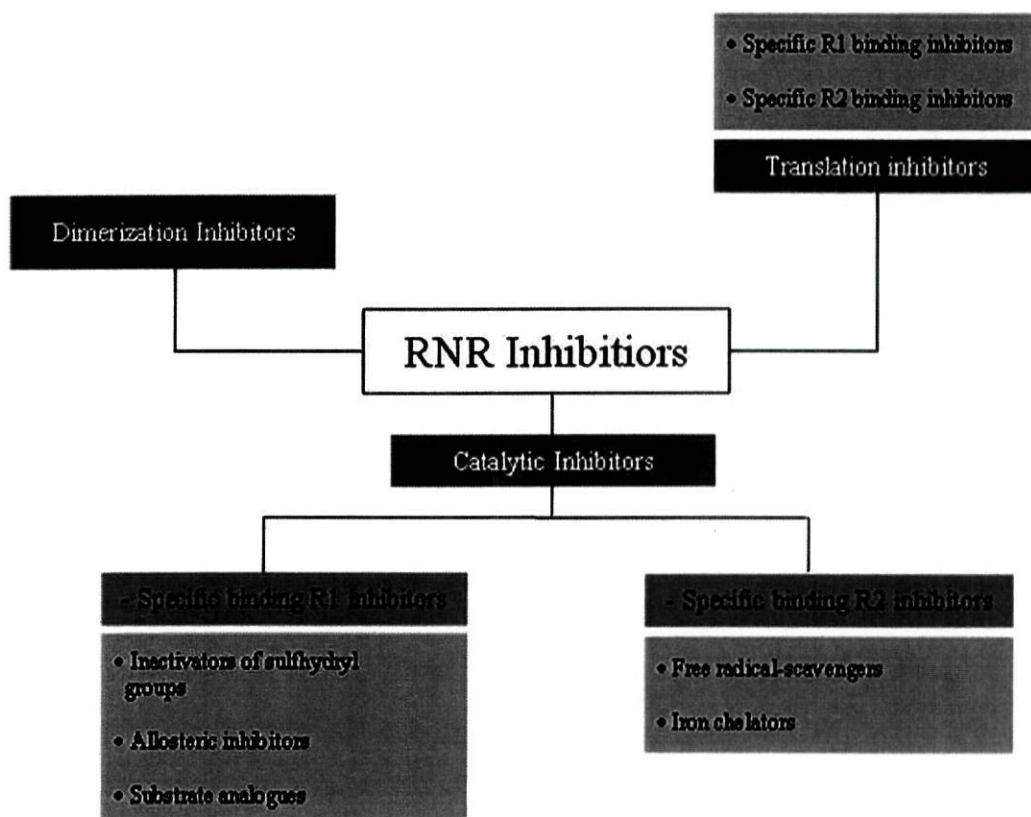
entire mRNA coding sequence. If the binding is successful, the expression of the coded protein may be inhibited or the mRNA can even be destroyed [55].

In the case of RNR, the antisense technology may be helpful to inhibit the expression of both subunits R1 and R2 [56], or related processes [57]. If successful, the formation of an active RNR is precluded, which allows, as seen before, the inhibition of DNA replication and repair [58].

One of the first studies was reported by Barker and co-workers, where the use of antisense oligonucleotides (ODNs), against different target mRNAs (including the RNR ones) of malaria parasite *Plasmodium falciparum*, was shown to inhibit the growth of the parasite in a nucleotide sequence-dependent manner [59].

With the development of the anti-sense technology, as well as with the knowledge of the genome of several organisms, this method started to become available to a wide range of organisms, which some years ago was impracticable.

In 2000, Chen *et al.* [60] reported that antisense ODNs could be successfully used to inhibit human cancer cell growth by the translation inhibition of both RNR subunits. The study involved the incubation of human oropharyngeal KB cells with human antisense ODNs of both subunits, R1 and R2, by isopropylthiogalactose. Although it was observed that the antisense of subunit R1 doesn't reveal a significant inhibition of the cell growth, the antisense of



Scheme 2. Schematic representation of the most important RNR inhibitors classes.

subunit R2 was capable of decreasing the formation of subunit R2, reducing in this way the enzyme activity and inhibiting cell growth. In the same year Aurelian *et al.* [61] reported that in the case of the herpes simplex virus, type 2, the growth and latency reactivation by cocultivation could also be inhibited by RNR inactivation with antisense oligonucleotides, but in this case complementary to subunit R1 from RNR.

Recently, Lee and collaborators [62] studied GTI-2040, a 20-mer oligonucleotide that is complementary to a coding region of mRNA of RNR subunit R2. *In vivo* studies have already shown that GTI-2040 significantly inhibits the growth of a wide range of tumours, as per example human colon, pancreatic, liver, lung, breast, kidney and ovary tumours [63]. GTI-2501 is another translation inhibitor of RNR, whose target is subunit R1 [64]. In the preclinical trials, GTI-2501 was an effective anticancer agent when tested in standard mouse models bearing a variety of different human cancer lines including tumour cells from lung, breast, colon, kidney, ovary, pancreas and skin cancers.

The latest developments of antisense technology allow to conclude that the inhibition of RNR can be performed in a pre-translation phase, which has several advantages over the other types of inhibition: i) they become very specific for the corresponding mRNA of that protein, and therefore of each organism and ii) taking this specificity in account it may decrease the toxicity or even the number of secondary effects that normally follows the other kind of inhibitors [65]. The main disadvantage of these inhibitors is related with their low rate of transport across cellular membranes and their sequestration within endocytic-like vesicles that complicates their use as therapeutic agents. Moreover the inhibition effect of these antisense inhibitors is dependent both on the initial concentration and half-life of the target enzyme and on the half life of the cell.

2.2. Dimerisation Inhibitors

Another type of inhibitors prevents the formation of an active RNR by competing with subunit R2 during

complexation with subunit R1 [66,67]. Generally these inhibitors are oligopeptides with similar sequences to the flexible C-terminus of R2, which is responsible for interaction with R1 [68 69] (see Table 1).

RNR peptide inhibition began with the discovery, by Cohen [68] and Dutia [70,71], of a nonapeptide corresponding to the nine C-terminal residues of subunit R2 of herpes simplex virus (HSV). The effective inhibition of HSV-RNR activity by oligopeptides that bind to subunit R1, attracted the attention of several investigators that started to perform detailed structure analysis [72,73] including NMR studies [74] and residues exchange [75-77]. The studies allowed to conclude that the complementarity of the peptide is not absolutely required and several group exchanges in the five C-terminal residues, along with combination of large hydrophobic groups at the N-terminus, optimise the inhibitory effect.

In vivo studies with some of the inhibitors developed by Moss *et al.* [78] were even more enthusiastic since it was observed that the inhibitors were able to effectively reduce the severity of the virus in most of the cases, without interfering with the infected host.

Although most of the studies were performed with Herpes simplex virus, some work has also been done with other organisms, such as mammalian, *E. coli*, *M. tuberculosis* and *S. Cerevisiae*. Some of these inhibitors are represented in Table 1 and are compared with the R2 C-terminus of some organisms.

The first work with mammals was reported by Yang *et al.* [79] which demonstrated that the heptapeptide, FTLDADF, identical in sequence to the last seven amino acid residues of the C-terminus of the R2 subunit of mouse ribonucleotide reductase (NSFTLDADF), and its N alpha-acetyl derivative (N-Ac-FTLDADF) were able to inhibit calf thymus RNR.

Taking in account the results obtained with herpes-simplex virus, several systematic structure-function studies [80], including residues modification and deletions [81,82] were also performed with these organisms in order to understand the inhibition mechanism and to achieve better

Table 1. Some Examples of Dimerisation Inhibitors and their Homology to the R2 C-terminus Sequence of Several Organisms

RR-Organism and Class	R2 C-terminus sequence	Inhibitor
<i>Herpes-Simplex virus</i>	YAGAVVNDL	STSYAGAVVNDL YVVNDL BILD 1357
<i>Mammalian - 1a</i>	NSFTLDADF	N-Ac-NSFTLDADF N-Ac-FTLDADF N-Ac-AGAFTFNEDF N-Ac-FTFNEDF
<i>S. cerevisiae</i>	AGAFTFNEDF	N-Ac-AGAFTFNEDF N-Ac-FTLDADF Sml1
<i>M. tuberculosis - 1b</i>	VTEDDDWDF	N-Ac-DDDWDF EDDDWDF N-Ac-VTEDDDWDF
<i>E. coli - la</i>	YLVGQIDSEVDTDDLNSFQL	LVGQIDSEVDTDDLNSFQL N-Ac-DDLSNFQL

inhibitory activity. These studies lead to the conclusion that for inhibition it is only necessary a small peptide and that the acetylation [83] of these inhibitors improves, in most of the cases, the ligand affinity and therefore the inhibition efficacy. Together with NMR trNOE techniques studies [84,85] it was also observed that there are two crucial phenylalanine residues upon which the inhibitory activity is

dependent (Phe¹ and Phe⁷). Pender *et al.* [81] showed that these Phe residues interact with two distinct positions in subunit R1 with which they have dominant interactions, the F7 subsite which is narrow and deep and very specific for Phe groups (Phe¹), and the F1 subsite, a shallow and broad subsite that can satisfy a wide range of groups and interacts strongly with Phe⁷.

Table 2. Catalytic Inhibitors of RNR that Interact with Subunit R2

Type of Inhibition	Inhibitors	
	Name	Structure
Free radical scavengers	hydroxyurea	
	acetoxyhydroxamate	
	benzohydroxamic acid derivatives	
	hydroquinone	
	hydrazine derivatives	
	hydroxylamine	NH ₂ OH
	SNAP	
Iron chelators	Triapine	
	DFO	
	PIH and derivatives	

Another kind of studies was performed by Gao [86,87] with small molecules. He found that Fmoc-tripeptides (Fmoc: α -fluorenylmethoxycarbonyl) were also capable of inhibiting the dimerisation of the mammalian RNR subunits. The inhibition was shown to occur in both subunits and with higher affinity than with the R2 C-terminus polypeptide derivatives. It was also shown that these molecules bind to another site in addition to the ones targeted by the R2 C-terminus peptide derivatives. Although its precise location is still unclear, the fact that these inhibitors strongly inhibit only the R1₂R2₂ form and not the R1₆R2₆ form, suggests that it may be located on a part of the R1 surface that becomes unavailable for binding after hexamerization [43,88].

These studies were also extended to some procaryotes (*M. tuberculosis* and *E. coli*) and fungi (*S. cerevisiae*) [80,84,89]. Although it was observed that RNR inhibition could also be accomplished by mimicking R2 C-terminal sequence, the conclusions acquired from some eukaryotes and herpes simplex virus could not be directly applied to some of these organisms. For example, although in *M. tuberculosis* and *S. cerevisiae* the acetylated R2 C-terminus heptapeptide maximizes the inhibitory efficacy, as in eukaryotes, in *E. coli* it has the opposite effect [67]. Moreover in *E. coli* the peptides must be longer since the two sites of the R2 C-terminus peptide that interact with R1 are not contiguous, contrarily to what happens with mammals [90].

The main advantage of this kind of inhibitor is that the R2 C-terminus sequences of different organisms show little homology which makes them highly specific, and allows, for instance, the specific inhibition of a parasite RNR without interfering with the host RNR. This was already demonstrated by Chabes *et al.* [91] where the Sml-1 protein was shown to be an efficient physiological inhibitor of RNR in yeast, whereas in mammals, it is poorly effective.

At the moment the main question that can be addressed to this kind of inhibitor is related with the recent knowledge that RNR can exist in the cell in two different forms, i.e., as a dimer and as a hexamer complex, and from which the inhibitory efficacy may be dependent, as it was observed with the Fmoc-tripeptide inhibitors. Since this knowledge is very recent, all the studies performed with these dimerization inhibitors must be checked in order to clarify which kind of form they interact with. This is important because, for instance, in tumour cells where the ATP concentration is very low (and where the R1₂R2₂ form is more expressed), the action of specific R1₂R2₂ inhibitors may be an advantage [92,93].

2.3. Catalytic Inhibitors

These inhibitors interact with the active form of RNR, promoting the inactivation of one or both enzyme subunits. The inhibition can occur through several ways: by the destruction of the radical that is essential for RNR activity and is located at the R2 subunit (specific R2 inhibitors), by association of small molecules that are capable of inactivating the active site or induce allosteric malfunction (specific R1 inhibitors), or by substrate analogues that, depending on their nature, can lead to the specific inhibition of subunit R1 or/and subunit R2.

In this review the inhibitors were grouped in two sub-categories, according to the subunit where they bind to, i.e., specific R2 binding inhibitors, that interact directly with and inhibit subunit R2, and specific R1 binding inhibitors that interact with subunit R1 and can inhibit one or both subunits.

2.3.1. Specific R2 Binding Inhibitors

These inhibitors interact specifically with subunit R2 destroying the radical that is settled in the tyrosine residue or preventing its generation by chelating the iron of the binuclear cluster (Table 2). As the radical is buried *c.a.* 10 Å from the surface of the protein, the radical scavengers are generally small and planar molecules in order to facilitate their approach to the free radical. As RNR is more sensitive to these inhibitors when it is catalytically active it has been proposed that these inhibitors may also react with residues that are transiently radicalised throughout the electron transfer pathway from tyrosyl residue to Cys439 of the active site [94].

Hydroxyurea (aminohydroxamate) is one of the best known inhibitors and has already been largely used in the treatment of cancer, specifically in leukaemia [95-98]. The exact mechanism is still not known but it has been shown to impair DNA synthesis by destroying irreversibly the tyrosyl free radical of RNR and thereby promoting cell apoptosis [99,100].

Similar structures to hydroxyurea [101] such as acetohydroxamate [102], substituted benzohydroxamic acids [54] or even hydroxylamine, hydroquinones and hydrazine derivatives [103] have shown similar inhibition behaviour. Although some of them are structurally dissimilar, they all readily donate electrons that facilitate the quenching of the critical tyrosyl radical. Actually it was observed that a number of these inhibitors are even more potent or have less toxicity than hydroxyurea [104,105].

Nitric oxide (NO[•]) is another radical scavenger. It is produced *in vivo* by nitric oxide synthetase enzymes that are expressed in a variety of cell types such as macrophages, or *in vitro* from thionitrites. Although it is known that NO[•] is highly reactive with thiols, leading to cysteine nitrosation, it was shown that it preferentially couples to radicals. In RNR it quenches the tyrosyl radical [106], presumably by forming nitrosotyrosine adducts. Studies *in vitro* with several thionitrites, e.g. SNAP (S-nitroso acetylpenicillamine) [107,108], have shown that these NO[•] donors can inhibit RNR, but the process is reversible which affects the inhibitor efficiency. The fact that NO[•] is produced physiologically and leads to a reversible inactivation of RNR, suggests that this interaction has an important biological role in the cell regulation. It can also be related to a first line of action of the activated macrophages to restrain the growth of proliferating tumours or infecting organisms.

Iron chelators are another kind of inhibitor that binds very tightly to metal ions and forms a chemically inert complex [109].

As the formation of the radical in RNR is dependent on the metallic cofactor, the addition of chelating reagents such as pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) or its analogues, deferoxamine (DFO), and thiosemicarbazone derivatives [110] inhibit enzymatic activity, by chelation of the cofactors

either in solution (precluding the incorporation of the cofactor in the enzyme) or directly at the enzyme-bound metallic centre. The success of these iron chelators, particularly DFO (deferrioxamine) [111], Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehydethiosemicarbazone) [112, 113] and 2-hydroxy-1-naphthylaldehydeisonicotinoyl hydrazone [114] *in vitro*, *in vivo* and in some clinical trials, concomitant with the selective anti-tumour activity shown by some of these molecules, confirm their potential as anti cancer drugs [115,116].

As subunit R2 has a short half-life, the main disadvantage of these inhibitors is that their application is limited to tumours that have an accelerated growth rate. In fact, only in these cases will the inhibitor have time enough to find its molecular target.

2.3.2. Specific R1 Binding Inhibitors

These inhibitors interact specifically with subunit R1 and, depending on their mode of inactivation, can be divided in three groups: i) inactivators of sulfhydryl groups, ii)

Table 3. Catalytic Inhibitors of RNR that Bind to Subunit R1

Type of Inhibition	Inhibitors	
	Name	Structure
Inactivators of sulfhydryl groups	(CAR)	
	cisplatin	
Allosteric inhibitors	8-azido-ATP	 $R^1=OH; R^2=H$
	claribine	 $R^1=H; R^2=H$
	fludarabine	 $R^1=H; R^2=OH$
	clofarabine	 $R^1=H; R^2=F$
Substrate analogues	Ara-C <i>Ci</i> dNDP <i>F</i> dNDP <i>N</i> ₃ dNDP <i>F</i> ₂ dNDP <i>CH</i> ₂ dNDP <i>CN</i> dNDP <i>CHF</i> dNDP <i>SH</i> dNDP	 $R^1=OH; R^2=H; R^3=OH; R^4=H$ $R^1=OH; R^2=H; R^3=H; R^4=Cl$ $R^1=OH; R^2=H; R^3=H; R^4=F$ $R^1=OH; R^2=H; R^3=H; R^4=N_3$ $R^1=OH; R^2=H; R^3=F; R^4=F$ $R^1=OH; R^2=H; R^3, R^4=CH_2$ $R^1=OH; R^2=H; R^3=CN; R^4=H$ $R^1=OH; R^2=H; R^3=H, CH_2F$ $R^1=OH; R^2=C_2H; R^3=H; R^4=OH$

allosteric inhibitors and iii) substrate analogues, as depicted in Table 3.

2.3.2. i) Inactivators of Sulfhydryl Groups

Since the groups that are directly involved in the reduction of the substrate in RNR catalysis are sulfhydryl groups of the active site cysteines, compounds that modify these groups may turn out to be potent RNR inhibitors.

These compounds are small molecules that become covalently bonded to the sulfhydryl groups of the active site. One of the most popular is caracemide (CAR or *N*-acetyl-*N*,*O*-di(methylcarbamoyl)-hydroxylamine), a small molecule that inactivates irreversibly subunit R1, probably at an activated cysteine or serine residue. Although no effect is observed in subunit R2, the complex between the two subunits is more sensitive to CAR inactivation than R1 alone [117]. CAR has already been used as an anticancer agent and with some success in Novikoff ascites tumour cells [118]. However it was observed that CAR leads to the development of serious neurological and psychiatric effects, which may be related with the toxicity of its three degradation products formed in aqueous solution [119]. Although water instability limits its utilization, an extended study of the mechanism of action of CAR may allow the development of analogous anti proliferative drugs with improved stability in body fluids and with less side effects [120].

Cisplatin or *cis* diamminedichloroplatinum (DDP) is an inorganic compound that is widely used for the treatment of a variety of tumours. Cisplatin is believed to kill cancer cells by binding to DNA and interfering with its repair mechanism, eventually leading to cell death [121]. Smith and Douglas have also shown that RNR, in the reduced form, is extremely sensitive to cisplatin (and less to the isomer transplatin). The site of inhibition was found to be the R1 subunit and the inhibition is instantaneous and irreversible [122]. The thiol groups seem to be the preferential targets, most likely the two conserved active site cysteines Cys225 and Cys462 but the mechanism is still not known.

2.3.2. ii) Allosteric Inhibitors

As RNR is under allosteric regulation by nucleoside triphosphates, with ATP the most important one, several changes were performed to this molecule in order to interfere with enzyme activity. It was shown by Harrington *et al.* [123] that RNR tolerates a wide range of modifications of the ATP molecule, including changes in the nucleobase, sugar and phosphate linkages. Some of the modified molecules could activate the enzyme as efficiently as ATP *e.g.*, 3-deazaATP or 5'-adenylymidodiphosphate, others were only partial activators, but some analogues were capable of inhibiting RNR. In this last group we can find 8-azidoATP, and several analogues of deoxyadenosine, such as 2-chloro-2'-deoxyadenosine (clarabine) [124,125], 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine (fludarabine) [126], and 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine (clofarabine) [127]. These last ones are the most promising since, as it was observed with clarabine [128], they are resistant to degradation by adenosine deaminase (an enzyme that degrades nucleotides in excess). Moreover, they are powerful inhibitors capable of inducing cell apoptosis [129],

through the inactivation of several enzymes involved in DNA replication and repair other than RNR [130], or by incorporation in DNA during S phase [131].

It was also found by Hoffer *et al.* [132] that allosteric regulation of RNR in *T. brucei* differs from the mammalian one, which gives hope for the use of allosteric inhibitors in the selective inactivation of parasite RNRs.

2.3.2. iii) Substrate Analogues

These inhibitors are normally known as suicide inhibitors because they are recognized by RNR as normal substrates and react in the active site leading to abnormal products that inactivate the enzyme. Most of these inhibitors are administrated as pro-drugs and must be activated by deoxycytidine kinase (dCK) to become a substrate analogue of RNR.

Most substrate analogues differ from the natural one in the group that is attached to carbon C-2', since this is the position that is reduced during RNR catalysis. One of the first inhibitors that showed interesting properties was ara-C (arabinosylcytosine) [133], a nucleotide analogue with an arabinose instead of a ribose (the hydroxyl group attached to carbon C-2' is on the other face of the ring). Although this inhibitor proved to be a potent drug and was used in the treatment of adult acute leukaemia, the rapid degradation by deamination and the ineffectiveness against solid tumours made it unsuitable for medical use.

Novel 2'-substituted substrate analogues started to be synthesized since then and their anti-tumour activity has been intensively investigated in the hope to find an effective inhibitor [134,135]. Some examples are 2'-chloro-2'-deoxynucleoside-5'-diphosphates (*Cl*dNDP) and 2'-azido-2'-deoxynucleoside-5'-diphosphates (*N*₃dNDP), whose activity was first studied by Thelander and Larsson in 1976 [136], and 2'-deoxy-2'-fluoro-nucleoside-5'-diphosphates (*Fd*dNDP) studied in 1980 by Stubbe and Kozarich [137,138]. These inhibitors have a similar mechanistic behaviour, and yield a common final product, a furanone [139-141] that adds covalently to subunit R1 of RNR (probably to a lysine residue) forming a chromophore with a characteristic UV absorption band at 320 nm. The furanone (scheme 3) is generated in solution through the degradation of a ketone intermediate that dissociates from the active site [138,142]. Interestingly the same ketone is also an intermediate in the reduction pathway of the natural substrate, which seems to be unable to dissociate from the active site¹. Although RNR inactivation by these three substrate analogues involves the inhibition of subunit R1 by addition of the furanone, in the case of *N*₃dNDP subunit R2 is also inactivated [143], since the radical becomes lodged at a nitrogen bonded to Cys225 of the active site, precluding tyrosyl radical regeneration [144-146]. Although these inhibitors have shown good results in *in vitro* studies, it was found that the inhibition is precluded by the presence of reductants such as thioredoxin, dithiothreitol (DDT) or glutathione that are able to intercept the furanone derivative [147,148]. The abundance of these reductive species in the cell explains their low *in vivo* efficacy, except *N*₃dNDP that is able to inhibit subunit R2.

¹ Unpublished results.

Some RNR inhibitors are also capable of inhibiting RNA synthesis and/or human DNA elongation [53]. For instance, 2'-deoxy-2',2'-difluoro-cytidine-5'-diphosphate (F_2dNDP) and 2'-deoxy-2'-methylene-nucleoside-5'-diphosphate (CH_2dNDP) inhibit RNR, but in a different phosphorylation state they can also interact with other enzymes that metabolize ribonucleotides and deoxyribonucleotides such as nucleoside and nucleotide kinases, CTP synthetase and DNA polymerases [149]. As a consequence they can also be incorporated into the DNA and inhibit DNA replication [150].

2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine (commonly named gemcitabine), the pro-drug of F_2dNDP , is a very promising anticancer agent already approved for clinical use in some therapeutic indications, such as non-small cell lung and bladder cancers and adenocarcinoma of the pancreas [151-153]. Interestingly F_2dNDP inhibition mechanism over RNR is different from the suicide inhibitors already mentioned above since the presence of reducing agents does not preclude the inhibition, which explains its effectiveness *in vivo* [154]. While the absence of reductive species leads to complete loss of the essential radical in subunit R2 and the formation of a new nucleoside-based one, in the presence of reductive agents the radical of subunit R2 is conserved but the targeted subunit becomes R1, which is inactivated probably by alkylation. However, in both cases a part of the mechanism is similar to the natural substrate catalysis, namely the formation of the radical anionic disulfide bridge [155].

CH_2dNDP shows high resistance to cytidine deaminase (enzyme that degrades nucleotides in excess), which makes it effective against human cancer xenograft models with high levels of cytidine deaminase activity [156], as already tested successfully *in vitro* and *in vivo* [157]. Experimental studies revealed that the inhibition involves the formation of a 2'-methyl furanone derivative that presumably inactivates the subunit [158], similarly to 2'-halogenated substrate analogues

Another possible RNR inhibitor is 2'-cyano-2'-deoxy-arabinosylcytosine ($CNdNDP$). The inhibition effect over RNR is still not known but it is known to delay the progress of further DNA replication similarly to what happens with gemcitabine and other deoxycytidine analogues. But, whereas in gemcitabine the incorporated analogue competes with the natural deoxycytidine 5'-triphosphate for incorporation into the replicating DNA, leading to DNA synthesis inactivation at the S phase, $CNdNDP$ also induces DNA [133] strand breaks by a β -elimination-mediated mechanism that leads to cell cycle arrest at the G2 phase [159,160]. Although it is not known if this ara-C derivative induces RNR inactivation the obtained

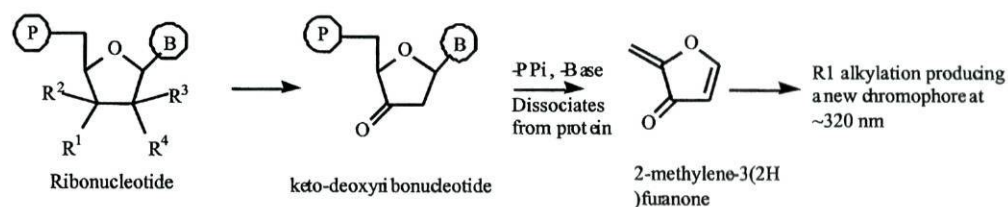
results indicated that $CNdNDP$ is a potent antineoplastic agent with a broad anti-tumour spectrum [161].

(*E*)-2'-Fluoromethylene-2'-deoxycytidine-5'-diphosphate (CHF_dNDP) is another RNR inhibitor. It possesses potent chemotherapeutic efficacy against leukaemia and solid tumours [162,163]. Due to its toxicity, it was initially thought that its triphosphate derivatives would function as DNA terminators during the DNA elongation reaction performed by DNA polymerase [164,165]. Only later it was observed that CHF_dNDP is also an RNR inhibitor that inactivates both subunits. EPR [166] and theoretical studies [167] suggested that the loss of the tyrosyl radical is accompanied by the addition of the substrate analogue to an active site residue (probably a cysteine), which leads to the formation of a chromophore with λ_{max} of 334 nm [168]. The presence of reductants, such as dithiothreitol does not protect the enzyme against inactivation by CHF_dNDP , although it does prevent chromophore formation.

As pointed out before, nitric oxide is also an inhibitor of RNR. Taking this idea into account, another class of substrate analogues that are capable of generating NO^* was developed by de Fallois *et al.* [169]. These inhibitors have S-nitroso groups attached to carbon C-2' that spontaneously decompose into nitric oxide, and are capable of inhibiting RNR in both subunits. Although the inhibition with NO is reversible, the remaining radical sulphur of the substrate can interact with the reducing cysteines of the active site and thus modify the course of the reaction, irreversibly inhibiting RNR in subunit R1.

The same group also reported the synthesis of 2'-deoxy-2'-mercaptouridine 5'-diphosphate, a substrate analogue substituted in carbon C-2' with a SH group that has been shown to be an efficient inactivator of RNR [170]. The proposed mechanism is still speculated but different from the previous inhibitors, since in the presence of oxygen there is an irreversible inactivation of protein R2 concomitant with the formation of a perthiyl radical (RSS^*), whereas in the absence of oxygen no inhibition is observed. This new radical is believed to be located in a cysteine residue of subunit R1, probably in Cys225. Interestingly the perthiyl radical, does not lead to R1 inactivation, suggesting that the presence of reductants such as thioredoxin can regenerate oxidized active site cysteines, as it happens with the natural substrate.

Another kind of inhibitors are the substrate analogues substituted at carbon C-3'. Although less popular there are several compounds of this type [171]. The main purpose in the development of these compounds was to try to trap the thiyl radical located at Cys439 that is proposed to initiate the reaction, quenching in this way the tyrosyl radical and therefore inhibiting RNR. From Matsuda *et al.* [149]



Scheme 3. Furanone formation after loss of inorganic pyrophosphate and base.

studies, it was suggested that ethynyl nucleoside analogues could act as inactivators of RNR, since they share potent anti-tumour activity, *in vitro* and *in vivo* both.

Taking this assumption in account Jung *et al.* [172] tried to model this suggestion with the reaction of 3'- β -ethynyl uridine in the presence of stannyl and thiyl radicals. They observed that the reaction yields a cyclonucleoside product with a thiovinyl adduct that could be mimicked in RNR active site and lead to its inhibition. However, more studies need to be accomplished with the enzyme *in vivo* and *in vitro*.

3. CONCLUDING REMARKS

As reviewed above, recent studies placed several RNR inhibitors at the forefront of the current biomedical research in tumour suppression.

Inhibition of the nucleotide biosynthesis in tumour cells by antimetabolites is a classic but still an important approach in cancer chemotherapy. In the last few decades 2'-deoxycytidine analogues, such as CH_2dNDP , $CldNDP$, $CHFdNDP$ and F_2dNDP have been developed as potent anti-tumour agents which can be used against a wide variety of tumours. The success of some of these inhibitors, such as F_2dNDP , in clinical trials promoted their approval by drug agencies in the treatment of certain kind of tumours, like non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the pancreas and bladder cancer.

The development of the antisense field in the last years is also an important improvement in this area. The recent proposal that the inhibition of the translation of each subunit (R2 and R1) can be obtained by a single oligonucleotide, complementary to its coding region in the mRNA, is very interesting since it allows the development of highly specific RNR inhibitors.

Although RNR inhibition investigation has been directed to tumour suppression, virology and bacteriology fields are becoming also points of interest. In these areas, advantage is taken from the differences between RNR of different species, namely the C-terminus sequence of subunit R2 that is essential for the complexation of the two subunits, and the allosteric regulation of the enzyme activity. These achievements are very important since they will allow, in a near future, the development of highly specific inhibitors that can induce, for instance, the specific inhibition of a parasite RNR without interfering with the host RNR. Besides some specific protein inhibitors (R1 or R2) these inhibitors are probably the most promising ones that may be used soon as major drugs in the treatment of several diseases such as cancer, AIDS and malaria.

Although the intense research on this enzyme gave new insights about the inducement of cell apoptosis, it is now an important challenge to use this information in order to produce more specific inhibitors, and better understand their mechanisms with the aim of promoting their specific enclosure in abnormal cells moiety without interfering with normal cells. Nevertheless, the improvements and success obtained with the inhibition of this enzyme have already given some benefits, as it is demonstrated by the recently inclusion of some inhibitors in the treatment of a wide range

of cancers. These facts promote this enzyme as one of the most interesting targets in the development of new specific drugs, and from which intense research will be pointing to in the near future.

4. ACKNOWLEDGEMENTS

Fundação para a Ciência e Tecnologia (Projecto Pocti/35736/99, Portugal), the Swedish Science Research Council (VR) and the National Foundation for Cancer Research (NFCR-U.S.A.) are gratefully acknowledged for financial support, N.M.F.S.A.C. and S. P. also thank the FCT for Ph.D. grants.

5. REFERENCES

- [1] Rose, I. A.; Schweigert, B. S. *J. Biol. Chem.* **1953**, *202*, 635-645.
- [2] Sjöberg, B. M.; Graslund, A. *Adv. Inorg. Biochem.* **1983**, *3*, 87-110.
- [3] Sjöberg, B. M. *Struct. Bond* **1997**, *88*, 139-173.
- [4] Stubbe, J.; Ge, J.; Yee, C. S. *Trends. Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 93-99.
- [5] Sjöberg, B. M. *Structure* **1994**, *2*, 793-796.
- [6] vanderDonk, W.; Licht, S.; daSalva, D.; McCarthy, J.; Robins, M. J.; Stubbe, J. *FASEB J.* **1996**, *10*, 503-503.
- [7] Fontecave, M.; Mulliez, E.; Logan, D. T. *Prog. Nucleic. Acid Res.* **2002**, *72*, 95-127.
- [8] Persson, A. L.; Eriksson, M.; Katterle, B.; Potsch, S.; Sahlin, M.; Sjöberg, B. M. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 31533-31541.
- [9] Johnston, M. I.; Mao, S. S.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J. *Biochemistry* **1989**, *28*, 1939-1939.
- [10] Kasrayan, A.; Persson, A. L.; Sahlin, M.; Sjöberg, B. M. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5749-5755.
- [11] Sjöberg, B. M.; Eklund, H.; Hahne, S.; Larsson, A.; Lundqvist, T.; Karlsson, M.; Nilsson, O.; Nordlund, P.; Uhlén, U.; Ahgren, A. *Protein Eng.* **1987**, *1*, 257-257.
- [12] Bollinger, J. M.; Krebs, C.; Vicol, A.; Chen, S. X.; Ley, B. A.; Edmondson, D. E.; Huynh, B. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1094-1095.
- [13] Stubbe, J.; Yee, C. S.; Chang, M. C. Y.; Ge, J.; Nocera, D. G. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* **2003**, *226*, U158-U158.
- [14] Mao, S. S.; Holler, T. P.; Yu, G. X.; Bollinger, J. M.; Booker, S.; Johnston, M. I.; Stubbe, J. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9733-9743.
- [15] Ator, M.; Stubbe, J.; Krenitsky, T. *Fed. Proc.* **1982**, *41*, 744-744.
- [16] Lawrence, C. C.; Bennati, M.; Obias, H. V.; Bar, G.; Griffin, R. G.; Stubbe, J. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 8979-8984.
- [17] van der Donk, W. A.; Yu, G. X.; Perez, L.; Sanchez, R. J.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J. *Biochemistry* **1998**, *37*, 6419-6426.
- [18] Mohr, M.; Zipse, H. *Chem-Eur. J.* **1999**, *5*, 3046-3054.
- [19] Lenz, R.; Giese, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2784-2794.
- [20] Siegbahn, P. E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8417-8429.
- [21] Pelmeshnikov, V.; Cho, K. B.; Siegbahn, P. E. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 311-321.
- [22] Cerqueira, N. M. F. S. A.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J.; Eriksson, L. A. *Theochem.* **2004**, *709*, 53-65.
- [23] Cerqueira, N. M. F. S. A.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J.; Eriksson, L. A. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 2031-2037.
- [24] Fernandes, P. A.; Eriksson, L. A.; Ramos, M. J. *Theor. Chem. Acc.* **2002**, *108*, 352-364.
- [25] Zipse, H. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 692-699.
- [26] Himo, F.; Siegbahn, P. E. M. *J. Phys. Chem. B.* **2000**, *104*, 7502-7509.
- [27] Ator, M.; Harris, G.; Stubbe, J. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* **1984**, *188*, 23-Biol.
- [28] Sjöberg, B. M. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* **1990**, *199*, 96-Inor.
- [29] Graslund, A.; Sahlin, M.; Sjöberg, B. M.; Petersson, L.; Ehrenberg, A. *Biophys. J.* **1988**, *53*, A69-A69.
- [30] Reichard, P. *Science* **1993**, *260*, 1773-1777.
- [31] Scott, C. P.; Kshlan, O. B.; Lear, J. D.; Cooperman, B. S. *Biochemistry* **2001**, *40*, 1651-1661.

- [32] Kashlan, O. B.; Scott, C. P.; Lear, J. D.; Cooperman, B. S. *Biochemistry* **2002**, *41*, 462-474.
- [33] Hammarsten, E.; Reichard, P.; Saluste, E. *J. Biol. Chem.* **1950**, *183*, 105-109.
- [34] Reichard, P.; Estborn, B. *J. Biol. Chem.* **1951**, *188*, 839-846.
- [35] Nordlund, P.; Sjöberg, B. M.; Eklund, H. *Nature* **1990**, *345*, 593-598.
- [36] Stubbe, J. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1990**, *63*, 349-419.
- [37] Stubbe, J. A. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 5329-5332.
- [38] Rova, U.; Adraif, A.; Potsch, S.; Graslund, A.; Thelander, L. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23746-23751.
- [39] Chang, C. H.; Cheng, Y. C. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 5081-5086.
- [40] Reichard, P.; Eliasson, R.; Ingemarson, R.; Thelander, L. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 33021-33026.
- [41] Eriksson, M.; Uhlin, U.; Ramaswamy, S.; Ekberg, M.; Regnstrom, K.; Sjöberg, B. M.; Eklund, H. *Structure* **1997**, *5*, 1077-1092.
- [42] Birgander, P. L.; Kasrayan, A.; Sjöberg, B. M. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 14496-14501.
- [43] Cooperman, B. S.; Kashlan, O. B.; Scott, C. P. *FASEB J.* **2002**, *16*, A154-A154.
- [44] Cooperman, B. S.; Kashlan, O. B. *Adv. Enzyme Regul.* **2003**, *43*, 167-182.
- [45] Kashlan, O. B.; Cooperman, B. S. *Biochemistry* **2003**, *42*, 1696-1706.
- [46] Engstrom, Y.; Eriksson, S.; Jildevik, I.; Skog, S.; Thelander, L.; Tribukait, B. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 9114-9116.
- [47] Elledge, S. J.; Zhou, Z.; Allen, J. B. *Trends. Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 119-123.
- [48] Thelander, M.; Graslund, A.; Thelander, L. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 2737-2741.
- [49] Guittet, O.; Hakansson, P.; Voevodskaya, N.; Fridt, S.; Graslund, A.; Arakawa, H.; Nakamura, Y.; Thelander, L. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 40647-40651.
- [50] Chabes, A.; Thelander, L. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17747-17753.
- [51] Kuo, M. L.; Hwang, H. S.; Sosnay, P. R.; Kunugi, K. A.; Kinsella, T. J. *Cancer J.* **2003**, *9*, 277-285.
- [52] Smith, B. D.; Karp, J. E. *Leukemia Res.* **2003**, *27*, 1075-1076.
- [53] Bianchi, V.; Borella, S.; Calderazzo, F.; Ferraro, P.; Bianchi, L. C.; Reichard, P. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 8403-8407.
- [54] Holland, K. P.; Elford, H. L.; Bracchi, V.; Annis, C. G.; Schuster, S. M.; Chakrabarti, D. *Antimicrob. Agents Chem.* **1998**, *42*, 2456-2458.
- [55] Vlasov, V. V.; Godovikov, A. A.; Zarytova, V. F.; Ivanova, E. M.; Nomokonova, N. Y. *Mol. Biol. (Mosk)* **1990**, *24*, 151-155.
- [56] Standart, N.; Hunt, T. *Enzyme* **1990**, *44*, 106-119.
- [57] Yang, D. C.; Jiang, X. P.; Elliott, R. L.; Head, J. F. *AntiCancer Res.* **2001**, *21*, 1777-1787.
- [58] Björklund, S.; Skog, S.; Tribukait, B.; Thelander, L. *Biochemistry* **1990**, *29*, 5452-5458.
- [59] Barker, R. H.; Metelev, V.; Rapaport, E.; Zamecnik, P. P. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 514-518.
- [60] Chen, S. Y.; Zhou, B. S.; He, F. Q.; Yen, Y. *Antisense Nucleic A.* **2000**, *10*, 111-116.
- [61] Aurelian, L.; Smith, C. C. *Antisense Nucleic A.* **2000**, *10*, 77-85.
- [62] Lee, Y.; Vassilakos, A.; Feng, N. P.; Lam, V.; Xie, H. S.; Wang, M.; Jin, H. N.; Xiong, K. Y.; Liu, C. Y.; Wright, J.; Young, A. P. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2802-2811.
- [63] Orr, R. M. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2001**, *2*, 1462-1466.
- [64] Tu, G. C.; Tu, X. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2001**, *2*, 1467-1470.
- [65] Davies, A. M.; Gandara, D. R.; Lara, P. N., Jr.; Mack, P. C.; Lau, D. H.; Gumerlock, P. H. *Clin. Lung Cancer* **2003**, *4* Suppl. 2, S68-73.
- [66] Climent, I.; Sjöberg, B. M.; Huang, C. Y. *Biochemistry* **1991**, *30*, 5164-5171.
- [67] Climent, I.; Sjöberg, B. M.; Huang, C. Y. *FASEB J.* **1991**, *5*, A1151-A1151.
- [68] Cohen, E. A.; Gaudreau, P.; Brazeau, P.; Langelier, Y. *Nature* **1986**, *321*, 441-443.
- [69] Lycksell, P. O.; Ingemarson, R.; Davis, R.; Graslund, A.; Thelander, L. *Biochemistry* **1994**, *33*, 2838-2842.
- [70] Dutia, B. M. *J. Gen. Virol.* **1983**, *64*, 513-521.
- [71] Dutia, B. M.; Frame, M. C.; Subaksharpe, J. H.; Clark, W. N.; Marsden, H. S. *Nature* **1986**, *321*, 439-441.
- [72] Gaudreau, P.; Michaud, J.; Cohen, E. A.; Langelier, Y.; Brazeau, P. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 12413-12416.
- [73] Gaudreau, P.; Brazeau, P.; Richer, M.; Cormier, J.; Langlois, D.; Langelier, Y. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 346-350.
- [74] Laplante, S. R.; Aubry, N.; Liuzzi, M.; Thelander, L.; Ingemarson, R.; Moss, N. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1994**, *44*, 549-555.
- [75] Chang, L. L.; Hannah, J.; Ashton, W. T.; Rasmussen, G. H.; Ikeler, T. J.; Patel, G. F.; Garsky, V.; Uncapher, C.; Yamanaka, G.; McClements, W. L.; Tolman, R. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1207-1212.
- [76] Llinas-Brunet, M.; Moss, N.; Scouten, E.; Liuzzi, M.; Deziel, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2881-2886.
- [77] Moss, N.; Deziel, R.; Adams, J.; Aubry, N.; Bailey, M.; Baillet, M.; Beaulieu, P.; Dimais, J.; Duceppe, J. S.; Ferland, J. M.; Gauthier, J.; Ghio, E.; Goulet, S.; Grenier, L.; Lavallee, P.; Lepinefrenette, C.; Plante, R.; Rakhit, S.; Soucy, F.; Wernic, D.; Guindon, Y. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3005-3009.
- [78] Moss, N.; Beaulieu, P.; Duceppe, J. S.; Ferland, J. M.; Garneau, M.; Gauthier, J.; Ghio, E.; Goulet, S.; Guse, I.; Jaramillo, J.; Llinas-Brunet, M.; Malenfant, E.; Plante, R.; Poirier, M.; Soucy, F.; Wernic, D.; Yoakim, C.; Deziel, R. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4173-4180.
- [79] Yang, F. D.; Spanevello, R. A.; Celiker, I.; Hirschmann, R.; Rubin, H.; Cooperman, B. S. *Febs Lett.* **1990**, *272*, 61-64.
- [80] Fisher, A.; Yang, F. D.; Rubin, H.; Cooperman, B. S. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3859-3862.
- [81] Pender, B. A.; Wu, X.; Axelsen, P. H.; Cooperman, B. S. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 36-46.
- [82] Liehr, S.; Barbosa, J.; Smith, A. B.; Cooperman, B. S. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1201-1204.
- [83] Cosentino, G.; Lavallee, P.; Rakhit, S.; Plante, R.; Gaudette, Y.; Lawetz, C.; Whitehead, P. W.; Duceppe, J. S.; Lepinefrenette, C.; Dansereau, N.; Guilbault, C.; Langelier, Y.; Gaudreau, P.; Thelander, L.; Guindon, Y. *Biochem. Cell Biol.* **1991**, *69*, 79-83.
- [84] Fisher, A.; Laub, P. B.; Cooperman, B. S. *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 951-955.
- [85] Pellegrini, M.; Liehr, S.; Fisher, A. L.; Laub, P. B.; Cooperman, B. S.; Mierke, D. F. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12210-12215.
- [86] Gao, Y.; Liehr, S.; Cooperman, B. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 513-515.
- [87] Gao, Y.; Tan, C. H.; Cooperman, B. S. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* **2002**, *224*, U41-U41.
- [88] Cooperman, B. S. *Biopolymers* **2003**, *71*, 117-131.
- [89] Yang, F. D.; Curran, S. C.; Li, L. S.; Avarbock, D.; Graf, J. D.; Chua, M. M.; Lui, G. Z.; Salem, J.; Rubin, H. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6408-6415.
- [90] Climent, I.; Sjöberg, B. M.; Huang, C. Y. *Biochemistry* **1992**, *31*, 4801-4807.
- [91] Chabes, A.; Domkin, V.; Thelander, L. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 36679-36683.
- [92] Martin, D. S.; Spriggs, D.; Koutcher, J. A. *Apoptosis* **2001**, *6*, 125-131.
- [93] Reddy, C. C.; Thomas, C. E.; Scholz, R. W.; Massaro, E. J. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1982**, *107*, 75-81.
- [94] Hendricks, S. P.; Mathews, C. K. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 29519-29523.
- [95] Sznol, M. *Cancer J.* **2003**, *9*, 247-250.
- [96] Moore, E. C.; Hurlbert, R. B. *Pharmacol. Therapeut* **1985**, *27*, 167-196.
- [97] Elford, H. L. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1968**, *33*, 129-135.
- [98] de Lima, P. D.; Cardoso, P. C.; Khayat, A. S.; Bahia Mde, O.; Burbano, R. R. *Genet. Mol. Res.* **2003**, *2*, 328-333.
- [99] Rosenkra, H.; Carr, H. S. *J. Bacteriol.* **1966**, *92*, 178-&.
- [100] Krakoff, I. H.; Brown, N. C.; Reichard, P. *Cancer Res.* **1968**, *28*, 1559-&.
- [101] Elford, H. P. *Am. Assoc. Canc. Res.* **1977**, *18*, 177.
- [102] Mayhew, C. N.; Mampuru, L. J.; Chendil, D.; Ahmed, M. M.; Phillips, J. D.; Greenberg, R. N.; Elford, H. L.; Gallicchio, V. S. *Antivir. Res.* **2002**, *56*, 167-181.
- [103] Han, J. Y.; Graslund, A.; Thelander, L.; Sykes, A. G. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, *2*, 287-294.
- [104] Li, Q.; Kasten-Jolly, J.; Yen, Y.; Freed, B. M. *Toxicol. Appl. Pharm.* **1998**, *150*, 154-157.
- [105] Sumpter, L. R.; Inayat, M. S.; Yost, E. E.; Duvall, W.; Hagan, E.; Mayhew, C. N.; Elford, H. L.; Gallicchio, V. S. *Antivir. Res.* **2004**, *62*, 111-120.
- [106] Lepoivre, M.; Flaman, J. M.; Bobe, P.; Lemaire, G.; Henry, Y. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 21891-21897.

- [107] Roy, B.; Lepoivre, M.; Henry, Y.; Fontecave, M. *Biochemistry* **1995**, *34*, 5411-5418.
- [108] Roy, B.; Guittet, O.; Beuneu, C.; Lemaire, G.; Lepoivre, M. *Free Radical. Bio. Med.* **2004**, *36*, 507-516.
- [109] Tam, T. F.; Leung-Toung, R.; Li, W. R.; Wang, Y. S.; Karimian, K.; Spino, M. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 983-995.
- [110] Bergeron, R. J.; Wiegand, J.; Brittenham, G. M. *Blood* **1998**, *91*, 1446-1452.
- [111] Juckett, M. B.; Shadley, J. D.; Zheng, Y. H.; Klein, J. P. *Radiat. Res.* **1998**, *149*, 330-337.
- [112] Chen, C. H.; King, I.; Belcourt, M. *Eur. J. Cancer.* **2002**, *38*, S26-S26.
- [113] Finch, R. A.; Liu, M. C.; Grill, S. P.; Rose, W. C.; Loomis, R.; Vasquez, K. M.; Cheng, Y. C.; Sartorelli, A. C. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 983-991.
- [114] van Reyk, D.; Sarel, S.; Hunt, N. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 581-587.
- [115] Richardson, D. R. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **2002**, *42*, 267-281.
- [116] Nyholm, S.; Mann, G. J.; Johansson, A. G.; Bergeron, R. J.; Graslund, A.; Thelander, L. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 26200-26205.
- [117] Larsen, I. K.; Cornett, C.; Karlsson, M.; Sahlin, M.; Sjoberg, B. M. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 12627-12631.
- [118] Moore, E. C.; Loo, T. L. *Cancer Treat. Rep.* **1984**, *68*, 1293-1294.
- [119] Newman, R. A.; Farquhar, D.; Lu, K.; Meyn, R.; Moore, E. C.; Massia, S.; Korp, J. D.; Wright, J. A.; McKinney, M. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35*, 2781-2787.
- [120] Nielsen, B. B.; Frydenvang, K.; Larsen, I. K. *Acta Crystallogr. C.* **1996**, *52*, 387-390.
- [121] Jamieson, E. R.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467-2498.
- [122] Smith, S. L.; Douglas, K. T. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1989**, *162*, 715-723.
- [123] Harrington, J. A.; Spector, T. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *42*, 759-763.
- [124] Chunduru, S. K.; Appleman, J. R.; Blakley, R. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *302*, 19-30.
- [125] Begleiter, A.; Verburg, L.; Ashique, A.; Lee, K.; Israels, L. G.; Mowat, M. R. A.; Johnston, J. B. *Leukemia* **1995**, *9*, 1875-1881.
- [126] Mansson, E.; Spasokoukotskaja, T.; Sallstrom, J.; Eriksson, S.; Albertioni, F. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 5956-5963.
- [127] Jeha, S.; Gandhi, V.; Chan, K. W.; McDonald, L.; Ramirez, I.; Madden, R.; Rytting, M.; Brandt, M.; Keating, M.; Plunkett, W.; Kantarjian, H. *Blood* **2004**, *103*, 784-789.
- [128] Mohammad, H.; Fatemeh, K.-T.; Ghavami, S. *Iranian Biomedical Journal* **2004**, *8*, 7-1.
- [129] Bontemps, F.; Delacauw, A.; Cardoen, S.; Van den Neste, E.; Van den Berghe, G. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 1237-1243.
- [130] Mansson, E.; Flordal, E.; Liljemark, J.; Spasokoukotskaja, T.; Elford, H.; Lagercrantz, S.; Eriksson, S.; Albertioni, F. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 237-247.
- [131] Iwasaki, H.; Huang, P.; Keating, M. J.; Plunkett, W. *Blood* **1997**, *90*, 270-278.
- [132] Hofer, A.; Schmidt, P. P.; Graslund, A.; Thelander, L. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 6959-6964.
- [133] Creasey, W. A.; Papac, R. J.; Markiw, M. E.; Calabres, P.; Welch, A. D. *Biochem. Pharmacol.* **1966**, *15*, 1417-1428.
- [134] Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J.; Lippert, B.; Jarvi, E.; Resvick, R. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1879-1884.
- [135] Cardoen, S.; Van Den Neste, E.; Smal, C.; Rosier, J. F.; Delacauw, A.; Ferrant, A.; Van den Berghe, G.; Bontemps, F. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 3559-3566.
- [136] Thelander, L.; Larsson, B. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 1398-1405.
- [137] Stubbe, J.; Kozarich, J. W. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 5511-5513.
- [138] Stubbe, J.; Kozarich, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2505-2507.
- [139] Ashley, G. W.; Harris, G.; Stubbe, J. *Biochemistry* **1988**, *27*, 4305-4310.
- [140] Ashley, G. M.; Stubbe, J. *Biochemistry* **1988**, *27*, 3110-3110.
- [141] Sjoberg, B. M.; Graslund, A.; Eckstein, F. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 8060-8067.
- [142] Harris, G.; Ator, M.; Stubbe, J. *Biochemistry* **1984**, *23*, 5214-5225.
- [143] Salowe, S.; Bollinger, J. M., Jr.; Ator, M.; Stubbe, J.; McCracken, J.; Peisach, J.; Samano, M. C.; Robins, M. J. *Biochemistry* **1993**, *32*, 12749-12760.
- [144] Vanderdonk, W. A.; Stubbe, J.; Gerfen, G. J.; Bellew, B. F.; Griffin, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8908-8916.
- [145] Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *Chem-Eur. J.* **2003**, *9*, 5916-5925.
- [146] Pereira, S.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 227-237.
- [147] Sjoberg, B. M.; Sahlin, M. *Method Enzymol.* **2002**, *348*, 1-21.
- [148] Ator, M. A.; Stubbe, J. *Biochemistry* **1985**, *24*, 7214-7221.
- [149] Hattori, H.; Tanaka, M.; Fukushima, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 5005-5011.
- [150] Huang, P.; Chubb, S.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Plunkett, W. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 6110-6117.
- [151] Heinemann, V.; Xu, Y. Z.; Chubb, S.; Sen, A.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Plunkett, W. *Mol. Pharmacol.* **1990**, *38*, 567-572.
- [152] Grem, J. L.; Quinn, M. G.; Keith, B.; Monahan, B. P.; Hamilton, J. M.; Xu, Y.; Harold, N.; Nguyen, D.; Takimoto, C. H.; Rowedder, A.; Pang, J.; Morrison, G.; Chen, A. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**, *52*, 487-496.
- [153] Rosell, R.; Crino, L.; Danenberg, K.; Scagliotti, G.; Bepler, G.; Taron, M.; Alberola, V.; Provencio, M.; Camps, C.; De Marinis, F.; Sanchez, J. J.; Penas, R. *Semin. Oncol.* **2003**, *30*, 19-25.
- [154] Ostruszka, L. J.; Shewach, D. S. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**, *52*, 325-332.
- [155] Pereira, S.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1286-1294.
- [156] Masuda, N.; Matsui, K.; Yamamoto, N.; Nogami, T.; Nakagawa, K.; Negoro, S.; Takeda, K.; Takifuji, N.; Yamada, M.; Kudoh, S.; Okuda, T.; Nemoto, S.; Ogawa, K.; Myobudani, H.; Nihira, S.; Fukuoka, M. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2288-2294.
- [157] Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 365-371.
- [158] Robins, M. J.; Samano, V.; Zhang, W. J.; Balzarini, J.; Declercq, E.; Borchardt, R. T.; Lee, Y.; Yuan, C. S. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2283-2293.
- [159] Asai, T.; Shuto, S.; Matsuda, A.; Kakiuchi, T.; Ohba, H.; Tsukada, H.; Oku, N. *Cancer Lett.* **2001**, *162*, 49-56.
- [160] Azuma, A.; Huang, P.; Matsuda, A.; Plunkett, W. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 725-731.
- [161] Tanaka, M.; Matsuda, A.; Terao, T.; Sasaki, T. *Cancer Lett.* **1992**, *64*, 67-74.
- [162] Kanazawa, J.; Takahashi, T.; Akinaga, S.; Tamaoki, T.; Okabe, M. *Anti-Cancer Drug* **1998**, *9*, 653-657.
- [163] Masuda, N.; Negoro, S.; Takeda, K.; Takifuji, N.; Hirashima, T.; Yana, T.; Kurata, N.; Kuwabara, T.; Kobayashi, S.; Kudoh, S.; Matsui, K.; Takada, M.; Fukuoka, M. *Invest. New Drug* **1998**, *16*, 245-254.
- [164] McCarthy, J. R.; Sunkara, P. S.; Matthews, D. P.; Bitonti, A. J.; Jarvi, E. T.; Sabol, J. S.; Resvick, R. J.; Huber, E. W.; vanderDonk, W. A.; Yu, G. X.; Stubbe, J. *Acc. Sym. Ser.* **1996**, *639*, 246-264.
- [165] Bitonti, A. J.; Bush, T. L.; Lewis, M. T.; Sunkara, P. S. *AntiCancer Res.* **1995**, *15*, 1179-1182.
- [166] vanderDonk, W. A.; Yu, G. X.; Silva, D. J.; Stubbe, J. *Biochemistry-U.S.* **1996**, *35*, 8381-8391.
- [167] Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6311-6322.
- [168] Snyder, R. D. *Oncol. Res.* **1994**, *6*, 177-182.
- [169] deFallois, L. L.; Decout, J. L.; Fontecave, M. *J. Chem. Soc. Perk. T. I.* **1997**, 2587-2595.
- [170] Coves, J.; deFallois, L. L. H.; lePape, L.; Decout, J. L.; Fontecave, M. *Biochemistry* **1996**, *35*, 8595-8602.
- [171] Auguste, S. P.; Young, D. W. *J. Chem. Soc. Perk. T. I.* **1995**, 395-404.
- [172] Jung, P. M. J.; Dauvergne, J.; Burger, A.; Biellmann, J. F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5877-5880.

1.3. Estudos Computacionais sobre a RNR

Um conhecimento detalhado de todos os processos que constituem a química complexa da RNR, e onde se incluem os mecanismos envolvidos nos vários tipos de inibição, representa um passo incontornável para o desenvolvimento racional de novos fármacos, mais potentes, mais específicos e menos tóxicos que os utilizados presentemente.

Para se conseguir esse conhecimento pormenorizado, os métodos computacionais são um complemento indispensável aos estudos experimentais de bioquímica e de biologia estrutural. Uma vantagem clara consiste no facto de poderem proporcionar informação sobre estados de transição e moléculas no próprio acto da reacção, sendo que a detecção directa destes acontecimentos transitórios não é possível com métodos físicos normais; para além disso, os estudos computacionais permitem a identificação de intermediários instáveis, o que facilita a elucidação detalhada dos mecanismos químicos estudados. Estas vantagens são particularmente relevantes no caso da RNR, onde há espécies radicalares envolvidas.

O artigo apresentado de seguida consiste numa revisão dos trabalhos devotados ao estudo da RNR, em que se utilizaram métodos de química computacional baseados em mecânica quântica. O artigo está organizado em quatro secções correspondentes aos seguintes processos químicos: (1) oxidação do centro metálico e formação do radical tirosilo; (2) transferência do carácter radicalar para o centro activo; (3) mecanismo catalítico de redução dos ribonucleótidos e (4) mecanismos de inibição por vários inibidores suicidas.

REVIEW

Susana Pereira · Nuno M.F.S.A. Cerqueira
Pedro Alexandrino Fernandes · Maria João Ramos**Computational studies on class I ribonucleotide reductase: understanding the mechanisms of action and inhibition of a cornerstone enzyme for the treatment of cancer**Received: 21 May 2005 / Revised: 21 September 2005 / Accepted: 28 September 2005 / Published online: 29 October 2005
© EBSA 2005

Abstract This review provides a synthesis of recent work, using computational methods, on the action and inhibition mechanisms of class I ribonucleotide reductase (RNR). This enzyme catalyzes the rate-limiting step of the pathway for the synthesis of DNA monomers and, therefore, has long been regarded as an important target for therapies aiming to control pathologies that depend strongly on DNA replication. In fact, over the last years, several molecules, which are able to impair RNR activity by different mechanisms, have been applied effectively in anti-cancer, anti-viral and anti-parasite therapies. A better understanding of the chemical mechanisms involved in normal catalysis and in inhibition of the enzyme is important for the rational design of more specific and effective inhibitor compounds. To achieve this goal, computational methods, particularly quantum chemical calculations, have been used more and more frequently. The ever-growing capabilities of these methods together with undeniable advantages make it a stimulating area for research purposes.

Introduction

Ribonucleotide reductase (RNR) catalyzes the conversion of ribonucleotides into the correspondent 2'-deoxyribonucleotides, in the rate limiting step for the biosynthesis of DNA (Reichard 1993; Stubbe and van der Donk 1998).

Ribonucleotide reductase is a ubiquitous radical-containing enzyme, which is usually classified into three different types, according to the cofactor needed to

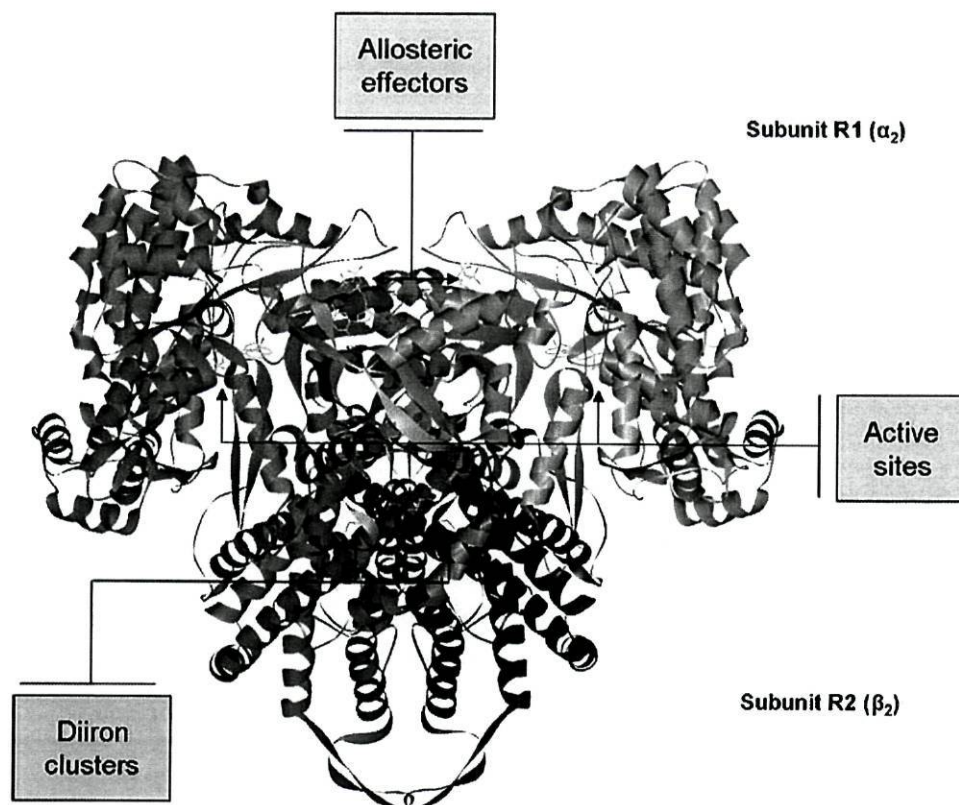
produce the essential organic radical, the active site residues that perform catalysis, and the phosphorylation state of the substrates. The *Escherichia coli* RNR is similar to the mammalian one (class I) and has served as its prototype in experimental and computational studies; these were much facilitated by the determination of the R1 and R2 subunits' X-ray crystallographic structure (Eriksson et al. 1997; Nordlund et al. 1990; Uhlin and Eklund 1994).

Escherichia coli RNR is an $\alpha_2\beta_2$ tetramer that results from the association of two catalytically inactive homodimers, R1 (α_2) and R2 (β_2) (see Fig. 1). Subunit R2 is the smaller of the two, with a molecular weight of 87 kDa, and contains a non-heme di-iron cluster, which is involved in generating and stabilizing the radical essential for catalysis. This radical is located in a tyrosine residue (Tyr₁₂₂), it is formed upon dissociation of a molecule of O₂ by the binuclear ferrous [Fe(II)] complex, and is stabilized by the resulting oxo-bridged ferric [Fe(III)] dimer (see Fig. 2). The active site of the enzyme and the allosteric sites that regulate its specificity and activity are all located in the bigger R1 subunit, which has a molecular weight of 171 kDa. When the substrate (a ribonucleoside-5'-diphosphate) binds to the active site, in R1, the radical character has to be transferred from the Tyr₁₂₂ in R2 to a cysteine residue (Cys₄₃₉) of the active site, which will in turn initiate the catalytic reaction. These two amino acid residues are ca. 35 Å apart and the radical character relocation is believed to occur via hydrogen atom transfers along a pathway of conserved hydrogen-bonded residues. As for the catalysis itself, the active site residues directly involved in the set of reactions are three cysteines (Cys₄₃₉, Cys₂₂₅ and Cys₄₆₂), one glutamate (Glu₄₄₁) (Persson et al. 1997) and one asparagine (Asn₄₃₇) (Kasrayan et al. 2002) (see Fig. 3). The reduction of the substrate leads to elimination of a water molecule and oxidation of Cys₂₂₅ and Cys₄₆₂ to a disulfide bridge (Stubbe and van der Donk 1998).

The same enzyme is responsible for the reduction of all four ribonucleotides. Its specificity towards each

S. Pereira · N.M.F.S.A. Cerqueira · P. A. Fernandes
M. J. Ramos (✉)
REQUIMTE/Departamento de Química,
Faculdade de Ciências do Porto, Rua do Campo Alegre, 687,
4169-007 Porto, Portugal
E-mail: pafernand@fc.up.pt

Fig. 1 X-ray crystallographic structure of *E. coli* RNR in ribbon representation



substrate depends on the actual needs of the cell and is controlled by the interaction of the right nucleotide effector with an allosteric site of RNR. Its general activity is also regulated allosterically and is cell cycle-dependent. These regulation mechanisms ensure the permanent maintenance of a low cellular pool of deoxyribonucleotides, and make DNA replication and repair greatly dependent on the performance of RNR. Naturally, these features have long made RNR a key target for therapies aiming to attack or control proliferation-based diseases.

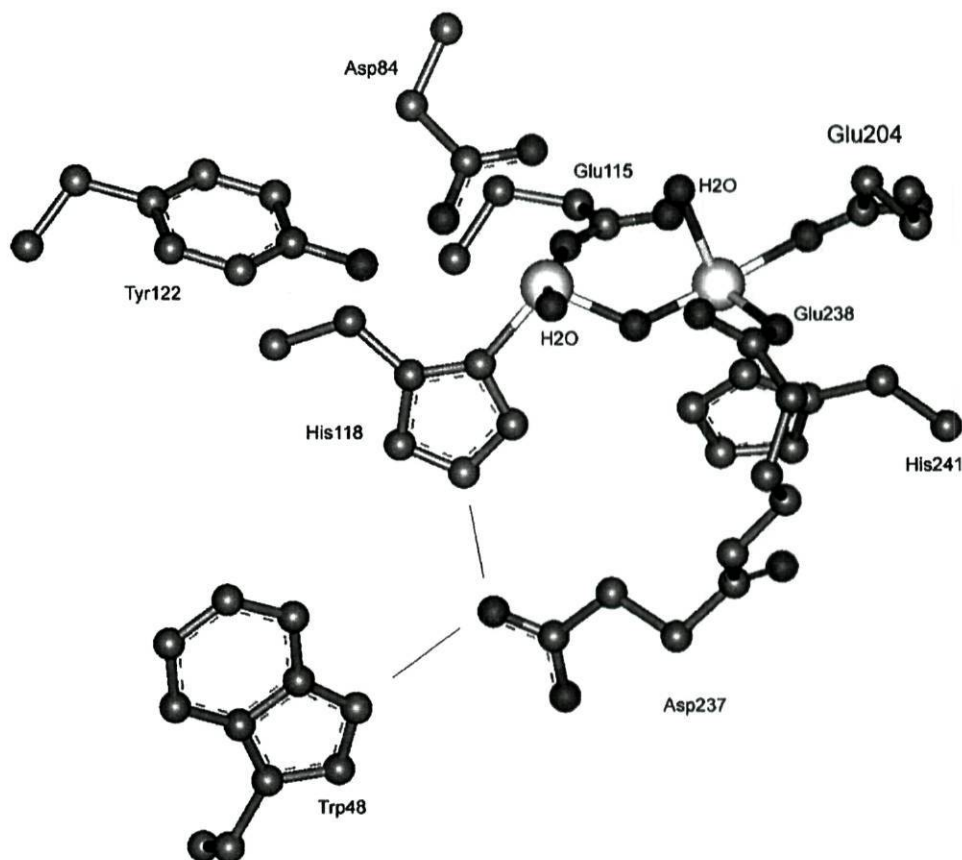
The RNR inhibitors hydroxyurea and gemcitabine are presently being used in the clinical treatment of melanoma, resistant chronic myelocytic leukaemia, carcinoma of the ovary, non-small cell lung cancer, pancreatic cancer, breast cancer and bladder cancer (<http://www.fda.gov>). Moreover, a growing number of clinical trials are being carried with these and other RNR inhibitors assessing their efficacy in different therapies, including anti-cancer, anti-viral and anti-parasite (Balzarini 2000; Ingram and Kinnaird 1999; Johns and Gao 1998; Manegold 2004; Romanelli et al. 1999; Tripathy 2002; Tsimberidou et al. 2002).

Ribonucleotide reductase inactivation may be achieved in numerous ways (Cerqueira et al. 2005). It can be induced, for instance, in an earlier phase, by interfering with the synthesis of the enzyme subunits or by preventing their interaction—using mRNA complementary nucleotide sequences, or small peptides that mimic the sequence responsible for the subunits' inter-

action. When the enzyme is in its active form, inhibition can be brought about with radical scavengers that interact with subunit R2 and destroy the essential tyrosyl radical—this is the inhibition mechanism of hydroxyurea. Another group of inhibitors that interact with the enzyme in its functional state consists of nucleoside-triphosphate and nucleoside-diphosphate analogs. The former interacts with the binding sites for the allosteric effectors (Harrington and Spector 1991); the latter, known as suicide inhibitors, are recognized by RNR as normal substrates and react with the active site leading to abnormal products that alkylate the protein and turn it enzymatically inactive—gemcitabine is an example of this latter group of molecules (see Fig. 4).

A comprehensive knowledge and thorough understanding of every process involved in the normal RNR functioning and in its inhibition mechanisms is very important to design new compounds, sought to inhibit the enzyme in a more specific and effective manner. To this end, computational methods, and particularly quantum chemical calculations, are an indispensable complement to structural biology studies and biochemical experiments. One advantage is that they can provide structural information on transition states and snapshots of molecules in the act of reaction; direct detection of such transient events is not possible by normal physical methods. This is particularly important in the case of RNR, where radical species are involved. Moreover, computational studies enable the identification of unstable intermediates, and thus the elucidation

Fig. 2 *E. coli* RNR di-iron cluster X-ray crystallographic structure in its oxidized form (Nordlund and Eklund 1993). The residues co-ordinating the iron atoms are shown, as well as the tyrosine residue where the organic radical is first generated (Tyr₁₂₂), and also the first elements of the hydrogen-bonded chain that carry the radical character between Tyr₁₂₂ and Cys₄₃₉ in the active site, that is, Hys₁₁₈, Asp₂₃₇ and Trp₄₈



of the chemical mechanisms involved in these processes, with atomic detail.

In the following four sections, we will review recent mechanistic studies that were performed with quantum chemical calculations, focusing specifically on the following aspects of RNR chemistry: di-iron cluster and tyrosyl radical formation; radical character transfer to the active site; catalytic mechanism; and inhibition mechanism by substrate analogs. The aim of these studies is to support the large efforts that are being made by the scientific and pharmaceutical communities in terms of the rational drug design for anti-cancer therapy. As the most promising inhibitors for clinical use are mechanism-based ones, a deep knowledge about the involved mechanisms is urgently needed if one wants to proceed rationally towards new drugs that are more potent, more specific and less toxic than the ones currently in use.

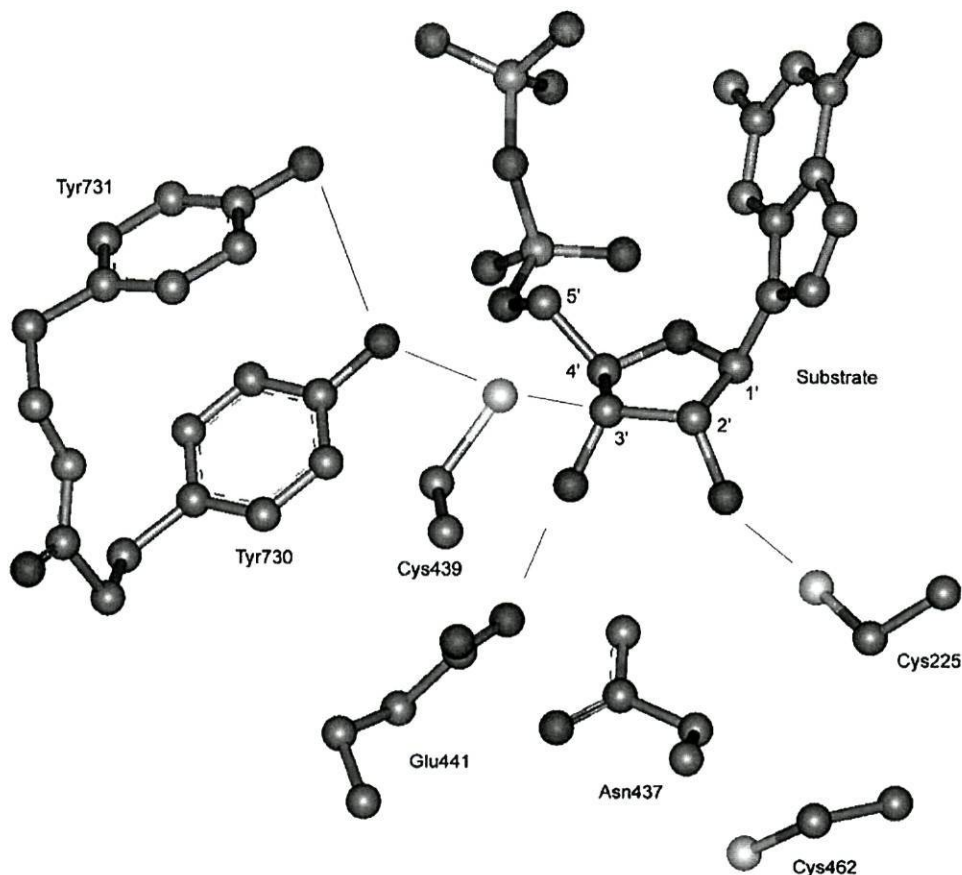
Di-iron cluster and tyrosyl radical generation

The di-iron cluster of RNR, in its reduced form, is composed of two ferrous iron atoms co-ordinated to two histidine residues and four carboxylate groups (three glutamate and one aspartate side chains). The iron dimer is oxidized by a direct reaction with an oxygen molecule: one oxygen atom is reduced to H₂O, and the other is

incorporated as a bridging oxo in the diferric complex (see Fig. 2); the reaction also results in a radical tyrosine residue (Tyr₁₂₂). Several intermediates of this process have been observed, namely by Mössbauer and resonance Raman spectroscopies—the iron spins of these complexes are usually anti-ferromagnetically coupled, which means that the ones with an even number of electrons are invisible by EPR. One of these intermediates is a compound termed **P**, which has been suggested to be an [Fe(III)]₂ peroxo complex, although so far it has only been detected in R2 variants (e.g., R2-D84E). Another compound, termed **X**, is the intermediate with the highest oxidation state observed, and has been spectroscopically characterized as an Fe(IV)Fe(III) dimer (Sturgeon et al. 1996). After **X** is formed, the next step is the abstraction of a proton and an electron from Tyr₁₂₂, thus forming the catalytic essential tyrosyl radical (Bollinger et al. 1994). As this radical is formed, the iron dimer is reduced to the resting oxo-bridged diferric state. To gain insight into the details of these complex processes quantum-chemical calculations have been widely used (Torrent et al. 2002; Noodleman et al. 2004; Himo and Siegbahn 2003); they will be now briefly discussed.

To assign possible structures for the observed intermediates, Siegbahn carried a theoretical study with a model of the iron dimer complex, which included the first ligand sphere represented by four carboxylates and two imidazoles (Siegbahn 1999). The experimental X-ray

Fig. 3 Active-site X-ray crystallographic structure of *E. coli* RNR with bound substrate (Eriksson et al. 1997). For simplicity, only the side chains of the residues are showed; the main hydrogen bonds are indicated by lines; Tyr₇₃₀ and Tyr₇₃₁ are believed to be the two final amino acid residues of the hydrogen-bonded chain that transports the radical character to Cys₄₃₉



structure (Nordlund et al. 1990) was used as a starting point for the optimization of the resting diferric state; it was observed that its main features, concerning bond directions and rough bond distances, were well reproduced by the calculations. Possible structures for compounds **P** and **X** were searched, always taking into account the data obtained from experimental studies, and assuming that the complexes should be maintained

neutral (because the iron cluster is buried in the low dielectric medium of the protein, where charge build-up will not easily occur). For intermediate **P**, two possible structures were optimized, which differed mainly in the position of the oxygen molecule relative to the iron atoms; based on experimental information, the one with the peroxo group symmetrically placed between them was chosen as the best candidate for the compound. A structure for intermediate **X** was also suggested, which is consistent with bond distance information obtained from experimental studies, but is quite different from the experimentally deduced proposal; the main difference is the existence of a hydroxyl group bridging the iron atoms in addition to the oxo-bridge that was proposed to be the only one by experimentalists.

The structure of compound **X**, and particularly whether or not the iron atoms have two oxo-bridges derived from the oxygen molecule, was also investigated theoretically by Han et al. (2003). The initial calculations were performed on a small model cluster that included first-shell ligands derived from the amino acid side chains. These first calculations showed that the introduction of the second oxygen species is most energetically favored as a bridging hydroxide. To incorporate second-shell hydrogen bonding as well as possible charge-transfer effects to the cluster, the most favored small model, which contained the oxo- and the

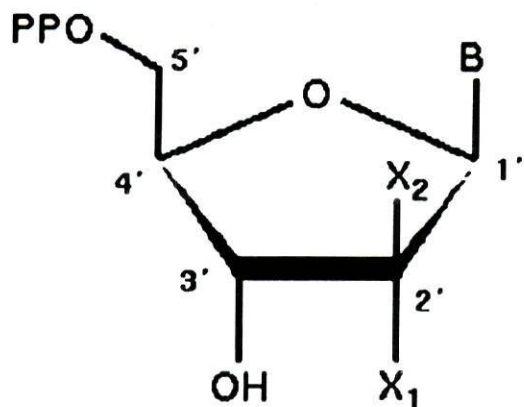


Fig. 4 Structure of the RNR substrate, product and some suicide inhibitors: $X_1 = \text{OH}$; $X_2 = \text{H}$: RNR substrate; $X_1 = X_2 = \text{H}$: product of RNR catalysis; $X_1 = X_2 = \text{F}$: Gemcitabine; $X_1 = \text{Cl, F, N}_3$; $X_2 = \text{H}$: other examples of suicide inhibitors

hydroxide bridges, was surrounded by second- and third-shell H-bonding partners similar to those found in the RNR protein environment for the resting and reduced oxidation states. The analysis of the model's calculated properties, however, revealed inconsistencies with known experimental ones, particularly with the Mössbauer data, which implied that the structure under consideration was not likely to be the mysterious compound X.

The same group undertook similar procedures to investigate the plausibility of another proposal for compound X (Han et al. 2004). This hypothesis had been suggested by Burdi et al. (1998) based on new experimental results; the proposed structure contained the two oxygen atoms initially derived from oxygen—one involved in the oxo bridge, and the other as a terminal aqua ligand bound to the Fe(III) of the Fe(III)Fe(IV) dimer—and one or two additional mono-oxygen bridges provided by carboxylates. Again, the comparison of the calculated properties with the experimental data indicates that the studied models are unlikely to be representative of the core structure of RNR intermediate X.

Yang et al. (2000) investigated the geometric and electronic structures of the reduced di-iron cluster both of RNR and of stearyl acyl carrier protein Δ^9 desaturase and explored the electronic contributions to their different oxygen reactivity. Theoretical calculations were used to describe the electronic structure of the reduced di-iron cluster and to explore its reactivity towards oxygen. The system that was used to represent the RNR di-iron complex was derived from the R2 subunit X-ray crystallographic coordinates (Logan et al. 1996), after adjusting the bond lengths to be within the range found for binuclear ferrous model complexes, and also to agree with complementary spectroscopic studies. After optimization of the geometry, the electronic structure of the complex was characterized and possible ways of oxygen binding were explored. Binding of oxygen to the iron atoms in a bridged mode, with two-electron transfer from the metals to the oxygens, was found to be the more energetically favored mechanism; it involves the rearrangement of the carboxylate ligands and results in direct formation of the $[\text{Fe(III)}]_2$ peroxo-bound species (intermediate P) (see Fig. 5).

The same type of study was performed by Wei et al. (2004), but in this case, the aim of the spectroscopic/

DFT studies was to provide insight into the geometric and electronic differences between the reduced binuclear iron complexes of two R2 variants (R2-D84E and R2-W48F/D84E), the R2-wt and methane mono-oxygenase (MMOH), which is another di-iron cluster-containing enzyme. This knowledge should improve the understanding of their structural differences and help in their correlation to a diverse O_2 reactivity. The di-iron cluster of MMOH is characterized by having two histidine and four glutamate residues coordinating the iron atoms, which means that it differs from the R2 complex only in one residue; in the R2-D84E variant this difference is gone. Nevertheless, the study showed that, although the central ligand set is the same in MMOH and R2-D84E, the protein environment must play a major role in structuring the di-iron complex. In fact, the geometric and electronic structures of the single and double R2-variants were found to be unlike MMOH in co-ordination, geometry and mode of bridging; the closer similarity to wt-R2 could thus be due to the influence of second sphere residues.

It is believed that the carboxylate ligands play a special role in the proper functioning of the metal complex. In fact, the flexibility of these ligands allows them to co-ordinate the iron centers as a function of the enzymatic needs: as bidentate ligands when saturation of the first sphere is required, and as monodentate when one or more vacant co-ordination sites are needed. The issue of the carboxylate ligands flexibility was addressed in a theoretical study by Torrent et al. (2001). In this study, quantum chemical methods were used to investigate two processes: the carboxylate shift that involves the two iron atoms (1,2-carboxylate shift), and the bidentate-monodentate carboxylate rearrangement within the same iron center (see Fig. 6). The different structures were found to be energetically very close and separated by small energetic barriers, which means that both rearrangement processes take place very easily. The calculations are consistent with the available experimental data that showed high flexibility of the carboxylate ligands and a non-rigid core structure.

In summary, although great effort is being made toward the understanding of the di-iron cluster reactivity and the generation of the tyrosyl radical, the overall process still remains elusive, and further studies are needed if one wants to rationally design a new

Fig. 5 Energy-minimized structures of the RNR di-iron cluster, with the oxygen molecule bound in a bridged mode, before and after the carboxylate rearrangement (Yang et al. 2000)

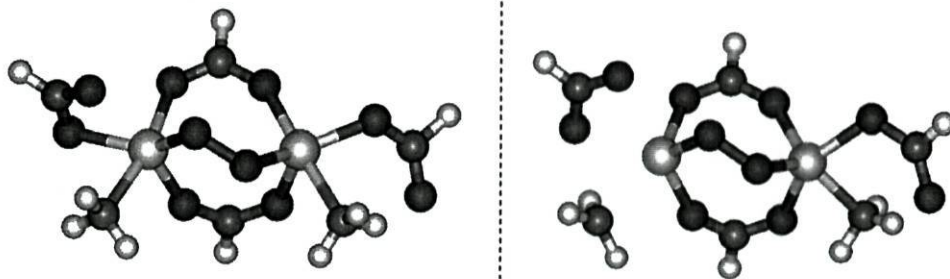
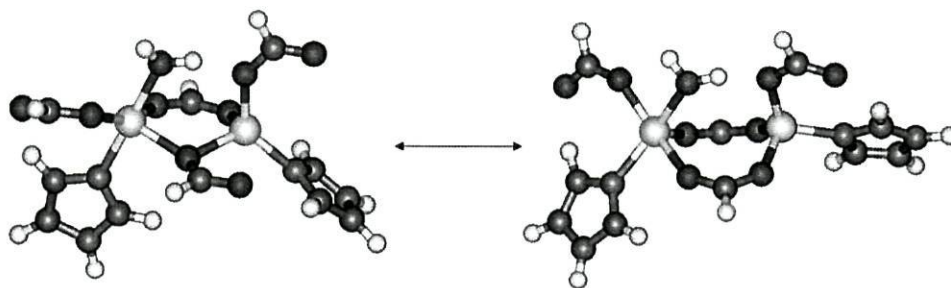


Fig. 6 An illustration of carboxylate flexibility in the first co-ordination sphere of the di-iron cluster (Torrent et al. 2001)



generation of potent, specific R2 radical scavengers to be used in the context of RNR inhibition.

Radical transfer to the active site

The organic free radical essential for RNR catalysis is generated at the amino acid residue Tyr₁₂₂, which is deeply buried in subunit R2, close to the di-iron cluster. Upon hydrogen bonding of the substrate to the active site, the radical has to be relocated to Cys₄₃₉, which will effectively start the catalytic reaction, by abstracting an H-atom from the sugar moiety of the ribonucleotide. When catalysis is over, the radical is transferred back to its resting position at Tyr₁₂₂; one tyrosyl radical can be active in a few hundred cycles. Although the two amino acid residues are more than 30 Å apart, they are connected by a single hydrogen-bonded chain, which is responsible for the conduction of the radical character. This hydrogen-bonded chain can be seen as composed of two different parts. One of them involves the metal centre in R2 and is formed by the Tyr₁₂₂, His₁₁₈, Asp₂₃₇ and Trp₄₈ residues (see Fig. 2). The other one consists of the path from Trp₄₈, which is still located in the vicinity of the iron dimer in R2, to Cys₄₃₉, at the active site in R1. The two amino acid residues immediately before Cys₄₃₉ in the hydrogen-bonded chain are Tyr₇₃₀ and Tyr₇₃₁ (see Fig. 3); the other residues have not yet been identified because the structure of the protein in this region is not very clear, but apparently they include one more tyrosine residue, Tyr₃₅₆, which may be the one receiving the radical character from Trp₄₈.

Initially, the mechanism for the radical character relocation was suggested to consist of an electron transfer followed by local proton transfers to create neutral radicals. A theoretical study, carried on simple amino acid models (with vinyl alcohols as models for tyrosine residues), offered an alternative possibility, in which entire hydrogen atoms, protons and electrons, would be transferred in each step (Siegbahn et al. 1997). The hypothesis is termed hydrogen atom transfer (HAT), and although three different chemical mechanisms for this transfer were actually found in the study, all of them presented very small charge separation, which means that a hydrogen atom is indeed the entity being transferred.

A second theoretical study showed that the chemical environment around Tyr₁₂₂ and Cys₄₃₉, does not favor a pure electron transfer mechanism between the two amino acid residues (Siegbahn et al. 1998a). In fact, the transfer was found to be endothermic by more than 40 kcal/mol, which makes it energetically unfeasible.

To gain insight into the details of the HAT mechanism for the radical transfer in RNR, Siegbahn et al. (1998b) undertook another theoretical study, in which the system was divided into two main subsets, according to the part of the hydrogen-bonded chain considered.

For the part of the chain closer to Cys₄₃₉, the radical transfer was suggested to occur in a sequence of individual steps of HAT between amino acid residues. Therefore, the study consisted of the evaluation of a HAT between the hydroxyl groups of two model tyrosines—both free and backbone linked—and between a tyrosine hydroxyl group and a thiol one. All these reactions were found to be energetically feasible, and presented predicted rates much faster than the overall turnover rate for RNR. Moreover, the charge separation was found to be very small, indicating a true HAT.

The radical transfer between Tyr₁₂₂ and Trp₄₈ over the iron dimer is considerably more complicated. It seems to involve a HAT as described previously—specifically from a water molecule, co-ordinated to one of the iron atoms, to the radical oxygen of Tyr₁₂₂—followed by a transfer of radical character through the His₁₁₈–Asp₂₃₇–Trp₄₈ residue chain. Thus, the mechanism tested in the theoretical study corresponded essentially to a single step for the entire distance, the reactants being the resting state with a radical Tyr₁₂₂ and a water molecule co-ordinated to the iron, and the products having the radical already placed in Trp₄₈ and a normal hydroxyl group in Tyr₁₂₂. Since the step involves a large number of amino acid residues and the iron complex, a very approximate model was required. It consisted of one iron atom with its direct ligands—including the water molecule and a hydroxyl group modeling the oxo-bridge—and part of the side-chains of the hydrogen-bonded residues His₁₁₈, Asp₂₃₇, and Trp₄₈; Tyr₁₂₂ was not included. After optimization of the reactants' and of the products' geometries, it was observed that the iron co-ordination and its spin were similar in both structures. In the products and as expected the spin population was mainly located at Trp₄₈.

Catalytic mechanism

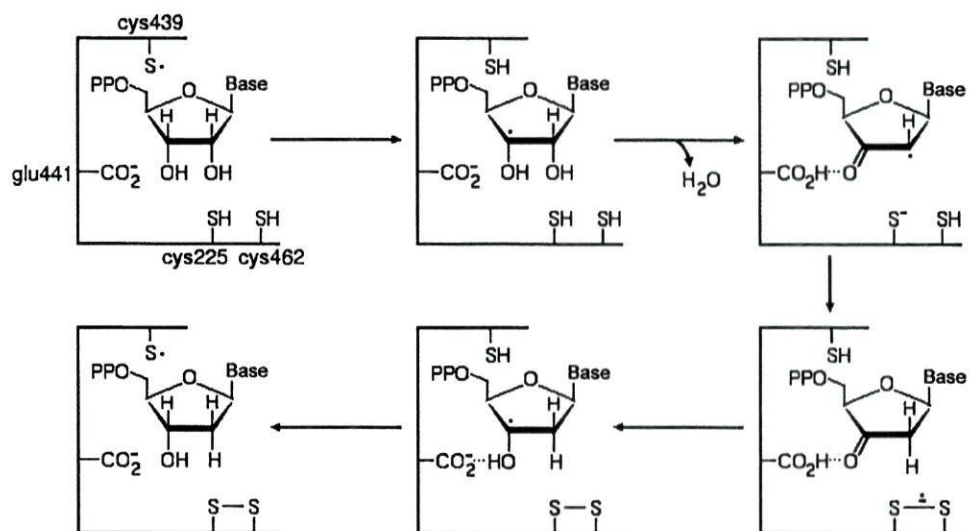
Ribonucleotide reductase catalyzes the reduction of ribonucleotides to their corresponding deoxyribonucleotides. Although apparently simple, this reaction has been shown to occur in a surprisingly complicated sequence of steps. A set of kinetic, spectroscopic, X-ray crystallographic, isotopic labeling and site-directed mutagenesis experiments has shed some light on the chemical events of the catalysis; the key amino acid residues involved were identified and a five-step hypothesis for the reaction mechanism was proposed. In the first step, the 3'-H atom is abstracted by the radical sulfur of Cys₄₃₉; this is followed by the transfer of a proton from the 3'-OH group to Glu₄₄₁, with concomitant protonation of the 2'-OH group by Cys₂₂₅ and elimination of a water molecule; the third step corresponds to the abstraction of an H atom from the thiol group of Cys₄₆₂ by the carbon C2'—directly or with mediation of the closer Cys₂₂₅; the resulting disulfide radical anion is subsequently reduced to a standard disulfide bond and a proton is transferred from Glu₄₄₁ to the 3'-O atom, which replaces the charge in the glutamate residue and the spin density in the C3' carbon; the final step consists of the donation of the H-atom by Cys₄₃₉ back to that carbon; thus, the 2'-deoxyribonucleotide is formed and the essential tyrosyl radical is regenerated. Figure 7 illustrates the proposed mechanism.

In an effort to clarify the details of the mechanism by which class I RNRs dehydrate ribonucleotides, Siegbahn (1998) undertook a thorough theoretical study with small models of the substrate and of the main active site residues. The substrate was modeled with the sugar ring, the cysteines with methylthiol molecules, the glutamate with a formic acid, and the asparagine with formamide; neutral models were assumed to mimic the active site environment best. Computed activation energetics and geometries were compared in the same step for different

residue permutations, and structures optimized in gas phase and in a continuum with a uniform dielectric constant of four. Consideration of multiple scenarios for each fundamental reaction step allowed for direct comparison of the plausibility of several mechanistic pathways. Overall, a six-step mechanism was proposed. The main differences between this proposal and the experimental one derive from the use of neutral models. Thus, in the second step, the protonation of the leaving hydroxyl group is not performed by the Cys₂₂₅, but by Glu₄₄₁, which is proposed to act as an acid-base catalyst, simultaneously abstracting the proton from the 3'-OH group and protonating the 2'-OH one. Moreover, the formation of the disulfide radical anion does not occur in the theoretical mechanism; instead, the oxidation of the two cysteines to a disulfide bond and the relocation of the spin in C3' are proposed to take place through the intermediate formation of a C3'-S-Cys₂₂₅ bond.

Theoretical calculations were again used (Himo and Siegbahn 2000) to identify the structure of a radical that had been detected in experimental studies with a mutant RNR (Persson et al. 1997). In the mutation experiments, the active site residue Glu₄₄₁ was replaced by a glutamine residue; this resulted in the interruption of the substrate reaction at some stage and in the detection of two new transient, kinetically coupled radicals. The first radical was proposed later to be a disulfide radical anion (Lawrence et al. 1999); the second was demonstrated to be substrate-derived but its position in the ribose ring remained elusive, the only really doubtful position being the C3' carbon. Himo and Siegbahn (2000) compared the stability of three different ribose-derived radicals (namely the C1', C2' and C4' radicals), and found the most stable to be the C4' radical. Their calculations also led to some changes in the theoretically derived catalytic mechanism previously proposed by Siegbahn. In the new mechanism, the Cys₂₂₅ sulfur does not add to the C3' carbon of the ribose ring, but forms

Fig. 7 The proposed catalytic mechanism of *E. coli* RNR



instead an earlier disulfide bond with the neighbor Cys₄₆₂.

The different proposals for the mechanism involved in the second step of RNR catalysis, that is, the elimination of the 2'-OH group from the ribose, were explored in another theoretical study (Fernandes et al. 2002). The models used were similar in size to Siegbahn's, but they were considered both in neutral and charged conditions. It was concluded that dehydration of the ribose may occur via two different acid or base catalyzed mechanisms. The first uses a protonated glutamate residue as a bifunctional catalyst, as proposed by Siegbahn; the second assumes that an unprotonated glutamate acts as a base, with a cysteine thiol group acting as an acidic catalyst. The latter should be the major pathway, given that at physiological pH only 0.2% of the glutamate residues will be protonated.

Pelmenschikov et al. (2004) reinvestigated the entire catalytic reaction pathway, with theoretical calculations. The active site residues were modeled by the same small molecules aforementioned, but with Glu₄₄₁ being considered this time as anionic in the beginning of catalysis. As for the substrate, two alternative modeling schemes were applied, the smaller one consisting of the sugar ring with H-atoms replacing the 4' and 1' substituents, and the bigger including the diphosphate and the base groups explicitly; in the latter scheme both the terminal P-atom and an N-atom of the base were fixed; in both schemes the residues were also restrained in their flexibility by fixing one atom for each residue, according to the X-ray structure (Eriksson et al. 1997). The mechanistic pathway obtained with both modeling schemes is similar; it is also comparable overall to the first experiment-based proposal. The main difference is related with the proton transfer from the 3'-OH group to Glu₄₄₁: in this theoretical mechanism, the glutamate residue only stabilizes the transition state of step 2, by temporarily accepting the proton from the 3'-OH group, but remains anionic in the products of the reaction; the transfer of the proton only happens when the C2' carbon receives the H-atom from a cysteine thiol, forming the ribose-derived furanone and the disulfide radical anion.

The detailed catalytic mechanism of RNR was also explored quantum-mechanically (by Cerqueira et al. 2004a). In the calculations, cysteine residues were modeled by methylthiol molecules, Glu₄₄₁ by a formate anion, Asn₄₃₇ by a formamide and the substrate by a ribose ring. The position of the residues was initially taken from the X-ray crystallographic structure (Uhlén and Eklund 1994), and although optimization of the structures was performed without any kind of restrictions, their position and orientation was retained, indicating that no strain is needed to build the active site. The mechanism scheme that resulted from this study is similar overall to the experimental proposal. One small difference is the role of Asn₄₃₇ in the transfer of the radical character from the disulfide radical anion to the C3' carbon (step 4); this residue had been proposed to be part of the transfer pathway, but the theoretical

calculations indicate that its mediation is not required and suggest a direct radical character transfer from the disulfide to the nucleotide. Regarding the theoretical proposals, an important difference is the role of the water molecule after elimination from the C2' carbon: while in the previous studies it was consistently kept in the active site and involved in hydrogen transfer reactions, here it was not included in the structures of the steps that follow its elimination, which seems reasonable given that water molecules can dissociate easily from the large, solvent-exposed RNR active site. Another difference particularly regarding Pelmenschikov's proposal, is that step 2 was found to involve the proton transfer from the 3'-OH group to Glu₄₄₁.

Another theoretical study undertaken by Cerqueira et al. (2004b) was focused on the first step of RNR catalytic mechanism. In this work, a large model of the active site region that included a total of 130 atoms was used, instead of the small models of previous theoretical studies. Thus, it was possible to obtain a clearer insight into the role of the enzyme and particularly into the following aspects: enzyme-substrate interaction energies, specific transition state stabilization and substrate steric strain energies. It was concluded that the transition state of step 1 is stabilized in 4.0 kcal/mol by specific enzyme-substrate interactions, but this stabilization is cancelled by the cost in conformational energy for the enzyme to adopt the transition state geometry. It was found that the substrate binds RNR with almost no steric strain, which emphasizes the complementarity and specificity of the active site for nucleotide binding. The main role of the enzyme at the very beginning of the catalytic cycle was concluded to be the imposition of stereospecificity upon the substrate and to protect the enzyme radical from the solvent. The results also allowed the validation of the earlier results with the smaller models; at least in this step, the results obtained with both models are very close, indicating that the main contribution for the activation and reaction energies comes from the reacting part of the system.

Inhibition mechanism by substrate analogs

Ribonucleotide reductase substrate analogs are very important compounds from a clinical point of view. Their anti-cancer properties are well established, and one of them (Gemcitabine) is in clinical use since 1998; Tezacitabine is a similar compound, currently in Phase III clinical trials. Moreover, they are very interesting inhibitors to study theoretically since they are recognized by the active site as normal substrates and all the knowledge gathered around RNR normal catalysis can be applied in the study of their inhibition mechanisms. In fact, they are expected to react with the same amino acid residues of the active site, and surely the first reaction will occur with the radical Cys₄₃₉. The rest of the reaction pathway will be subsequently unravelled by exploring different possibilities, which should be both

chemically attractive and experimentally supported, and discarding the ones that present higher energetic landscapes.

Ribonucleotide reductase substrate analogs are usually modified in position C2', which is the one that, in the natural catalysis, suffers reduction from 2'-OH to 2'-H. The interaction of these 2'-substituted substrate analogs with the RNR active site results in loss of the essential tyrosyl radical in R2 and/or covalent addition of a reaction intermediate to the enzyme in the R1 subunit. The 2'-chloro-2'-deoxynucleotides are an example of the former and 2'-azido-2'-deoxynucleotides of the latter. To gain insight into the underlying reasons for their different behavior, theoretical calculations were performed on the interaction of these two inhibitors with the main residues of the RNR active site (Fernandes and Ramos 2003a). Interestingly, it was observed that, in both cases, the initial abstraction of the 3'-H atom by the radical Cys₄₃₉ is coupled with a proton transfer from the 3'-OH group to Glu₄₄₁ and with the elimination of the 2'-substituent as an anion. After the decomposition of the inhibitor, the spin becomes localized in the carbon C2', and two major pathways are possible: (1) C2' receives an H-atom from Cys₄₃₉, the tyrosyl radical is regenerated and RNR will be inhibited by R1 alkylation or (2) C2' receives the H-atom from Cys₂₂₅ and the tyrosyl radical is lost. The X-ray crystallographic structure together with knowledge from catalytic mechanism, suggests that Cys₂₂₅ would be the natural cysteine residue to perform the reaction. It was thus proposed that the first hypothesis only happens when the 2'-leaving group hinders the approach of Cys₂₂₅ by forming a strong H-bond with it, which was observed to be the case with 2'-chloro-2'-deoxynucleotides. As for the 2'-azido-2'-deoxynucleotides, the addition of the azide group to the carbon C3' after elimination from the C2', opens the way for Cys₂₂₅ to perform this reaction.

(*E*)-2'-fluoromethylene-2'-deoxycytidine-5'-diphosphate (FMCDP), also known as Tezacitabine, is an RNR substrate analog that possesses potent chemotherapeutic efficacy against several forms of cancer. It inhibits both RNR subunits, by destroying the essential tyrosyl radical in R2 and alkylating the active site in R1. EPR studies detected the formation of a new, inhibitor-derived radical, which accompanied the loss of the tyrosyl radical and involved covalent addition of an active-site residue. Based on these facts and in earlier mechanistic results for other 2'-substituted substrate analogs, a theoretical study was undertaken to explore all relevant chemical pathways that could be involved in the inhibition mechanism of FMCDP (Fernandes and Ramos 2003b). It was proposed that the major inhibition pathway would proceed through protonation of the fluorine atom by Cys₄₃₉, with subsequent elimination of fluoride and addition of the cysteine to the inhibitor. A final H-atom abstraction by Cys₂₂₅ would place the spin density in the inhibitor, thus forming the radical detected in the experimental studies; the tyrosyl radical is destroyed by the covalent addition of Cys₄₃₉ to the

inhibitor, which simultaneously inactivates R1 by occluding the active site for further substrate binding.

A similar study was carried to explore the possible inhibition pathways of the 2'-azido-2'-deoxyribonucleotides substrate analogs (Pereira et al. 2004a). A set of experimental studies had indicated that inhibition of RNR involved loss of the tyrosyl radical and covalent modification of R1; the latter was exposed by the appearance of a characteristic absorbance at 320 nm, which was observed in other RNR mechanism-based inhibitions and is explained by the addition of a ribose-derived furanone to the enzyme. The formation of a new substrate-based transient radical concomitant with the destruction of the tyrosyl one was also detected, and an experiment-based mechanism was proposed, which had two possible endings corresponding to the formation of two different promising intermediate radical structures. The study led to the identification of the structure of the radical intermediate, between the two existing proposals; in this structure, the spin density is placed on one azide-derived nitrogen, which is bound to the sulfur atom of Cys₂₂₅ and to the carbon C3' of the inhibitor; the calculated Hypefine Coupling Constants for this radical were in excellent agreement with the correspondent experimental measurements. A new mechanistic pathway was also proposed, which was found to be the most energetically favoured; it led to the formation of the transient radical and subsequently to the production of the furanone responsible for R1 inactivation; the spin density is never replaced in Cys₄₃₉, which explains the loss of the tyrosyl radical. The identity of the radical, as well as the proposed pathway has been confirmed by later experimental findings (Fritscher et al. 2005).

Gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) is a deoxycytidine analog that has shown promising results as an anti-cancer drug. Its use was approved by the FDA for the treatment of patients with non-small cell lung cancer, breast cancer and adenocarcinoma of the pancreas; in Europe it was approved additionally for the treatment of patients with bladder cancer. Moreover, it continues to be employed in multiple clinical trials to assess the benefit of different therapeutic approaches in those and in other types of cancer. Part of its activity involves inhibition of RNR, and some experimental studies aiming to gain insight into the details of this reaction observed that the absence or presence of reducing species in the medium influenced the enzyme subunit targeted; while the absence of reductants leads to loss of the essential tyrosyl radical in R2, with concomitant formation of a new nucleotide-based one, the availability of reducing species prevents the loss of the tyrosyl radical and results in R1 inhibition, probably by covalent modification; for either situation, no experiment-based mechanistic pathways were suggested. A theoretical study of the interaction of gemcitabine with the RNR active site was undertaken, which led to the first proposal of a mechanistic scheme for RNR inactivation in the absence of reductants (Pereira et al. 2004b); in this mechanism, the new nucleotide-based radical,

was proposed to be a C4' radical, which had been previously suggested to be similar to the one detected in EPR experiments with a variant RNR (Persson et al. 1997; Himo and Siegbahn 2000).

The 2'-mercapto-2'-deoxyribonucleotides are yet another group of RNR substrate analogs with potential anti-cancer activity, whose inhibition mechanism was the subject of a theoretical study by Pereira et al. (2005). Experimentally, it had been found that RNR inhibition by these molecules only occurred in the presence of oxygen; in this situation, subunit R2 was specifically targeted with the destruction of the essential tyrosyl radical, and the role of R1 in RNR activity was not affected; the formation of a transient radical was also detected, which was proposed to be a perthiyl located in an active-site cysteine, probably Cys₂₂₅. If the experiment was carried out in anaerobic conditions, the enzyme remained active, the tyrosyl radical was not lost and the transient radical was not formed, suggesting that the reaction proceeded as with the normal substrate. Contrary to the other theoretical studies on inhibition mechanisms described so far in which small models were used to represent the active-site residues and the nucleotide (methylthiol for the cysteines, formate for Glu₄₄₁ and the ribose-derived ring for the substrate), here the calculations were performed on a system containing ca. 130 atoms; it consisted of a cut-off of the R1 subunit, composed of a chain of seven amino acid residues (Ser₄₃₆-Asn₄₃₇-Leu₄₃₈-Cys₄₃₉-Leu₄₄₀-Glu₄₄₁-Ile₄₄₂) plus the side chain of Cys₂₂₅, and the same small model of the substrate. The results of the study were in agreement with the experimental mechanism by which RNR inhibition was proposed to take place when oxygen was available, and could refine and clarify such mechanistic proposal. The previously proposed structure for the transient radical detected in the presence of oxygen was also confirmed. Additionally, the first proposal was also made for the reaction pathway that occurs in anaerobiosis and which does not affect RNR activity.

Conclusion

An overview of the main computational studies performed in the investigation of the action and inhibition mechanisms of the elusive enzyme RNR has been presented here. This kind of studies provides qualitative and quantitative insights that could not have been available from experiments alone. Thus, they are very useful as a complement to experimental studies, aiding in the validation or rebuttal of a given hypothesis. In fact, high accuracy quantum chemistry has become an indispensable tool for analyzing mechanisms of chemical reactions and, for small- and medium-sized systems, where the accuracy obtained is very high, mechanisms are now seldom accepted without support from theoretical calculations. One of the most useful aspects of quantum-

chemical methods is that short-lived species are treated with equal ease and accuracy as long-lived ones, which means that it is possible to obtain structures and energies for transition states and unstable intermediates of chemical reactions, and also important information on radicals.

Ribonucleotide reductase is a medically very important enzyme, given that it is involved in the processes responsible for cell proliferation, and it is also a puzzling one, with a mechanism that took a lot of studies to unravel and involves radical generation by a metal cluster and complex radical reactions with the substrates. However, the deep understanding of such complex and intricate mechanisms is a fundamental prerequisite for the scientific and pharmaceutical rational drug design effort towards the development of more potent and efficient anti-cancer drugs. Computational methods aided in the understanding of the catalysis mechanism, and will continue to be useful in the investigation of the details that remain to be learned and that will help in finding new, more effective and safer ways of inhibiting the enzyme.

References

- Balzarini J (2000) Effect of antimetabolite drugs of nucleotide metabolism on the anti-human immunodeficiency virus activity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Pharmacol Ther* 87:175-187
- Bollinger JM Jr, Tong WH, Ravi N, Huynh BH, Edmonson DE, Stubbe J (1994) Mechanism of assembly of the tyrosyl radical-*diiron(III)* cofactor of *E. coli* ribonucleotide reductase. 2. Kinetics of the excess Fe²⁺ reaction by optical, EPR, and Mössbauer spectroscopies. *J Am Chem Soc* 116:8015-8023
- Burdi D, Willems J-P, Riggs-Gelasco P, Antholine WE, Stubbe J, Hoffman BM (1998) The core structure of X generated in the assembly of the diiron cluster of ribonucleotide reductase: ¹⁷O₂ and H₂¹⁷O ENDOR. *J Am Chem Soc* 120:12910-12919
- Cerqueira NMFSA, Fernandes PA, Eriksson LA, Ramos MJ (2004a) New insights into a critical biological control step of the mechanism of Ribonucleotide reductase. *J Mol Struct (Theor Chem)* 709:53-65
- Cerqueira NMFSA, Fernandes PA, Eriksson LA, Ramos MJ (2004b) Ribonucleotide activation by enzyme ribonucleotide reductase: understanding the role of the enzyme. *J Comp Chem* 25:2031-2037
- Cerqueira NMFSA, Pereira S, Fernandes PA, Ramos MJ (2005) Overview of ribonucleotide reductase inhibitors: an appealing target in anti-tumour therapy. *Curr Med Chem* 12:1283-1294
- Eriksson M, Uhlin U, Ramaswamy S, Ekberg M, Regnström K, Sjöberg B-M, Eklund H (1997) Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binding. *Structure* 5:1077-1092
- Fernandes PA, Ramos MJ (2003a) Theoretical studies on the mode of inhibition of ribonucleotide reductase by 2'-substituted substrate analogues. *Chem Eur J* 9:5916-5925
- Fernandes PA, Ramos MJ (2003b) Theoretical studies on the mechanism of inhibition of ribonucleotide reductase by (E)-2'-fluoromethylene-2'-deoxycytidine-5'-diphosphate. *J Am Chem Soc* 125:6311-6322
- Fernandes PA, Eriksson LA, Ramos MJ (2002) The reduction of ribonucleotides catalyzed by the enzyme ribonucleotide reductase. *Theor Chem Acc* 108:352-364
- Fritscher J, Artin E, Wnuk S, Bar B, Robblee JH, Kacprzak S, Kaupp M, Griffin RG, Bennati M, Stubbe J (2005) *J Am Chem Soc*, Article ASAP. DOI 10.1021/ja043111x

- Han WG, Lovell T, Liu TQ, Noodleman L, (2003) A density functional evaluation of an Fe(III)-Fe(IV) model diiron cluster: Comparisons with ribonucleotide reductase intermediate X. *Inorg Chem* 42:2751–2758
- Han WG, Lovell T, Liu TQ, Noodleman L (2004) Density functional study of a μ -1,1-carboxylate bridged Fe(III)-O-Fe(IV) model complex. 2. Comparison with ribonucleotide reductase intermediate X. *Inorg Chem* 43:613–621
- Harrington JA, Spector T (1991) Human ribonucleotide reductase. Activation and inhibition by analogs of ATP. *Biochem Pharmacol* 42:759–763
- Himo F, Siegbahn PEM (2000) Very stable ribonucleotide substrate radical relevant for class I ribonucleotide reductase. *J Phys Chem B* 104:7502–7509
- Himo F, Siegbahn PEM (2003) Quantum chemical studies of radical-containing enzymes. *Chem Rev* 103:2421–2456
- Ingram GM, Kinnaird JH (1999) Ribonucleotide reductase: a new target for antiparasite therapies. *Parasitol Today* 15:338–342
- Johns DG, Gao WY (1998) Selective depletion of DNA precursors: an evolving strategy for potentiation of dideoxynucleoside activity against human immunodeficiency virus. *Biochem Pharmacol* 55:1551–1556
- Kasrayan A, Persson AL, Sahlin M, Sjöberg B-M (2002) The conserved active site asparagine in class I ribonucleotide reductase is essential for catalysis. *J Biol Chem* 277:5749–5755
- Lawrence CC, Obias H, Stubbe J, Bennati M, Bar G, Griffin RG (1999) High-field EPR detection of a disulfide radical anion in the reduction of cytidine 5'-diphosphate by the E441Q R1 mutant of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8979–8984
- Logan DT, Su X-D, Åberg A, Regnström K, Hadju J, Eklund H, Nordlund P (1996) Crystal structure of reduced protein R2 of ribonucleotide reductase: the structural basis for oxygen activation at a dinuclear iron site. *Structure* 4:1053–1064
- Manegold C (2004) Gemcitabine (Gemzar) in non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 4:345–360
- Noodleman L, Lovell T, Han WG, Li J, Himo F. (2004) Quantum chemical studies of intermediates and reaction pathways in selected enzymes and catalytic synthetic systems. *Chem Rev* 104:459–508
- Nordlund P, Sjöberg B-M, Eklund H (1990) 3-Dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase. *Nature* 345:593–598
- Nordlund P, Eklund H (1993) Structure and function of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. *J Mol Biol* 232:123
- Pelmenschikov V, Cho KB, Siegbahn PEM (2004) Class I ribonucleotide reductase revisited: the effect of removing a proton on Glu441. *J Comp Chem* 25:311–321
- Pereira S, Fernandes PA, Ramos MJ (2004a) Theoretical study of ribonucleotide reductase mechanism-based inhibition by 2'-azido-2'-deoxyribonucleoside-5'-diphosphates. *J Comp Chem* 25:227–237
- Pereira S, Fernandes PA, Ramos MJ (2004b) Mechanism for ribonucleotide reductase inactivation by the anticancer drug gemcitabine. *J Comp Chem* 25:1286–1294
- Pereira S, Fernandes PA, Ramos MJ (2005) Theoretical study on the inhibition of ribonucleotide reductase by 2'-mercapto-2'-deoxyribonucleoside-5'-diphosphates. *J Am Chem Soc* 127:5174–5179
- Persson AL, Eriksson M, Katterle B, Pötsh S, Sahlin M, Sjöberg B-M (1997) A new mechanism-based radical intermediate in a mutant R1 protein affecting the catalytically essential Glu441 in *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* 272:31533–31541
- Reichard P (1993) From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* 260:1773–1777
- Romanelli F, Pomeroy C, Smith KM (1999) Hydroxyurea to inhibit human immunodeficiency virus-1 replication. *Pharmacotherapy* 19:196–204
- Siegbahn PEM (1998) Theoretical study of the substrate mechanism of ribonucleotide reductase. *J Am Chem Soc* 120:8417–8429
- Siegbahn PEM (1999) Theoretical model studies of the iron dimer complex of MMO and RNR. *Inorg Chem* 38:2880–2889
- Siegbahn PEM, Blomberg MRA, Crabtree RH (1997) Hydrogen transfer in the presence of amino acid radicals. *Theor Chem Acc* 97:289–300
- Siegbahn PEM, Blomberg MRA, Pavlov M (1998a) A comparison of electron transfer in ribonucleotide reductase and the bacterial photosynthetic reaction center. *Chem Phys Lett* 292:421–430
- Siegbahn PEM, Eriksson L, Himo F, Pavlov M (1998b) Hydrogen atom transfer in ribonucleotide reductase (RNR). *J Phys Chem B* 102:10622–10629
- Stubbe J, van Der Donk WA (1998) Protein radicals in enzyme catalysis. *Chem Rev* 98:705–762
- Sturgeon BE, Burdi D, Chen S, Huynh B-H, Edmondson DE, Stubbe J, Hoffman BM (1996) Reconsideration of X, the diiron intermediate formed during cofactor assembly in *E. coli* ribonucleotide reductase. *J Am Chem Soc* 118:7551–7557
- Torrent M, Musaev DG, Morokuma K (2001) The flexibility of carboxylate ligands in methane monooxygenase and ribonucleotide reductase: a density functional study. *J Phys Chem B* 105:322–327
- Torrent M, Musaev DG, Basch H, Morokuma K (2002) Computational studies of reaction mechanisms of methane monooxygenase and ribonucleotide reductase. *J Comp Chem* 23:59–76
- Tripathy D. (2002) Gemcitabine in breast cancer: future directions. *Clin Breast Cancer* 3:45–48
- Tsimberidou AM, Alvarado Y, Giles FJ (2002) Evolving role of ribonucleoside reductase inhibitors in hematologic malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2:437–448
- Uhlen U, Eklund H (1994) Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature* 370:533–539
- Wei PP, Skulan AJ, Mitic N, Yang YS, Saleh L, Bollinger JM, Solomon EI (2004) Electronic and spectroscopic studies of the non-heme reduced binuclear iron sites of two ribonucleotide reductase variants: comparison to reduced methane monooxygenase and contributions to O₂ reactivity. *J Am Chem Soc* 126:3777–3788
- Yang Y-S, Baldwin J, Ley BA, Bollinger JM Jr, Solomon EI (2000) Spectroscopic and electronic structure description of the reduced binuclear non-heme iron active site in ribonucleotide reductase from *E. coli*: comparison to reduced Δ^9 desaturase and electronic structure contributions to differences in O₂ reactivity. *J Am Chem Soc* 122:8495–8510

Referências

- Åberg A, Hahne S, Karlsson M, Larsson A, Ormö M, Åhgren A, Sjöberg B-M (1989) Evidence for two different classes of redox-active cysteines in ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264 (21): 12249-12252
- Balzarini J (2000) Effect of antimetabolite drugs of nucleotide metabolism on the anti-human immunodeficiency virus activity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Pharmacol Ther* 87 (2-3): 175-187
- Bunn P Jr (2004) New investigative regimens and cytotoxic agents in thoracic cancers: gemcitabine and pemetrexed. *Oncology (Williston Park)* 18 (8 Suppl 5): 5-11
- Cerqueira NMFS, Femandes PA, Eriksson LA, Ramos MJ (2004) New insights into a critical biological control step of the mechanism of ribonucleotide reductase. *J Molec Struct (Theochem)* 709 (1-3): 53-65
- Choy H (2004) Chemoradiation in NSCLC: focus on the role of gemcitabine. *Oncology (Williston Park)* 18 (8 Suppl 5): 38-42
- Ekberg M, Sahlin M, Eriksson M, Sjöberg B-M (1996) Two conserved tyrosine residues in protein R1 participate in an intermolecular electron transfer in ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* 271 (34): 20655-20659
- Eriksson M, Uhlin U, Ramaswamy S, Ekberg M, Regnström K, Sjöberg B-M, Eklund H (1997) Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binding. *Structure* 5 (8): 1077-1092
- Jordan A, Reichard P (1998) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 67: 71-98
- Kasrayan A, Persson AL, Sahlin M, Sjöberg B-M (2002) The conserved active site asparagine in class I ribonucleotide reductase is essential for catalysis. *J Biol Chem* 277 (8): 5749-5755
- Kolberg M, Strand KR, Graff P, Andersson KK (2004) Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochim Biophys Acta* 1699 (1-2): 1-34
- Mao SS, Holler TP, Bollinger JM Jr, Yu GX, Johnston MI, Stubbe J (1992) Interaction of C225SR1 mutant subunit of ribonucleotide reductase with R2 and nucleoside diphosphates: tales of a suicidal enzyme. *Biochemistry* 31 (40): 9744-9751

- Nordlund P, Eklund H (1993) Structure and function of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. *J Mol Biol* 232 (1): 123-164
- Nordlund P, Sjöberg B-M, Eklund H (1990) Three-dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase. *Nature* 345 (6276): 593-598
- Orr RM, Dorr FA (2005) Clinical studies of antisense oligonucleotides for cancer therapy. *Methods Mol Med* 106: 85-111
- Persson AL, Eriksson M, Katterle B, Pötsch S, Sahlin M, Sjöberg B-M (1997) A new mechanism-based radical intermediate in a mutant R1 protein affecting the catalytically essential Glu441 in *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* 272 (50): 31533-31541
- Reichard P (1993) From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* 260 (5115): 1773-1777
- Romanelli F, Pomeroy C, Smith KM (1999) Hydroxyurea to inhibit human immunodeficiency virus-1 replication. *Pharmacotherapy* 19 (2): 196-204
- Seley KL (2000) Tezacitabine Hoechst Marion Roussel. *Curr Opin Investig Drugs* 1 (1): 135-140
- Siegbahn PEM, Eriksson L, Himo F, Pavlov M (1998) Hydrogen atom transfer in ribonucleotide reductase (RNR). *J Phys Chem B* 102 (51): 10622-10629
- Stubbe J, Ator M, Krenitsky T (1983) Mechanism of ribonucleoside diphosphate reductase from *Escherichia coli*: evidence for 3'-C-H bond cleavage. *J Biol Chem* 258 (3): 1625-1631
- Stubbe J, van Der Donk WA (1998) Protein radicals in enzyme catalysis. *Chem Rev* 98 (2): 705-762
- Tsimberidou AM, Alvarado Y, Giles FJ (2002) Evolving role of ribonucleoside reductase inhibitors in hematologic malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2 (4): 437-448
- Uhlen U, Eklund H (1994) Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature* 370 (6490): 533-539

2. Métodos Computacionais

Os métodos utilizados neste trabalho baseiam-se em modelos teóricos quânticos, a maioria dos quais tem raiz na resolução mais ou menos aproximada da equação de Schrödinger.

Dos postulados fundamentais da mecânica quântica tem-se que, para cada sistema químico, existe uma *função de onda* (Ψ) que o descreve, sendo que, da acção de determinados operadores sobre essa função, se obtêm valores para as propriedades observáveis do sistema. A função de onda é assim chamada devido a um paralelismo entre as propriedades do mundo microscópico e as das ondas estacionárias, ambos fenómenos quantizados. O produto de Ψ pelo seu conjugado complexo tem unidades de densidade de probabilidade: se Ψ for uma função real, como é geralmente o caso, a probabilidade de um sistema químico se encontrar numa determinada região do espaço-tempo será dada pelo integral do quadrado de Ψ nessa região.

O operador que associa a função de onda à energia do sistema por ela descrito (E) é o operador hamiltoniano (\hat{H}) e esta relação é representada matematicamente pela equação de Schrödinger:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (1)$$

Uma vez que os sistemas estudados correspondem a estados estacionários, Ψ é função apenas das coordenadas espaciais dos núcleos e dos electrões e a equação de Schrödinger diz-se independente do tempo.

Se os núcleos e os electrões forem assumidos como cargas pontuais não relativistas, o hamiltoniano, correspondendo à soma dos operadores energia cinética (\hat{T}) e energia potencial (\hat{V}), terá em conta cinco contribuições para a energia total do sistema – as cinéticas dos electrões e dos núcleos, a atracção electrostática entre electrões e núcleos e as energias de repulsão electrostática interelectrónica e internuclear – tal como representado, em unidades atómicas, na seguinte expressão:

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V} = -\sum_i \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_k \frac{1}{2m_k} \nabla_k^2 - \sum_i \sum_k \frac{Z_k}{r_{ik}} + \sum_{i<j} \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{k<l} \frac{Z_k Z_l}{r_{kl}} \quad (2)$$

Em (2), i e j identificam os electrões do sistema, k e l referem-se aos núcleos, m_k e Z_k são a massa e o número atómico do núcleo k , e r_{ik} (ou r_{kl}) representa a distância entre as partículas i e k (ou k e l); ∇^2 é o operador Laplaciano que, em coordenadas cartesianas, tem a forma:

$$\nabla_i^2 = \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2}$$

De acordo com o princípio variacional, a energia resultante da acção do operador hamiltoniano sobre uma função de onda é sempre maior ou igual que a menor energia possível do sistema, ou seja, que a sua energia do estado fundamental. Daqui resulta que, na procura da melhor função de onda para definir o estado fundamental de um sistema, é possível construir funções de onda tentativa e avaliar a sua qualidade pelos valores das energias associadas: quanto menor o valor de energia obtido, mais exacta será a função de onda utilizada. Por outro lado, ao procurar o valor mais baixo de energia, de modo a otimizar a função de onda utilizada, é possível tirar partido de todas as ferramentas matemáticas

disponíveis para localizar valores extremos.

A resolução da equação de Schrödinger com o hamiltoniano representado na expressão (2) é analiticamente impossível para sistemas com mais do que 1 electrão e/ou mais do que 1 núcleo, devido à presença dos termos repulsivos que impedem a separação de variáveis, o que torna inevitável a adopção de simplificações. Uma das simplificações mais importantes consiste na aproximação de Born-Oppenheimer que permite separar o movimento dos núcleos do dos electrões, com base na diferença de magnitude das suas massas (Cramer 2004). A massa muito menor dos electrões leva a que a sua cinética se possa considerar independente do movimento dos núcleos e estes sejam tratados como estando fixos. Deste modo, o termo da expressão (2) referente à energia cinética nuclear é desprezado e o último termo, relativo à repulsão electrostática internuclear, passa a ter um valor constante avaliado para cada conjunto de coordenadas nucleares. Os três termos restantes dependem apenas da dinâmica dos electrões e definem por isso um hamiltoniano electrónico; da utilização deste hamiltoniano na resolução da equação de Schrödinger obtém-se a energia electrónica do sistema.

É da aproximação de Born-Oppenheimer que surgem o conceito de *superfície de energia potencial* (PES), definida pela energia electrónica ao longo de todas as coordenadas nucleares possíveis, e a consequente possibilidade de reconhecer geometrias estáveis através da identificação dos seus mínimos locais ou globais.

Apesar desta simplificação, a equação de Schrödinger permanece analiticamente insolúvel para sistemas com mais do que um electrão, onde a presença do termo repulsivo interelectrónico exige a assunção de novas aproximações.

2.1. Teoria de Hartree-Fock

A teoria de Hartree-Fock (HF) faz a aproximação fundamental de considerar que cada electrão se move num campo eléctrico estático criado por todos os outros electrões do sistema (Cramer 2004). Na ausência da repulsão interelectrónica, o hamiltoniano electrónico total corresponde a uma soma de hamiltonianos monoelectrónicos, em que cada electrão é descrito por uma função que depende somente das suas coordenadas, não se pondo deste modo o problema da separação de variáveis.

No modelo proposto inicialmente por Hartree, a influência dos outros electrões é incluída através da adição de um potencial de repulsão de Coulomb, que representa a interacção electrostática entre cada electrão e a distribuição de carga dos restantes. No entanto, tendo em conta que essa densidade de carga é dada pela função de onda electrónica, chega-se à situação complicada de ser necessário conhecer a função de onda para a poder calcular. Para ultrapassar este problema, Hartree desenvolveu um método iterativo chamado campo auto-consistente (SCF), que se baseia no princípio variacional, e em que se procede a um primeiro cálculo com funções de onda tentativa, utilizando-se as funções de onda resultantes (presumivelmente diferentes e melhores que as primeiras) para um novo cálculo, teoricamente mais exacto. Seguem-se então cálculos sucessivos, em que se utilizam as funções de onda geradas pelo cálculo imediatamente anterior, até que a diferença entre as novas funções de onda e as utilizadas para as gerar se encontre abaixo de um determinado critério preestabelecido como limite de convergência.

À luz da mecânica quântica, a descrição dos electrões não fica completa com as coordenadas espaciais; cada electrão é também caracterizado pelo número quântico de spin que pode tomar apenas um de dois valores: $+\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$. Como esta coordenada é independente das espaciais, pode ser facilmente incluída no modelo através da consideração de novas funções de onda monoeléctricas, correspondentes ao produto de duas: a definida anteriormente, que depende apenas das coordenadas espaciais do electrão e que corresponde ao conceito químico de orbital molecular, e outra dependente do momento de spin e que se designa por α ou β consoante o valor tomado pelo electrão seja $+\frac{1}{2}$ ou $-\frac{1}{2}$ respectivamente. Estas novas funções são chamadas *orbitais de spin*.

De acordo com o princípio de exclusão de Pauli, uma orbital molecular pode ter até dois electrões, a única diferença entre eles consistindo no número quântico de spin. Deste modo, para descrever um sistema de *camada fechada*, onde todas as orbitais ocupadas contêm dois electrões com spin emparelhado, pode-se usar um *modelo restrito*, com um número de funções de coordenadas espaciais (orbitais moleculares) correspondente a metade do número de electrões. Neste cenário, cada função espacial descreve dois electrões, definindo uma orbital de spin para cada um, por associação com as funções de spin α e β .

No caso de sistemas de *camada aberta*, em que existe pelo menos uma orbital ocupada por

um só electrão, a simplificação de atribuir a mesma distribuição espacial aos pares de electrões das orbitais duplamente ocupadas pode introduzir erros significativos no cálculo, porque exclui o fenómeno da polarização de spin, causado pelo electrão desemparelhado. Nestes casos, para permitir que os electrões α e β das orbitais duplamente ocupadas possam ocupar diferentes regiões do espaço, é necessário tratá-los individualmente, descrevendo-os por orbitais de spin com uma componente espacial similar mas não necessariamente idêntica. A utilização deste *modelo não restrito* é particularmente importante no estudo de sistemas em que é indispensável a consideração explícita de electrões não emparelhados, como é o caso das espécies radicalares mas, apesar de constituir uma descrição mais realista do sistema, apresenta o problema de estar sujeito à *contaminação de spin* (a função de onda total pode apresentar algum grau de contaminação por estados de spin diferentes do desejado).

O princípio de exclusão de Pauli é um corolário do chamado princípio de antissimetria que estabelece que a função de onda deve trocar de sinal sempre que haja permuta de índices entre qualquer par de electrões. De facto, para partículas indistinguíveis entre si, a densidade de probabilidade, dada pelo quadrado da função de onda que as descreve, não varia quando ocorre a troca de coordenadas entre quaisquer duas dessas partículas, o que implica que a função de onda permanece constante (simetria) ou sofre apenas uma troca de sinal (antissimetria). Foi demonstrado que o segundo caso é o característico das partículas de número quântico de spin não inteiro, onde se incluem os electrões.

A obediência ao princípio de antissimetria é garantida quando a função de onda é representada matematicamente por um determinante de Slater. Foi Fock quem propôs pela primeira vez a extensão do procedimento SCF às funções de onda electrónicas descritas por determinantes de Slater (Cramer 2004). Tal como as orbitais de Hartree, estas podem ser determinadas individualmente como funções próprias de um conjunto de operadores monoelectrónicos mas, para definir a interacção de cada electrão com o campo eléctrico estático criado pela distribuição de carga dos restantes, à repulsão de Coulomb são adicionados efeitos de permuta. A inclusão do termo de permuta no hamiltoniano HF diminui a energia de repulsão entre dois electrões com o mesmo momento de spin – reflectindo a probabilidade reduzida de dois electrões nessas condições se encontrarem perto um do outro – e introduz alguma correlação electrónica no modelo.

Os cálculos envolvidos na resolução das equações HF são facilitados pela representação das

orbitais moleculares (Ψ_i) como combinações lineares de um conjunto fixo de N funções:

$$\Psi_i = \sum_{\mu=1}^N c_{i\mu} \psi_{\mu} \quad (3)$$

Com esta estratégia, os parâmetros a calcular durante a optimização variacional da função de onda, passam a ser os coeficientes $c_{i\mu}$ utilizados na combinação linear. O conjunto das funções utilizadas na construção das orbitais moleculares é designado por *base de funções*, sendo cada uma das funções ψ_{μ} denominada *função de base*.

Roothaan desenvolveu as equações algébricas matriciais que permitem chegar aos valores dos coeficientes envolvidos na construção de cada orbital molecular (Cramer 2004). Durante o cálculo, os termos de Coulomb e de permuta são pesados com uma *matriz de densidade* que representa o grau de contribuição de cada função de base para a função de onda total. Uma vez que a matriz de densidade é definida pelos coeficientes que se pretendem calcular, a resolução das equações de HF-Roothaan recorre também a um processo variacional iterativo tipo SCF, em que se começa por utilizar uma matriz tentativa.

Quanto mais completa for a base de funções utilizada, mais exacta será a função de onda construída e conseqüentemente mais realista o valor de energia que lhe está associado. Na situação limite (chamada *limite de Hartree-Fock*), que corresponde à utilização de uma base de funções completa, a diferença entre a energia calculada e a energia real (não relativista) do sistema será apenas a energia de correlação electrónica, que não é imputada pelo método, devido às aproximações assumidas. Por outro lado, e uma vez que o tempo de computação escala à quarta potência com o aumento do número de funções de base, é conveniente escolher uma base de funções com um tamanho que corresponda ao melhor compromisso possível entre a exactidão do cálculo e o custo computacional envolvido.

2.2. Bases de Funções

De uma perspectiva química, as funções mais adequadas para construir as orbitais moleculares serão funções centradas nos átomos, num procedimento denominado Combinação Linear de Orbitais Atómicas (LCAO). Uma vez que a equação de Schrödinger pode ser resolvida analiticamente para o átomo de Hidrogénio, ou sistemas semelhantes ditos hidrogenóides, consegue-se chegar a uma descrição exacta das suas orbitais atómicas que

constituem deste modo óptimos blocos de construção para as orbitais moleculares. No entanto, a utilização destas funções envolve cálculos muito complicados e implica um grande custo computacional.

Felizmente, como consequência do princípio variacional, a construção das funções de onda pode ser feita de qualquer maneira considerada razoável, uma vez que a sua qualidade pode ser avaliada comparativamente através dos valores de energia que lhes estão associados. Lembrando as unidades de densidade de probabilidade do produto de Ψ pelo seu conjugado complexo (ou do quadrado de Ψ quando esta for real), a função de onda electrónica pode ser interpretada como uma espécie de mapa para as regiões do espaço multidimensional onde é mais ou menos provável encontrar electrões. Deste modo, pondo a intuição química temporariamente de lado e olhando para as orbitais atómicas como meras funções matemáticas, podem-se procurar novas funções que sejam, por um lado, mais fáceis de tratar matematicamente, e por outro, passíveis de se combinar de modo a permitir a presença de electrões onde uma maior probabilidade de eles se encontrarem baixe a energia do sistema.

Como alternativa às orbitais atómicas hidrogenóides usam-se, portanto, funções matemáticas que as tentam descrever o mais aproximadamente possível, mas que são mais fáceis de tratar devido a simplificações, por exemplo, nos termos radiais ($\Psi(r)$). As funções deste género mais comumente utilizadas nos cálculos de química computacional são as orbitais do tipo Slater (STOs) e as orbitais do tipo Gaussiano (GTOs) (Cramer 2004; Jensen 1999).

As STOs são funções exponenciais que conseguem aproximar-se bastante da descrição das orbitais dos átomos hidrogenóides. A parte radial destas funções é dada por

$$\Psi(r) = r^{n-1} e^{-\zeta r} \quad (4)$$

em que n é um número quântico principal, por analogia com as funções radiais daquelas orbitais, e ζ é um expoente escolhido de acordo com algumas regras definidas por Slater, relacionadas *inter alia* com o número atómico. Esta expressão descreve de forma correcta o decaimento exponencial com r , apresentando inclusivamente o pico em $r=0$ das orbitais tipo s . No entanto, este tipo de funções não permite a resolução analítica das equações HF, o que implica a utilização de métodos numéricos que limitam a sua aplicação a sistemas relativamente simples.

As GTOs foram propostas por Boys como alternativa às STOs. Nestas funções, a parte radial

é dada por

$$\Psi(r) = e^{-\alpha r^2} \quad (5)$$

em que α é uma constante de ajuste da curva, que controla a sua largura e permite uma maior ou menor aproximação à forma de uma STO. A descrição do decaimento radial como e^{-r^2} em vez de e^{-r} torna possível a solução analítica das equações HF mas, apesar de muito conveniente de um ponto de vista computacional, corresponde a uma representação bastante deficiente das orbitais atómicas, atenuando o potencial das GTOs para servirem como funções de base.

Para combinar a melhor propriedade das GTOs (eficiência computacional) com a das STOs (correcta descrição radial) desenvolveram-se bases de funções que utilizam STOs aproximadas, construídas a partir da combinação linear de GTOs. Uma função de base definida como uma combinação linear de GTOs é denominada função de base contraída, sendo cada GTO que a constitui designada por gaussiana primitiva. Estas bases de funções são representadas pela sigla STO- n G, em que n indica o número de primitivas gaussianas utilizadas na construção de cada STO.

Uma base de funções STO- n G é também conhecida como base de funções de ζ único ou base de funções mínima, uma vez que é constituída pelo número mínimo de funções de base necessárias: uma função de base (resultante da combinação de n primitivas) para cada orbital atómica, do cerne até à valência. Bases de funções mais flexíveis, com mais do que uma função de base para cada orbital atómica, são chamadas de ζ múltiplo, sendo a multiplicidade definida pelo número de funções usadas: uma base de funções de ζ duplo, por exemplo, terá duas funções de base correspondentes a cada orbital atómica, geralmente uma delas mais concentrada no núcleo e a outra permitindo que a densidade electrónica se encontre mais afastada.

Considerando que as orbitais do cerne do átomo são apenas ligeiramente afectadas pela ligação química, acaba por ser indiferente utilizar bases de funções tipo STO- n G ou de ζ múltiplo para construir as respectivas orbitais moleculares. Já as orbitais de valência podem variar bastante em função da ligação química, e justifica-se plenamente a utilização de bases de funções mais flexíveis para a sua construção. O mais razoável e usual consiste em utilizar as chamadas bases de funções “split-valence”, que contêm uma função de base contraída

correspondente a cada orbital atómica do cerne e mais do que uma função para cada orbital atómica de valência; o número de funções empregues na descrição de cada orbital de valência define a multiplicidade de ζ destas bases de funções. Neste trabalho foram utilizadas as bases de funções “split-valence”, desenvolvidas por Pople *et al.*, 6-31G (Hehre *et al.* 1972) e 6-311G (Krishnan *et al.* 1980), em que as funções do cerne são contraídas a partir de 6 primitivas e as de valência recorrem a 1 função contraída de 3 primitivas e 1 função GTO simples (6-31G – ζ duplo) ou 2 funções GTO simples (6-311G – ζ triplo).

Para descrever de forma mais exacta a função de onda de um sistema químico, de modo a incluir, nomeadamente, os efeitos causados pelas ligações químicas, é conveniente introduzir mais flexibilidade matemática na construção das orbitais moleculares. Para este efeito, adicionam-se à base de funções as chamadas *funções de polarização*, que consistem em GTOs correspondentes a orbitais com um número quântico de momento angular superior ao da orbital de valência de cada elemento. Assim, as funções de polarização adicionadas para a descrição de átomos de Hidrogénio serão GTOs do tipo p e, para átomos de Carbono ou Oxigénio, serão GTOs tipo d (Hariharan e Pople 1973); a adição de mais funções de polarização (GTOs do tipo d para o Hidrogénio e do tipo f para átomos mais pesados) aumentará a flexibilidade matemática e a consequente exactidão do cálculo mas terá um custo computacional acrescido (Frisch *et al.* 1984). A utilização destas funções é geralmente indicada na nomenclatura da base de funções, entre parênteses: a base de funções de ζ triplo 6-311G(3df,3pd) inclui 3 conjuntos de GTOs tipo d e um de tipo f para os átomos pesados e 3 conjuntos de GTOs tipo p e um de tipo d para o Hidrogénio; já a base de funções de ζ duplo 6-31G(d) inclui apenas funções de polarização tipo d para os átomos pesados.

Determinadas situações requerem flexibilidade matemática adicional: no caso de aniões ou estados electrónicos altamente excitados, por exemplo, as orbitais moleculares de maior energia estão bastante difusas no espaço, pelo que a sua descrição deve permitir que um electrão fracamente ligado se possa encontrar longe da restante densidade electrónica. Para descrever este tipo de situações, adicionam-se à base de funções, GTOs definidas por um valor de α baixo, que apresentam assim um decaimento lento com o aumento da distância ao núcleo. A inserção destas *funções difusas* é indicada na nomenclatura das bases de funções de Pople através do sinal +: a presença de um sinal indica a adição de uma função difusa tipo s e de um conjunto tipo p para a descrição dos átomos pesados (ex. 6-31+G); a presença de dois sinais indica a inclusão adicional de uma função difusa tipo s para os átomos de Hidrogénio

(ex. 6-311++G).

Algumas bases de funções foram desenvolvidas especificamente para o cálculo de determinadas propriedades químicas. É o caso da base de funções EPR-III, que foi otimizada para o cálculo das constantes de acoplamento hiperfino (HCC), características da ressonância paramagnética electrónica (EPR), e que inclui, nomeadamente, uma descrição aperfeiçoada das orbitais do cerne (Cramer 2004).

A principal limitação química do método HF deriva da natureza monoelectrónica dos operadores: com excepção dos efeitos de permuta, a correlação electrónica não é considerada. Por este motivo, a energia HF de um sistema é sempre calculada por excesso e a diferença entre a energia limite HF e a energia real é a energia de correlação electrónica. Outro problema de ordem mais prática está relacionado com a escolha das bases de funções. A aproximação LCAO utilizando orbitais hidrogenóides é atractiva mas implica a solução numérica de integrais complicados que fazem o cálculo escalar à quarta potência com o aumento do número de funções de base utilizadas.

A tentativa de resolução destes problemas levou à progressão por dois caminhos divergentes. Por um lado tentou-se diminuir a exigência computacional sem sacrificar a exactidão, utilizando parâmetros que reproduzem quantidades experimentais chave, numa senda que deu origem aos chamados *métodos semiempíricos*. A outra corrente considerou a teoria HF como um passo no caminho para a resolução exacta da equação de Schrödinger e enveredou pelo desenvolvimento de teorias mais sofisticadas sem introduzir qualquer aproximação, gerando deste modo os métodos *ab initio* pós-HF. Um terceiro grupo de métodos, que não cabe completamente na definição dos dois anteriores, baseia-se na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e tem como característica fundamental não depender do cálculo da função de onda mas sim da densidade electrónica.

Neste trabalho utilizou-se um método semiempírico e um método baseado no formalismo DFT, pelo que serão discutidas de seguida as principais características destas duas teorias.

2.3. Métodos Semiempíricos

A inexactidão intrínseca do método HF, relacionada com a não consideração da correlação

electrónica, sugere que a introdução de modificações para simplificar o seu formalismo pode na realidade melhorar os resultados, desde que as novas aproximações garantam de alguma forma a inclusão desse factor. Este objectivo pode ser atingido se, ao fazer aproximações que envolvam a adopção de uma descrição paramétrica para um determinado aspecto do cálculo, os parâmetros respectivos forem escolhidos de maneira a melhor reproduzirem os dados experimentais. É este o caso dos chamados métodos semiempíricos que correspondem fundamentalmente a versões simplificadas da teoria HF em que se usam correcções empíricas para compensar as aproximações introduzidas na resolução da equação de Schrödinger.

Uma aproximação básica feita por todos os métodos semiempíricos, consiste na assunção de que os electrões do cerne são suficientemente insensíveis a alterações no ambiente químico para que alterações nas suas orbitais como função desse ambiente não tenham consequências químicas relevantes, nomeadamente a nível energético. Deste modo, apenas os electrões de valência são considerados de forma explícita, usando-se habitualmente uma base de funções mínima, em que cada orbital de valência é descrita por uma STO. Os electrões das camadas mais internas são tratados implicitamente através da redução da carga nuclear ou da introdução de funções de repulsão cerne-cerne que modelam a energia de repulsão devida ao conjunto do núcleo e dos electrões internos.

Outra assunção fundamental dos métodos semiempíricos é a Aproximação da Sobreposição Diferencial Nula (ZDO), que simplifica o cálculo dos integrais de repulsão interelectrónica, ao considerar como nulos os que envolvem a sobreposição de distribuições de carga de orbitais diferentes. Os integrais restantes são normalmente substituídos por funções analíticas aproximadas, que incluem parâmetros ajustados por comparação dos resultados dos cálculos com os respectivos dados experimentais (nomeadamente em termos de energia e geometria). Os vários métodos semiempíricos podem ser classificados em três grupos de acordo com o grau de aplicação da ZDO:

-os CNDO (Complete Neglect of Differential Overlap), como o nome indica, aplicam-na extensivamente e ignoram todos os integrais de repulsão que tenham um produto de duas funções de base diferentes afectas ao mesmo electrão (Pople *et al.* 1965);

-os INDO (Intermediate Neglect of Differential Overlap) fazem-no num grau intermédio porque, dos integrais anteriores, não consideram nulos os que apresentam as quatro funções de base centradas no mesmo átomo (Bingham *et al.* 1975);

-os NDDO (Neglect of Differential Diatomic Overlap), de desenvolvimento mais recente e mais frequentemente utilizados, aplicam a ZDO apenas se as funções de base afectas ao mesmo electrão estiverem centradas em dois átomos diferentes (Dewar e Thiel 1977a).

Os métodos desenvolvidos com base no formalismo NDDO são, por ordem cronológica, o MNDO (Modified Neglect of Diatomic Overlap), o AM1 (Austin Model 1) e o PM3 (Parametrized Model 3) (Dewar e Thiel 1977b; Dewar *et al.* 1985; Stewart 1989). A principal falha do primeiro método está relacionada com a deficiente descrição da energia e geometria das pontes de hidrogénio, interacções particularmente relevantes em sistemas de interesse biológico. O desenvolvimento do AM1 veio tentar colmatar esta imperfeição do MNDO, melhorando o cálculo da energia de repulsão cerne-cerne, através da introdução de uma função parametrizada mais complexa. Esta função, característica do tipo de átomo, inclui quatro parâmetros otimizados adicionais em relação à do MNDO e, para alguns elementos, depende também do segundo átomo do par interactuante. O método PM3 utiliza um esquema funcional, incluindo a descrição da repulsão cerne-cerne, idêntico ao do AM1; a justificação para o seu desenvolvimento teve como base o aumento dos recursos computacionais que veio possibilitar a utilização de um processo mais sofisticado de procura e optimização de parâmetros, tendo estes podido ser avaliados contra um conjunto muito mais alargado de dados experimentais. Convém notar, no entanto, que a qualidade da parametrização está sempre limitada pelo conjunto de moléculas escolhidas para esse procedimento; assim, o desempenho do PM3 no estudo de qualquer sistema não será necessariamente melhor que o dos dois métodos anteriores, embora se possam esperar resultados óptimos para moléculas muito próximas das incluídas no conjunto teste.

O desempenho médio dos três métodos NDDO no estudo de sistemas orgânicos típicos, que contenham átomos de C, H, N e O, é relativamente bom, com o PM3 e o AM1 a apresentarem resultados de qualidade idêntica e algo superior aos do MNDO. Já no caso de cálculos em sistemas que incluam átomos mais pesados, tais como S ou P, o desempenho piora bastante, sendo a descrição de compostos hipervalentes particularmente problemática; para compostos com este tipo de átomos, o PM3 é o que apresenta, ainda assim, maior robustez.

Outra área de aplicação crítica dos métodos NDDO é a que envolve cálculos em compostos com azoto, uma vez que as barreiras de inversão do azoto piramidal são usualmente estimadas por defeito com AM1 e por excesso com PM3. Como consequência, alguns compostos contendo azoto não planar serão previstos como sendo planares pelo AM1, e os planares

poderão ser estimados como piramidais pelo PM3. Esta falha é especialmente importante no estudo de estruturas peptídicas já que a ausência de uma descrição apropriada da ligação amida (e em particular da geometria do azoto amídico) irá interferir com uma descrição realista do espaço conformacional desses sistemas. Para lidar especificamente com este problema, o método PM3 está também disponível numa versão denominada PM3MM que inclui um termo simples de mecânica molecular para corrigir a descrição da ligação amida.

Uma vez que o desenvolvimento de cada método semiempírico foi direccionado para certa classe de compostos e para o cálculo de determinadas propriedades moleculares, a escolha do método mais adequado dependerá das características do sistema e dos objectivos do estudo a efectuar. Numa parte deste trabalho utilizou-se o método PM3MM inserido num procedimento QM/QM, em que o sistema em estudo foi dividido em duas camadas tratadas por métodos diferentes de Mecânica Quântica. Na parte tratada pelo método semiempírico não ocorria quebra ou formação de novas ligações; pretendeu-se apenas simular o ambiente proteico à volta do centro activo da enzima onde os processos de interesse estavam de facto a ocorrer.

2.4. Teoria do Funcional da Densidade

Os fundamentos da DFT assentam no trabalho de Hohenberg e Kohn (Hohenberg e Kohn 1964), que mostraram que a energia do estado fundamental de um sistema pode ser expressa por um funcional da sua densidade electrónica; deste modo, ao contrário das $3N$ variáveis da função de onda relativa aos N electrões do sistema, passa a haver dependência de apenas 3 variáveis (as que definem a densidade electrónica). No entanto, uma vez que o funcional que representa a correspondência entre a densidade electrónica de um sistema e a sua energia, não é ainda conhecido, têm de ser utilizados funcionais aproximados, sendo que a construção de funcionais que se aproximem o mais possível do correcto, constitui o principal desafio no desenvolvimento dos métodos DFT – a palavra funcional designa uma função de outra função, neste caso a energia é função da densidade electrónica que, por sua vez, é uma função das coordenadas electrónicas no espaço real.

Existem vários formalismos desenvolvidos com base na DFT, sendo a teoria de Kohn-Sham (KS) a mais popular (Kohn e Sham 1965). Esta, tomando como ponto de partida um sistema fictício de electrões não interactuantes, com uma densidade do estado fundamental (ρ)

idêntica à do sistema de interesse, considera o funcional de energia electrónica ($E(\rho)$) como correspondendo à soma dos seguintes componentes: energia cinética dos electrões não interactuantes ($T(\rho)$); energia electrostática de atracção aos núcleos ($V_{ne}(\rho)$); interacção electrostática com a densidade electrónica total ($V_{ee}(\rho)$) e energia de permuta-correlação ($E_{xc}(\rho)$) que engloba as interacções interelectrónicas restantes.

$$E(\rho) = T(\rho) + V_{ne}(\rho) + V_{ee}(\rho) + E_{xc}(\rho) \quad (6)$$

O termo E_{xc} , para além de contribuir com os efeitos de permuta e de correlação electrónica, deve compensar as aproximações adoptadas no cálculo dos outros termos, fazendo uma correcção à energia cinética que contabilize a natureza interactuante dos electrões no sistema real e uma correcção adicional à repulsão interelectrónica V_{ee} de modo a anular a “auto-interacção” que esta inclui. Uma vez que a descrição matemática exacta de E_{xc} não é conhecida, os métodos computacionais baseados nesta teoria têm de utilizar uma descrição aproximada. Esta é geralmente introduzida na forma de dois funcionais independentes, um chamado de permuta (E_x) e outro de correlação (E_c).

As equações KS têm uma formulação semelhante às HF e a sua resolução envolve igualmente um procedimento iterativo SCF. Embora as orbitais KS não tenham o significado físico das HF, correspondendo simplesmente às funções matemáticas que garantem a densidade electrónica exacta do estado fundamental do sistema, são construídas do mesmo modo, por combinação linear das funções de base, e é a respectiva matriz de densidade que é optimizada iterativamente. A eficiência computacional dos métodos DFT, no entanto, é superior à dos HF, sendo que o tempo de computação de um cálculo DFT escala apenas ao cubo, com o aumento de número de funções de base utilizadas.

Um aspecto bastante relevante que distingue a teoria HF da DFT é o facto de uma ser aproximada e a outra ser teoricamente exacta: no limite da utilização duma base de funções completa, enquanto a energia HF será sempre superior à energia real do sistema devido à não consideração da correlação electrónica, a energia gerada por um método DFT, deveria corresponder, em princípio, à energia exacta do sistema. Na prática, no entanto, uma vez que a forma correcta do funcional da densidade, e especificamente do termo E_{xc} , não é conhecida, o valor da energia calculada por DFT não só é aproximado como não é necessariamente superior ao real, pelo que o processo de convergência das orbitais KS pode não ser

verdadeiramente variacional (a energia converge simplesmente para o valor mínimo que é possível obter com o funcional utilizado).

Os vários métodos DFT disponíveis, baseados no formalismo KS, diferenciam-se pela forma dos funcionais E_x e E_c que adoptam.

Alguns métodos assumem uma variação lenta de ρ no espaço, e consideram a energia de permuta-correlação dependente apenas do valor local de ρ ; dizem-se por isso baseados na “Local Density Approximation” (LDA) ou na “Local Spin Density Approximation” (LSDA), sendo este um formalismo mais geral que permite incluir a polarização de spin nos sistemas de camada aberta. Os funcionais de permuta Slater e $X\alpha$ são deste tipo (Cramer 2004), assim como o funcional de correlação de Vosko, Wilk e Nusair (VWN) (Vosko *et al.* 1980).

Outros métodos entram em linha de conta com a forma como a densidade electrónica varia no espaço e fazem os funcionais de permuta e correlação depender também do gradiente de ρ (Generalized Gradient Approximation – GGA); estes funcionais são geralmente construídos a partir de funcionais LDA aos quais se soma um termo de correcção. O primeiro funcional de permuta GGA a tornar-se bastante popular, foi desenvolvido por Becke em 1988 e é conhecido simplesmente por B (Becke 1988); este funcional incorpora um único parâmetro empírico, optimizado por ajuste às energias de permuta dos gases nobres. Exemplos de funcionais de correlação GGA são o B88 de Becke, o LYP, desenvolvido por Lee, Yang e Parr (Lee *et al.* 1988), e os P86 e PW91 propostos por Perdew e por Perdew e Wang, respectivamente (Perdew 1986; Perdew e Wang 1992). O funcional LYP contém quatro parâmetros empíricos ajustados ao átomo de Hélio e não consiste numa correcção a um funcional LDA, avaliando de raiz a energia de correlação; este é o único funcional de correlação que consegue o cancelamento exacto do erro da “auto-interacção” para sistemas monoeléctronicos.

Um terceiro grupo de métodos utiliza um funcional E_x híbrido (definido como uma combinação linear de termos HF, LDA e GGA) associado a um funcional de correlação LDA e/ou GGA. O mais conhecido dos funcionais E_x híbridos é o funcional de três parâmetros de Becke, no formalismo B3PW91 ou B3LYP, de acordo com o funcional de correlação GGA associado (Becke 1993). O funcional B3LYP pode ser descrito pela expressão

$$E_{xc}^{B3LYP} = (1-a)E_x^{LSDA} + aE_x^{HF} + b\Delta E_x^B + (1-c)E_c^{LSDA} + cE_c^{LYP} \quad (7)$$

onde os parâmetros de Becke a , b e c assumem os valores 0.20, 0.72 e 0.81, respectivamente.

Os métodos que utilizam funcionais híbridos são os mais eficientes, apresentando em geral melhor desempenho que os funcionais puros correspondentes. De facto, a inclusão da permuta de HF no funcional híbrido proporciona um cancelamento de erros que beneficia, em particular, a previsão das barreiras energéticas em reacções químicas (normalmente subestimadas com um funcional GGA puro e sobrestimadas com HF) e dos comprimentos das ligações químicas (que tendem a ser subestimados com HF e sobrestimados com os funcionais DFT puros).

De todos os funcionais modernos, o B3LYP provou ser o mais popular, apresentando um desempenho geral impressionantemente bom. De estudos comparativos com outros funcionais e com valores experimentais, o erro médio apresentado pelo funcional B3LYP, no cálculo da energia de um sistema é de cerca de 3 kcal.mol⁻¹ (Cramer 2004). Este funcional foi usado com sucesso no estudo de mecanismos enzimáticos, pelo que se considerou ser o método apropriado para o trabalho apresentado nesta tese. Neste caso, utilizou-se o método B3LYP não restrito, porque o sistema em estudo envolvia espécies radicalares (é de notar que os métodos baseados na DFT são muito mais robustos no tratamento de sistemas de camada aberta, não manifestando o grau de contaminação de spin apresentado pelos métodos HF).

2.5. ONIOM

Para um determinado nível de exactidão, os métodos DFT apresentam o custo computacional mais baixo, constituindo por isso a melhor escolha, em particular quando estão envolvidas quebra e formação de ligações químicas. No entanto, e apesar da evolução exponencial do poder computacional, ainda não é possível aplicar DFT ao estudo, em tempo razoável, de sistemas com mais do que uma centena de átomos.

Para o estudo de sistemas *grandes* – que não podem ser estudados na totalidade com um nível teórico elevado, em tempo útil, pelo computador disponível – é vantajoso utilizar métodos híbridos que permitem a aplicação de diferentes níveis de teoria a diferentes partes de uma molécula ou sistema molecular. O objectivo é realizar um cálculo de nível teórico elevado na parte mais interessante do sistema e calcular os efeitos do sistema restante com um nível de teoria mais baixo, de modo a que o resultado final tenha uma exactidão comparável à de um cálculo de nível teórico elevado no sistema completo.

Um método híbrido bastante popular, desenvolvido por Morokuma *et al.* é o ONIOM (“Our own N-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics”), que permite a divisão do sistema em duas ou mais *camadas* e a atribuição de um método computacional a cada uma delas (Svensson *et al.* 1996).

A divisão do sistema é feita, naturalmente, de acordo com a função e o grau de interesse de cada região para o estudo em causa: se o objectivo do estudo for, por exemplo, a elucidação do mecanismo catalítico de uma enzima, a parte do sistema a tratar com o nível teórico mais elevado deverá estar concentrada no respectivo centro activo. Para além disso, a colocação da fronteira entre as camadas deve atender a várias considerações: as ligações químicas que estejam a ser quebradas ou formadas devem ser incluídas na camada tratada com o nível teórico mais elevado tal como os átomos que sofram alteração de hibridização; os sistemas conjugados ou aromáticos não devem ser partidos mas incluídos completamente numa das camadas; onde os efeitos de segundos ou terceiros átomos se prevejam importantes, estes devem ser incluídos na mesma camada.

Quando a fronteira entre as camadas separa átomos que interagem por ligações covalentes, é necessário preencher a valência dos átomos afectados. Essas valências podem ser completadas com átomos, chamados “link atoms”, que são geralmente átomos de hidrogénio.

A energia ONIOM de um sistema dividido em duas camadas é dada pela expressão

$$E_{\text{ONIOM}} = E_{\text{baixo, real}} + E_{\text{elevado, modelo}} - E_{\text{baixo, modelo}} \quad (8)$$

em que os termos *baixo* e *elevado* se referem ao nível teórico do método e os termos *real* e *modelo* indicam o sistema completo e a subregião deste que é tratada com o nível teórico mais elevado, respectivamente. O programa começa por calcular a energia do *modelo*, com os dois níveis teóricos, relacionando os valores obtidos; no passo seguinte, a energia do sistema *real* é calculada com o nível teórico mais baixo e a esta energia é aplicada a relação encontrada no primeiro passo, de modo a extrapolar o valor de energia que resultaria de tratar todo o sistema com o nível teórico mais elevado.

A divisão do sistema e a escolha dos métodos computacionais devem ser convenientemente ponderadas, já que destes dois parâmetros dependerá a qualidade dos resultados obtidos. Em princípio, o desenho de um modelo de duas camadas será apropriado se: (1) o sistema *modelo* incluir as interacções que dominam a diferença de energia que está a ser calculada, (2) o nível

teórico *elevado* descrever essas interações com a exactidão requerida, e (3) as interações entre o sistema *modelo* e o sistema *real* restante forem descritas com exactidão suficiente pelo nível teórico *baixo*.

Neste trabalho, para o estudo da inibição da RNR por um dos análogos do substrato, utilizou-se uma secção da enzima que foi estudada com o formalismo ONIOM. Para esse efeito, o sistema foi dividido em duas regiões, tendo-se escolhido o método B3LYP para o estudo do sistema *modelo* (resíduos de amino ácido do centro activo e inibidor) e o método PM3MM para o sistema *real*.

2.6. Modelos Contínuos

Em química computacional, um *modelo contínuo* corresponde àquele em que, alguns graus de liberdade das partículas constituintes do sistema são descritos de forma contínua, através de uma função de distribuição apropriada. Neste sentido, a descrição dos electrões por uma função de densidade, é um exemplo de utilização de um modelo contínuo. A aplicação do conceito de distribuição contínua a partículas mais complexas, tais como núcleos, átomos ou moléculas, é uma aproximação interessante dado que restringe ainda mais os graus de liberdade do sistema e facilita consideravelmente o cálculo computacional. Este tipo de modelos é particularmente útil em estudos cujo interesse recai principalmente sobre uma pequena parte do sistema (por exemplo, uma molécula de soluto numa solução diluída, a camada superficial de um sólido, o centro activo de uma enzima ou uma única molécula num líquido puro ou num gás). A parte onde se pretende focar o estudo deve naturalmente ser tratada de forma mais detalhada mas a parte restante do sistema pode ser descrita vantajosamente através de um modelo contínuo (Tomasi *et al.* 2005).

Uma vez que a distribuição de carga do sistema tratado explicitamente induz polarização no meio contínuo e é influenciada por esta, a definição da interacção electrostática entre ambos corresponde a um processo auto-consistente que implica um procedimento iterativo denominado SCRF (Self-Consistent Reaction Field).

O procedimento de representar a parte “menos interessante” do sistema por um modelo contínuo foi aplicado neste trabalho: os cálculos foram realizados com a modelação explícita de parte do inibidor rodeado pelas cadeias laterais dos resíduos do centro activo (ou de uma

secção mais alargada da enzima que inclui os resíduos do centro activo e os directamente ligados a estes, no caso dos cálculos com o formalismo ONIOM) e todos os efeitos de longo alcance que poderiam ser causados pelo resto da proteína, foram simulados através de um modelo contínuo uniformemente polarizável de constante dieléctrica (ϵ) considerada apropriada.

O método utilizado para a modelação da proteína como um meio contínuo foi o C-PCM (Conductor-like Polarizable Continuum Model), implementado no software Gaussian (Cossi *et al.* 2003; Frisch *et al.* 2003). Este método baseia-se na aproximação da Carga Aparente da Superfície (ASC), que consiste na redução do meio contínuo a uma superfície fechada que engloba o sistema explícito. O cálculo computacional fica consideravelmente facilitado pelo facto da fonte do potencial reactivo (que é devido à polarização sofrida pelo meio contínuo) se resumir à distribuição de carga de uma superfície, particularmente porque esta pode ser ainda aproximada em termos de um conjunto de elementos finitos (chamados tesseræ) suficientemente pequenos para que a distribuição de carga seja praticamente constante em cada um.

A característica que distingue este método de outros igualmente baseados na ASC prende-se com a atribuição de uma constante dieléctrica com valor infinito ao meio contínuo (que fica assim equiparado a um meio condutor), para facilitar o cálculo da interacção electrostática. Os efeitos decorrentes do valor real da constante dieléctrica ser finito, são recuperados posteriormente através da ponderação da distribuição de carga com uma função apropriada de ϵ , determinada empiricamente por comparação com energias electrostáticas correctas.

2.7. Optimização de Geometria

Os métodos discutidos até este ponto permitem o cálculo mais ou menos aproximado, da energia electrónica de um sistema com *uma dada geometria*; no entanto, o que geralmente interessa estudar são geometrias particulares, correspondentes a pontos estacionários da PES. Para encontrar as geometrias de interesse é necessário proceder à minimização da sua energia em função das coordenadas nucleares, num processo denominado *optimização de geometria*.

Como se referiu anteriormente, a aproximação de Born-Oppenheimer permite que a energia de um sistema molecular, no seu estado electrónico fundamental, possa ser considerada como uma função das coordenadas dos núcleos. Considerando um sistema com N núcleos, existem

$3N$ coordenadas cartesianas e $3N-6$ coordenadas internas para definir a sua geometria; a necessidade de menos 6 coordenadas internas reflecte a liberdade de transladar e rodar arbitrariamente o sistema no espaço cartesiano sem alterar as posições relativas dos átomos (no caso particular de uma molécula linear, são necessárias apenas duas coordenadas para descrever o movimento rotacional, pelo que a sua geometria precisa de $3N-5$ coordenadas internas para ser caracterizada). As alterações na energia do sistema podem ser então assumidas como movimentos numa hipersuperfície de pelo menos $3N-6$ dimensões – a PES.

Nos pontos estacionários da PES, a primeira derivada é nula em relação a todas as coordenadas nucleares, tal como o somatório das forças que actuam em cada um dos átomos. Os pontos estacionários de interesse podem ser *mínimos* (locais ou global), com segunda derivada positiva em relação a todas as coordenadas, ou *pontos sela de 1ª ordem*, que correspondem a geometrias de estados de transição e apresentam segunda derivada negativa em relação a uma coordenada.

Em termos matemáticos, a optimização de geometria corresponde à minimização de uma função com pelo menos $3N-6$ variáveis. A maneira mais natural de minimizar uma função com várias variáveis consiste em variar uma delas de cada vez até se encontrar o mínimo, fazendo o mesmo para todas as variáveis sucessivamente. No entanto, quando as variáveis não são independentes entre si, como é o caso de um sistema químico, é necessário repetir o processo de forma iterativa até se encontrar o mínimo global. Quanto maior o acoplamento entre os diversos graus de liberdade do sistema, mais lenta será a convergência para o mínimo e o procedimento torna-se impraticável quando o sistema tem mais de 5-10 graus de liberdade.

No cenário de uma optimização de geometria multidimensional, em alternativa ao processo moroso de mover o sistema de modo a minimizar cada coordenada individualmente, procura-se deslocá-lo na direcção do maior declive energético em relação a todas as coordenadas simultaneamente. Os métodos de optimização utilizados em química computacional assumem em geral que pelo menos a primeira derivada da função energia pode ser calculada analiticamente em ordem a todas as variáveis: as primeiras derivadas negativas apontam para baixo na superfície de energia potencial e indicam a direcção a seguir para atingir o mínimo. Alguns métodos assumem que a matriz das segundas derivadas (matriz Hessiana) pode ser igualmente calculada: esta derivada dá informações sobre a curvatura da superfície e permite estimar o local em que a função passará por um mínimo, acelerando deste modo o processo de

otimização.

Os algoritmos de otimização que tiram partido apenas do cálculo da primeira derivada são o “steepest descent” e o “conjugated gradient”; o primeiro é mais robusto, permitindo uma aproximação ao mínimo global mesmo a partir de geometrias distantes, mas o segundo é mais eficiente e rápido porque guarda informação sobre o caminho de otimização já percorrido. O algoritmo Newton-Raphson tira partido da informação adicional fornecida pelo cálculo da matriz Hessiana, o que permite uma convergência muito rápida, em particular para geometrias já próximas do mínimo. No entanto, este método é instável quando a estrutura inicial se encontra distante do mínimo, para além de implicar o armazenamento de bastante informação e envolver o cálculo e a manipulação da matriz Hessiana, cujos termos são difíceis de derivar.

O algoritmo de otimização utilizado neste trabalho consiste no algoritmo Berny, que é um algoritmo tipo Newton-Raphson desenvolvido por Bernhard Schlegel e implementado no software Gaussian (Schlegel 1982; Peng *et al.* 1996). Dado um sistema com uma determinada geometria, este algoritmo avalia as forças que actuam sobre os átomos e analisa a matriz Hessiana, para prever geometrias energeticamente mais favoráveis e assim otimizar a estrutura molecular em direcção ao mínimo local mais próximo na PES. Uma vez que o cálculo explícito da matriz Hessiana é demasiado custoso, o algoritmo Berny constrói uma Hessiana aproximada no início do processo de otimização, procedendo à sua actualização ao longo da otimização à medida que vão sendo calculadas as energias e as primeiras derivadas. O sucesso da otimização dependerá de quão bem a Hessiana aproximada representa a situação real, num dado ponto. Em algumas situações, poderá ser necessário calcular explicitamente a matriz no início do processo de otimização, utilizando o esquema normal de actualização nos passos seguintes; só em casos muito raros, em que a matriz Hessiana sofra alterações muito grandes de um passo para outro, será necessário calculá-la explicitamente em todos os passos da otimização.

A função a ser otimizada e as suas derivadas são calculadas com uma precisão finita, pelo que os pontos estacionários podem não ser localizados exactamente. De facto, o algoritmo de otimização irá variar a estrutura do sistema até que as alterações no gradiente e na estrutura, em duas iterações sucessivas, se revelem menores que determinados valores estabelecidos previamente como limites de convergência. Os limites de convergência são definidos de acordo com o grau de exigência pretendido e referem-se a quatro parâmetros: a força máxima sentida por um átomo do sistema; a força média sentida por todos os átomos; o deslocamento

máximo, ou seja, a maior alteração sofrida por uma coordenada, e o deslocamento médio, ou seja, a alteração média sofrida por todas as variáveis estruturais. A otimização ficará completa quando os valores dos quatro parâmetros se encontrarem abaixo dos limites de convergência estabelecidos à priori; naturalmente, a escolha de limites mais apertados dará resultados mais exactos mas apresentará um maior custo computacional. Na figura 6 encontra-se representado um fluxograma simplificado do processo de otimização de uma geometria utilizando um método baseado no formalismo de DFT de Kohn-Sham.

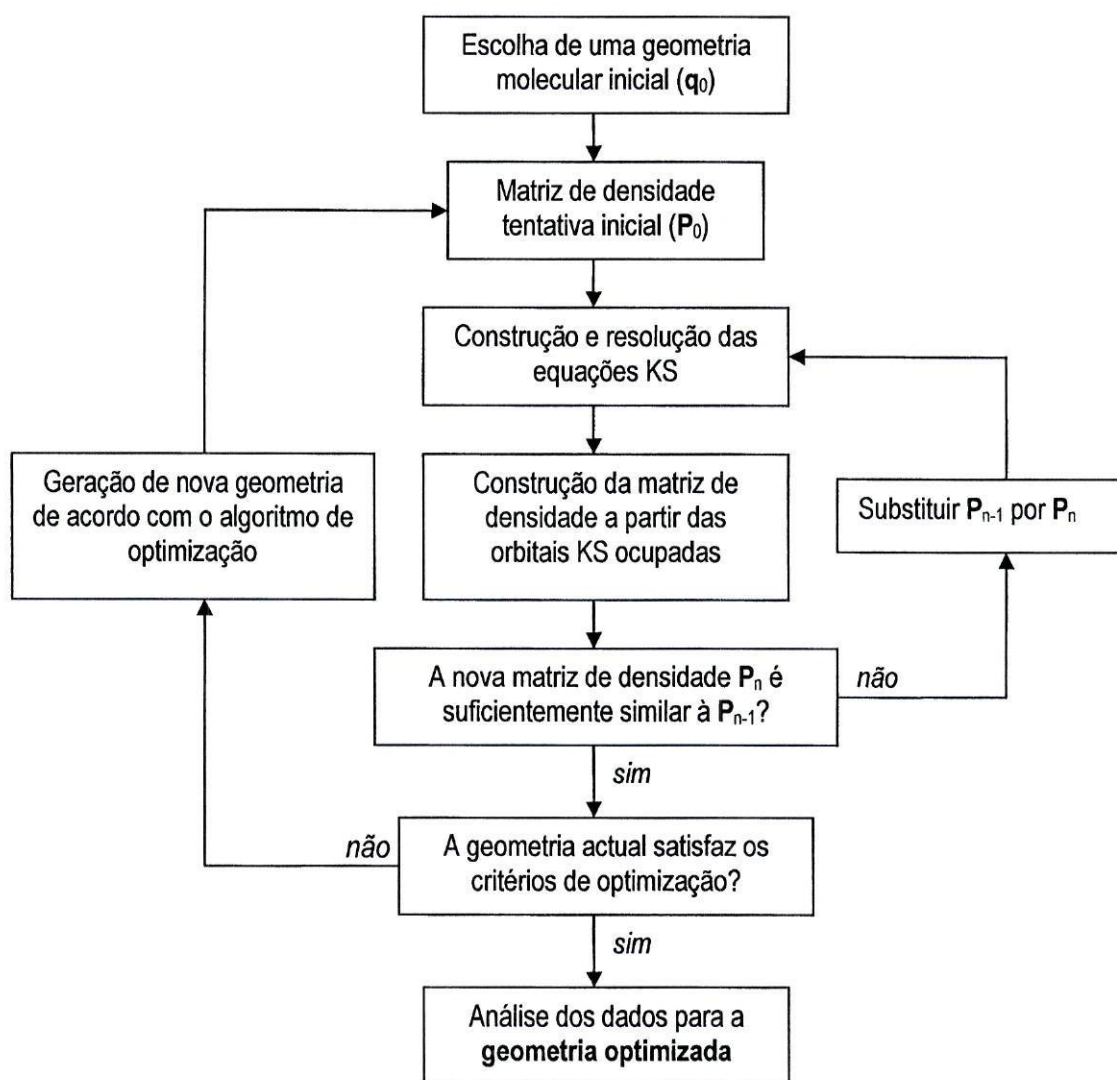


Figura 6. Representação esquemática do processo de otimização de uma geometria, utilizando um método baseado no formalismo DFT de Kohn-Sham (adaptado de Cramer 2004).

A procura de um estado de transição é bastante similar à otimização da geometria para um mínimo: em ambos os casos é necessário minimizar o gradiente da energia em relação às

coordenadas do sistema; no entanto, como os estados de transição se encontram num “pico” da PES em relação a uma das coordenadas, neste caso é necessário que esta seja maximizada simultaneamente. Para facilitar a optimização do estado de transição, é conveniente fornecer uma estrutura inicial razoável, que se encontre o mais próximo possível do ponto máximo da curvatura negativa em causa. O cálculo explícito da matriz Hessiana é também importante, particularmente no início da optimização, para que o algoritmo identifique o termo negativo correcto e possa mover o sistema nessa direcção e sentido ascendente, enquanto minimiza o gradiente de energia em relação às outras coordenadas. A actualização da Hessiana nos passos seguintes da optimização, com base na Hessiana da estrutura anterior e na informação relativa ao gradiente nos últimos pontos, é normalmente suficiente para convergir rapidamente a geometria para o estado de transição pretendido.

Existem várias estratégias para obter uma estrutura aproximada à da do estado de transição. Se o caminho reaccional puder ser descrito por uma única coordenada estrutural, como é o caso da maioria das reacções relevantes nos mecanismos de inibição estudados, os estados de transição podem ser localizados aproximadamente, através de um varrimento da PES ao longo dessa coordenada específica. Este varrimento consiste numa série de optimizações do sistema, em que a coordenada em causa é mantida congelada num determinado valor, variado progressivamente entre cada optimização – varrimento relaxado da PES. Das estruturas resultantes dessa série de cálculos, a que apresenta maior energia é então submetida a um método de procura local para optimizar o estado de transição. Quanto mais fino for o varrimento efectuado, mais próxima do estado de transição estará a estrutura seleccionada, e mais provável será a convergência para o estado de transição pretendido. Uma alternativa simples ao varrimento relaxado da PES consiste em fazer uma única optimização constrangida, em que as coordenadas de interesse se mantêm congeladas no ponto que se sabe à priori ser próximo do estado de transição pretendido. Outra possibilidade ainda, particularmente útil no caso de um caminho reaccional complexo, baseia-se no fornecimento inicial das estruturas dos dois mínimos ligados pelo estado de transição de interesse, acompanhadas, ou não, de uma estrutura aproximada do próprio estado de transição (método “Transit-Guided Quasi-Newton” ou STQN; Peng *et al.* 1996); este método começa por fazer uma interpolação entre as estruturas dos reagentes e dos produtos (influenciada pela estrutura do estado de transição se esta também for providenciada), gerando uma geometria teoricamente próxima do estado de transição que as liga, e procedendo de seguida à optimização local dessa geometria.

A confirmação de que a geometria otimizada corresponde a um estado de transição, e em particular ao estado de transição procurado, é feita pelo número de termos negativos da Hessiana e pelas coordenadas a que estes estão associados. Uma vez que os termos da Hessiana num ponto estacionário correspondem às constantes de força das coordenadas, eles podem ser utilizados para calcular as respectivas frequências vibracionais; os termos positivos darão origem a valores de frequência reais e os negativos originarão valores imaginários. Deste modo, a existência de uma única frequência imaginária indica que a estrutura corresponde a um estado de transição, sendo que a animação dessa frequência permite verificar facilmente se a coordenada maximizada é a pretendida (por outro lado, a obtenção de $3N-6$ frequências reais indica que a Hessiana é constituída apenas por termos positivos e valida a convergência para um ponto estacionário correspondente a um mínimo).

Para além deste critério “local”, a caracterização de um estado de transição passa também pela identificação dos mínimos da PES que lhe estão associados. Isto pode ser efectuado pelo seguimento da coordenada de reacção intrínseca (IRC), que consiste no deslocamento do sistema ao longo da PES, pelo caminho de menor energia que liga o estado de transição aos seus mínimos; naturalmente, o processo terá de ser realizado em duas partes, uma na direcção dos reagentes e outra na dos produtos.

A caracterização dos estados estacionários correspondentes aos mínimos e ao estado de transição de reacções químicas permite a comparação destas em termos cinéticos e termodinâmicos, e possibilita a triagem de caminhos reaccionais alternativos. A selecção do caminho reaccional mais favorável é uma ferramenta útil para a elucidação dos mecanismos enzimáticos (catalítico ou de inibição).

Referências

- Becke AD (1988) Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys Rev A* 38 (6): 3098-3100
- Becke AD (1993) Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys* 98 (7): 5648-5652
- Bingham RC, Dewar MJS, Lo DH (1975) Ground states of molecules. XXV. MINDO/3. An improved version of the MINDO Semiempirical SCF-MO Method. *J Am Chem Soc* 97 (6): 1285-1293
- Cossi M, Rega N, Scalmani G, Barone V (2003) Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J Comp Chem* 24 (6): 669-681
- Cramer CJ (2004) *Essentials of computational chemistry: theories and models*. 2^a Ed. Wiley: Chichester
- Dewar MJS, Thiel W (1977a) A semiempirical model for the two-center repulsion integrals in the NDDO approximation. *Theor Chim Acta* 46 (2): 89-104
- Dewar MJS, Thiel W (1977b) Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters. *J Am Chem Soc* 99 (15): 4899-4907
- Dewar MJS, Zoebisch EG, Healy EF, Stewart JJP (1985) AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J Am Chem Soc* 107 (13): 3902-3909
- Frisch MJ, Pople JA, Binkley JS (1984) Self-consistent molecular orbital methods 25. Supplementary functions for Gaussian basis sets. *J Chem Phys* 80 (7): 3265-3269
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery Jr JA, Vreven T, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV,

Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C, Pople JA (2003) Gaussian 03, Revision B.04, Gaussian, Inc: Pittsburgh PA

Hariharan PC, Pople JA (1973) The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theo Chim Acta* 28 (3): 213-222

Hehre WJ, Ditchfield R, Pople JA (1972) Self-consistent molecular orbital methods. XII. Further extensions of Gaussian-type basis sets for use in molecular orbital studies of organic molecules. *J Chem Phys* 56 (5): 2257-2261

Hohenberg P, Kohn W (1964) Inhomogeneous electron gas. *Phys Rev* 136 (3B): 864-871

Jensen F (1999) *Introduction to computational chemistry*. Wiley: Chichester

Kohn W, Sham LJ (1965) Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Phys Rev* 140 (4A): 1133-1138

Krishnan R, Binkley JS, Seeger R, Pople JA (1980) Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. *J Chem Phys* 72 (1): 650-654

Lee CT, Yang WT, Parr RG (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B* 37 (2): 785-789

Peng CY, Ayala PY, Schlegel HB, Frisch MJ (1996) Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *J Comp Chem* 17 (1): 49-56

Perdew JP (1986) Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. *Phys Rev B* 33 (12): 8822-8824

Perdew JP, Wang Y (1992) Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. *Phys Rev B* 45 (23): 13244-13249

Pople JA, Santry DP, Segal, GA (1965) Approximate self-consistent molecular orbital theory. I. Invariant procedures. *J Phys Chem* 43 (10): S129-S135

Schlegel HB (1982) Optimization of equilibrium geometries and transition structures. *J Comp Chem* 3 (2): 214-218

Stewart JJP (1989) Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. J Comp Chem 10 (2): 209-220

Svensson M, Humbel S, Froese RDJ, Matsubara T, Sieber S, Morokuma K (1996) ONIOM: a multilayered integrated MO + MM method for geometry optimizations and single point energy predictions. A test for Diels-Alder reactions and Pt(P(*t*-Bu)₃)₂ + H₂ oxidative addition. J Phys Chem 100 (50): 19357-19363

Tomasi J, Mennucci B, Cammi R (2005) Quantum mechanical continuum solvation models. Chem Rev 105 (8): 2999-3093

Vosko SH, Wilk L, Nusair M (1980) Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin-density calculations: a critical analysis. Can J Phys 58 (8): 1200-1211

3. Resultados e Conclusões

Neste capítulo são apresentados em detalhe os estudos computacionais referentes aos mecanismos de inibição da RNR por quatro inibidores análogos dos substratos: os N_3dNDP , o $dFdCDP$ ou gemcitabina-5'-difosfato, os $EtNDP$ e os $SHdNDP$.

O primeiro grupo de inibidores estudado foi escolhido devido à quantidade de informação experimental disponível; tendo sido dos primeiros a ser identificados como inibidores suicidas da RNR, os análogos com o substituinte $2'-N_3$ são os mais estudados e o seu mecanismo de inibição constitui um paradigma da inibição suicida da RNR. Estudos com marcação isotópica, espectroscopia de EPR e mutagénese de resíduos do centro activo haviam levado à detecção de um importante intermediário radicalar, centrado no inibidor, com uma estrutura reduzida a duas possibilidades, e à proposta de um mecanismo coerente com todos os dados experimentais, apresentando dois cursos finais diferentes, de acordo com cada uma das

estruturas possíveis para o intermediário (van der Donk *et al.* 1995). Com este estudo computacional pretendeu-se avaliar a viabilidade energética do mecanismo proposto, explorar a existência de um caminho reaccional mais favorável e estabelecer a estrutura do intermediário radicalar detectado experimentalmente, objectivos que foram atingidos na totalidade.

Depois do sucesso com o estudo dos N₃dNDP, considerou-se interessante aplicar a mesma metodologia ao estudo da interacção da gemcitabina-5'-difosfato com o centro activo da RNR. O facto de não existir tanta informação experimental disponível ou qualquer proposta de mecanismo na literatura, onde se pudesse basear o estudo computacional, foi largamente compensado pela importância clínica deste inibidor, com utilização aprovada como antineoplásico para várias indicações terapêuticas. Dos estudos experimentais realizados concluíra-se que o mecanismo de inibição da gemcitabina era diferente dependendo da presença ou ausência de redutores no meio (van der Donk *et al.* 1998); o estudo computacional tentou esclarecer as diferenças entre os dois mecanismos e resultou numa proposta de mecanismo para a ausência de espécies redutoras.

Seguiu-se o estudo computacional do grupo de inibidores com o substituinte etinilo na posição 3' da ribose. Estudos experimentais haviam divulgado resultados promissores para a sua aplicação no tratamento de vários tipos de cancro e havia sido sugerido que parte da acção terapêutica seria devida à inibição irreversível da RNR através de um mecanismo simples que envolveria a produção de um aducto cíclico estável (Jung *et al.* 1997). O estudo computacional teve como objectivos, não só verificar a viabilidade do mecanismo proposto para a inibição da RNR, mas também averiguar a existência de uma correlação entre a estabilidade termodinâmica do produto cíclico final e o grau de actividade demonstrada pelos diferentes análogos do inibidor. A existência desta correlação confirmaria de forma indiscutível o papel central da inibição da RNR na eficácia anti-tumoral dos 3'-etinil-ribonucleósidos, mas os resultados do estudo computacional não foram conclusivos.

Por último, é apresentado o estudo computacional da interacção dos SHdNDP com o centro activo da RNR. Estudos experimentais haviam revelado que a inibição *in vitro* da RNR por estes análogos ocorria apenas na presença de oxigénio molecular, observando-se então perda irreversível do radical tirosilo e formação de um novo radical, ligado a uma cisteína do centro activo; se a experiência decorria em condições anaeróbicas, a enzima permanecia activa, o radical tirosilo não era destruído e não se detectava a formação do novo radical (Covès *et al.*

1996). Com o estudo computacional realizado, foi possível fazer uma primeira proposta para a sequência de reacções na ausência de O₂ e confirmar o mecanismo anteriormente sugerido para a inibição da RNR em meio oxidante.

Os três primeiros inibidores foram estudados com uma metodologia semelhante. No que se refere ao sistema considerado, foram utilizados modelos pequenos: moléculas de CH₃SH para representar os resíduos de cisteína, uma molécula de formato ou ácido fórmico para o resíduo Glu441 e a pentose, geralmente sem o carbono C5', com os substituintes correspondentes a cada inibidor. A adequabilidade destes modelos já havia sido demonstrada em trabalhos semelhantes realizados com a mesma enzima (Siegbahn 1998; Fernandes *et al.* 2002); uma diferença introduzida aqui, foi a consideração do resíduo de glutamato como aniónico, de acordo com o que é sugerido pelo pKa da cadeia lateral do glutamato e pelo pH fisiológico, e ao contrário do que vinha a ser feito em estudos similares. Esta diferença influencia naturalmente as alternativas reaccionais possíveis e, conseqüentemente, o mecanismo final obtido.

Quanto ao nível teórico, os cálculos foram realizados em DFT não restrito, com o funcional B3LYP. Para cada reacção estudada, os três pontos estacionários foram localizados, otimizados e confirmados pela análise das frequências vibracionais, com a base de funções 6-31G(d). A utilização de bases de funções maiores foi considerada desnecessária do ponto de vista computacional, uma vez que introduziria alterações muito pequenas nas geometrias otimizadas, originando simultaneamente um acréscimo considerável no tempo de computação.

Para cada passo, começou-se por localizar a estrutura do estado de transição, geralmente através do varrimento da PES ao longo da coordenada de reacção. Depois do estado de transição ser otimizado e confirmado pelo número e animação das respectivas frequências imaginárias, procedeu-se a cálculos IRC, seguidos de optimização de geometria, para obter os dois mínimos associados.

Os valores de energia finais das reacções consideradas, resultam de um cálculo sobre as estruturas otimizadas dos três pontos estacionários respectivos, com UB3LYP e a base de funções alargada 6-311++G(3df,3pd), onde se incluíram os efeitos de longo alcance da proteína através do modelo contínuo C-PCM, com uma constante dieléctrica de valor 4, e a

que foram somadas as energias do ponto zero e os efeitos térmicos e entrópicos, calculados à temperatura fisiológica (310.15 K) aquando das frequências de vibração, com a base de funções mais pequena.

De acordo com estudos anteriores, a utilização do modelo contínuo com $\epsilon=4$, dá resultados concordantes com os experimentais e parece contabilizar de forma correcta o efeito médio da proteína global e das moléculas de água existentes no seu interior (Siegbahn 1998; Siegbahn *et al.* 1998; Blomberg *et al.* 1998). De facto, em estudos computacionais recentes sobre o mecanismo catalítico da RNR, não foram encontradas diferenças significativas nos valores das energias dos primeiros passos, quando calculados com modelos pequenos dos resíduos do centro activo, rodeados de um modelo contínuo com esta constante dieléctrica, ou com um modelo bastante mais alargado da enzima, em que se incluiu toda a subunidade R1, tratada com um método de QM/MM (Cerqueira *et al.* 2006).

No estudo do mecanismo de acção do primeiro inibidor, utilizou-se ainda a base de funções EPR-III, para o cálculo das constantes de acoplamento hiperfino das duas estruturas propostas como possíveis para o intermediário radicalar detectado experimentalmente. As constantes foram calculadas para as geometrias previamente optimizadas (com B3LYP/6-31G(d)) e os valores obtidos foram comparados com os experimentais.

Para o estudo do quarto grupo de inibidores, o sistema foi alargado, passando a englobar uma cadeia de sete resíduos de aminoácidos (Ser436, Asn437, Leu438, Cis439, Leu440, Glu441, e Ile442), a cadeia lateral do resíduo Cis225 e o modelo pequeno do inibidor, num total de 130 átomos.

Para a localização e optimização das estruturas dos pontos estacionários correspondentes a cada reacção estudada, o sistema foi dividido em duas regiões segundo o formalismo ONIOM: a região tratada com o nível teórico mais elevado incluiu o modelo do inibidor e as cadeias laterais dos resíduos Cis225, Cis439 e Glu441, num total de 28 átomos, e foi tratada com DFT e o método UB3LYP/6-31G(d); a segunda região, correspondente ao sistema restante, foi tratada com o método semiempírico PM3MM.

Em cada passo, procedeu-se a um varrimento da PES ao longo da coordenada de reacção em causa, com um incremento de 0.01 Å, tomando-se a estrutura com a energia mais elevada, como uma boa aproximação à geometria do estado de transição. A partir desse pico da PES, o

sistema foi liberto de restrições e a sua geometria otimizada nos dois sentidos da coordenada de reacção, de modo a obter as estruturas dos respectivos mínimos. É interessante notar que, durante as optimizações de geometria, o sistema manteve sempre a configuração aproximada da estrutura inicial adquirida do ficheiro cristalográfico.

As energias finais dos pontos estacionários são as resultantes de um cálculo “single-point”, em que se tratou todo o sistema com a base de funções 6-31+G(d), inserido igualmente num meio contínuo de constante dieléctrica 4.

Para cada inibidor, o mecanismo de inibição final proposto foi seleccionado por comparação das energias das reacções que constituem os vários caminhos alternativos considerados. Alguns dos caminhos foram descartados como fazendo parte do mecanismo principal de acção, por envolverem reacções com barreiras de energia superiores às de caminhos alternativos, deduzindo-se que levarão à formação de produtos secundários pouco relevantes, ou por originarem produtos com energia semelhante ou superior às dos reagentes, constituindo deste modo caminhos termodinamicamente desfavoráveis que não deverão ser responsáveis por uma inibição suicida.

Para a estipulação definitiva do mecanismo reaccional responsável pela actividade dos inibidores da RNR estudados, seria necessário considerar todas as possibilidades mecanísticas existentes, procedendo à sua triagem por comparação cinética e termodinâmica.

Considerando os resíduos do centro activo que se sabe terem um papel activo na química da RNR e tendo em conta as suas restrições estereoquímicas, o número de possibilidades mecanísticas que podem ser consideradas quimicamente razoáveis e que são coerentes com os dados experimentais, fica relativamente limitado – naturalmente, quanto maior a quantidade de informação experimental existente maior será essa limitação. No entanto, há sempre uma quota-parte de “suposição” inerente ao trabalho, não sendo possível afirmar com certeza absoluta que foram consideradas todas as alternativas existentes.

De qualquer modo, embora não sejam propostas definitivas, contribuem de forma válida para a compreensão detalhada dos mecanismos a que se referem, e constituem uma base valiosa a partir da qual novos estudos, computacionais ou experimentais, podem ser planeados de modo a confirmá-las ou refiná-las.

Este capítulo encontra-se organizado em quatro secções correspondentes aos quatro inibidores estudados:

-na primeira secção, o estudo do mecanismo de inibição dos N₃dNDP é apresentado através do artigo III;

-na segunda secção, a descrição do estudo do segundo inibidor (dFdCDP) é feita em duas partes, uma relativa ao mecanismo de inibição na ausência de redutores (apresentado através do artigo IV e respectivo material suplementar) e a outra referente ao estudo, ainda em curso, do mecanismo de inibição na presença de redutores;

-a terceira secção corresponde à descrição do estudo, não publicado, dos inibidores EtNDP;

-na quarta e última secção foi integrado o artigo V, onde é descrito o estudo do mecanismo de inibição dos SHdNDP, na presença e na ausência de oxigénio molecular.

3.1. 2'-azido-2'-desoxirribonucleótidos

Os inibidores que se começou por estudar foram os análogos dos substratos em que o grupo OH da posição 2' da ribose se encontra substituído por um grupo azida (os N₃dNDP). A interacção destes inibidores com a RNR foi objecto de inúmeros estudos experimentais, desde a sua identificação inicial como inibidores suicidas da enzima, em 1976.

Os resultados desses estudos, que envolveram, entre outros, a utilização de enzimas com mutações direccionadas para resíduos chave do centro activo, a marcação isotópica de alguns desses resíduos e/ou dos inibidores e a análise espectroscópica do sistema por EPR, originaram a compilação de um conjunto extenso de dados, que permitiram a elucidação gradual e quase completa do seu mecanismo de inibição. Eis alguns dos dados experimentais mais importantes:

- desaparecimento do sinal do radical tirosilo da subunidade R2;
- detecção de um novo radical, localizado no centro activo, a par do desaparecimento do tirosilo na subunidade R2, no que constituiu a primeira prova directa do envolvimento de radicais nas reacções mediadas pela RNR;
- quebra da ligação entre o carbono 3' e o átomo de hidrogénio, tal como ocorre com o substrato natural;
- inibição da enzima num ciclo catalítico com libertação de pirofosfato inorgânico (PP_i), de azoto molecular (N₂) e da base azotada;
- adição de um composto derivado do açúcar à subunidade R1;
- aparecimento de uma absorvância a 320 nm, que deve estar associada à modificação covalente da R1, uma vez que foi detectada igualmente com outros inibidores análogos do substrato e pode ser explicada pela adição de uma furanona derivada da ribose a um resíduo de lisina;
- quebra da ligação entre o carbono 2' e o átomo de azoto do grupo azida.

A análise do sinal de EPR correspondente ao novo radical, seguida de ensaios utilizando o inibidor marcado isotopicamente e a enzima com alguns resíduos do centro activo mutados e

com ^2H na posição β dos resíduos de cisteínas da R1, permitiram o estabelecimento da estrutura do radical como $\text{X-N}^{\cdot}\text{-SCH}_2\text{-R1}$: o azoto que possui o electrão desemparelhado é um dos que constituíam o grupo azida originalmente ligado ao carbono 2'; este azoto encontra-se ligado ao enxofre do resíduo de cisteína Cis225, sofrendo uma interacção de acoplamento hiperfino de um dos seus hidrogénios β , e a um átomo desconhecido X que pode ser de oxigénio, sem hidrogénios, ou de carbono com um átomo de hidrogénio no máximo, desde que este esteja orientado de modo bastante definido (i.e. aproximadamente 90 graus em relação à orbital $2p_z$ do azoto).

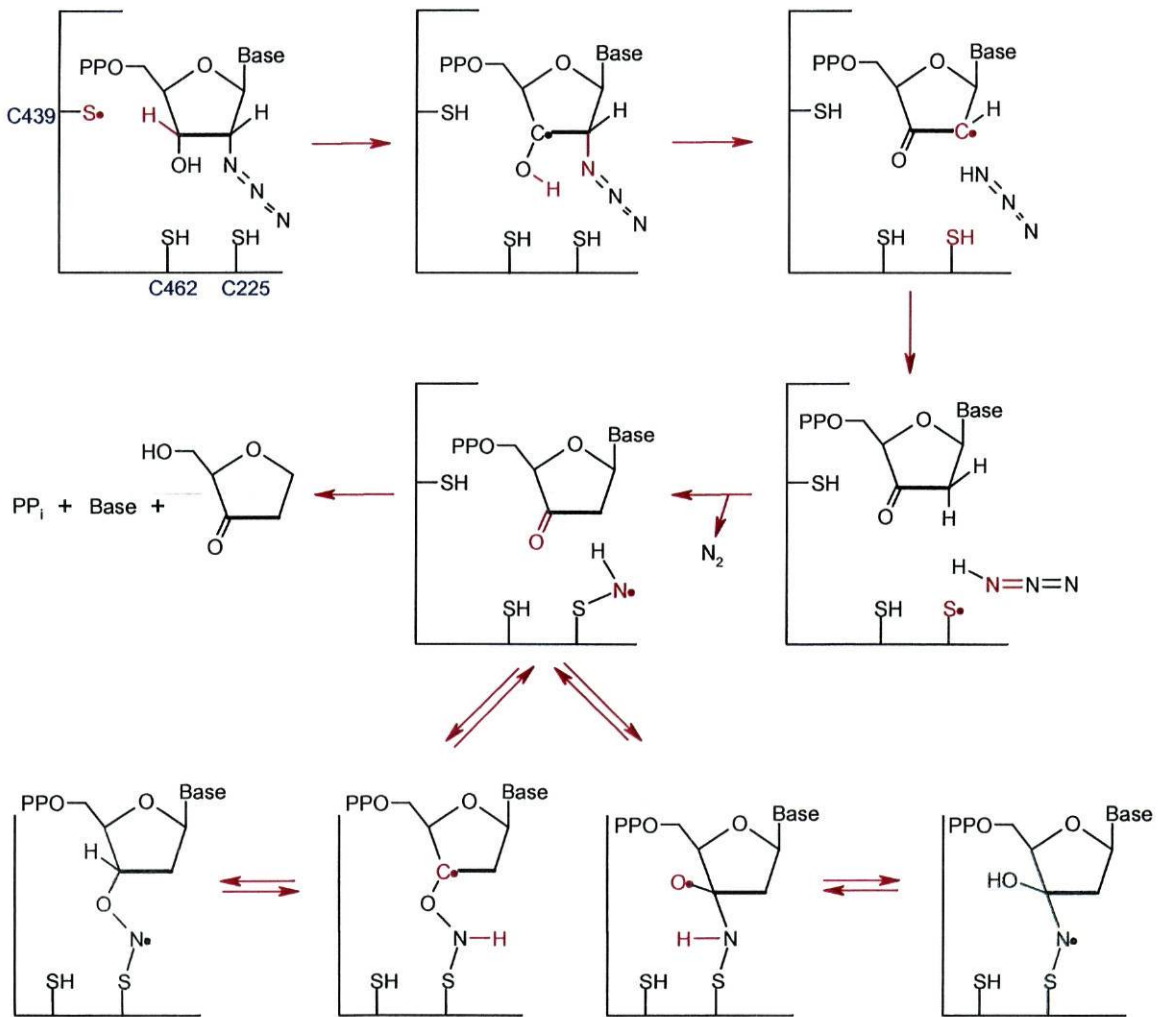


Figura 7. Mecanismo proposto por van der Donk *et al.* para a inibição da RNR pelos N_3dNDP (adaptado de van der Donk *et al.* 1995); as duas alternativas para a estrutura do intermediário radicalar estão representadas a verde.

Van der Donk *et al.* concluíram que o átomo X deveria corresponder ao carbono 3' do inibidor ou ao oxigénio ligado a esse carbono (grupo 3'-OH). A estrutura do intermediário radicalar ficou assim reduzida a duas possibilidades e foi construída uma proposta de

mecanismo, coerente com todas as informações fornecidas pelos estudos experimentais, com duas alternativas reaccionais correspondentes às duas estruturas possíveis para o intermediário (van der Donk *et al.* 1995) – este mecanismo encontra-se representado na figura 7. Uma das alternativas envolve a adição do azoto remanescente do grupo azida (depois da libertação de N_2) ao átomo 3'-O, seguida de uma transferência de hidrogénio do azoto para o carbono 3'; a outra alternativa consiste na adição do mesmo azoto ao carbono 3', seguida da transferência do átomo de H do azoto para o átomo 3'-O. Não se conheciam precedentes químicos para a adição do azoto ao átomo de oxigénio, bem como para ambas as transferências de hidrogénio.

Com o estudo computacional, pretendeu-se verificar a viabilidade do mecanismo proposto e avaliar as duas alternativas reaccionais de modo a esclarecer a estrutura do intermediário radicalar detectado experimentalmente. Simultaneamente foi feita uma exploração do espaço reactivo do sistema, com o objectivo de averiguar a existência de um possível caminho reaccional diferente do proposto, que pudesse ser energeticamente mais favorável.

Os diferentes caminhos reaccionais, para além de comparados entre si, de modo a seleccionar os que possuíssem barreiras energéticas mais baixas, foram também avaliados com base nos limites superiores para a energia de activação do passo limitante, estimados a partir dos valores experimentais da cinética de formação e decaimento do intermediário radicalar.

Das várias possibilidades consideradas, o mecanismo mais favorável é de facto diferente do que havia sido proposto. Uma diferença crucial, que influencia o caminho reaccional a partir do primeiro passo, é o envolvimento de um resíduo do centro activo adicional, para além dos resíduos de cisteína Cis225 e Cis439: o de glutamato Glu441. Este resíduo foi considerado essencial para a redução catalítica do substrato natural, depois da publicação da proposta de van der Donk *et al.* para a inibição da RNR pelos N_3 dNDP. O papel activo que desempenha nesta inibição confirma a sua importância para a química da enzima.

O mecanismo proposto como resultado do estudo computacional está representado na figura 8. O primeiro passo consiste na passagem do protão do grupo 3'-OH para o resíduo Glu441, sendo seguido pela abstracção do átomo de hidrogénio 3'-H pelo enxofre radicalar do resíduo Cis439, num passo que resulta igualmente na saída espontânea do grupo azida da posição 2'. O grupo azida adiciona então ao carbono 3', no que constitui o passo limitante para a formação do intermediário radicalar, e, no mesmo passo, o protão que fora abstraído pelo

Glu441 regressa ao átomo 3'-O. Finalmente, um átomo de hidrogénio é transferido do grupo tiol da Cis225 para o carbono 2' e o enxofre radicalar resultante adiciona ao azoto ligado ao carbono 3', provocando a quebra de uma ligação N-N, a libertação de uma molécula de N₂ e a formação do intermediário radicalar detectado experimentalmente.

Na segunda parte do mecanismo, o intermediário radicalar dá origem à furanona, que será libertada do centro activo e perderá os grupos fosfato e a base azotada em solução, adicionando então covalentemente a um resíduo da subunidade R1. A formação da furanona ocorre em dois passos: o átomo de hidrogénio do grupo 3'-OH é transferido para o azoto radicalar (passo limitante do decaimento do radical, catalizado pelo Glu441) e a ligação C3'-N é quebrada.

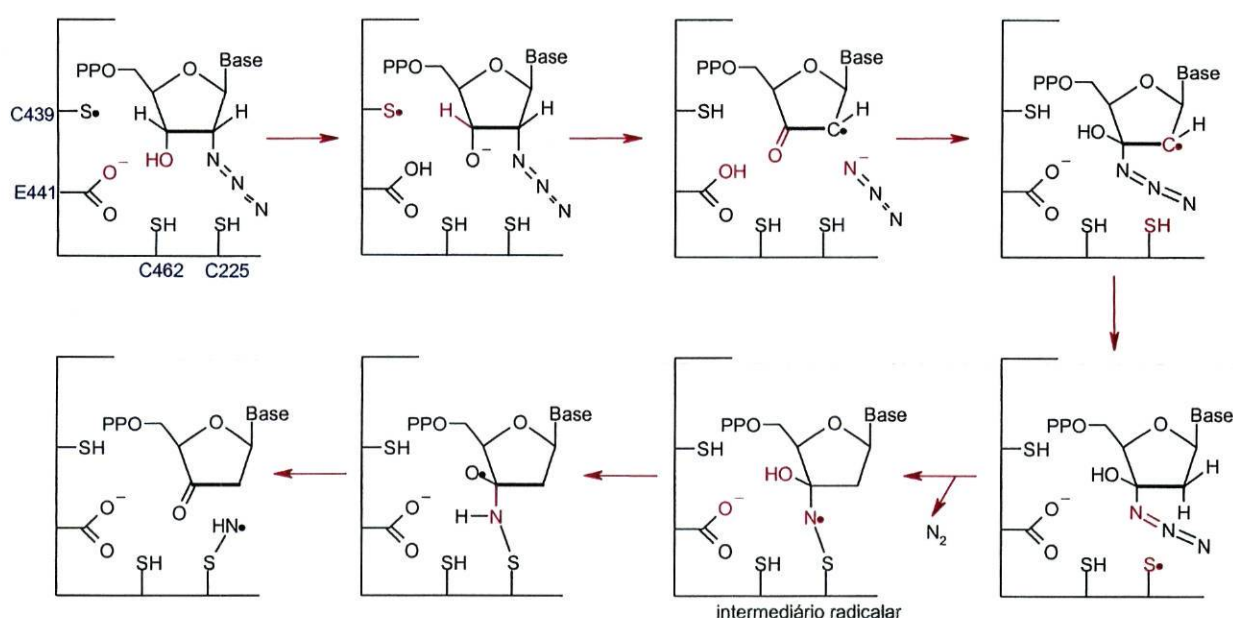


Figura 8. Mecanismo proposto para a inibição da RNR pelos N₃dNDP, com base nos resultados do estudo computacional.

Das duas estruturas alternativas que haviam sido propostas para o intermediário radicalar, a que se forma no novo mecanismo é aquela em que o átomo X consiste no carbono 3' do inibidor. Vários resultados do estudo computacional indicam que esta será, de facto, a estrutura correcta, em detrimento da que possui o azoto radicalar ligado ao átomo de oxigénio 3'-O.

Por um lado, das reacções estudadas, as que consistem na tentativa de adicionar o átomo de azoto ao de oxigénio, apresentam barreiras energéticas decididamente proibitivas. Por outro lado, a comparação dos valores das constantes de acoplamento hiperfino, resultantes do

estudo teórico e obtidos experimentalmente, revelam maior concordância para a estrutura em que o azoto se encontra ligado ao carbono 3'.

Um estudo experimental posterior que analisou a alteração no sinal de EPR do intermediário radicalar, ao utilizar um inibidor com ^{17}O na posição 3', corroborou as conclusões a que havíamos chegado, ao verificar que a estrutura que melhor encaixa nos resultados é a que apresenta o azoto ligado ao carbono (Fritscher *et al.* 2005).

O estudo computacional realizado permitiu esclarecer, entre as duas propostas existentes, qual a estrutura do radical intermediário detectado experimentalmente, e também identificar um novo caminho mecanístico para a interacção dos N3dNDP com a RNR que é o mais favorável energeticamente. As energias envolvidas neste mecanismo e as constantes de acoplamento hiperfino calculadas para a estrutura eleita do intermediário radicalar estão muito próximas dos valores experimentais correspondentes. Mais ainda, o novo mecanismo respeita todos os dados experimentais restantes.

Theoretical Study of Ribonucleotide Reductase Mechanism-Based Inhibition by 2'-Azido-2'-Deoxyribonucleoside 5'-Diphosphates

SUSANA PEREIRA, PEDRO ALEXANDRINO FERNANDES, MARIA JOÃO RAMOS
REQUIMTE/Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto,
Rua do Campo Alegre, 687, 4169-007 Porto, Portugal

Received 2 June 2003; Accepted 14 July 2003

Abstract: 2'-Azido-2'-deoxyribonucleoside 5'-diphosphates are mechanism-based inhibitors of Ribonucleotide Reductase. Considerable effort has been made to elucidate their mechanism of inhibition, which is still controversial and not fully understood. Previous studies have detected the formation of a radical intermediate when the inhibitors interact with the enzyme, and several authors have proposed possible structures for this radical. We have conducted a theoretical study of the possible reactions involved, which allowed us to identify the structure of the new radical among the several proposals. A new reactional path is also proposed that is the most kinetically favored to yield this radical and ultimately inactivate the enzyme. The energetic involved in this mechanism, both for radical formation and radical decay, as well as the calculated Hyperfine Coupling Constants for the radical intermediate, are in agreement with the correspondent experimental values. This mechanistic alternative is fully coherent with remaining experimental data.

© 2003 Wiley Periodicals, Inc. J Comput Chem 25: 227–237, 2004

Key words: 2'-azido-2'-deoxyribonucleoside 5'-diphosphate; ribonucleotide reductase; RNR; mechanism; DFT

Introduction

Ribonucleotide reductase (RNR) is the enzyme responsible for the physiological reduction of ribonucleotides to deoxyribonucleotides,^{1–3} a reaction that constitutes the only cellular source of the DNA monomers. Every cell of the organism has one copy of the DNA molecule, whose integrity is essential to the performance of its proper metabolism and function. When a cell suffers division, it is necessary that a previous replication of DNA has occurred, so that each one of the two daughter cells receives an identical copy of the molecule. Impairment of the DNA synthesis and repair, by inhibition of RNR, leads to a decreased cell proliferation and increased cell death, respectively; these effects will be more strongly felt in tissues with an accelerated metabolism and growth. RNR inhibitors may, therefore, be used in the treatment of cancer to control the growth of malignant tumours;^{4–10} they can also be useful in combined therapies to refrain the virus replication in infections such as the one responsible for AIDS¹¹ (where the host RNR is used by the virus).

There are three different classes of RNR, which seem to have evolved from a common ancestor. All of them catalyze radical mediated reactions.^{2,3} The RNR of *Escherichia coli* is similar to the mammalian (class I RNR), and has served as its prototype in experimental studies. This RNR uses ribonucleoside diphosphates as substrates, and is constituted by two nonidentical subunits, each

of which is composed of two equivalent protomers. One of the subunits (R2) has an oxygen-linked diiron [Fe(III)] center in each protomer and an organic free radical that is localized on a tyrosine residue and is generated and stabilized by the diiron-cluster. The other subunit (R1) contains the binding sites for the substrates and for the nucleoside triphosphates that act as allosteric regulators. The active site residues that seem to be directly involved in the reactions with the substrates are three cysteines, one glutamate,¹² and one asparagine,¹³ these residues are cys225, cys439, cys462, glu441, and asn437 in the *E. coli* RNR. For reaction to occur, the radical localized in a tyrosine residue in R2, has to be transferred to cys439 in R1, probably through a ≈ 35 Å-long chain of conserved residues. The new thiyl radical at cys439 starts the catalysis of the substrates by abstracting the 3'-H of the ribose.^{14,15} During turnover, the thiols of the other two active site cysteines become oxidized and an H₂O molecule is released.

RNR inactivation may be achieved in several ways. Some inhibitors interact with R2 destroying the essential tyrosyl radical or interfering with its passage to R1. Others prevent the association of the two subunits. An important group of inhibitors consists in nucleoside-triphosphates and nucleoside-diphosphates analogs. The first ones interact with the binding sites for allosteric effec-

Correspondence to: M. J. Ramos; e-mail: mjramos@fc.up.pt

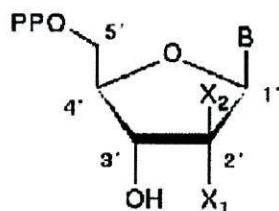


Figure 1. Structure of the RNR substrate, product, and some suicide inhibitors: $X_1 = \text{OH}$; $X_2 = \text{H}$: RNR substrate. $X_1 = X_2 = \text{H}$: product of RNR catalysis. $X_1 = \text{Cl, F, N}_3$; $X_2 = \text{H}$: some RNR inhibitors (substrate analogs).

tors;¹⁶ the others, known as suicide inhibitors, are recognized by RNR as normal substrates, and react with the active site leading to abnormal products that alkylate the protein and turn it enzymatically inactive. In most suicide inhibitors, the 2'-OH group that would be reduced in a normal substrate reaction, is substituted by a different group (see Fig. 1). 2'-Azido-2'-deoxyribonucleoside 5'-diphosphates (N_3dNDP) are a group of such molecules, with different bases connected to $\text{C1}'$. They are presently the most studied, representing a paradigm in RNR suicide inactivation.

2'-Azido-2'-deoxycytidine 5'-diphosphate (N_3dCDP) and 2'-azido-2'-deoxyuridine 5'-diphosphate (N_3dUDP) were among the first RNR suicide inhibitors discovered. Their inhibitory action was reported by Thelander et al., who studied the interaction between *E. coli* RNR and some 2'-modified ribonucleoside diphosphates.¹⁷ It was observed that those inhibitors competed with the natural substrates for the same site on RNR and, during inactivation, the free radical in R2 disappeared.

Later, Salowe et al. utilized specific isotopically labeled N_3dUDP and 2'-azido-2'-deoxyadenosine 5'-diphosphate (N_3dADP) to examine the identity and stoichiometry of the products formed in the reaction between N_3dNDP and RNR.¹⁸ They observed that the 3' carbon-hydrogen bond suffered cleavage during turnover as it was already known to happen with the natural substrate. They also reported that inactivation of RNR occurred in one turnover with the production of 1 equivalent of inorganic pyrophosphate (PP_i), 1 equiv of molecular nitrogen (N_2), 1 equiv of base, and 1 equiv of "sugar" label bound specifically to R1. This covalent modification of R1 was accompanied by the appearance of a characteristic absorbance at 320 nm; the same was observed with other mechanism-based inhibitors, and can be explained by the addition of a ribose-derived furanone to the enzyme.^{19,20}

EPR spectroscopy studies of the RNR interaction with N_3dCDP and N_3dUDP , conducted by Sjöberg et al., revealed the formation of a new transient radical concomitant with the destruction of the tyrosyl one, providing the first direct evidence for radical involvement in RNR mediated reactions.²¹ The analysis of this new EPR signal, followed by several studies with isotopically labeled N_3dUDP ,^{22,23} site-directed mutagenesis of some active site residues²³ and [β - ^2H]-label of R1 cysteines,²⁴ established the structure of the new radical as $\text{XN} \cdot \text{SCH}_2\text{-R1}$. The nitrogen that bears the unpaired electron was part of the azide originally bound to $\text{C2}'$. This radical nitrogen is covalently bound to the sulphur of cys225, and to a X atom that has to be an oxygen or a carbon with no hydrogens bound, or a carbon with a single hydrogen bound but

oriented in a defined fashion, i.e., approximately 90 degrees with respect to the nitrogen's $2p_z$ orbital.

Based on all the experimental data, a putative mechanistic scheme for RNR inactivation by N_3dNDP was proposed by van der Donk et al.,²⁴ shown in Scheme 1 by the blue path. These authors have concluded that the X atom bound to the nitrogen radical is either the $\text{C3}'$ or the 3'-Oxygen of the inhibitor. Thus, their mechanism leads to two possible pathways for the formation of the radical intermediate, as represented in reactions 13 and 14; one involves addition of the nitrogen to the 3'-O atom followed by a H transfer from the N to the $\text{C3}'$ atom, and the other addition of the nitrogen to the $\text{C3}'$ atom followed by an H transfer from the N to the 3'-O atom. The nitrogen addition to the oxygen atom and both H transfers are chemically unprecedented. The pathway usually preferred and adopted as the most probable, as reported even in very recent articles,¹³ is the one that involves addition of the nitrogen to the 3'-O atom.

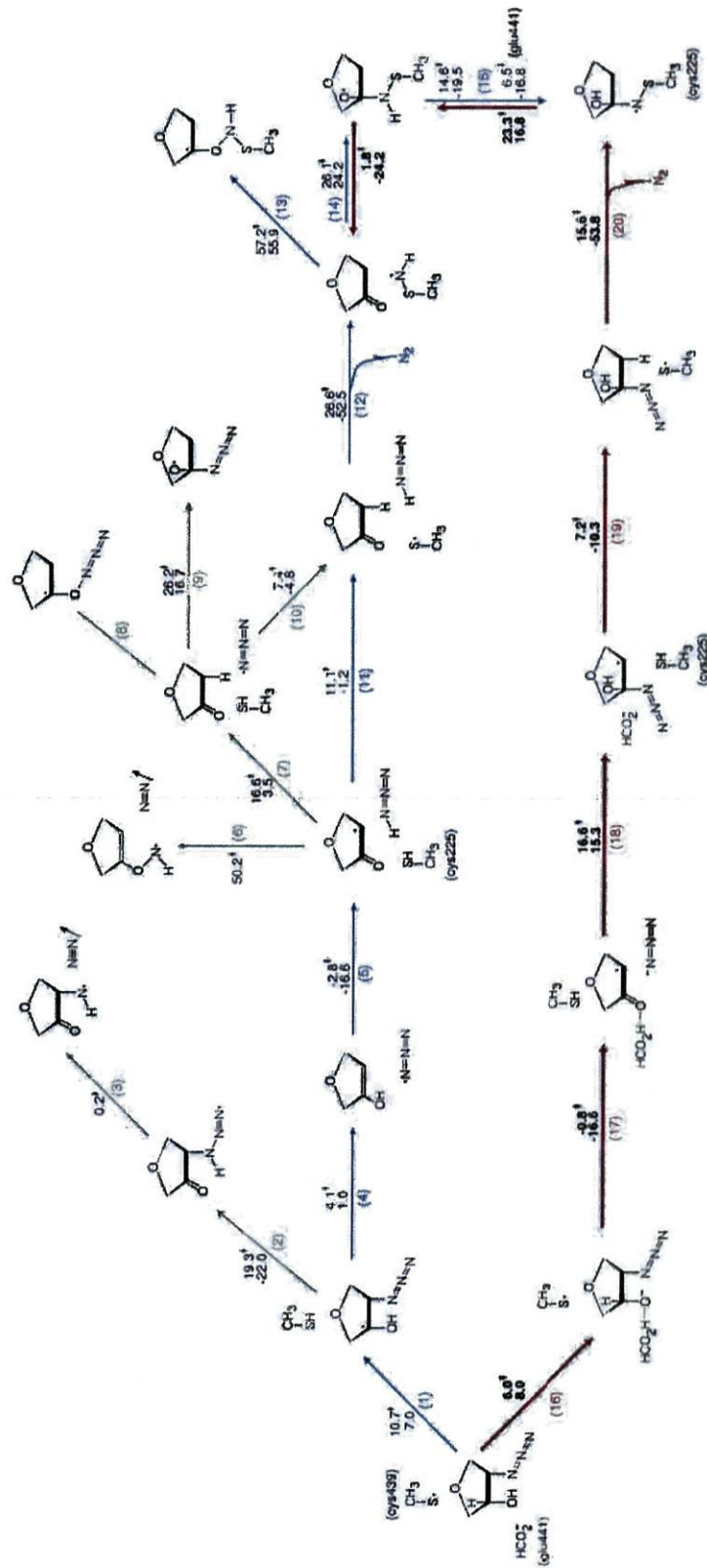
In this work we have tried to check the viability of the reactions proposed, to distinguish between the two mechanistic alternatives, and also test the existence of a different and kinetically more favorable mechanism to achieve the same results.

Theoretical Approach

The theoretical study of RNR inactivation by N_3dNDP was performed using the Density Functional Theory, with the Gaussian98 suite of programs,²⁵ at the unrestricted Becke3LYP level of theory.²⁶⁻²⁸

In geometry optimizations and frequency analysis the 6-31G(d) basis set was used. The zero-point energies were calculated with the same theoretical level. It is well known that larger basis sets give very small additional corrections to the geometries of chemical systems such as the ones studied in this work,²⁹⁻³³ and their use is, hence, considered unnecessary from a computational point of view. The larger 6-311++G(3df,3pd) basis set was used to calculate the energy of the optimized geometries. This basis set is very close to saturation in the present system. For the calculation of hyperfine coupling constants we used the EPR-III basis set with the previously optimized geometries.³⁴

The calculations were performed as described below. First, the geometries of the reactants and products of each mechanistic step were optimized, and those geometries were used to generate a guess for the transition state. When the transition state was located, internal reaction coordinate (IRC) calculations, followed by further tighter optimizations, were performed, to determine which minima were connected to each transition state. Usually, these minima corresponded to the minima first determined. The structures of all reactants and products discussed in this article are the ones resulting from the internal coordinate calculations. The hyperfine coupling constants were calculated for the minima, which corresponded to the structures previously proposed as possible for the radical detected experimentally. Frequency analyses were performed at each stationary point on the potential energy surface. All minima and transition states were identified by the number of imaginary frequencies. A scaling factor of 0.9804 was used for the frequency calculations. Thermal and entropic effects were deter-



Scheme 1. Overview of the reactions studied and respective calculated energies. All energy values are in kcal/mol. The activation free energies (ΔG^\ddagger) are identified with the symbol \ddagger in superscript; the second value, when present, refers to the reaction free energy (ΔG). The bold labels and arrows (colored in red) identify the mechanism that was found to be the more kinetically favored.

mined at physiological temperature (310.15 K) and added to the calculated energies.

The hydrogen-bonded complexes illustrated in this work have a very large number of minima. The particular structures discussed here were the ones that most closely reproduced the geometry of the active site. Therefore, they are not necessarily the absolute minima for the complexes.

According to previous studies on the active sites of proteins, the introduction of a dielectric continuum in the calculations with an empirical dielectric constant of 4 gives good agreement with experimental results, and accounts for the average effect of both the protein and the buried water molecules.^{29,30,35} We calculated the effect of the dielectric continuum³⁶ for each reaction, using that parameter, with the 6-31G(d) basis set (just as we did with all other contributions to the electronic energy). For most reactions, this effect was found to be very small (less than 1 kcal/mol).

In open-shell systems, spin contamination is a frequent problem. It is well known that DFT methods are quite robust to spin contamination, and in the calculations presented here the expectation value for S^2 never reached a value of 0.78 before annihilation. After annihilation, the expectation value for S^2 never exceeded 0.7504. The atomic spin density distributions were calculated with a Mulliken population analysis,³⁷ using the larger basis set.

In the calculations, the cysteines were modeled by methylthiol molecules and the glutamate by a formate molecule. To model the substrate analogs we used the ribose derived ring without the C5', the diphosphate and the base. The adequacy of these models was demonstrated in earlier works.^{32,33}

Results and Discussion

In this work we have studied the most promising pathways that could be involved in the inhibition mechanism of RNR by N_3 dNDP. Considering the active site residues that are known to participate in the enzyme chemistry, and accounting for their steric restraints, the number of pathways that are reasonable from a chemical point of view and that are coherent with the experimental data is somewhat limited. However, some degree of guesswork is inherent to the study. Thus, we focussed on the mechanism already proposed in the literature,²⁴ and explored new paths based on aspects that had not yet been considered—one of these aspects was the role of the active site's glutamate, which was found to be essential in the reduction of the normal substrate.¹²

Some of the studied pathways turned out to be dead ends in the sense that they involved reactions with higher activation free energies, thus leading to minor products.

Additionally, we did base ourselves on the experimentally observed kinetics for the formation and decay of the radical intermediate, to calculate upper limits to the activation free energies (ΔG^\ddagger) of the reactions involved in those processes. Although the nature of the radical decay may be due either to a chemical step or to the dissociation of the enzyme subunits,²³ in the proposed mechanisms the radical is necessary to yield the furanone responsible for R1 labeling, which means that the chemical steps to yield this molecule must be faster than the radical quenching provoked by a dissociation of the enzyme subunits. Therefore, we can use the kinetics of the radical decay to establish an upper limit for the

ΔG^\ddagger of those steps. Sjöberg et al.,²¹ when first detected the radical intermediate, reported the kinetics of its formation and decay; using the Transition State Theory, we can estimate the correspondent ΔG^\ddagger values, at physiological temperature (310.15 K), to be 21.6 kcal/mol (formation) and 22.1 kcal/mol (decay). More recently, Kasrayan et al.¹³ referred somewhat different kinetic values that lead to a ΔG^\ddagger of 18.4 kcal/mol for the rate-determining step in the radical formation and 22.4 kcal/mol for the radical decay. We decided to discard any mechanism with activation free energies well beyond any of those values.

In Scheme 1 we present an overview of all the reactions studied, labeled with the respective free energy values. Reactions represented in the above half of the scheme, presume no involvement from glu441 in the mechanism of inhibition; they include the earlier proposed mechanistic scheme,²⁴ although a little more detailed (blue path), and some alternatives that we explored additionally (green paths). The red pathway, in the bottom half of the scheme, takes into account glu441, and was found to be the path more kinetically favored. We will first discuss briefly reactions 1 to 15 (blue and green paths) of Scheme 1.

Reaction 1

The first reaction of the blue pathway consists in the abstraction of the 3'—H atom by the radical sulphur of cys439. This step is known to be the first in the natural catalysis, and seems to occur with most suicide inhibitors. The ΔG^\ddagger is 10.7 kcal/mol, and the reaction free energy (ΔG_r) is 7.0 kcal/mol. As expected, in the reactants, spin density is concentrated on the S atom of cys439, and in the products, it is undoubtedly on the C3' atom.

Reactions 2 and 3

According to the mechanism that has been proposed earlier,²⁴ the second step towards inhibition would be the formation of a HN_3 molecule and a radical 3'-ketonucleotide. This involves cleavage of the C2'—N bond and abstraction of the hydrogen from the 3'—OH group by N_3 . Reactions 2 and 3 represent the possibility of the hydrogen atom being first abstracted by the proximal nitrogen of the azide. The intramolecular reaction is thermodynamically favored with a ΔG^\ddagger of 19.3 kcal/mol and a ΔG_r of -22.0 kcal/mol, but does not lead to formation of the HN_3 molecule. Instead, there is a kinetically highly favored N—N bond cleavage and N_2 release ($\Delta G^\ddagger = 0.2$ kcal/mol); thus, one nitrogen remains bound to the C2' atom when it is known from experimental data that the C2'—N bond is cleaved during inactivation.²³

Reactions 4 and 5

These reactions represent the possibility of the C2'—N cleavage occurring first, and being followed by the abstraction of the 3'—OH hydrogen atom by the released azide group.

The ΔG^\ddagger for reaction 4 is 4.1 kcal/mol and its ΔG_r is 1.0 kcal/mol. In the products, the spin is almost entirely concentrated in the N_3 molecule with the density delocalized between the two terminal nitrogen atoms.

Reaction 5 has a very small electronic energy barrier (2.47 kcal/mol) that disappears upon addition of zero-point energy and

thermal and entropic effects, and is quite exothermic. In the products, the spin density is mainly located on the C2' atom, although somewhat delocalized to the 3'-O atom.

These two reactions are much more kinetically favored than reactions 2 and 3, which were thus discarded as being part of an important pathway.

Reactions 6, 7, 8, 9, and 10

Once obtained, the HN_3 molecule and the 3'-ketonucleotide radical in reaction 5, several pathways are possible.

Reaction 6 represents the attack of the 3'-O atom by the HN_3 molecule, in an attempt to yield the radical intermediate with the N bound to the oxygen using a different pathway than the one already proposed.²⁴ This attack is very unlikely to happen, given its prohibitive ΔG^\ddagger of 50.2 kcal/mol.

In reaction 7, the donation of a hydrogen atom to the C2' carbon by the HN_3 molecule gives back the azide radical and leads to the formation of a furanone. This 3'-ketonucleotide is a well-known intermediate that is thought to be the responsible for RNR inactivation, after dissociation into solution, loss of the phosphates, and the base and reaction with an enzyme residue.^{18,23}

Reaction 8 is another attempt to add a nitrogen to the 3'-O atom, this time with the attack of the azide radical produced in reaction 7. The product of this addition lies about 60 kcal/mol above the reactants and decays spontaneously to them, indicating that it does not correspond to a stationary point in the potential energy surface.

Addition of N_3 to the C3' atom as represented in reaction 9 is possible, but has a high-energy barrier ($\Delta G^\ddagger = 26.2$ kcal/mol), and is very endothermic ($\Delta G_r = 16.7$ kcal/mol).

In reaction 10, the azide radical abstracts the H atom of the cys225 thiol yielding HN_3 and a thiyl radical. This hydrogen abstraction has a ΔG^\ddagger of 7.4 kcal/mol and a ΔG_r of -4.8 kcal/mol, and is more favorable than the addition of N_3 to the C3' atom.

Overall, in this group of reactions, the path more kinetically feasible is the one constituted by reactions 7 and 10.

Reaction 11

In this step, the C2' atom abstracts the thiol hydrogen of cys225, yielding the same products as the path that involves reactions 7 and 10; the ΔG^\ddagger of 11.1 kcal/mol makes it much faster than the two steps alternative. During this reaction, the HN_3 molecule must remain in the active site, where it is needed for the formation of the nitrogen centered radical intermediate; therefore, its dissociation from the active site has to be slower than reaction 11.

Reaction 12

The following step in the blue pathway consists in the addition of the cys225 radical sulphur to the HN_3 . The products are cys225-SNH and N_2 , with the spin density located mainly on the N but also on the sulphur to which it is bound. It has a very high ΔG^\ddagger (26.6 kcal/mol) but is greatly exothermic ($\Delta G_r = -52.5$ kcal/mol). These values, together with the fact that N_2 easily leaves the active site, make the reaction practically irreversible and, if the

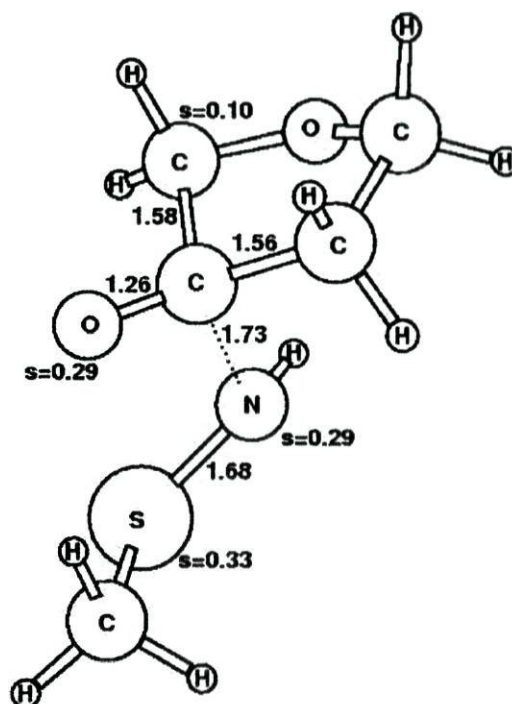


Figure 2. Transition state optimized geometry of reaction 14. Bond lengths are in angstrom and spin densities (s) in a.u.

step were kinetically feasible, the equilibrium would be definitely shifted in favor of the products; however, the energy barrier seems a bit too high to match experimental kinetics.

Reactions 13 and 14

Here, we have two alternative pathways, each leading to one of the two possible structures of the transient radical. The nitrogen centered radical observed by EPR spectroscopy²¹ is proposed to be bound to the sulphur atom of cys225 and to either the carbon C3' or to the oxygen 3'-O; thus, the nitrogen radical formed in reaction 12 has to attack the substrate analog, adding to one of these two atoms.²⁴

Reaction 13 represents the addition of the nitrogen radical to the 3'-O atom. The energies involved in this attack ($\Delta G^\ddagger = 57.2$ kcal/mol and $\Delta G_r = 55.9$ kcal/mol), led us to discard the possibility of the nitrogen-centered radical being bound to the oxygen.

Alternatively, in reaction 14 the nitrogen radical adds to the C3' atom of the furanone. In the reactants, just like in the products of reaction 12, the spin density is located in the nitrogen atom and the sulphur to which it is attached (0.63 and 0.37 a.u., respectively); the N is oriented toward the C3' atom, and is 3.16 Å away from it. The transition state is presented in Figure 2; spin density is now largely delocalized on the sulphur (0.33 a.u.), the nitrogen (0.29 a.u.), the 3'-Oxygen (0.29 a.u.) and the C4' (0.10 a.u.) atoms, and the N is 1.73 Å away from the C3' atom. In the products, the nitrogen is bound to the C3' atom (1.48 Å) and spin density is

mainly located at the 3'-O atom (0.68 a.u.), although somewhat delocalized to the C4' (0.17 a.u.), the C2' (0.06 a.u.) and the S (0.06 a.u.) atoms. This reaction has a ΔG^\ddagger of 26.1 kcal/mol and the ΔG_r is 24.2 kcal/mol, making it rather unfavorable. On the other hand, the reverse reaction is very favored ($\Delta G^\ddagger = 1.8$ kcal/mol and $\Delta G_r = -24.2$ kcal/mol), which is an important aspect because the radical intermediate has to reorganize the furanone responsible for enzyme alkylation.

Reaction 15

The last reaction of the blue pathway consists in the transfer of the hydrogen atom from the nitrogen to the 3'-O. It is an unprecedented step that was proposed to finally yield the radical intermediate detected experimentally.²⁴

The direct transfer of the H atom has a ΔG^\ddagger of 14.6 kcal/mol and a ΔG_r of -19.5 kcal/mol. Although these are acceptable values, perfectly coherent with the experimental data for the formation of the radical, they are too high when it comes to its decay. In fact, the energy barrier for the reverse reaction is 34.1 kcal/mol, about 12 kcal/mol higher than the experimentally deduced ΔG^\ddagger for the radical decay, which means that the radical would disappear faster than the reverse of step 15, preventing the regeneration of the furanone intermediate. Therefore, if the furanone is produced through the reverse of steps 15 and 14, there has to be an active site residue that catalyzes reaction 15 and decreases the energies involved. Glu441 seemed a good candidate for such a role. This residue, in the natural reduction pathway, is important for efficient dehydration of the substrates and is absolutely essential for reduction of the furanon \bar{e} intermediate in position 3';¹² from crystallographic studies it is also known that it interacts with the 3'-OH group of the natural substrate through a hydrogen bond.

The inclusion of the glutamate model in the calculations proved very effective: it reduced the ΔG^\ddagger of the reaction to 6.5 kcal/mol and the ΔG_r to -16.8 kcal/mol. The ΔG^\ddagger for the reverse reaction now becomes 23.3 kcal/mol, exceeding the experimental value in only about 1 kcal/mol. Thus, the reverse of reaction 15 catalyzed by glu441, is a plausible rate-limiting step for the formation of the furanone intermediate.

In the reactants of the glutamate-catalyzed reaction, the proton is connected to the N atom (1.07 Å) at a distance of 2.61 Å from the 3'-O and H-bonded to glu441 (1.64 Å); the spin density is mainly located on the 3'-O atom (0.60 a.u.), although delocalized also to the nitrogen (0.33 a.u.), and the -1 charge is located on the glutamate. In the transition state (Fig. 3), the proton is bound to one oxygen atom of the glutamate and is situated in the space between the 3'-O and the N atoms, although closer to the latter; the spin density is being shared by the nitrogen (0.60 a.u.), the 3'-O (0.23 a.u.) and the sulphur (0.20 a.u.) atoms, and the -1 charge of the system is located on the inhibitor (glu441 has a charge of +0.06). In the products, the proton is connected to the 3'-O atom (1.02 Å long bond), 2.63 Å away from the N and is H-bonded to the glutamate (1.64 Å); the spin density is mainly concentrated on the nitrogen (0.63 a.u.), although delocalized to the sulphur atom (0.35 a.u.), and the charge is located on the glutamate (-1.01).

Glu441 lowers the energy barrier of the reaction by interacting with the proton that is being transferred, thus stabilizing preferen-

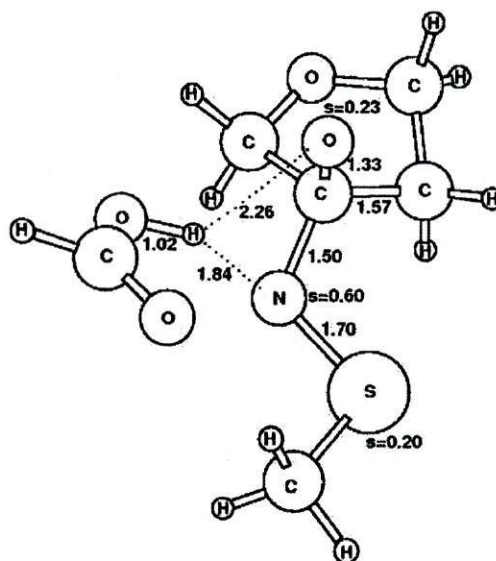


Figure 3. Transition state optimized geometry of reaction 15. Bond lengths are in angstrom and spin densities (s) in a.u.

tially the transition structure; without the glutamate, the hydrogen is transferred via a coupled proton-electron transfer, and with the glutamate included, the mechanism changes and the reaction is accomplished via a proton transfer. This is a good illustration of enzymatic catalysis, by transition-state stabilization, that turns feasible one chemically unprecedented reaction.

Comment

The blue pathway is plausible. It has an overall ΔG_r of -62.3 kcal/mol, the rate-limiting step for the radical intermediate formation is reaction 12 (ΔG^\ddagger of 26.6 kcal/mol), and the rate-limiting one for the furanone formation is the reverse of reaction 15 ($\Delta G^\ddagger = 23.3$ kcal/mol).

There are, however, two main aspects that led us to explore alternative pathways. The first one is concerned with the high-energy barriers of reactions 12 and 14, which seem a bit too high when compared with the observed kinetics. The second refers to the role of glu441: the fact that this residue is important for the last step of the mechanism indicates that it might have an influence in previous reactions and even modify all set of events.

This brings us to the red pathway, represented in the bottom half of Scheme 1, which will now be discussed in detail.

Reaction 16

With residue glu441 included in the calculations, the 3'-OH proton is transferred to the glutamate before the abstraction of the 3'-H atom by the radical sulphur of cys439. The reaction has a ΔG^\ddagger of 6.0 kcal/mol and a ΔG_r of 8.0 kcal/mol.

In the reactants, the spin density is located on the S atom of cys439 (0.96 a.u.) and the negative charge is concentrated on glu441 (-0.93), which is H-bonded to 3'-OH (1.61 Å).

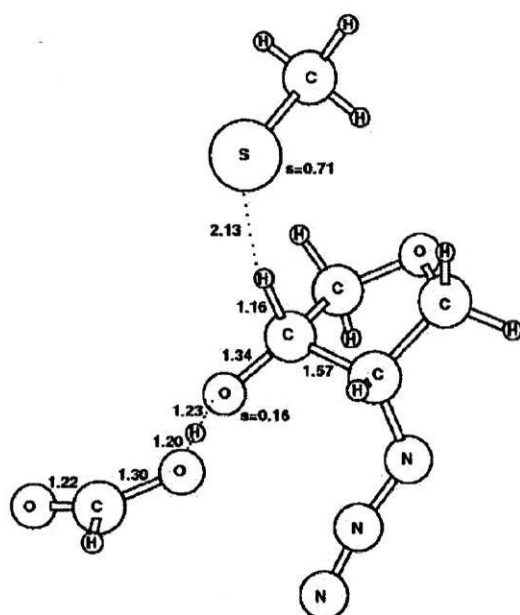


Figure 4. Transition state optimized geometry of reaction 16. Bond lengths are in angstrom and spin densities (s) in a.u.

Figure 4 presents the optimized geometry of the transition state, where the spin density is still mainly located on the sulphur (0.71 a.u.), although somewhat delocalized to the 3'-O atom (0.16 a.u.), and the proton is halfway between the two oxygen atoms (1.23 Å from the 3'-O and 1.20 Å from the glutamate).

In the products, the spin density is slightly more delocalized to the 3'-O atom (0.61 a.u. on the cys439 S and 0.24 a.u. on the 3'-O), and the negative charge is shared by the inhibitor and cys439 (-0.69 and -0.40, respectively); the proton is bound to glu441 (1.06 Å) and H-bonded to the 3'-O atom (1.47 Å). At the end of this reaction, the cys439 sulphur is much closer to the 3'-H (2.04 Å), and the C3'-H bond is elongated to 1.19 Å, which is consistent with the next step being exactly the 3'-H abstraction by cys439.

Reaction 17

This reaction represents the 3'-H abstraction by the sulphur atom of cys439; it is similar to reaction 1 except that now the 3'-OH proton is transferred to the glu441 residue. This reaction has a very small electronic barrier, which disappears after the addition of thermal and entropic corrections becoming localized 0.8 kcal/mol below the reactants. It is also quite exothermic ($\Delta G_r = -16.6$ kcal/mol).

Figure 5 depicts the transition state for this reaction; the 3'-H atom is 1.54 Å away from the C3' and 1.56 Å from the sulphur; the spin density is shared by the C3' (0.45 a.u.), the S (0.28 a.u.) and the 3'-O (0.26 a.u.) atoms; the C2'-N bond is 1.51 Å long.

Extensive IRC calculations show that the azide is spontaneously eliminated after abstraction of the 3'-H by cys439. Thus, in the products, the 3'-H is bound to the S atom (1.35 Å) and the

azide is 2.46 Å away from C2'. The C3'-C2' and C3'-O bonds are 1.40 and 1.27 Å, respectively, which lie between the typical values for simple and double bonds reflecting a keto-enolate equilibrium. The spin density is widely distributed by the C2' (0.34 a.u.), the distal nitrogen (0.27 a.u.), the proximal nitrogen (0.20 a.u.), and the 3'-O (0.16 a.u.) atoms, and the negative charge is shared by the azide (-0.58) and the ribose derived ring (-0.48).

Reaction 18

In this step, we explored a possible addition of the azide to the C3' atom. The reaction is stereochemically favored by the fact that the azide, after leaving the ring, becomes very well positioned to perform the addition to this carbon. Moreover, the EPR spectrum of the radical intermediate is consistent with an N-centered radical connected to C3'.²⁴ The ΔG^* for the addition is 16.6 kcal/mol and the ΔG_r is 15.3 kcal/mol, which means that it is not thermodynamically very favorable, unless the next reaction shifts the equilibrium towards the products.

In the reactants (which did not include cys439 anymore), the spin density is distributed by C2' (0.38 a.u.), the distal nitrogen (0.25 a.u.), the proximal nitrogen (0.19 a.u.) and the 3'-O (0.17 a.u.) atoms, and the negative charge is shared by the azide (-0.62) and the ribose derived ring (-0.46); these distributions are quite

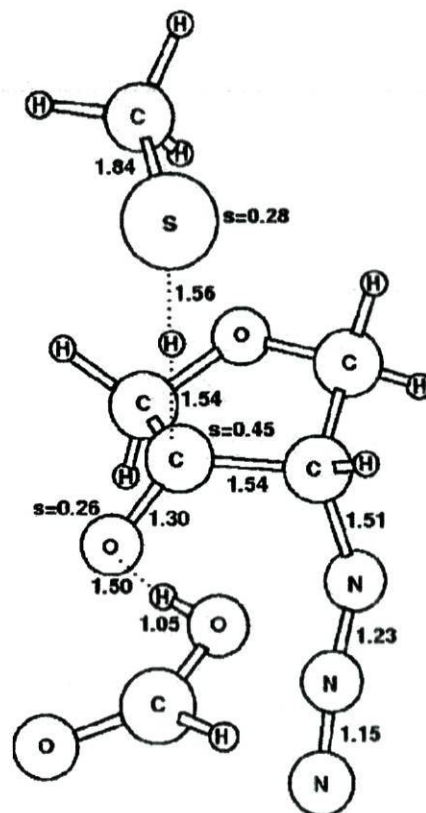


Figure 5. Transition state optimized geometry of reaction 17. Bond lengths are in angstrom and spin densities (s) in a.u.

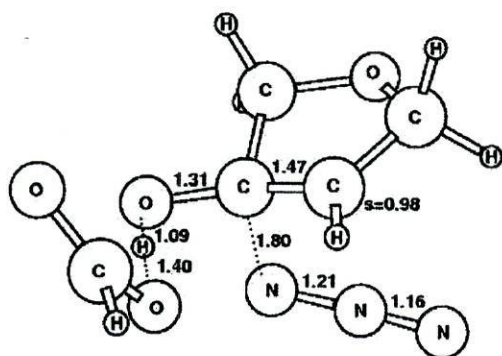


Figure 6. Transition state optimized geometry of reaction 18. Bond lengths are in angstrom and spin densities (*s*) in a.u.

similar to the ones of the products of reaction 17. The C3' atom has approximate sp^2 hybridization and is 3.09 Å away from the nearest azide nitrogen, and the 3'-O atom is still interacting with glu441 through a 1.56 Å long hydrogen bond.

The transition state, presented in Figure 6, is characterized by the spin density being already located on the C2' (0.98 a.u.), and the C3' bonds being longer (1.31 Å for C3'-O and 1.47 Å for C3'-C2') revealing the change to an sp^3 hybridization; another interesting fact is that a proton is simultaneously transferred from glu441 back to the 3'-O atom.

In the products, the azide is bound to C3' (1.61 Å) and the other C3' bonds are longer than at the transition state (1.35 Å for C3'-O and 1.49 Å for C3'-C2'); the proton is definitely transferred to the 3'-O atom (1.05 Å bond) and H-bonded to glu441 (1.52 Å); the spin density is concentrated on the C2' (1.05 a.u.) and the charge on the glutamate (-1.02).

Reaction 19

After the addition of the azide to C3', the spin density becomes localized at the C2' atom, which points to the fact that the pathway should proceed involving this radical center. The obvious reaction is the abstraction of a thiol hydrogen by the carbon atom, mimicking the chemistry behind reaction 11. Cys225 is in an optimal position to perform the transfer, as it is H-bonded to the 2' position in the X-ray structure. The reaction has a $\Delta G^\ddagger = 7.2$ kcal/mol and a $\Delta G_r = -10.3$ kcal/mol.

In the reactants the C2' atom is 4.43 Å away from the thiol hydrogen. In the transition state (Fig. 7) the spin density is shared by the C2' (0.82 a.u.) and the S (0.29 a.u.) atoms, and the thiol hydrogen is halfway between these two atoms. The products have the spin density concentrated on the cys225 sulphur (0.95 a.u.), and the former thiol hydrogen is bound to C2' (1.09 Å long bond) and is 3.20 Å away from the sulphur.

Reaction 20

After the abstraction of the hydrogen by the C2' atom, the sulphur radical newly formed only has to attack the nitrogen bound to the C3' atom, to provoke the N-N bond cleavage, the experimentally

observed N_2 release, and the transient radical formation. The ΔG^\ddagger for this event is calculated as 15.6 kcal/mol. The reaction is hugely exoenergetic ($\Delta G_r = -53.8$ kcal/mol), and almost irreversible due not only to the 69.4 kcal/mol energy barrier of the reverse reaction, but especially to the N_2 fast release from the active site.

In the reactants, the spin density is concentrated on the cys225 sulphur atom (0.97 a.u.); the nitrogen bound to C3' is 3.35 Å away from the sulphur and its N-C3' and N-N bonds are 1.49 and 1.24 Å long, respectively; the other N-N bond is 1.14 Å long.

In the transition state, presented in Figure 8, the spin density is shared by the sulphur (0.54 a.u.) and the distal nitrogen (0.43 a.u.) atoms; the sulphur is 2.13 Å away from the N atom; the N-N bond being cleaved is 1.29 Å and the other N-N bond is 1.16 Å long.

In the products, the sulphur is connected to the nitrogen through a 1.67 Å-long bond and the spin density is shared by these two atoms, although more concentrated on the N; the N-C3' bond is 1.45 Å and the remaining N-N bond in the released N_2 molecule is further shortened to 1.10 Å.

From this radical intermediate we can obtain the final product—the 3'-ketonucleotide that will slowly dissociate from the active site, loose the phosphates and the base, alkylate the protein, and produce a chromophore with a characteristic absorption at 320 nm—just by reverting reactions 15 and 14. The first one, catalyzed by glu441 residue, has a ΔG^\ddagger of 23.3 kcal/mol and a ΔG_r of 16.8 kcal/mol, and the second has a ΔG^\ddagger of 1.8 kcal/mol and a ΔG_r of

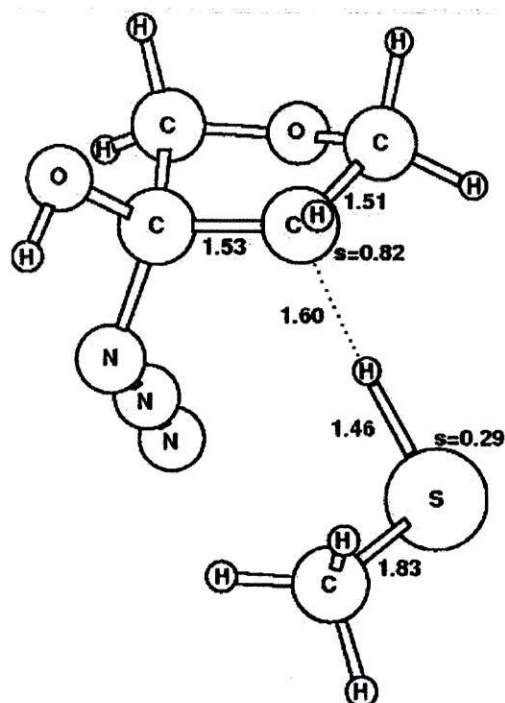


Figure 7. Transition state optimized geometry of reaction 19. Bond lengths are in angstrom and spin densities (*s*) in a.u.

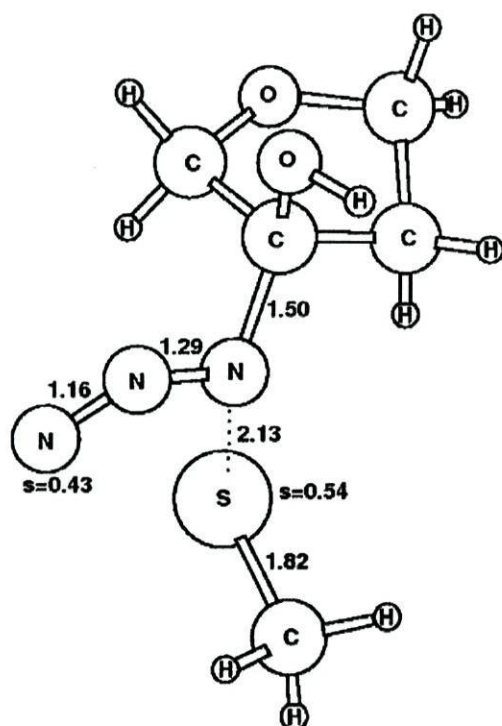


Figure 8. Transition state optimized geometry of reaction 20. Bond lengths are in angstrom and spin densities (s) in a.u.

-24.2 kcal/mol. The two transition states are presented in Figures 3 and 2.

Comment

Once obtained the final 3'-ketonucleotide, we can say that the red pathway has an overall ΔG_r of -64.8 kcal/mol; reaction 18 is the rate determining step for the formation of the nitrogen centered radical intermediate ($\Delta G^\ddagger = 16.6$ kcal/mol), and the reverse of reaction 15 is the rate determining step for the formation of the furanone ($\Delta G^\ddagger = 23.3$ kcal/mol).

Comparing the blue pathway with the red one, we can see that the first has higher energy barriers (namely, in steps 12 and 14), making the latter favored by the theoretical predictions. In Figure 9 we present an energy diagram of these two pathways.

The Structure of the Radical Intermediate

Several experimental studies led to the conclusion that the nitrogen-centered radical intermediate, which appears upon the interaction of N_3dNDP with RNR, is covalently bound to the cys225 sulphur atom in the enzyme active site and suffers a hyperfine coupling interaction from one of its β -hydrogens. The other atom to which it is connected, is proposed to be the carbon C3' or the oxygen atom of the 3'-OH group, in the ribose derived ring.²⁴ As a result of our studies, we can say that the radical nitrogen may, in

fact, be bound to the carbon C3' but not to the 3'-O atom; both the reactions' energetics and the analysis of the hyperfine coupling constants (HCC) support this conclusion.

Every time we tried to perform the addition of the nitrogen to the 3'-O atom, we obtained prohibitively high-energy barriers and extremely unfavorable reaction energies; in reaction 9 the product did not even correspond to a stationary point of the potential energy surface, decaying spontaneously to the reactants.

As for the HCC, by comparing the experimental values with the ones calculated theoretically (Table 1) we can conclude that, although the nitrogen's values are in good agreement for both radical structures, the hydrogens' HCC are well reproduced only in the structure with the nitrogen bound to the C3' atom; in the theoretical calculations there are two β -hydrogen nuclei coupled with the unpaired electron, instead of one, because the cysteine model has one more hydrogen than in the enzyme.

Conclusion

This article describes the main results and conclusions of the theoretical study that we have conducted on the inactivation mechanism of RNR by N_3dNDP .

The long-range stabilization provided by the enzyme and its buried water molecules was simulated in the calculations by the inclusion of a dielectric continuum with an empirical dielectric constant of 4. This correction was added to the calculated energies but, for most reactions, it was found to be very small (less than 1 kcal/mol).

The study allowed us to identify the structure of the radical intermediate that had been detected experimentally. Of the two existing proposals, we conclude that the only possible is the one with the nitrogen bound to the C3' atom of the ribose derived moiety.

We also propose a new mechanistic pathway, which leads to the formation of this stable radical intermediate and subsequently to the production of the furanone effectively responsible for RNR inactivation.

The new pathway begins with the 3'-OH proton abstraction by the glu441 residue and simultaneous weakening of the C3'-H bond. The 3'-H atom is subsequently abstracted by the radical sulphur of cys439, leading to the spontaneous release of the azide from the C2' atom. Then, the azide adds back to the ring, but this time to carbon C3', transferring the spin density to the C2' atom. This is the rate-controlling step for the radical intermediate formation. In the same step, the proton that was first abstracted by glu441 returns to the 3'-O atom. Carbon C2' abstracts a hydrogen from the cys225 thiol, and the resulting sulphur radical attacks the nitrogen bound to the C3' atom provoking the cleavage of a N-N bond, the release of the N_2 molecule and the formation of the detected radical intermediate.

In the second part of the mechanism, the radical intermediate generates the furanone in two steps: the 3'-OH hydrogen is transferred to the nitrogen (rate-controlling step, catalyzed by glu441) and the C3'-N bond suffers cleavage. The unprecedented chemistry of the H transfer between the 3'-O and the nitrogen

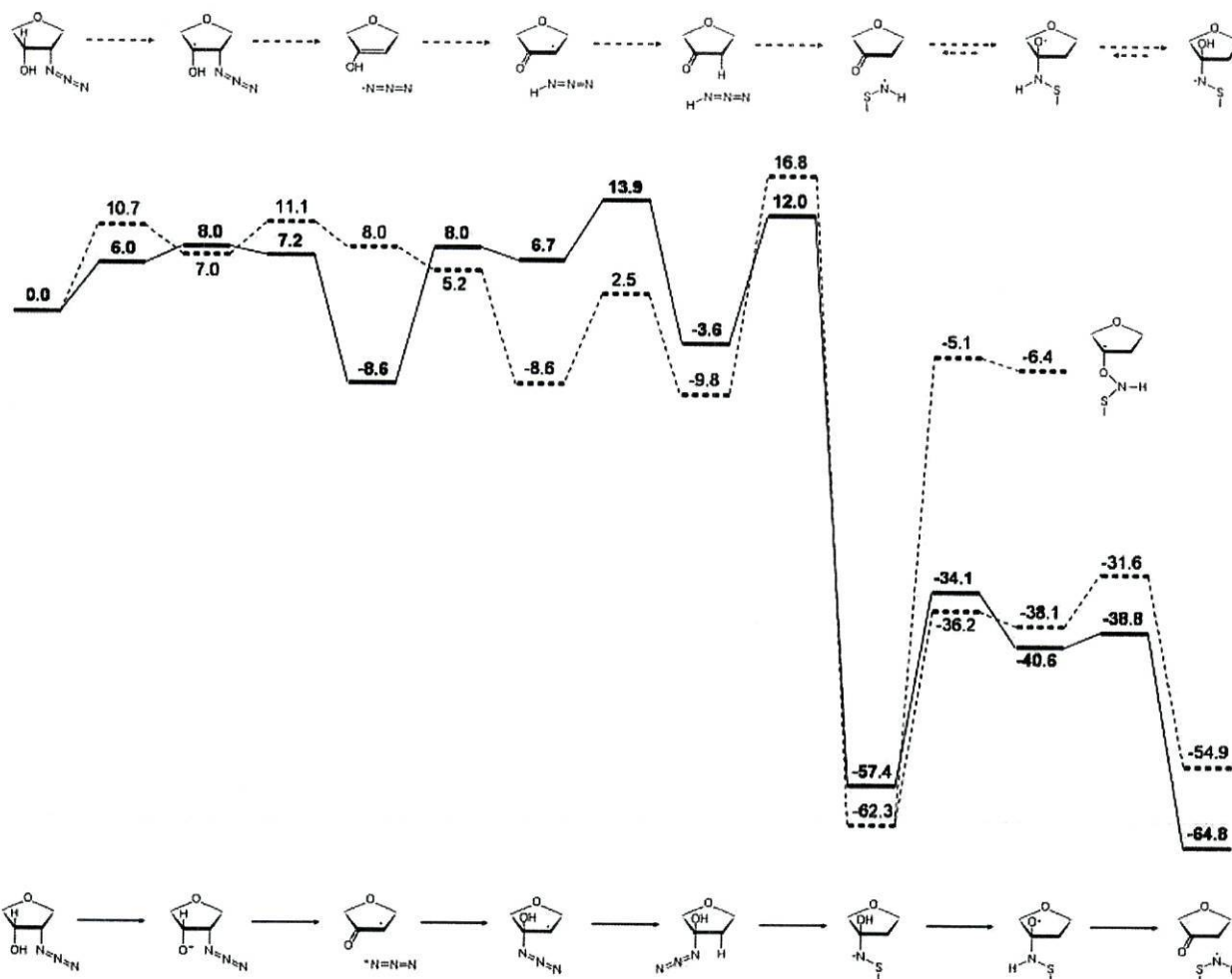


Figure 9. Energetics involved in the blue (---) and red (—) pathways.

atoms was greatly facilitated by enzyme catalysis, demonstrating the amazing capabilities of the RNR catalytic machinery.

This mechanism is so far the most kinetically favorable. The energies involved and the calculated HCC for the chosen structure

of the radical, reveal excellent agreement with the correspondent experimental measurements. It is also entirely consistent with all remaining experimental data.

Table 1. Isotropic Hyperfine Coupling Constants.

B3LYP EPR-III		Experimental Values ²⁴	
RC(3')N · SCH ₃			
N	10.1 G		
H	7.3 G		
H	7.1 G	XN · SCH ₂ R1	
RC(3')ON · SCH ₃			
N	11.4 G	N	11.7 G
H	3.3 G	H	6.3 G
H	3.3 G		
(C3')—H	2.5 G		

Acknowledgments

We thank the NFCR (National Foundation for Cancer Research) Centre for Drug Discovery, University of Oxford, UK, for financial support and the FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) for a doctoral scholarship for Susana Pereira.

References

1. Stubbe, J. *J Biol Chem* 1990, 265, 5329.
2. Reichard, P. *Science* 1993, 260, 1773.
3. Stubbe, J.; van der Donk, W. A. *Chem Rev* 1998, 98, 705.
4. Åkerblom, L.; Reichard, P. *J Biol Chem* 1985, 260, 9197.

5. Heinemann, V.; Xu, Y.-Z.; Chubb, S.; Sen, A.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Plunkett, W. *Mol Pharmacol* 1990, 38, 567.
6. Cory, A. H.; Hertel, L. W.; Kroin, J. S.; Cory, J. G. *Oncol Res* 1993, 5, 59.
7. Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem Pharmacol* 1994, 47, 365.
8. Huang, P.; Plunkett, W. *Semin Oncol* 1995, 22, 19.
9. Merriman, R. L.; Hertel, L. W.; Schultz, R. M.; Houghton, P. J.; Houghton, J. A.; Rutherford, P. G.; Tanzer, L. R.; Boder, G. B.; Grindey, G. B. *Invest New Drugs* 1996, 14, 243.
10. Iwasaki, H.; Huang, P.; Keating, M. J.; Plunkett, W. *Blood* 1997, 90, 270.
11. Bianchi, V.; Borella, S.; Calderazzo, F.; Ferraro, P.; Bianchi, L. C.; Reichard, P. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91, 8403.
12. Persson, A. L.; Eriksson, M.; Katterle, B.; Pötsh, S.; Sahlin, M.; Sjöberg, B.-M. *J Biol Chem* 1997, 272, 31533.
13. Kasrayan, A.; Persson, A. L.; Sahlin, M.; Sjöberg, B.-M. *J Biol Chem* 2002, 277, 5749.
14. Stubbe, J.; Ackles, D. *J Biol Chem* 1980, 255, 8027.
15. Stubbe, J.; Ator, M.; Krenitsky, T. *J Biol Chem* 1983, 258, 1625.
16. Harrington, J. A.; Spector, T. *Biochem Pharmacol* 1991, 42, 759.
17. Thelander, L.; Larsson, B.; Hobbs, J.; Eckstein, F. *J Biol Chem* 1976, 251, 1398.
18. Salowe, S. P.; Ator, M. A.; Stubbe, J. *Biochemistry* 1987, 26, 3408.
19. van der Donk, W. A.; Yu, G.; Silva, D. J.; Stubbe, J.; McCarthy, J. R.; Jarvi, E. T.; Matthews, D. P.; Resvick, R. J.; Wagner, E. *Biochemistry* 1996, 35, 8381.
20. Harris, G.; Ator, M.; Stubbe, J. *Biochemistry* 1984, 23, 5214.
21. Sjöberg, B.-M.; Gräslund, A.; Eckstein, F. *J Biol Chem* 1983, 258, 8060.
22. Ator, M.; Salowe, S. P.; Stubbe, J.; Emptage, M. H.; Robins, M. *J Am Chem Soc* 1984, 106, 1886.
23. Salowe, S.; Bollinger, J. J. M.; Ator, M.; Stubbe, J.; McCracken, J.; Peisach, J.; Samano, M. C.; Robins, M. J. *Biochemistry* 1993, 32, 12749.
24. van der Donk, W. A.; Stubbe, J.; Gerfen, G. J.; Bellew, B. F.; Griffin, R. G. *J Am Chem Soc* 1995, 117, 8908.
25. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G. Jr.; J. A. M.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replege, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian98, Rev. A.9*; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 1998.
26. Becke, A. D. *J Chem Phys* 1993, 98, 5648.
27. Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G. *Phys Rev B* 1988, 37, 785.
28. Hertwig, R. W.; Koch, W. *J Comp Chem* 1995, 16, 576.
29. Siegbahn, P. E. M. *J Am Chem Soc* 1998, 120, 8417.
30. Siegbahn, P. E. M.; Eriksson, L.; Himo, F.; Pavlov, M. *J Phys Chem B* 1998, 102, 10622.
31. Forrester, J.; Frish, A. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 1996.
32. Fernandes, P. A.; Eriksson, L. A.; Ramos, M. *J Theor Chem Acc* 2002, 108, 352.
33. Fernandes, P. A.; Ramos, M. *J Am Chem Soc* 2003, 125, 6311.
34. Barone, V. In *Recent Advances in Density Functional Methods, Part I*; Chong, D. P., Ed.; World Scientific Publ. Co.: Singapore, 1996.
35. Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M.; Babcock, G. T. *J Am Chem Soc* 1998, 120, 8812.
36. Barone, V.; Cossi, M. *J Phys Chem A* 1998, 102, 1995.
37. Mulliken, R. S. *J Chem Phys* 1955, 23, 1833.

3.2. Gemcitabina-5'-difosfato

Depois dos N_3dNDP , considerou-se interessante estudar a gemcitabina-5'-difosfato. Apesar de ser um dos inibidores suicidas da RNR mais promissores para o tratamento de vários tipos de cancro, sabe-se muito pouco sobre o seu mecanismo de inibição e pensa-se que tenha uma forma particular de actuar, que se traduz numa eficácia bastante elevada *in vivo*.

A gemcitabina (2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina ou dFdC) apresenta uma especificidade de acção em termos de ciclo de vida celular, afectando preferencialmente as células em que está a decorrer a replicação do ADN.

O análogo de nucleósido sofre uma dupla ou tripla fosforilação já no interior da célula, através da desoxicitidina cinase, originando gemcitabina-5'-difosfato (dFdCDP) e gemcitabina-5'-trifosfato (dFdCTP). O efeito citotóxico é atribuído a uma combinação de duas acções desempenhadas por estes dois metabolitos: por um lado o dFdCDP inibe a RNR, levando a uma diminuição da concentração celular dos quatro monómeros do ADN; por outro o dFdCTP compete com o nucleósido de que é análogo (desoxicitidina-5'-trifosfato ou dCTP) para ser incorporado no ADN em replicação, provocando o bloqueamento da síntese deste.

A diminuição da concentração celular do nucleótido dCTP, devido à inibição da RNR, leva à fosforilação mais rápida da dFdC nas duas formas activas, à diminuição da eliminação metabólica dos nucleótidos de gemcitabina e ao aumento da incorporação do dFdCTP no ADN, num mecanismo de auto-potenciação que deve explicar, pelo menos parcialmente, a elevada eficácia anti-cancerígena deste análogo de nucleósido.

A elucidação do mecanismo de acção da gemcitabina é um passo muito importante para o desenho de novas moléculas anti-cancerígenas ainda mais específicas e eficazes. No entanto, os dados experimentais, disponíveis até à data, não são suficientes para uma compreensão pormenorizada da sua actividade e, em particular, do mecanismo de inibição da RNR pela gemcitabina-5'-difosfato.

Tal como acontece com os N_3dNDP , o mecanismo de inibição da RNR por análogos dos

substratos envolve frequentemente a formação de uma furanona derivada da ribose que, depois de abandonar o centro activo, reage com a proteína tornando-a cataliticamente inactiva e produzindo um cromóforo com uma absorção característica a 320 nm (Harris *et al.* 1984; Stubbe 1990). Este tipo de inibição é impedido pela adição de agentes redutores que interceptam a furanona em solução. Enquanto a abundância de espécies redutoras no meio celular explica a baixa actividade *in vivo* destes inibidores, a eficácia da gemcitabina indica que o seu mecanismo de inibição será distinto desse paradigma.

De facto, estudos experimentais sobre a interacção da gemcitabina com a RNR não detectaram a formação do cromóforo característico da adição da furanona à proteína e verificaram que a presença de agentes redutores não impede a inibição da enzima, originando apenas uma alteração na maneira como esta é afectada: enquanto a ausência de redutores origina uma perda completa do radical tirosilo e leva à formação de um novo radical centrado no inibidor, a disponibilidade de espécies redutoras previne a perda do radical, mas resulta em inibição provavelmente por adição covalente do inibidor a um resíduo do centro activo (van der Donk *et al.* 1998). Em ambos os casos, ocorre libertação da citosina e dos dois átomos de flúor.

Em estudos experimentais que utilizaram RNR com os resíduos Cis754 e Cis759 mutados para serina, observou-se a perda completa do radical tirosilo, mesmo na presença de agentes redutores. Tendo em conta o papel daqueles resíduos de cisteína na redução da ponte dissulfureto, formada entre os resíduos do centro activo Cis225 e Cis462 durante a catálise da RNR, a diferença no caminho reaccional na presença de agentes redutores parece estar relacionada com a disponibilização destes ao centro activo e, possivelmente, com a redução da mesma ponte dissulfureto.

Ausência de redutores

O estudo computacional sobre a interacção da gemcitabina com a RNR conduziu à primeira proposta de um possível esquema mecanístico para a inactivação da RNR na ausência de espécies redutoras.

Os dados experimentais disponíveis e os conhecimentos sobre os mecanismos catalítico e de inibição suicida, por outros análogos dos substratos, serviram de guia na pesquisa de um caminho mecanístico plausível para a inibição da RNR pelo dFdCDP. Dos vários caminhos

alternativos pesquisados, depois de comparados em termos energéticos, foi seleccionado o mais favorável, apresentado na figura 9.

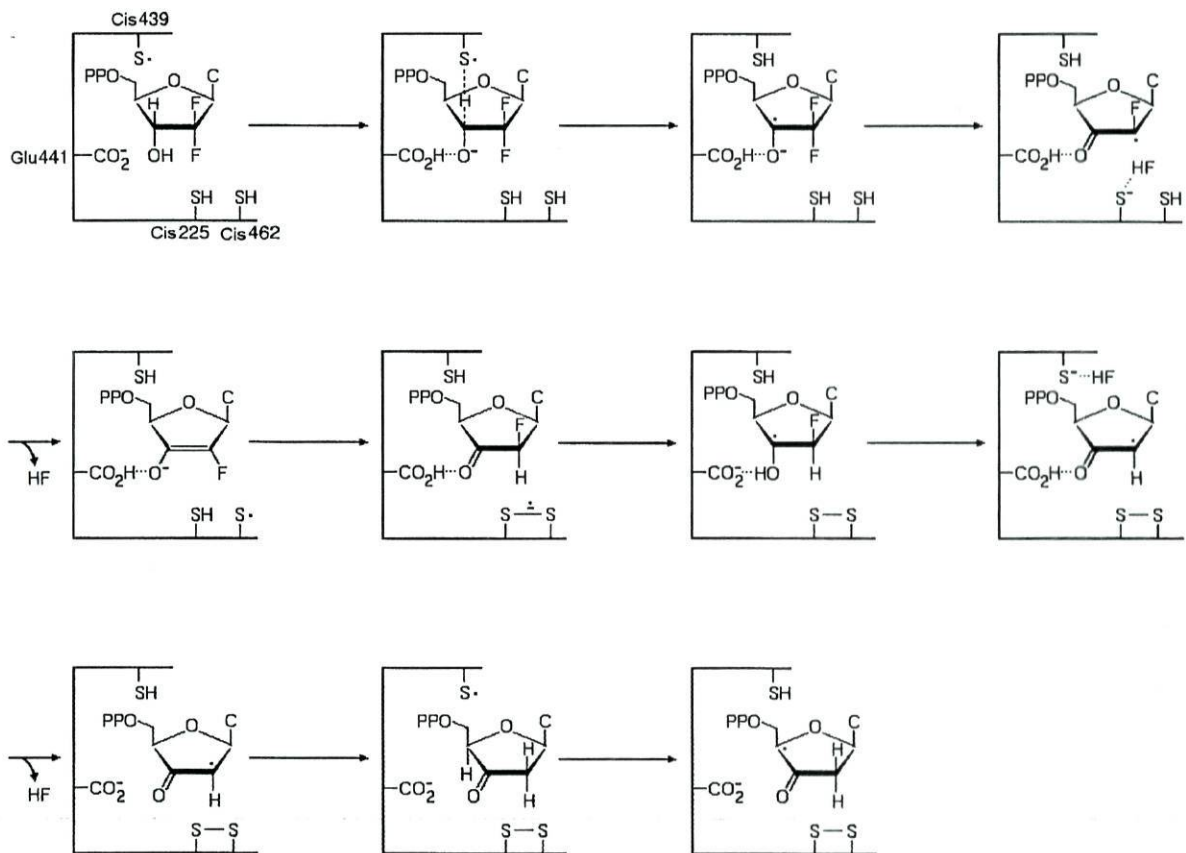


Figura 9. Mecanismo proposto para a inibição da RNR pelo dFdCDP, na ausência de redutores.

As primeiras reacções do mecanismo proposto são equivalentes, até certo ponto, às que se presume terem lugar durante o mecanismo catalítico natural da RNR.

O primeiro passo na catálise da RNR consiste na abstracção do átomo 3'-H pelo radical tiolo do resíduo de cisteína Cis439, pelo que é razoável esperar que os inibidores suicidas da RNR, sendo análogos dos substratos, comecem por sofrer a mesma reacção. Os cálculos indicam, no entanto, que, pelo menos no caso dos N₃dNDP e do dFdCDP, a presença do grupo substituinte no carbono C2' influencia a reactividade da posição vizinha de modo a originar a passagem prévia ou simultânea do protão do grupo 3'-OH para o resíduo de glutamato Glu441. Deste modo, e tal como havia sido sugerido para os N₃dNDP, é proposto que a interacção da gemcitabina-5'-difosfato com o centro activo da RNR, se inicie com a passagem do protão do grupo 3'-OH do inibidor para o grupo carboxílico do Glu441, seguida da abstracção do átomo de hidrogénio da posição 3' pelo enxofre radicalar do resíduo de cisteína Cis439.

De acordo com os dados experimentais existentes, os dois átomos de flúor do dFdCDP são libertados durante a inibição da RNR. O terceiro passo do mecanismo proposto leva à eliminação de um deles – o que se encontra na face α do anel –, depois de protonado pelo grupo tiol do resíduo de cisteína Cis225. Esta reacção é equivalente ao segundo passo da catálise da RNR, onde o grupo 2'-OH é eliminado na forma de H₂O, depois de protonado pelo mesmo resíduo de cisteína.

A eliminação do segundo átomo de flúor da posição 2' não poderá ocorrer no passo seguinte, uma vez que este carbono já se encontra insaturado. Antes da saída do flúor, será pois necessário que o carbono C2' receba um hidrogénio de um dos resíduos do centro activo. Os resíduos que estão melhor posicionados para doar o hidrogénio são os de cisteína Cis225 e Cis439; embora o tiol da Cis225 tenha ficado desprotonado depois da reacção anterior, pode receber um protão do grupo tiol do resíduo de cisteína próximo, Cis462. No mecanismo catalítico da RNR, foi proposto que a saída da molécula de água seria seguida da transferência de protão entre estas duas cisteínas e da subsequente doação do átomo de hidrogénio da Cis225 ao átomo de carbono C2', originando a formação de uma ponte dissulfureto aniónica radicalar, já detectada experimentalmente por espectroscopia de EPR, em estudos com a enzima mutada. Comparando as energias da transferência do hidrogénio a partir do resíduo Cis439 e do Cis225, a última é de facto bastante mais favorável. Assim e, mais uma vez imitando os acontecimentos da catálise natural, o mecanismo prossegue com a regeneração do grupo tiol do resíduo Cis225 através da transferência de protão do resíduo de cisteína Cis462, seguida da doação do átomo de hidrogénio do tiol regenerado ao carbono C2', numa reacção que resulta na formação da ponte dissulfureto aniónica radicalar entre os dois resíduos de cisteína.

Depois da obtenção da ponte dissulfureto aniónica radicalar, e tendo em conta que é provável a ocorrência da formação de uma ponte dissulfureto durante a inibição da RNR pelo dFdCDP, o passo natural seguinte consiste na oxidação da ponte, à semelhança também do que acontece durante a catálise natural. A formação da ponte dissulfureto ocorre com a transferência simultânea do protão do grupo carboxílico do resíduo de glutamato Glu441, de volta para o átomo de oxigénio da posição 3'; como resultado, a densidade de spin fica localizada no carbono C3'.

No mecanismo catalítico da RNR, um átomo de hidrogénio seria agora transferido do grupo tiol do resíduo de cisteína Cis439, de volta para o carbono C3', originando a formação do

desoxirribonucleótido final e a regeneração do radical tirosilo. No caso da interacção com o dFdCDP, o mesmo grupo tiol pode também interagir com o átomo 2'-F restante. Os resultados do estudo computacional indicam que a protonação do átomo de flúor é mais favorável cinética e termodinamicamente do que a transferência do átomo de H para o carbono C3'. Deste modo, o passo 6 do mecanismo proposto corresponde à primeira grande diferença em relação à catálise natural da RNR: nele ocorre protonação do segundo átomo de flúor, que é eliminado na forma de HF, e fica impedida a regeneração do radical tiolo e, conseqüentemente, do tirosilo, na subunidade R2. Simultaneamente, ocorre ainda nova transferência do protão do grupo 3'-OH para o resíduo de glutamato Glu441.

Os passos da proposta de mecanismo, descritos até aqui, estão de acordo e explicam a maior parte das observações experimentais, nomeadamente a libertação dos dois átomos de flúor e a perda do radical tirosilo. Apenas um dado permanece por explicar, a detecção de um novo radical estável, centrado no inibidor, de estrutura não completamente definida. O espectro de EPR apresenta duas interacções de acoplamento hiperfino com núcleos de spin $\frac{1}{2}$, que foram propostos consistir em dois protões do inibidor. Um espectro de EPR semelhante havia sido detectado em estudos com RNR mutada e várias estruturas tinham sido propostas como possíveis para o radical em causa. Um estudo computacional subsequente em que se procedeu à avaliação da estabilidade das várias estruturas radicalares, levou à conclusão que a estrutura com o electrão desemparelhado no carbono C4' seria a estrutura mais provável para o radical desconhecido, sendo os dois hidrogénios do carbono C5' os responsáveis pelas interacções de acoplamento detectadas. As últimas reacções do mecanismo proposto levam à formação desse radical.

No sétimo passo, é sugerido que o enxofre aniónico do resíduo de cisteína Cis439 seja protonado pelo grupo carboxílico do Glu441; tanto a estrutura da RNR – uma simples rotação da ligação $C_{\alpha}-C_{\beta}$ do resíduo de cisteína ($C-CH_2S$) coloca o átomo de enxofre suficientemente próximo do grupo CO_2H do resíduo de glutamato – como os valores de pKa das cadeias laterais dos dois resíduos de aminoácidos – *circa* 4.5 para o glutamato e 8.5 para a cisteína – são concordantes com esta transferência de protão.

De seguida, o grupo tiol do resíduo Cis439 doa o átomo de hidrogénio ao carbono C2' e abstrai um do C4', produzindo deste modo o radical estável proposto ser o detectado experimentalmente, e impedindo definitivamente a regeneração do radical tirosilo essencial para a actividade da enzima.

A última parte do mecanismo, particularmente o passo da abstracção do hidrogénio da posição C4' pela Cis439, é algo polémica porque implica que este resíduo aceda à face α do anel, quando na estrutura cristalográfica ele está a interagir através de uma ponte de hidrogénio com o átomo 3'-H, na face β . No entanto, o facto do inibidor, nesta altura do mecanismo, não se encontrar estabilizado por pontes de hidrogénio com os resíduos Glu441, Cis225 e Cis462 – o primeiro encontra-se desprotonado e os dois últimos oxidados numa ponte dissulfureto –, pode facilitar e permitir o acesso do Cis439 ao átomo 4'-H. Embora o custo conformacional deva ser significativo, depois de ultrapassado, a abstracção do átomo 4'-H é favorecida cinética e termodinamicamente, uma vez que origina a formação de uma estrutura radicalar particularmente estável, onde a distribuição de spin e os comprimentos das ligações revelam a existência de formas ressonantes em equilíbrio.

O mecanismo proposto está de acordo com toda a informação experimental disponível e com os conhecimentos anteriores sobre a catálise e a inibição suicida da RNR. Embora não constitua uma proposta definitiva, em absoluto, pode ser considerado como um ponto de partida sólido para novos estudos experimentais e/ou teóricos que possam contribuir para a sua demonstração ou revisão.

Mechanism for Ribonucleotide Reductase Inactivation by the Anticancer Drug Gemcitabine

SUSANA PEREIRA, PEDRO ALEXANDRINO FERNANDES, MARIA JOÃO RAMOS
REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, Rua do Campo
Alegre, 687, 4169-007 Porto, Portugal

Received 10 October 2003; Accepted 9 March 2004

DOI 10.1002/jcc.20054

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Abstract: Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine, dFdC) is a very promising anticancer drug, already approved for clinical use in three therapeutic indications. It is metabolized intracellularly to 5'-diphosphate (dFdCDP), which is known to be a potent inhibitor of ribonucleotide reductase (RNR). Although several nucleotide analogs show *in vitro* capacity of RNR inactivation, none has shown the *in vivo* efficacy of dFdCDP. Accordingly, the experimental data suggests that its mechanism of inhibition is different from the other known RNR suicide inhibitors. Enzyme inhibition in the absence of reductive species leads to complete loss of the essential radical in subunit R2, and formation of a new nucleotide-based radical. Interestingly, however, the presence of the reductants does not prevent inhibition—the radical is not lost but the targeted subunit of RNR becomes R1, which is inactivated possibly by alkylation. We have conducted a theoretical study, which led us to the first proposal of a possible mechanism for RNR inhibition by dFdCDP in the absence of reductants. This mechanism turned out to be very similar to the natural substrate reduction pathway and only deviates from the natural course after the formation of the well-known disulphide bridge. This deviation is caused precisely by the F atom in the β -face, only present in this inhibitor. The essential radical in R2 is lost, and so is the enzyme catalytic activity. The nucleotide-based radical that constitutes the end product of our mechanism has been suggested in the literature as a possible candidate for the one detected experimentally. In fact, all experimental data available has been reproduced by the theoretical calculations performed here.

© 2004 Wiley Periodicals, Inc. J Comput Chem 25: 1286–1294, 2004

Key words: 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine; gemcitabine; ribonucleotide reductase; RNR; mechanism; DFT

Introduction

Gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine, dFdC) is a deoxycytidine analog that has shown promising results as an anticancer drug. Its use was approved by the FDA for the treatment of patients with non-small cell lung cancer and adenocarcinoma of the pancreas; in Europe it was approved additionally for the treatment of patients with bladder cancer. Moreover, it continues to be employed in multiple essays that assess the clinical benefit of different therapeutic approaches in those and in other types of cancer.^{1–7}

dFdC exhibits cell phase specificity, primarily killing cells undergoing DNA synthesis. It is metabolized intracellularly by deoxycytidine kinase to 5'-diphosphate (dFdCDP) and 5'-triphosphate (dFdCTP) nucleosides (Fig. 1). The cytotoxic effect is attributed to a combination of two actions performed by those two metabolites. First, dFdCDP inhibits ribonucleotide reductase⁸ (RNR), which is responsible for catalyzing the reaction that generates the deoxyribonucleotides required for DNA synthesis and repair; inhibition of RNR causes a reduction in the cellular con-

centration of the four DNA monomers. Second, dFdCTP competes with the natural deoxycytidine 5'-triphosphate (dCTP) for incorporation into the replicating DNA;⁹ once one molecule of dFdCTP is incorporated, an additional deoxyribonucleotide is added to the growing DNA strands, and after that, DNA synthesis can no longer proceed. The decreased intracellular concentration of dCTP, caused by the inhibition of RNR, has important consequences: faster phosphorylation of dFdC to the two active forms, decreased metabolic clearance of the gemcitabine nucleotides by deoxycyti-

Correspondence to: M. J. Ramos; e-mail: mjramos@fc.up.pt

Contract/grant sponsor: Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT); contract/grant number: Pocti/35736/99 to S.P.).

Contract/grant sponsor: National Foundation for Cancer Research (NFCR) Centre for Drug Discovery, University of Oxford.

This article includes Supplementary Material available from the authors upon request or via the Internet at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/0192-8651/suppmat>.

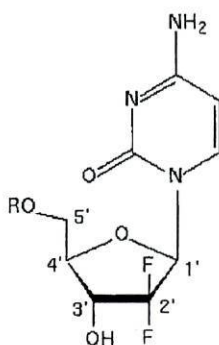


Figure 1. Structure of dFdC (R=H) and its nucleotides dFdCDP (R=PP) and dFdCTP (R=PPP).

dine monophosphate deaminase, and enhanced incorporation of dFdCTP into DNA.^{10,11} This self-potential mechanism should account for the high anticancer efficacy of dFdC as opposed to other nucleoside antimetabolites.

RNR is a ubiquitous enzyme, present in every cell of all living organisms. Although there are different classes of RNR, they are thought to have a common ancestor, and all of them catalyze radical mediated reactions.^{12,13} The *Escherichia coli*'s RNR is related to the mammalian's (they are both class I RNRs), and has served as its prototype in experimental studies. It is constituted by two different subunits. One of them (R1) contains the binding sites for the substrates and the allosteric regulators; the other (R2) has an oxygen-linked diiron cluster that generates and stabilizes the organic free radical essential to the enzyme's activity.¹² The structure of the enzyme has been determined through X-ray crystallography,¹⁴ which facilitated the unraveling of the catalytic mechanism. The active site residues that are thought to play a more active role in the substrate catalysis are three cysteines (cys225, cys439, and cys462), one glutamate (glu441),¹⁵ and one asparagine (asn437).¹⁶ For catalysis to occur, the essential radical, which is localized on a tyrosine residue (tyr122) in R2, has to be transferred to the sulfur atom of the active site cys439 in R1. The natural reduction pathway begins with the 3'-H atom abstraction by the radical sulfur of cys439.^{17,18} The 2'-OH group is subsequently protonated by the cys225 thiol group, and leaves the substrate in the form of an H₂O molecule; simultaneously, there is a proton transfer from the 3'-OH group to the glu441 residue.^{19,20} The cys225 thiol is regenerated through a proton transfer from the cys462 residue and donates the hydrogen atom to the carbon C2';²¹ the spin and charge densities thus become concentrated on these two cysteine residues, which form an anionic radical disulphide bridge.^{22,23} In the following step, the anionic radical disulphide is oxidized to a normal disulphide bond, and a proton is simultaneously transferred from glu441 back to the 3'-O atom, placing the spin density in the carbon C3'.²¹ In the final step, a hydrogen atom is donated by the cys439 thiol group back to the carbon C3', which leads to the formation of the deoxynucleotide product and to the regeneration of the essential tyrosyl radical.¹⁷ After each turnover, the active site cys225 and cys462 form a cystine, that is, they are disulphide bonded. For a new turnover to be possible, the disulphide bond must be reduced to the respective

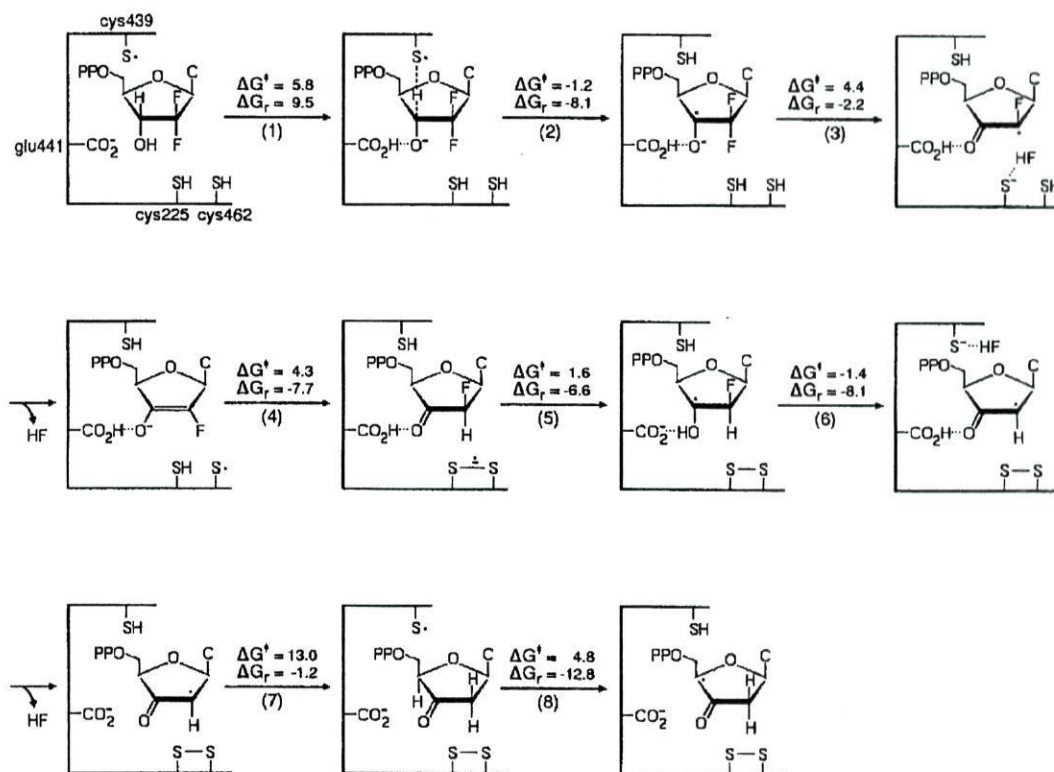
thiols; biochemical and site-directed mutagenesis studies indicate that this happens through a shuttle of reducing equivalents with two other cysteines (cys754 and cys759), located in a flexible arm of R1 that allows them to contact both with the active site and with external reductive species.^{24,25}

The inhibition of RNR by dFdCDP is of the suicide type: the inhibitor is falsely recognized by the enzyme as a natural substrate, and reacts with the active site, leading to abnormal products and loss of the RNR catalytic activity.^{26,27} There are other known RNR suicide inhibitors, but none has shown the *in vivo* efficacy of dFdCDP. Their inhibition mechanism often involves the formation of a ribose-derived furanone that leaves the active site and alkylates the protein, turning it catalytically inactive and producing a chromophore with a characteristic absorption at 320 nm.^{28,29} This type of inhibition is prevented by the addition of reductants such as dithiothreitol (DTT), which intercept the furanone in solution; the abundance of reductive species in the cell explains their low *in vivo* efficacy. The dFdCDP mechanism of action has to be different from the one just described. Accordingly, experimental studies on the interaction of this inhibitor with RNR revealed that there is no chromophore formation, and that the presence of reductants does not prevent inactivation, only changes the targeted subunit of the enzyme.²⁷ Although the absence of reductants leads to complete loss of the essential tyr122 radical in R2, and formation of a new nucleotide-based one, the availability of reducing species prevents the loss of the tyrosyl radical and results in R1 inactivation, probably by alkylation. In both cases, each molecule of dFdCDP inactivates one molecule of RNR with the release of cytosine and two fluorides. The different inhibition pathway seems to depend in the delivery of the reducing equivalents to the active site, as suggested by experimental studies that used RNR with cys754 and cys759 mutated to serines.²⁷ The key issue could be the reduction of a disulphide bond formed between cys225 and cys462, as in the natural pathway.

The elucidation of this different mechanism for RNR inhibition is very important to the design of new anticancer drugs, even more specific and effective; so far, however, it has remained completely elusive. In this work, we have performed a theoretical study of the interaction of dFdCDP with RNR, which led us to the first proposal of a possible mechanistic scheme for RNR inactivation by the gemcitabine nucleotide, in the absence of reductants. Our results are consistent with the experimental observations, and the proposed mechanism seems to be a solid starting basis from where new experiments and theoretical calculations can be envisaged, to achieve full comprehension of such an efficient anticancer drug. As a consequence, in the conclusion we have been able to pinpoint a few suggestions, which might lead to the design of new drugs.

Theoretical Approach

The theoretical study of RNR inactivation by dFdCDP was performed using Density Functional Theory (DFT), with the Gaussian98 suite of programs,³⁰ at the unrestricted Becke3LYP level of theory.³¹⁻³³ For geometry optimizations and frequency analysis the 6-31G(d) basis set was used. The zero-point energies were calculated with the same theoretical level. It is well known that larger basis sets give very small additional correc-



Scheme 1. Proposed mechanism for the RNR inhibition by dFdCDP in the absence of reductants; all energy values are in kcal/mol.

tions to the geometries of chemical systems such as the ones studied in this work,^{20,34–37} and their use is therefore considered unnecessary from a computational point of view. The larger 6-311++G(3df,3pd) basis set was used to calculate the energy of the optimized geometries; this basis set is very close to saturation in the present system. Here we introduced a dielectric continuum³⁸ with an empirical dielectric constant of 4; according to previous studies on the active sites of proteins, the introduction of this parameter in the calculations gives good agreement with experimental results, and accounts for the average effect of the protein and the buried water molecules.^{34,35,39} The atomic spin density distributions were also calculated with the larger basis set, using a Mulliken population analysis.⁴⁰ In open-shell systems, spin contamination is a frequent problem, but it is well known that DFT methods are quite robust in this regard. In the calculations presented here, the expectation value for S^2 never reached a value of 0.765 before annihilation; after annihilation, the expectation value for S^2 never exceeded 0.7501.

The calculations were performed as follows. In each step, we began with a guess for the transition state, generated either by performing a scan of the reaction coordinate or by optimizing the geometries of the respective reactants and products. When the transition state was located, internal reaction coordinate (IRC) calculations, followed by tight geometry optimizations, were performed, to determine which minima were connected to each tran-

sition state. The structures of all reactants and products discussed in this article are the ones resulting from the IRC calculations. Frequency analysis (with a scaling factor of 0.9804) were performed at each stationary point on the potential energy surface; all minima and transition states were identified by the number of imaginary frequencies. Thermal and entropic effects were calculated at physiological temperature and added to the calculated energies.

To model the cysteines and the glutamate we used methylthiol and formate molecules respectively; dFdCDP was modeled without the C5' atom, the phosphates and the cytosine (except in reaction 8 where carbon C5' was also included as a methyl group). The adequacy of these models was demonstrated in earlier works.^{20,37}

Results and Discussion

Available experimental data and earlier knowledge about RNR natural catalysis and suicide inhibition, guided us in the search of a plausible mechanism for RNR inactivation by dFdCDP. Several possible pathways were initially possible; we investigated their energetic and tried to find the most favorable from a kinetic point of view. The mechanism that we propose as being the more plausible is represented in Scheme 1; we shall now discuss these reactions in detail.

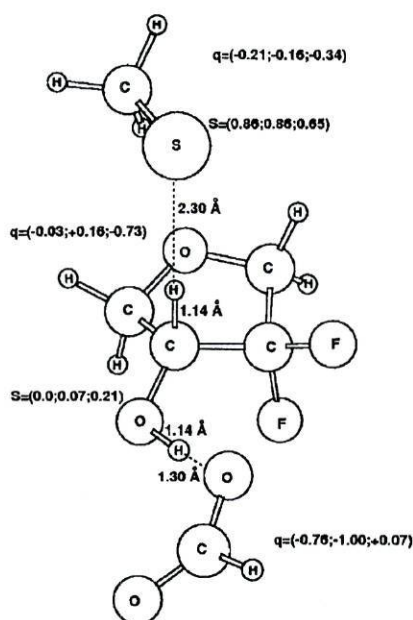


Figure 2. Transition state for reaction 1, labeled with relevant bond lengths and with the charge (q) and spin density (S) distributions of the three geometries (reactants, transition state, products, respectively). The q values (in a.u.) refer to the group (cysteine, inhibitor, and glutamate, respectively); the S values are also in a.u.

Reaction 1—Abstraction of the 3'-OH Proton by glu441

The first step of RNR natural catalysis is the abstraction of the 3'-H atom by the radical sulfur of cys439.¹⁸ Substrate analogs undergo a similar transformation, but as the nature of the group attached to the C2' atom influences the reactivity of the neighbor 3' position, they may suffer a prior or simultaneous 3'-OH proton abstraction by glu441.⁴¹ In the case of dFdCDP, we observed that the first reaction is indeed the 3'-OH proton abstraction by the glutamate residue, with simultaneous weakening of the C3'-H bond. This has been shown by a scan along the cys439-S---H-C3' coordinate; as the cysteine approaches the 3'-H atom, the hydroxyl proton is spontaneously transferred to the glutamate. Thus, the structure with the radical at C3' and the 3'-OH still protonated is not a stationary point on the PES, and decays spontaneously to the products (transferring the proton to glu441). The activation free energy (ΔG^\ddagger) for the abstraction of the hydroxyl proton is 5.8 kcal/mol and the reaction free energy (ΔG_r) is 9.5 kcal/mol. The energy of the transition state becomes lower than the products after the single point calculation, as a result of the dielectric effects.

In the reactants, the spin density is mainly located in the cys439 sulfur atom, and the negative charge in the glu441 residue. The glutamate oxygen that will abstract the 3'-H atom is H-bonded to this group (1.68 Å). The two C—O bonds of glutamate are 1.26 Å long; the C3'-O and the C3'-H bonds are 1.39 Å and 1.10 Å long; the 3'-H atom is 4.90 Å away from the cys439 sulfur.

The transition state is presented in Figure 2. The proton being transferred is now at 1.14 Å distance from the 3'-O atom and 1.30

Å from glu441. The C3'-O and the C3'-H bonds are 1.35 Å and 1.14 Å long, respectively.

In the products, the spin density is somewhat delocalized to the 3'-O atom, although still concentrated in the sulfur; the negative charge has been transferred to the inhibitor and to the cys439 residue. The proton is connected to the glutamate oxygen (1.05 Å) and is H-bonded to the 3'-O atom (1.50 Å). The C3'-O bond is 1.32 Å long; the C3'-H bond is further elongated to 1.19 Å and the 3'-H atom is 2.06 Å away from the sulfur, which is entirely coherent with the next step being exactly the 3'-H abstraction by cys439.

Reaction 2—Abstraction of the 3'-H Atom by cys439

This step consists in the 3'-H atom abstraction by the radical sulfur of cys439. It has a very small electronic barrier that disappears after the addition of thermal and entropic corrections, becoming localized 1.2 kcal/mol below the reactants; the ΔG_r is -8.1 kcal/mol. Such a low barrier was predictable from the very elongated C3'-H bond and the very short distance between the hydrogen and the sulfur atoms.

The transition state (Fig. 3) has the spin density delocalized between the C3', the S and the 3'-O atoms. The hydrogen being abstracted is halfway between the C3' and the S atoms.

In the products, the spin density is delocalized to the C3', the 3'-O, and the C2' atoms; the negative charge is concentrated in the inhibitor, and the 3'-H atom is bound to the sulfur (1.35 Å).

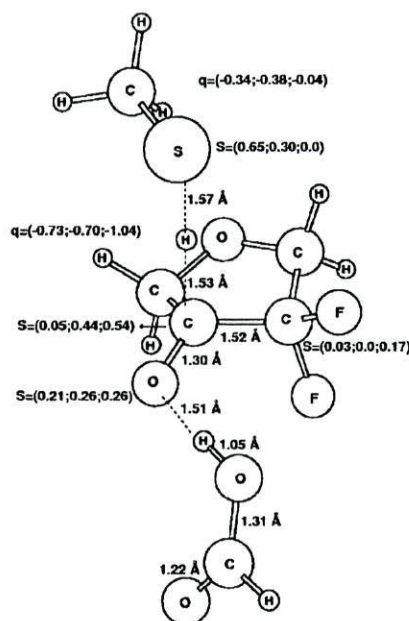


Figure 3. Transition state for reaction 2, labeled with relevant bond lengths and with the charge (q) and spin density (S) distributions of the three geometries (reactants, transition state, products, respectively). The q values (in a.u.) refer to the group (cysteine and inhibitor, respectively); the S values are also in a.u.

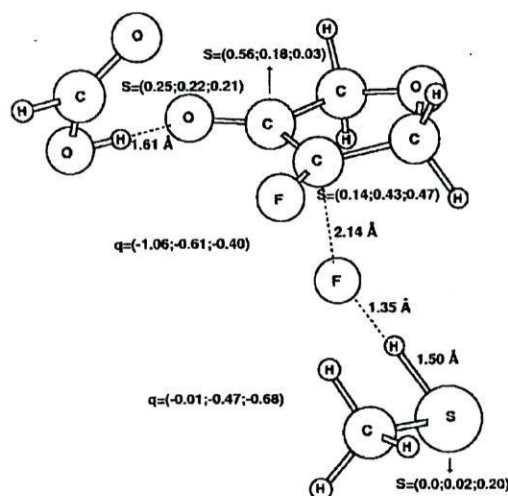


Figure 4. Transition state for reaction 3, labeled with relevant bond lengths and with the charge (q) and spin density (S) distributions of the three geometries (reactants, transition state, products, respectively). The q values (in a.u.) refer to the group (inhibitor and cysteine, respectively); the S values are also in a.u.

Reaction 3—Protonation/Elimination of the α -Fluorine

According to the existing experimental data, two fluorides are lost during RNR inactivation by dFdcDP.²⁷ We searched for plausible mechanisms that could lead to fluoride release inside the active site of RNR, and concluded that only protonation of the F atom by a cysteine thiol would allow its elimination at an acceptable rate. Thus, the third step of our mechanism consists in the release of fluoride from the bottom face (α -face) of the ring, in the form of an HF molecule, with the proton provided by the cys225 thiol. This step was proposed to occur immediately upon activation, as in the natural substrate reduction pathway; it mimics the second step of the normal catalysis, where cys225 is known to protonate the 2'-OH group that leaves the ribose in the form of an H₂O molecule. The reaction is very fast, with a ΔG^\ddagger of only 4.4 kcal/mol and a ΔG_r of -2.2 kcal/mol.

In the reactants, the spin density is shared by the C3', the 3'-O, and the C2' atoms, and the charge is concentrated in the inhibitor. The thiol proton is 2.12 Å away from the fluorine atom, which is bound to the C2' atom through a 1.44 Å long bond; the other C2'-F bond is 1.40 Å long. The glutamate residue is H-bonded to the 3'-O atom (1.38 Å).

In the transition state (Fig. 4), the spin density is delocalized to the same atoms but more concentrated in the C2' atom. The proton is 1.35 Å away from the F and 1.50 Å from the S atoms; the C2' bond to the leaving fluoride is very elongated (2.14 Å); the other C2'-F bond is shortened (1.33 Å).

In the products, the spin density is delocalized to the C2', the 3'-O, and the S atoms; the charge is shared by the cys225 residue and the ribose-derived ring. The newly formed HF molecule is H-bonded to the cys225 sulfur atom (2.00 Å); the H-bond between glu441 and the 3'-O atom is elongated to 1.62 Å, a consequence of the charge transfer from this oxygen to the cysteine.

Reaction 4—Formation of the Anionic Radical Disulphide Bridge

After release of the HF molecule, the inhibitor still retains one fluorine atom bound to the carbon C2'. We know from the experimental data that this F atom will also be released,²⁷ but it cannot be eliminated from an already unsaturated carbon; it is necessary that the C2' carbon abstracts an H atom, prior to elimination of the second fluorine. The active site residues that are in a good position to donate this hydrogen atom are the cysteines cys225 and cys439. Although cys225 is anionic as a result of reaction 3, there can be a proton transfer from the neighbor cys462 thiol, directly or with involvement of the released HF molecule. In the catalysis of the natural substrate, the loss of the water molecule is proposed to be followed by a proton transfer between the two cysteines, and by a subsequent donation of the cys225 thiol hydrogen to the C2' atom;²¹ these reactions lead to the formation of an anionic radical disulphide bridge, already detected by EPR spectroscopy.²³ The fact that cys225 is the active site residue that carries out the reaction in the natural catalysis, seems to rule out the possibility of cys439 being the one involved in the dFdcDP inhibition. Indeed, we investigated the possible participation of this residue and obtained a high ΔG^\ddagger value (15.4 kcal/mol); if the hydrogen is donated by the cys225 thiol, with cys462 included in the calculations, the ΔG^\ddagger becomes as low as 4.3 kcal/mol, making it a much more kinetically favored reaction. Therefore, this step also mimics the natural substrate reduction pathway, giving further support to its occurrence.

In the reactants, after the proton transfer from cys462 to cys225, the spin density is mainly located in the cys462 sulfur, although somewhat delocalized to the C2' atom; the charge is shared by the ribose-derived ring and the cys462 residue. The two sulfur atoms are 4.74 Å away from each other.

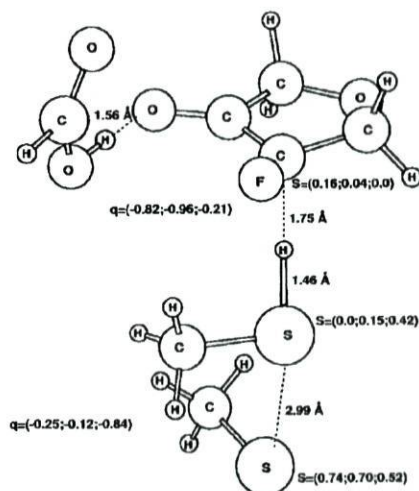


Figure 5. Transition state for reaction 4, labeled with relevant bond lengths and with the charge (q) and spin density (S) distributions of the three geometries (reactants, transition state, products, respectively). The q values (in a.u.) refer to the groups (inhibitor and cysteines, respectively); the S values are also in a.u.

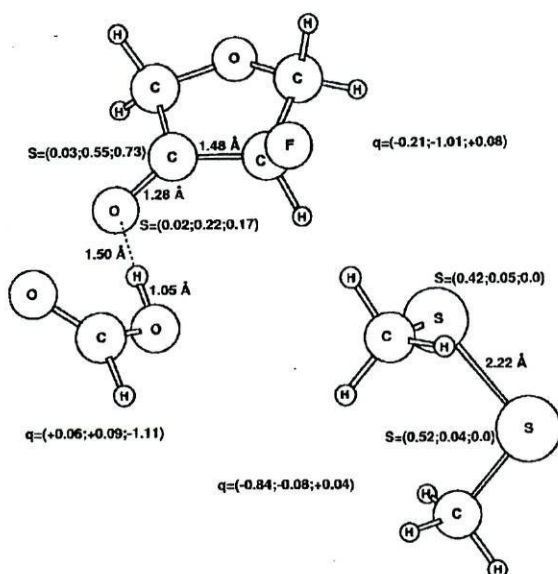


Figure 6. Transition state for reaction 5, labeled with relevant bond lengths and with the charge (q) and spin density (S) distributions of the three geometries (reactants, transition state, products, respectively). The q values (in a.u.) refer to the groups (inhibitor, glutamate, and cysteines, respectively); the S values are also in a.u.

The transition state is presented in Figure 5. The spin density is still mainly concentrated in the cys462 sulfur but is now delocalized to the other cysteine sulfur atom. The cys225 S—H bond is elongated to 1.46 Å and the proton is 1.75 Å away from the carbon C2'; the two sulfur atoms are closer than in the reactants.

In the products, the spin density is definitely shared by the two sulfur atoms (0.94 a.u. in total), and the negative charge is also located on the two cysteine residues. The proton is bound to the carbon C2' (1.12 Å), the sulfur atoms are bonded through a 2.77-Å long anionic radical disulphide bridge, and the glutamate is still H-bonded to the 3'-O atom (1.75 Å).

Reaction 5—Oxidation of the Radical Anionic Disulphide Bond

After obtaining the anionic radical disulphide bridge and giving the fact that a disulphide bond is probably formed during RNR inactivation by dFdCDP, a reasonable following step is the oxidation of the two cysteines. This reaction also occurs with the natural substrate, from a closed-shell ketone intermediate similar to the one obtained in reaction 4 (with the fluorine replaced by a hydrogen atom). The formation of the disulphide bond occurs with simultaneous transfer of a proton from glu441 back to the 3'-O atom, as it was recently demonstrated to happen in the natural catalysis;^{15,21} it is extremely fast, having a ΔG^\ddagger of 1.6 kcal/mol and a ΔG_r of -6.6 kcal/mol.

In the transition state (Fig. 6), the spin density is already delocalized between the C3' and the 3'-O atoms, but the proton is still bound to the glutamate. The disulphide bond is 2.22 Å long.

In the products, the spin density is concentrated in the carbon C3', although still somewhat delocalized to the 3'-O atom, and the charge is located in the glu441 residue. The proton is bound to the 3'-O atom (1.04 Å) and H-bonded to the glutamate (1.52 Å); the disulphide bond is fully formed (2.09 Å), and no charge or spin density are located anymore in the sulfur atoms.

Reaction 6—Protonation/Elimination of the β -Fluorine

The reactions discussed so far mimic the ones proposed for the natural substrate reduction pathway; this step is the one that establishes the real difference between the two situations. In the normal RNR catalysis, the cys439 thiol donates a hydrogen back to the C3' atom, forming the deoxyribonucleotide product and regenerating the initial thiyl radical. Here, the same thiol hydrogen can also interact with the remaining 2' F atom. Our results indicate that protonation of the remaining fluorine is kinetically and thermodynamically favored over hydrogen transfer to the C3' atom; while the former has a very small electronic energy barrier that disappears upon addition of zero-point energy and thermal and entropic effects, and a ΔG_r of -8.1 kcal/mol, the latter has a ΔG^\ddagger of 7.5 kcal/mol and a ΔG_r of -1.2 kcal/mol. Thus, reaction 6 involves protonation of the fluorine, and leads to the formation of a second HF molecule, which simultaneously prevents the regeneration of the thiyl radical and consequently of the tyrosyl one in the R2 subunit.

In the reactants, the spin density is mainly located in the C3' atom, and the charge is concentrated in the glutamate. The fluorine is bound to the C2' atom (1.48 Å) and is H-bonded to the cys439

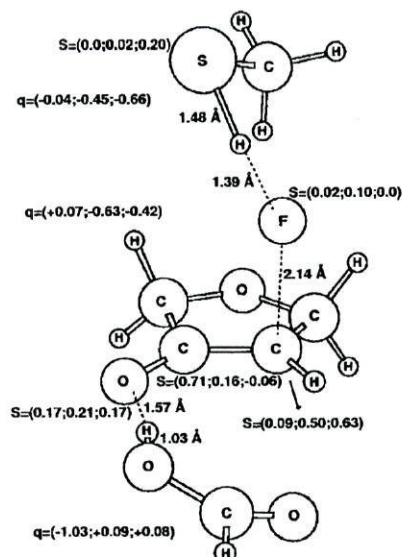


Figure 7. Transition state for reaction 6, labeled with relevant bond lengths and with the charge (q) and spin density (S) distributions of the three geometries (reactants, transition state, products, respectively). The q values (in a.u.) refer to the group (cysteine, inhibitor, and glutamate, respectively); the S values are also in a.u.

thiol group (2.03 Å); the glu441 residue is H-bonded to the 3'-OH group (1.46 Å).

Figure 7 depicts the geometry of the transition state. The spin density is now largely delocalized between the C2', the 3'-O, the C3' and the F atoms. The C2'-F bond is elongated to 2.14 Å and the proton is halfway between the F and the S atoms. Another interesting fact is the concerted proton transfer from the 3'-OH group to the glutamate residue.

In the products, the spin density is primarily located in the carbon C2', although delocalized to the S and the C3' atoms; the charge is mainly concentrated in the cys439 residue, although also present in the ribose-derived ring. The HF molecule is H-bonded to the cys439 sulfur (2.04 Å), and the 3'-O atom is H-bonded to glu441 (1.56 Å).

The anionic sulfur atom of cys439 that resulted from reaction 6 should subsequently be protonated by glu441. From the crystallographic structure of the enzyme,¹⁴ we observe that a simple rotation of the cys439 C_α-C_β bond (C-CH₂S) can bring the sulfur atom close enough to the CO₂H group of the glutamate residue. The side chain pK_a values of the two amino acid residues involved—c.a. 4.5 for the glutamate and 8.5 for the cysteine—indicate that this proton transfer should be fast and complete.

EPR studies on the RNR inhibition by dFdCDP in the absence of reductants detected the formation of a new radical, which was concluded to be substrate based.²⁷ The spectrum is characterized by two hyperfine interactions of the same magnitude with nuclei of spin $\frac{1}{2}$, which were proposed to be two protons of the inhibitor. A similar EPR spectrum was detected in different studies using mutated RNR,¹⁵ and different structures were then proposed as possible candidates for the radical in question. A recent theoretical study has focused on the stability of the different deoxyribose carbon-based radicals.⁴² The C4'-based radical was found to be extremely stable and was proposed to be the unknown radical; the two C5' hydrogens would be the ones responsible for the hyperfine

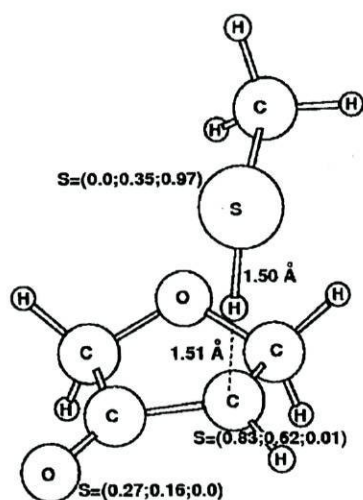


Figure 8. Transition state for reaction 7, labeled with relevant bond lengths and with the spin density (*S*) distribution of the three geometries (reactants, transition state, products) in a.u.

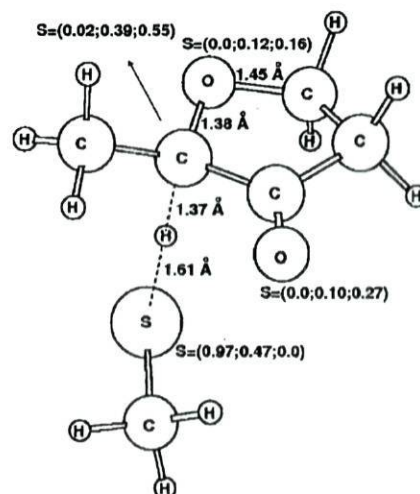


Figure 9. Transition state for reaction 8, labeled with relevant bond lengths and with the spin density (*S*) distribution of the three geometries (reactants, transition state, products) in a.u.

interaction. The two reactions that follow in our mechanism were the only ones that could lead to the formation of that radical.

Reaction 7—Protonation of the Carbon C2'

In this step the thiol hydrogen of cys439 is transferred to the carbon C2', replacing the spin density in the cysteine. The corresponding ΔG^\ddagger is 13.0 kcal/mol and the ΔG_r is -1.2 kcal/mol.

In the reactants, the spin density is concentrated in the C2' atom although somewhat delocalized to the 3'-O; the hydrogen is bound to the S atom (1.35 Å long bond) and is 3.94 Å away from the C2' atom. In the transition state (Fig. 8) the spin density is delocalized among the C2', the S and the 3'-O atoms and the hydrogen is halfway between the S and the C2' atoms. The products have the spin density concentrated on the sulfur atom; the H atom is connected to the carbon C2' (1.10 Å) and is 3.21 Å away from the sulfur.

Reaction 8—Formation of the Very Stable Nucleotide-Based Radical

In this final step, the cys439 thiol radical abstracts the hydrogen from the C4' atom, leading to the formation of the very stable nucleotide-based radical, and definitely preventing the regeneration of the tyrosyl radical in R2, which, from the experimental studies is known to be completely lost.²⁷ Although with the natural substrate cys439 does not reach the α -face of the ring, here there are different conditions that can make that possible to happen: at this point, the inhibitor is no longer stabilized by hydrogen bonds with the active site residues glu441, cys225, and cys462 (the first one is charged and the other two are oxidized to a disulphide). This fact, together with possible interactions with the two eliminated fluorides, allow for some deviation of the inhibitor's position, making possible for cys439 to reach the 4'-H atom.⁴³ Although the conformational cost is significant (calculated to be lower than 18

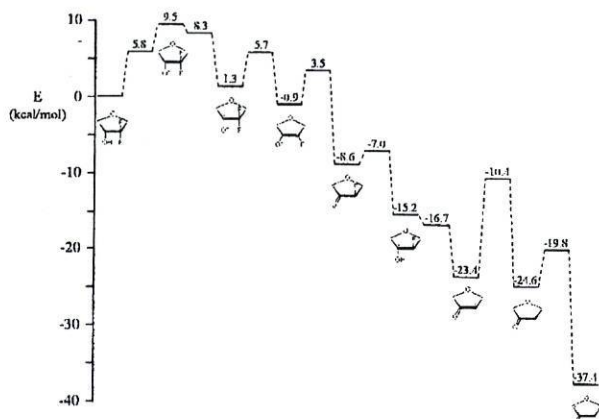


Figure 10. Energetic of the proposed mechanism for RNR inactivation by gemcitabine in the absence of reductants.

kcal/mol for cys225⁴²) it will make this step the rate-limiting one, but clearly reasonable. Once the steric strain is overcome, the abstraction of the 4'-H atom is kinetically and thermodynamically favored with a ΔG^\ddagger of 4.8 kcal/mol and a ΔG_r of -12.8 kcal/mol.

In the reactants, the spin density is located on the sulfur atom, which is 3.32 Å away from the 4'-H atom. The C4'-C3' and C4'-C5' bonds are 1.54 Å and 1.52 Å long, respectively; the two O-C bonds of the ring oxygen are 1.43 Å long.

The transition state is presented in Figure 9. The spin density is now widely delocalized to the S, the C4', and the two O atoms. The O-C bonds of atoms C1' and C4' are no longer equivalent.

In the products, the hydrogen is connected to the sulfur (1.35 Å) and is 5.16 Å away from the carbon C4'. The spin density, although mainly located on the C4' atom, is still somewhat delocalized to the two O atoms. The C4'-C3' and C4'-C5' bonds are both shorter than in the reactants (1.43 and 1.48 Å long, respectively); the two O-C bonds of the ring oxygen are more asymmetric (1.47 Å to C1' and 1.34 Å to C4'). The spin distribution and the asymmetric bonding reveal the existence of resonance forms that stabilize the radical.⁴²

In the experimental studies, the same radical EPR spectrum was observed when the RNR was previously oxidized or when it had cys225 and cys462 mutated to serines. In the face of this, we would be prompted to conclude that the cysteines are not involved in the generation of the radical intermediate. However, our results show that the presence of the reduced cysteines forces the fluoride protonation/elimination to occur with extremely low barriers, that is, 4.4 kcal/mol for the first elimination and a vanishing barrier for the second. As there is clearly no faster alternative pathway to eliminate fluoride inside the active site of RNR, it must follow that fluoride elimination will be cysteine-catalyzed whenever the reaction starts with reduced *wt* R1. Obviously, this does not exclude the fact that fluoride elimination can also occur without cysteine catalysis as it happens with previously oxidized or mutated R1, ultimately leading to the very stable 4'-radical. However, the absence of cysteine catalysis makes the rate for the steps slower than with reduced *wt* R1.

In Figure 10 we present a graphic of the energies involved in

the mechanism. The overall reaction is very favorable with a ΔG_r of -37.4 kcal/mol. Although step 7 has the higher ΔG^\ddagger (13.0 kcal/mol), reaction 8 will be the real rate-limiting step of the pathway (with an energy barrier smaller than 23 kcal/mol), due to the steric strain that has to be overcome for the reaction to take place. To check the viability of this step, we performed QM/MM calculations with a spherical cut of the crystallographic structure of RNR (radius of c.a. 15 Å, including the whole inhibitor and its binding pockets, in a total of 1852 atoms) to estimate the conformational cost of step 8. We obtained, as expected, an energy barrier of 23.3 kcal/mol for this reaction. The details of these calculations have been included in the Supplementary Material.

Conclusion

A theoretical study was conducted on the inactivation of RNR by dFdCDP, which led to the first proposal of a possible mechanism for the enzyme inhibition in the absence of reductants.

The first reactions of the proposed mechanism mimic to some extent the natural substrate catalysis. It begins with the 3'-OH proton abstraction by the glu441 residue and simultaneous weakening of the C3'-H bond, followed by the 3'-H atom abstraction by the radical sulfur of cys439. The 2'-F atom in the α -face of the ring is subsequently protonated by the cys225 thiol group and leaves as an HF molecule. The cys225 thiol is regenerated via a proton transfer from the neighbor cys462 residue and donates the hydrogen atom to carbon C2'; at this point the spin and charge densities become concentrated on cys462 and cys225 residues, which form an anionic radical disulphide bridge. In the following step, a disulphide bond is formed between these two cysteines, and a proton is transferred from glu441 back to the 3'-O atom; as a result, the spin density is placed in the carbon C3'.

In the normal RNR catalysis, a hydrogen atom would now be donated by the cys439 thiol group back to the carbon C3', leading to the formation of the deoxyribonucleotide product and to the regeneration of the tyrosyl radical. Predictably, things happen differently here, and the cys439 thiol group interacts instead with the 2' F atom in the β -face of the ring, leading to the release of a second HF molecule and preventing the regeneration of the initial thiyl radical; simultaneously, in the same step, a proton is transferred from the 3'-O atom to the glu441 residue. The anionic sulfur of cys439 can now suffer a protonation by the glu441 residue; both the crystallographic structure of RNR and the pKa values of the amino acid side-chain groups, make this proton transfer plausible.

After this, the thiol group of cys439 can donate the hydrogen to the carbon C2' and abstract one from the 4' position producing a very stable C4'-centered radical, which will definitely prevent the regeneration of the essential enzyme radical.

The mechanism proposed is consistent with all the experimental data available, as well as with the earlier findings for RNR natural catalysis and inhibition. Even though it was derived through calculations, it should not be regarded as a purely "theoretical" mechanism; in fact, experimental results have determined, to a large extent, the model used for RNR and the pathways investigated among a large number of possible alternatives. It should not be viewed as absolutely definitive; it corresponds instead to a very solid starting basis from where new experiments

and calculations can proceed, to demonstrate/confirm/revise or refine the proposed mechanistic scheme.

The inhibition of RNR by dFdCDP is very efficient, and the unraveling of its mechanism is fundamental in the design of new anticancer drugs. In fact, the results of this work enable us to make some suggestions in this respect. We propose that nucleotide analogs with two good leaving groups in the position 2' will behave similarly to dFdCDP. However, to mimic the normal substrate pathway, just like with dFdCDP, the substituent on the α -face of the inhibitor must be eliminated in the protonated form. This is the case for fluorine or chlorine substituents, but not for an azide.⁴¹ Some examples of such substrate analogs can be the 2'(α)-fluoro-2'(β)-chloro-2'-deoxyribonucleosides, the 2'(α)-chloro-2'(β)-fluoro-2'-deoxyribonucleosides, or the 2',2'-dichloro-2'-deoxyribonucleosides.

References

- Heinemann, V. *Oncology* 2003, 64, 191.
- Fishman, M.; Antonia, S. *Expert Opin Invest Drugs* 2003, 12, 593.
- Kosmas, C.; Tsavaris, N.; Mylonakis, N.; Kalofonos, H. P. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003, 45, 265.
- Tomek, S.; Manegold, C. *Curr Opin Oncol* 2003, 15, 148.
- de Wit, R.; Bellmunt, J. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003, 45, 191.
- Raraty, M. G. T.; Magee, C. J.; Ghaneh, P.; Neoptolemos, J. P. *Acta Oncol* 2002, 41, 582.
- Chau, I.; Watkins, D.; Cunningham, D. *Clin Lymphoma* 2002, 3, 97.
- Heinemann, V.; Xu, Y.-Z.; Chubb, S.; Sen, A.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Plunkett, W. *Mol Pharmacol* 1990, 38, 567.
- Huang, P.; Chubb, S.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Plunkett, W. *Cancer Res* 1991, 51, 6110.
- Plunkett, W.; Huang, P.; Gandhi, V. *Anticancer Drugs* 1995, 6(Suppl 6), 7.
- Plunkett, W.; Huang, P.; Searcy, C. E.; Gandhi, V. *Semin Oncol* 1996, 23(5 Suppl 10), 3.
- Reichard, P. *Science* 1993, 260, 1773.
- Stubbe, J.; van der Donk, W. A. *Chem Rev* 1998, 98, 705.
- Eriksson, M.; Uhlin, U.; Ramaswamy, S.; Ekberg, M.; Regnstrom, K.; Sjöberg, B.-M.; Eklund, H. *Structure* 1997, 5, 1077.
- Persson, A. L.; Eriksson, M.; Katterle, B.; Pötsh, S.; Sahlin, M.; Sjöberg, B.-M. *J Biol Chem* 1997, 272, 31533.
- Kasrayan, A.; Persson, A. L.; Sahlin, M.; Sjöberg, B.-M. *J Biol Chem* 2002, 277, 5749.
- Stubbe, J.; Ator, M.; Krenitsky, T. *J Biol Chem* 1983, 258, 1625.
- Mao, S. S.; Yu, G. X.; Chalfoun, D.; Stubbe, J. *Biochemistry* 1992, 31, 9752.
- Lenz, R.; Giese, B. *J Am Chem Soc* 1997, 119, 2784.
- Fernandes, P. A.; Eriksson, L. A.; Ramos, M. J. *Theor Chem Acc* 2002, 108, 352.
- Cerqueira, N. M. S. A.; Fernandes, P. A.; Eriksson, L. A.; Ramos, M. J. *Theo Chem*, accepted for publication.
- Stubbe, J. *J Biol Chem* 1990, 265, 5329.
- Lawrence, C. C.; Bennati, M.; Obias, H. V.; Bar, G.; Griffin, R. G.; Stubbe, J. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96, 8979.
- Lin, A. N. I.; Ashley, G. W.; Stubbe, J. *Biochemistry* 1987, 26, 6905.
- Mao, S. S.; Holler, T. P.; Yu, G. X.; Bollinger, J. M.; Booker, S.; Johnston, M. I.; Stubbe, J. *Biochemistry* 1992, 31, 9733.
- Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J.; Lippert, B.; Jarvi, E.; Resvick, R. *J Med Chem* 1991, 34, 1879.
- van der Donk, W. A.; Yu, G.; Pérez, L.; Sanchez, R. J.; Stubbe, J.; Samano, M.; Robins, M. J. *Biochemistry* 1998, 37, 6419.
- Harris, G.; Ator, M.; Stubbe, J. *Biochemistry* 1984, 23, 5214.
- Salowe, S. P.; Ator, M. A.; Stubbe, J. *Biochemistry* 1987, 26, 3408.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G., Jr.; Montgomery, J. A. M.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Rega, N.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 98*, Revision A.11.2; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 1998.
- Becke, A. D. *J Chem Phys* 1993, 98, 5648.
- Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G. *Phys Rev B* 1988, 37, 785.
- Hertwig, R. W.; Koch, W. *J Comp Chem* 1995, 16, 576.
- Siegbahn, P. E. M. *J Am Chem Soc* 1998, 120, 8417.
- Siegbahn, P. E. M.; Eriksson, L.; Himo, F.; Pavlov, M. *J Phys Chem B* 1998, 102, 10622.
- Forrester, J.; Frish, A. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 1996.
- Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *J Am Chem Soc* 2003, 125, 6311.
- Barone, V.; Cossi, M. *J Phys Chem A* 1998, 102, 1995.
- Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M.; Babcock, G. T. *J Am Chem Soc* 1998, 120, 8812.
- Mulliken, R. S. *J Chem Phys* 1955, 23, 1833.
- Pereira, S.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *J Comp Chem* 2004, 25, 227.
- Himo, F.; Siegbahn, P. E. M. *J Phys Chem B* 2000, 104, 7502.
- Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *Chem Eur J*, 2003, 9, 5916.

**-Supplementary Material-
QM/MM Calculations on Step 8**

To estimate the conformational cost of step 8, we performed QM/MM calculations on a very large model of RNR. The system corresponds to a spherical cut centered on the active site, with a radius of c.a. 15 Å, and includes the whole inhibitor, with the base and the phosphates, plus the respective binding pockets, in a total of 1852 atoms.

The calculations were performed with the ONIOM facility of Gaussian 03. The system was divided in three layers: (1) the ribose and the $-\text{CH}_2-\text{S}^\cdot$ group of cys439 were studied with DFT (B3LYP/6-31G(d)); (2) the phosphates and the base were studied with a semi-empirical method (PM3) and (3) the rest of the system was studied with molecular mechanics (UFF).

We optimized the structure of the reactants (fig. 1-3) and obtained an extrapolated energy of -783.537046 hartree.

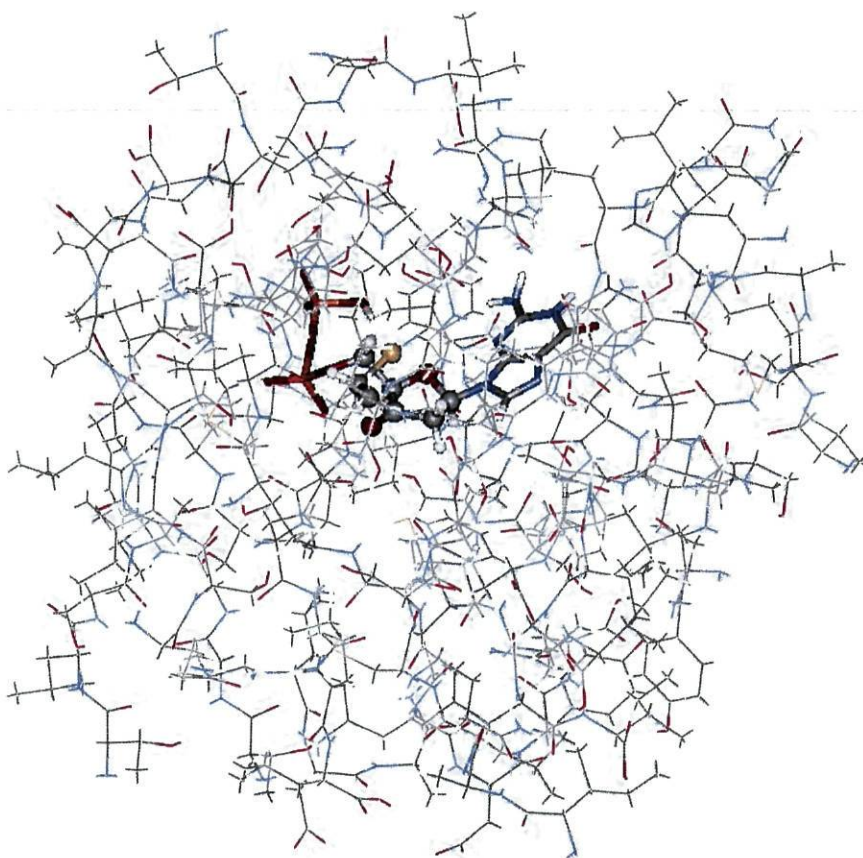


Fig. 1 Optimized structure of the reactants (layer 1: ball and stick; layer 2: stick; layer 3: wire).

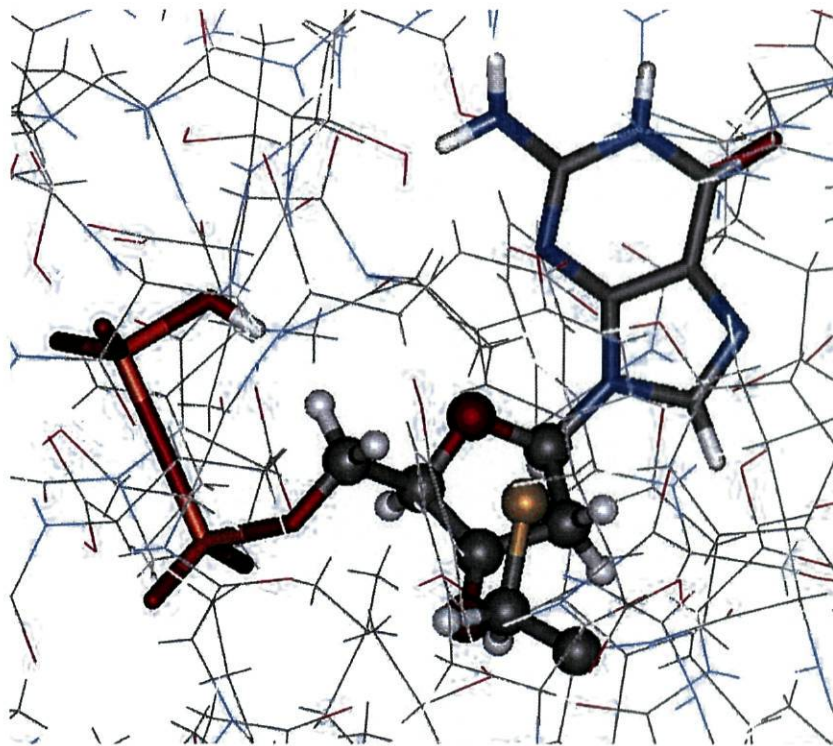


Fig. 2 Close up of the optimized structure of the reactants.

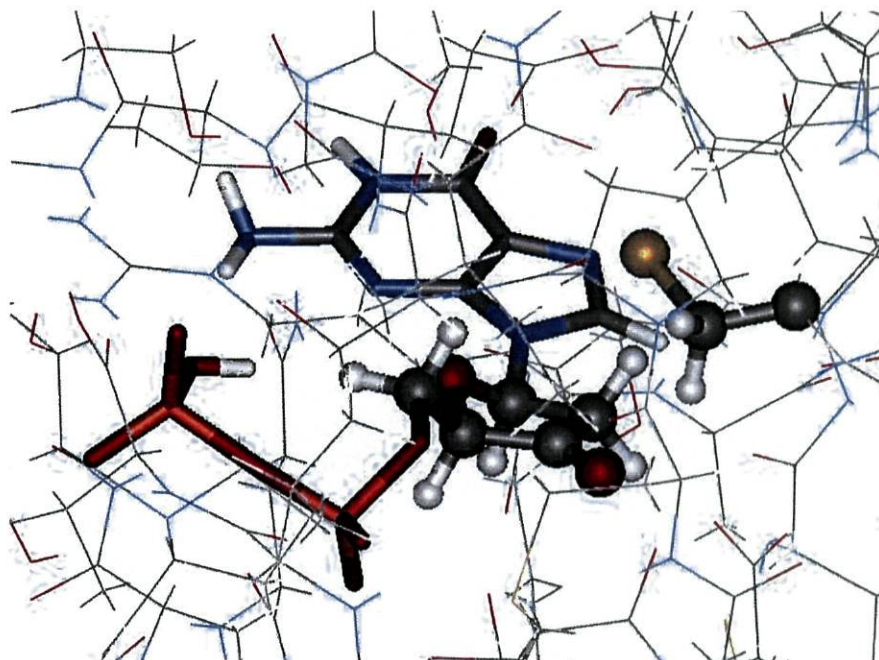


Fig. 3 Another close view of the optimized structure of the reactants.

After a scan along the reaction coordinate, we performed an optimization of the system, keeping the distances $\text{cys439-S} \cdots 4'\text{H}$ and $\text{H} \cdots \text{C4}'$ frozen at the transition state values found before, i.e. 1.61 Å and 1.37 Å respectively. For this structure (fig. 4-6) we obtained an extrapolated energy of -783.497767 hartree.

The energy difference between the two structures is therefore 24.7 kcal/mol. If we add the zero point energy and the thermal correction that have been calculated in the gas phase, we obtain an approximate activation energy of 23.3 kcal/mol.

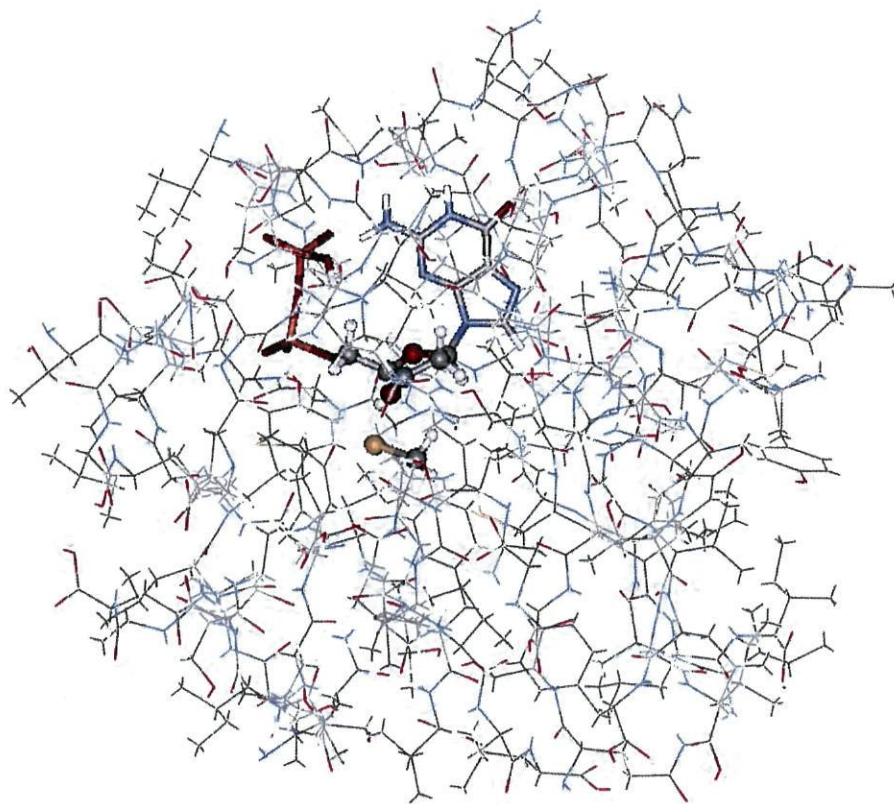


Fig. 4 Overview of the optimized structure of the "transition state".

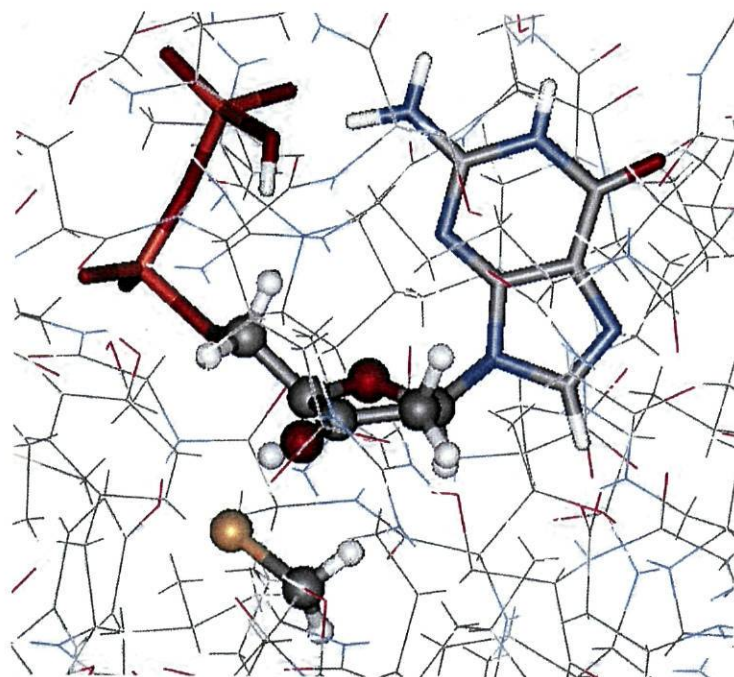


Fig. 5 Close up of the optimized structure of the "transition state".

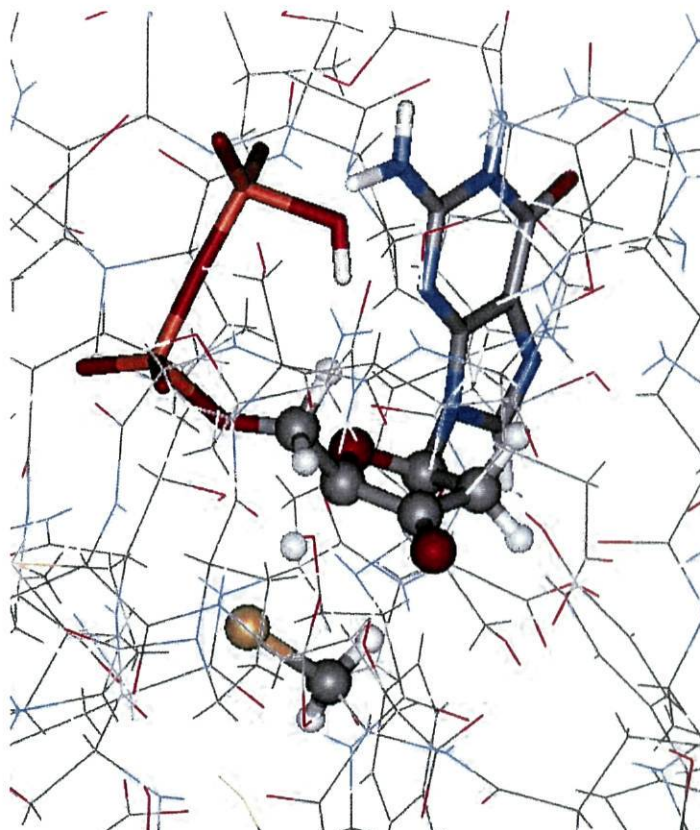


Fig. 6 Another perspective of the optimized structure of the "transition state".

Presença de redutores

O mecanismo de inibição da RNR pela gemcitabina-5'-difosfato (dFdCDP) na presença de redutores, que deverá ser o responsável pela eficácia clínica deste composto devido à abundância de espécies redutoras no meio celular, não foi elucidado pelos cálculos computacionais efectuados.

Os estudos experimentais sobre a interacção do dFdCDP com a RNR haviam revelado divergências no mecanismo de inibição consoante existissem espécies redutoras disponíveis no meio ou não: enquanto na ausência de redutores o radical tirosilo desaparecia, surgindo o sinal de um novo radical centrado no inibidor, a disponibilidade de espécies redutoras prevenia a perda do radical, mas resultava em inibição da RNR provavelmente por adição covalente do inibidor a um resíduo do centro activo.

A utilização de uma enzima com os resíduos Cis754 e Cis759 mutados em resíduos de serina originou o mecanismo de inibição observado na ausência de redutores, mesmo quando estes estavam disponíveis (van der Donk *et al.* 1998). Em condições fisiológicas normais, os resíduos Cis754 e Cis759 medeiam a redução da ponte dissulfureto formada durante a catálise, entre os resíduos Cis225 e Cis462, de modo a regenerar os respectivos grupos tiol e possibilitar um novo ciclo catalítico à RNR. A proposta de mecanismo, baseada nos cálculos computacionais, para a inibição da RNR pelo dFdCDP na ausência de redutores, envolve a formação da mesma ponte dissulfureto. Deste modo, o mecanismo diferenciado de inibição, resultante da disponibilização ou não de espécies redutoras ao centro activo, pode estar directamente relacionado com a redução dessa ponte.

Admitindo esta possibilidade, o mecanismo de inibição inicial seria idêntico na ausência e na presença de espécies redutoras, divergindo apenas após a formação da ponte dissulfureto, já que a sua redução alteraria o curso reaccional de alguma forma, levando às duas consequências observadas experimentalmente, i.e. a regeneração do radical tirosilo e a inibição da RNR possivelmente por alquilação.

O caminho delineado para o estudo computacional envolveu a exploração de caminhos reaccionais que divergissem do caminho proposto na ausência de redutores, após a formação da ponte dissulfureto, e que obedecessem aos seguintes critérios:

-envolvimento dos resíduos Cis462 e Cis225 reduzidos, de modo a justificar a necessidade de espécies redutoras;

-relocalização do carácter radicalar no resíduo Cis439 (Tir122), que se observou experimentalmente ser regenerado;

-formação de um aducto final termodinamicamente muito estável, que explique a potência inibidora da gemcitabina.

Apesar de se terem investigado muitas possibilidades, ainda não foi encontrada uma sequência de reacções que obedeça aos três critérios simultaneamente. Com a maior parte das hipóteses consideradas, o critério não satisfeito foi o do produto final particularmente estável. Tendo em conta que apenas foram explorados caminhos que envolvem resíduos do centro activo, a falta de resultados satisfatórios pode significar que o aducto final estável, responsável pela eficácia do inibidor, resulta de reacção com um resíduo de aminoácido fora do centro activo.

3.3. 3'-β-etinil-ribonucleótidos

Os 3'-β-etinil-ribonucleótidos apresentam um grupo etinilo a substituir o hidrogénio da posição 3' da ribose, como representado na figura 10.

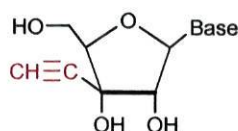


Figura 10. Estrutura geral dos 3'-β-etinil-ribonucleósidos.

Quando este composto foi desenhado, pretendeu-se criar um anti-metabolito com um espectro de actividade alargado, capaz de interferir com vários processos do metabolismo dos nucleótidos, de modo a pôr em causa, de forma eficaz, a integridade e a síntese tanto do ADN como do ARN (Matsuda *et al.* 1996). Por um lado, a presença dos dois grupos hidroxilo nas posições 2' e 3', em configuração *ribo*, explora a possibilidade destes análogos de nucleótidos poderem ser reconhecidos como substratos e interferirem com a actividade das enzimas envolvidas no metabolismo dos ribonucleósidos e ribonucleótidos, tais como as várias cinases, a CTP sintetase, as polimerases do ARN e a própria RNR. Por outro lado, o grupo etinilo da posição 3'-β pretende funcionar como “spin-trap” do radical orgânico da RNR, ao reagir com o enxofre radicalar da Cis439 que, em condições normais, inicia a catálise desta enzima abstraindo o átomo de hidrogénio existente nessa mesma posição.

A actividade dos 3'-β-etinil-ribonucleósidos foi confirmada em estudos experimentais com o análogo 3'-β-etinil-uridina (Matsuda *et al.* 1996). Este composto não só demonstrou capacidade de inibir *in vitro* a proliferação de várias linhas celulares tumorais humanas, como apresentou forte actividade anti-tumoral *in vivo*, contra um tipo de leucemia do rato e vários enxertos de tumores sólidos humanos.

Estudos experimentais subseqüentes foram realizados com os análogos 3'-β-etinil-citidina (EtC), 3'-β-etinil-5-fluorocitidina (EtFC), 3'-β-etiniluridina (EtU), 3'-β-etinil-5-fluorouridina (EtFU), 3'-β-etinil-5-metiluridina (EtMU), 3'-β-etinil-adenosina (EtA) e 3'-β-etinil-guanosina (EtG), de modo a avaliar a influência da base azotada na actividade geral destes compostos (Hattori *et al.* 1996).

A actividade dos 7 nucleósidos foi investigada *in vitro*, contra dois tipos de linhas celulares

tumorais, uma do rato e outra humana. O composto EtC foi o que apresentou maior eficácia na inibição da proliferação das duas linhas celulares tumorais, seguido do EtU que apresentou eficácia semelhante ao anterior contra a linha celular humana mas foi cerca de 8 vezes menos activo contra a do rato. A presença do átomo de flúor na posição 5 destas bases diminuiu a actividade dos respectivos compostos em cerca de 20 a 50 vezes, enquanto a adição do grupo metilo na posição 5 do uracilo tornou o EtMU completamente inactivo. Em relação aos análogos com as bases púricas, o EtA apresentou uma actividade semelhante ao EtFC enquanto o EtG não demonstrou propriedades inibidoras. Podemos assim ordenar os vários compostos de acordo com a respectiva actividade anti-tumoral: EtC > EtU >> EtFC ≈ EtFU ≈ EtA >>> EtMU ≈ EtG.

A actividade anti-tumoral dos dois compostos que haviam apresentado maior eficácia no estudo anterior – EtC e EtU – foi posteriormente avaliada e confirmada em estudos que envolveram 36 linhas celulares de tumores sólidos humanos (*in vitro*) e enxertos de 11 tumores humanos em rato. Neste último estudo, a sua actividade foi também comparada com a do composto 5-fluorouracilo (5-FU) – com utilização clínica aprovada para os cancros da mama, gastrointestinais e superficiais da pele –, tendo-se verificado que os dois compostos induziram maiores níveis de contenção do crescimento tumoral, em doses inferiores às de 5-FU e com a dificuldade acrescida de não se conhecer a sua posologia óptima de administração.

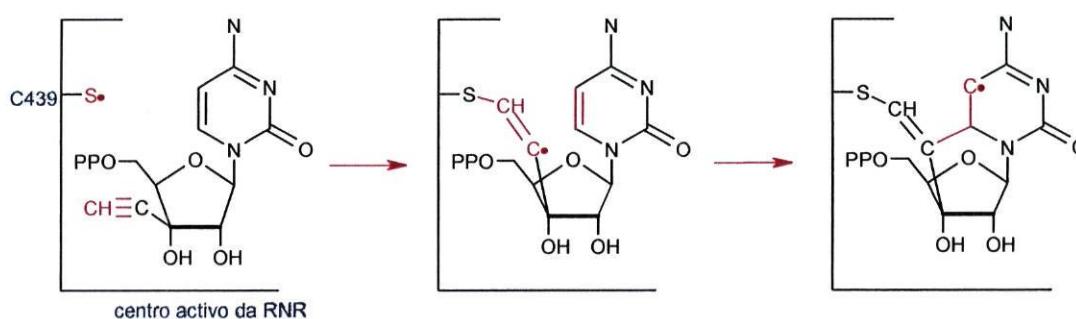


Figura 11. Mecanismo proposto para a interacção dos 3'-β-etinil-ribonucleótidos, aqui representados pelo análogo 3'-β-etinil-citidina, com o centro activo da RNR (adaptado de Jung *et al.* 1997).

O mecanismo proposto para a inibição irreversível da RNR pelos EtNDP corresponde a dois passos em que, à adição do enxofre radicalar do resíduo Cis439 a um carbono do grupo etinilo, se segue uma reacção de ciclização com a base azotada ou com outro resíduo de aminoácido do centro activo, que dará origem a um produto particularmente estável (Jung *et*

al. 1997). Na figura 11 está representado o mecanismo proposto, exemplificado com o análogo EtC.

O estudo computacional aqui apresentado foi efectuado tendo em vista dois objectivos fundamentais: por um lado a elucidação do mecanismo de inibição, verificando a viabilidade cinética e termodinâmica do que havia sido proposto na literatura; por outro, a averiguação da existência de uma correlação entre a reacção de ciclização com cada uma das bases azotadas e o grau de actividade anti-tumoral detectado experimentalmente.

Na primeira parte do estudo procedeu-se à avaliação energética da reacção de adição do enxofre radicalar ao grupo etinilo. A metodologia seguida foi semelhante à dos estudos dos mecanismos de inibição dos dois inibidores já descritos:

-um grupo SCH₃ e o anel da ribose sem o C5', como modelos do resíduo de cisteína e do inibidor, respectivamente;

-o funcional de DFT B3LYP com a base de funções 6-31G(d) para a localização e optimização dos três pontos estacionários de cada reacção e para o cálculo das frequências de vibração das estruturas optimizadas, de onde são retirados os valores da energia do ponto zero e dos efeitos térmicos e entrópicos;

-o mesmo funcional com a base de funções alargada 6-311++G(3df,3pd) para o cálculo da energia de cada uma das estruturas optimizadas, com a inclusão dos efeitos de longo alcance da proteína, através do modelo contínuo C-PCM com uma constante dieléctrica de valor 4.

Foi assim avaliada e comparada a adição do enxofre radicalar a cada um dos dois carbonos do grupo etinilo, tendo-se verificado que a adição ao carbono distal é a mais favorável, com uma barreira energética de 7.7 kcal/mol (contra 13.2 para a adição ao carbono proximal) e uma energia de reacção de -1.2 kcal/mol (contra 3.6 para o carbono proximal). Na figura 12 encontram-se representadas as duas reacções, com indicação das distribuições de spin em cada ponto estacionário.

Uma vez que a adição ao carbono distal é a mais favorável, partiu-se do produto desta reacção para avaliar a formação de um composto cíclico por reacção do carbono proximal (onde a

densidade de spin ficou localizada) com as várias bases azotadas incluídas no estudo experimental atrás descrito.

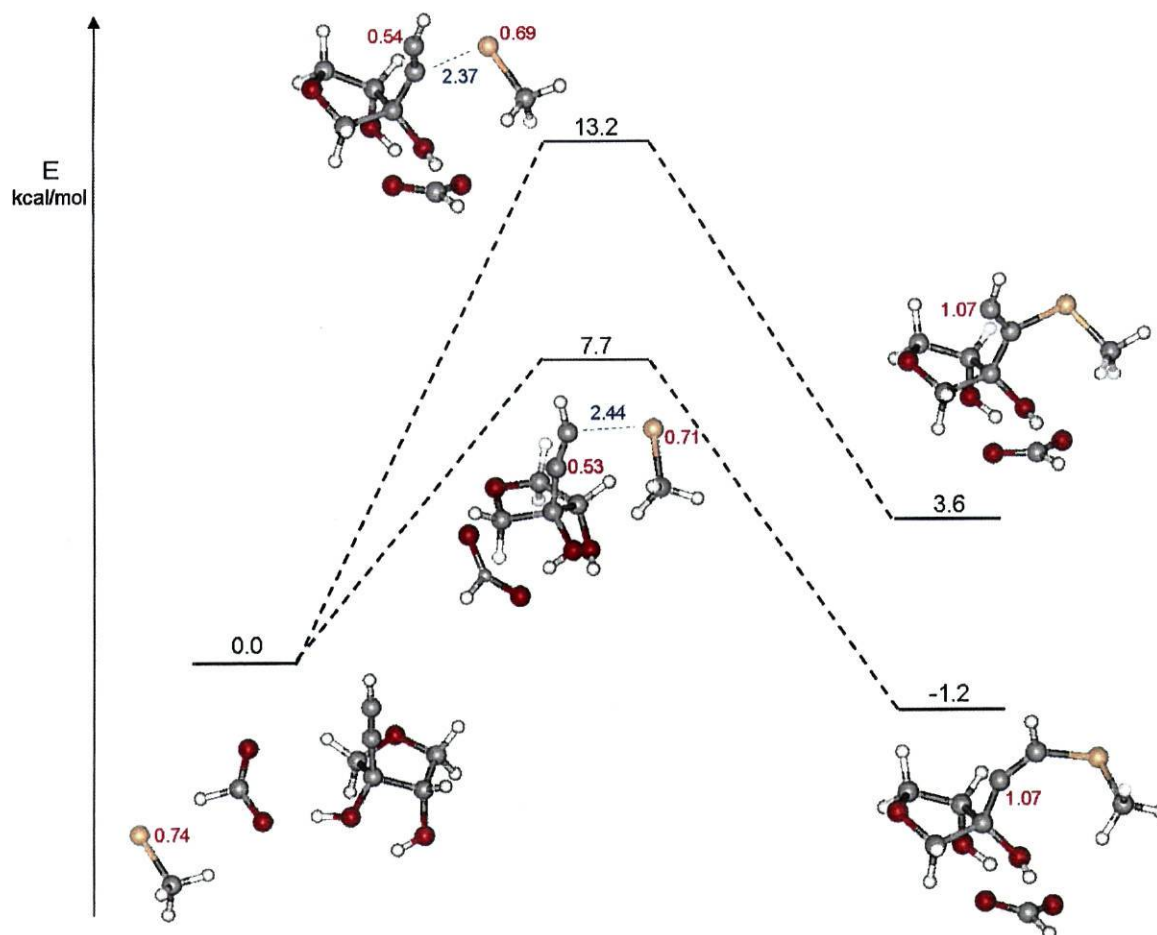


Figura 12. Perfil energético das reacções de adição do enxofre radicalar aos carbonos do grupo etinilo, com indicação da distribuição de spin a vermelho, em u.a., e das distâncias a azul, em Å.

A metodologia seguida na segunda parte do estudo computacional diferiu da anterior nos seguintes aspectos:

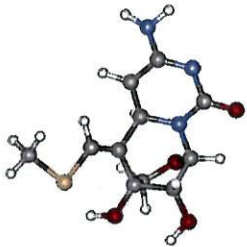
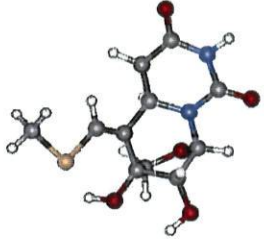
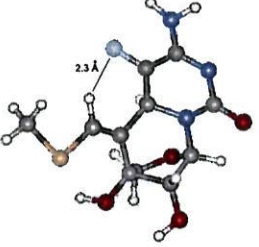
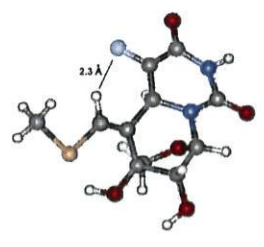
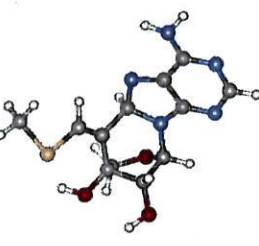

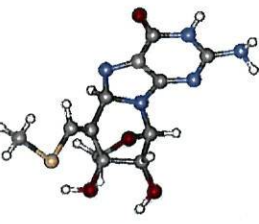
-o sistema foi necessariamente alargado, de modo a incluir a base azotada;

-procedeu-se à optimização dos reagentes e dos produtos das reacções de ciclização com as sete bases azotadas, seguida do cálculo das respectivas frequências vibracionais, com o método B3LYP e a base de funções 6-31G(d), tendo-se utilizado os valores de energia resultantes para calcular as respectivas energias de reacção.

As energias livres de reacção para as diferentes bases azotadas foram comparadas de forma a

averiguar a existência de uma correlação entre a estabilidade termodinâmica do produto cíclico e a potência anti-tumoral dos vários análogos. Os resultados estão compilados na tabela 2, com os compostos dispostos por ordem decrescente de actividade (da esquerda para a direita e de cima para baixo).

Tabela 2. Energias livres de reacção, ΔG_r , para a formação de um composto cíclico com a base azotada de vários 3'- β -etinil-ribonucleótidos.

Análogo	Produto	ΔG_r (kcal/mol)	Análogo	Produto	ΔG_r (kcal/mol)
EtC		-8.8	EtU		-12.5
EtFC		-13.2	EtFU		-17.1
EtA		-17.7	EtMU		-13.3
EtG		-10.4			

Como se pode observar, não existe correlação entre os valores das energias de reacção envolvidas na formação dos compostos cíclicos e a actividade anti-tumoral avaliada experimentalmente. De facto a ordem esperada para a actividade relativa dos inibidores é praticamente a inversa da observada:

-o inibidor com a base citosina, que apresentara a maior eficácia anti-tumoral, é o que forma o produto cíclico menos estável;

-a presença dos átomos de flúor na posição 5 do uracilo e da citosina, que originara uma diminuição da actividade experimental, aumenta a estabilidade do produto cíclico;

-os compostos com as bases adenina e 5-metil-uracilo, que não tinham demonstrado actividade anti-tumoral, formam um produto cíclico de estabilidade semelhante aos restantes.

Em relação à viabilidade do mecanismo proposto na literatura, embora não se tenham calculado as barreiras energéticas para o segundo passo, os valores energéticos obtidos e, em particular, o carácter exotérmico da reacção de ciclização, sugerem um caminho reaccional bastante favorável que não deve de modo algum ser descartado. No entanto, não ficou confirmado que a reacção de ciclização proposta ocorra preferencialmente com a base azotada. Para investigar a possibilidade dessa reacção ocorrer com um resíduo do centro activo seria necessário aumentar o sistema para averiguar quais os resíduos em posição privilegiada para sofrer o ataque do carbono radicalar e calcular as energias envolvidas, comparando-as com as da reacção com a base azotada.

Quanto à correlação entre a estabilidade do produto cíclico e a actividade anti-tumoral do análogo respectivo, os resultados obtidos não são conclusivos.

O facto de não se ter detectado uma correlação pode ser explicado pelo tamanho do sistema, provavelmente demasiado pequeno para incluir todos os efeitos que podem influenciar a interacção. Por exemplo, a estabilização dos produtos com o átomo de flúor na posição 5 das bases pirimídicas parece resultar da formação de uma ponte de hidrogénio não existente nos reagentes; a formação desta ponte poderá ser impedida de alguma forma no sistema real, devido a uma limitação do movimento do resíduo Cis439 ou por interacção do flúor com outros resíduos do centro activo. Para contabilizar este tipo de efeitos, seria necessário alargar o sistema à parte da enzima que rodeia a base azotada; no entanto, o estudo computacional de um tal sistema não é possível, por enquanto, para todas as bases azotadas, uma vez que existe apenas uma estrutura cristalográfica da RNR com um substrato no centro activo (o que possui a base guanina).

Por outro lado, a correlação pode, de facto, não existir, o que indicaria que a inibição da RNR não constitui o factor principal para a actividade anti-tumoral diferenciada dos vários análogos. Esta poderia ser devida à inibição de qualquer outra enzima-alvo ou ter origem numa afinidade diferente para as enzimas envolvidas nas reacções de activação dos inibidores – por exemplo, a afinidade para as cinases responsáveis pela dupla fosforilação que os compostos precisam de sofrer de modo a poderem interagir com o centro activo da RNR, pode ser diminuída pela presença dos átomos de flúor.

3.4. 2'-mercapto-2'-desoxirribonucleótidos

O grupo de análogos dos substratos 2'-mercapto-2'-desoxirribonucleósidos-5'-difosfato (SHdNDP) possui um grupo SH a substituir o 2'-OH do substrato natural. Estudos experimentais anteriores tinham revelado a actividade *in vitro* e *in vivo* dos SHdNDP. Nesses estudos observou-se que o análogo com a base uracilo (SHdUDP) inibia a actividade da RNR isolada da *Escherichia coli*, enquanto o análogo com a base citosina era o mais eficaz na redução dos níveis de desoxirribonucleótidos e consequente diminuição da proliferação da linha celular linfoblastoide humana CEM/SS, provavelmente devido a uma fosforilação mais eficiente no interior das células (Roy *et al.* 2003).

Os estudos *in vitro* com o SHdUDP revelaram características específicas no mecanismo reaccional que sugerem um comportamento diferente do de outros inibidores suicidas da RNR. Uma diferença importante é o facto da inibição da RNR apenas ocorrer na presença de oxigénio molecular, circunstâncias em que ocorre perda irreversível do radical tirosilo e se detecta a formação de um novo radical. Da análise do espectro de EPR e dos resultados de estudos mutagénicos e isotópicos foi proposto tratar-se de um radical pertiilo (RS-S'), ligado a uma cisteína do centro activo, provavelmente a Cis225. Quando a experiência é conduzida em condições anaeróbicas, a enzima permanece activa, o radical tirosilo não é destruído e não ocorre formação do novo radical, o que sugere que a reacção prossegue como se se tratasse do substrato natural (Covès *et al.* 1996).

Para compreender melhor o mecanismo da inibição da RNR pelos SHdNDP, procedeu-se ao estudo teórico das reacções possíveis entre estes inibidores e o centro activo da RNR. Mais uma vez, os dados experimentais disponíveis e os conhecimentos existentes sobre a catálise natural e a inibição suicida da enzima serviram de base para a procura de caminhos mecanísticos plausíveis; do trabalho resultou a primeira proposta para a sequência de reacções na ausência de O₂ e a confirmação da que existia na literatura para os acontecimentos químicos no meio oxidante.

Em relação à interacção dos SHdNDP com a RNR, na presença de O₂, o mecanismo proposto anteriormente pressupunha a formação de uma ponte dissulfureto entre o grupo tiol do inibidor e o do resíduo de cisteína Cis225, logo após a entrada do composto no centro activo.

De seguida, a abstracção do hidrogénio da posição 3' pelo radical tiilo do resíduo Cis439 e a subsequente clivagem homolítica da ligação C2'-S, produziria o radical pertiilo e impediria a regeneração do radical essencial da subunidade R2 (ver figura 13).

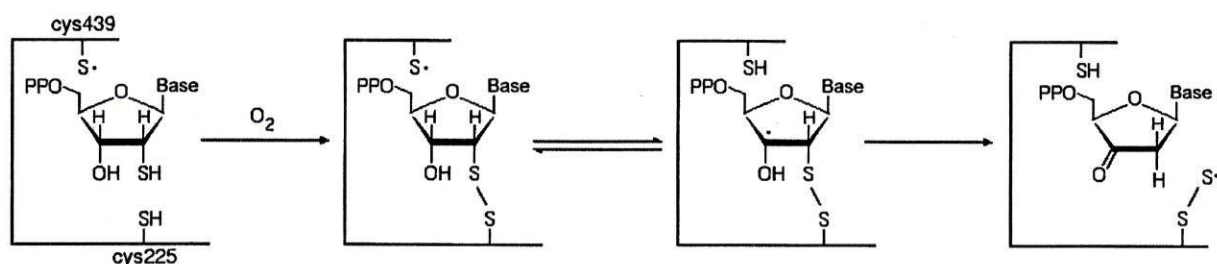


Figura 13. Mecanismo proposto anteriormente para a inibição da RNR pelos SHdNDP, na presença de O_2 (adaptado de Covès *et al.* 1996).

Os cálculos para a avaliação deste mecanismo foram feitos assumindo como correcta a formação prévia da ponte dissulfureto entre os grupos SH do inibidor e do resíduo Cis225. O estudo computacional dos dois passos seguintes, propostos para a formação do radical pertiilo revelou um facto interessante: a abstracção do átomo de hidrogénio da posição 3' pelo resíduo Cis439 origina a quebra espontânea da ligação C2'-S e produz directamente o radical Cis225-S•. A eliminação espontânea dos substituintes da posição 2' dos análogos dos substratos, após a abstracção do átomo 3'-H, foi observada anteriormente com os inibidores N_3dNDP e 2'-cloro-2'-desoxirribonucleótidos.

Os resultados do estudo computacional validam a proposta que tinha sido feita com base apenas em estudos experimentais, confirmando a natureza do radical que havia sido detectado, como um pertiilo resultante de uma reacção energeticamente favorável. A nova proposta difere da anterior apenas no facto de ser necessário um único passo, após a oxidação dos grupos SH, para formar o radical pertiilo e inibir a enzima através da não regeneração do radical tirosilo.

Nos estudos experimentais verificou-se que a subunidade R1 permanecia funcional, o que indica que o resíduo de cisteína Cis225 será reduzido pela maquinaria enzimática como acontece na catálise natural com a ponte dissulfureto formada entre este resíduo e o Cis462.

Quanto à interacção com o centro activo da RNR na ausência de O_2 , o facto da enzima permanecer activa, mesmo que o meio seja oxigenado após passar algum tempo em

anaerobiose, indica que, naquelas condições, os SHdNDP sofrem modificações que originam a perda do seu poder inibitório. Como a enzima modifica os compostos e permanece cataliticamente activa, foi sugerido que as reacções envolvidas no processo deveriam ser semelhantes às responsáveis pela redução dos substratos naturais. No entanto, os resultados do estudo computacional revelam alguns desvios em relação ao mecanismo catalítico, como representado na figura 14.

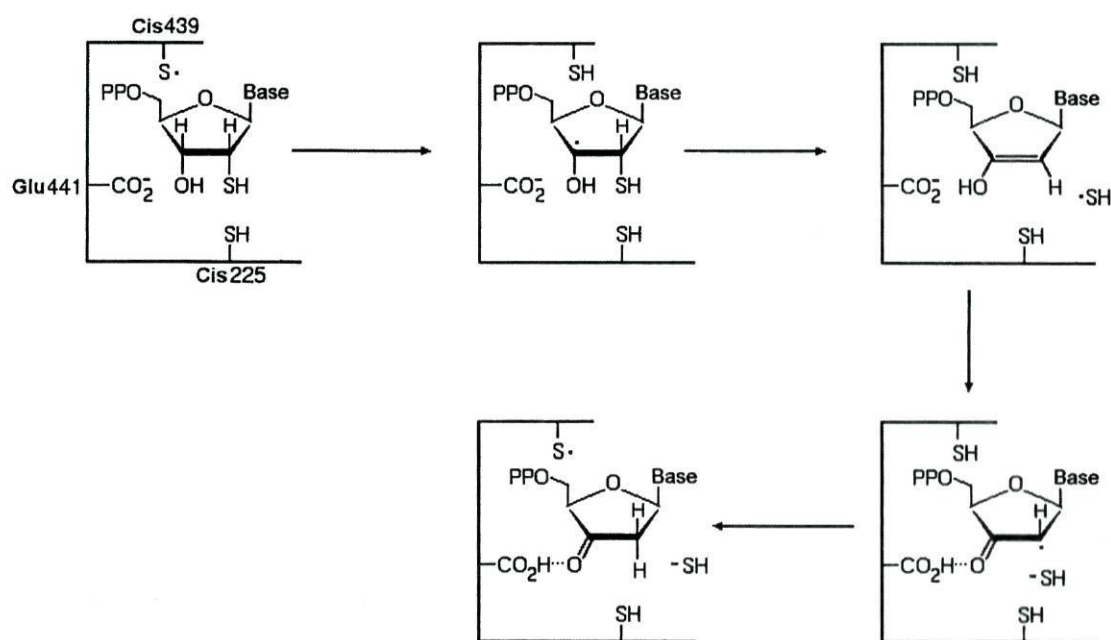


Figura 14. Mecanismo proposto para a interacção dos SHdNDP com o centro activo da RNR, na ausência de O_2 .

O mecanismo que resultou do estudo teórico tem início com a habitual abstracção do átomo 3'-H pelo enxofre radicalar do resíduo de cisteína Cis439. No final desta reacção verificou-se que a ligação C2'-S se encontrava bastante distendida, indicando que poderia ser facilmente quebrada. De facto, o segundo passo do mecanismo corresponde à eliminação do grupo SH de forma quase espontânea, praticamente sem barreira energética.

A saída do grupo SH da posição 2' difere da catálise natural, onde o grupo 2'-OH é protonado pelo resíduo de cisteína Cis225 antes de deixar a ribose, na forma de uma molécula de água. Aqui, a protonação do grupo tiol não é energeticamente favorecida.

Na sequência do segundo passo, o grupo SH permanece em interacção com o inibidor num equilíbrio radicalar-aniónico/ceto-enólico. O passo seguinte consiste na transferência do protão do grupo 3'-OH para o resíduo de glutamato Glu441; com este rearranjo do sistema, a

carga negativa passa a estar concentrada no grupo tiol libertado e a densidade de spin maioritariamente localizada no carbono C2'.

De acordo com os dados experimentais, na ausência de O₂, o radical essencial da enzima é regenerado. Neste ponto do mecanismo há claramente um passo que pode originar essa regeneração: a transferência do átomo de hidrogénio do resíduo Cis439 para o carbono C2'. Com esta reacção, correspondente ao quarto e último passo do mecanismo proposto, o radical tiolo inicial é regenerado e a enzima está pronta para novo ciclo catalítico.

Outro resultado desta sequência de reacções é uma furanona derivada da ribose, que constitui um produto conhecido da interacção de alguns inibidores suicidas com o centro activo da RNR. Habitualmente, após sair do centro activo, este composto perde os fosfatos e a base azotada e origina a inactivação da enzima por adição covalente a um resíduo externo da subunidade R1. A adição é detectada pela produção de um cromóforo com uma absorvância característica a 320 nm e é impedida pela presença de redutores que interceptam a furanona em solução. Nos estudos experimentais sobre a interacção dos SHdNDP com a RNR, não houve qualquer indicação da formação da furanona – o cromóforo característico não foi detectado e a subunidade R1 permaneceu activa –; no entanto, a possibilidade da furanona ter sido formada e a viabilidade geral do mecanismo proposto, não podem ser postas de parte porque todas as experiências foram realizadas na presença de redutores.

J|A|C|S

ARTICLES

Published on Web 03/18/2005

Theoretical Study on the Inhibition of Ribonucleotide Reductase by 2'-Mercapto-2'-deoxyribonucleoside-5'-diphosphates

Susana Pereira, Pedro Alexandrino Fernandes, and Maria João Ramos*

Contribution from REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, Rua do Campo Alegre, 687, 4169-007 Porto, Portugal

Received June 7, 2004; E-mail: mjramos@fc.up.pt

Abstract: Ribonucleotide reductase (RNR) is responsible for the reduction of ribonucleotides into the correspondent 2'-deoxyribonucleotides in the only physiological process that yields the monomers of DNA. The enzyme has thus become an attractive target for chemotherapies that fight proliferation-based diseases, specifically cancer and infections by some viruses and parasites. 2'-Mercapto-2'-deoxyribonucleoside-5'-diphosphates (SHdNDP) are mechanism-based inhibitors of RNR and therefore potential chemotherapeutic agents for those indications. Previous experimental studies established the *in vitro* and *in vivo* activity of SHdNDP. In the *in vitro* studies, it was observed that the activity was dependent on the oxidative status of the medium, with the inactivation of RNR only occurring when molecular oxygen was available. To better understand the mechanism involved in RNR inactivation by SHdNDP, we performed theoretical calculations on the possible reactions between the inhibitors and the RNR active site. As a result, we propose the possible mechanistic pathways for the chemical events that occur in the absence and in the presence of O₂. They correspond to a refinement and a complement of those proposed in the literature.

Introduction

Ribonucleotide reductase (RNR) catalyzes the reduction of ribonucleotides into the correspondent 2'-deoxyribonucleotides, in the rate-limiting step for the synthesis of DNA monomers. It is a highly regulated enzyme, with a cell cycle-dependent activity that ensures the maintenance of a permanently low cellular pool of deoxyribonucleotides. DNA replication, which must occur prior to each cell division, is therefore greatly dependent on the activity of RNR. The same stands for the reverse transcription of viral RNA in retroviral infections. As such, RNR became a very important element in the effort to control proliferation-based diseases, and, in the last years, several molecules that are able to impair RNR activity have been applied effectively in anti-cancer, anti-viral, and anti-parasite therapies.¹⁻⁵

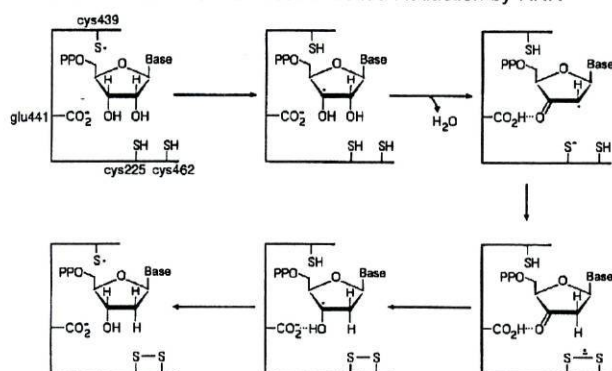
Life on earth is believed to have been RNA-based at the very beginning. Nowadays, with the exception of viroids and virusoids, all modern organisms have their genetic information encoded in a DNA molecule, and all need an RNR enzyme that transforms the RNA monomers into the DNA ones.⁶ Different organisms have related RNRs; for instance, their catalytic mechanism is always based on radical-mediated reactions.⁷ The

main evolutionary differences lie in the cofactor needed to produce the essential organic radical, the active site residues that perform catalysis, and the phosphorylation state of the substrates. In mammalian RNR (class Ia), the essential radical is located in a tyrosine residue, generated and stabilized by an adjacent oxygen-linked non-heme iron cluster, and the active site residues directly involved in the reduction are three cysteines, a glutamate, and an asparagine. The substrates of this RNR are ribonucleoside-5'-diphosphates.

The *Escherichia coli* RNR is similar to the mammalian and has served as its prototype in experimental studies. The determination of its crystallographic structure was a step forward in the unraveling of the catalytic mechanism and in the development of new inhibitors.⁸ *E. coli* RNR is constituted by two different homodimeric subunits. The larger one, known as R1, lodges the active site and the binding sites for the allosteric regulators; the smaller, known as R2, harbors the iron cluster and the organic free radical, located in Tyr₁₂₂. The active site residues that are catalytically important are Cys₂₂₅, Cys₄₃₉, Cys₄₆₂, Glu₄₄₁,⁹ and Asn₄₃₇.¹⁰ For catalysis to begin, the tyrosyl radical in R2 must generate a thiyl one in Cys₄₃₉ of the active site in R1. This is thought to occur by proton-coupled electron transfers, through a ca. 35 Å long chain of hydrogen-bonded residues. A generally accepted proposal for RNR catalytic mechanism is presented in Scheme 1.⁷

- (1) Murren, J.; Modiano, M.; Clairmont, C.; Lambert, P.; Savaraj, N.; Doyle, T.; Sznol, M. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 4092.
- (2) Lee, Y.; Vassilakos, A.; Feng, N. P.; Lam, V.; Xie, H. S.; Wang, M.; Jin, H. N.; Xiong, K. Y.; Liu, C. Y.; Wright, J.; Young, A. P. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2802.
- (3) Heinemann, V. *Oncology* **2003**, *64*, 191.
- (4) Mayhew, C. N.; Mampuru, L. J.; Chendil, D.; Ahmed, M. M.; Phillips, J. D.; Greenberg, R. N.; Elford, H. L. *Antiviral Res.* **2002**, *56*, 167.
- (5) Ingram, G. M.; Kinnaird, J. H. *Parasitol. Today* **1999**, *15*, 338.
- (6) Reichard, P. *Science* **1993**, *260*, 1773.
- (7) Stubbe, J.; van der Donk, W. A. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 705.

- (8) Eriksson, M.; Uhlin, U.; Ramaswamy, S.; Ekberg, M.; Regnstrom, K.; Sjöberg, B.-M.; Eklund, H. *Structure* **1997**, *5*, 1077.
- (9) Persson, A. L.; Eriksson, M.; Katterle, B.; Pötsh, S.; Sahlin, M.; Sjöberg, B.-M. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 31533.
- (10) Kasrayan, A.; Persson, A. L.; Sahlin, M.; Sjöberg, B.-M. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5749.

Scheme 1. Mechanism of Ribonucleotide Reduction by RNR

In the first step, the 3'-H atom is abstracted by the radical sulfur of Cys₄₃₉.^{11,12} After protonation of the 2'-OH group by Cys₂₂₅ and loss of a water molecule,^{13,14} Cys₂₂₅ and Cys₄₆₂ reduce the ribose and become oxidized to a disulfide bridge.⁷ With the spin density replaced in C3', the final step consists of the donation of the hydrogen atom by Cys₄₃₉ back to that carbon. Thus, the 2'-deoxyribonucleotide is formed and the essential tyrosyl radical is regenerated.¹¹

Several modifications of the nucleotides' ribose moiety at the 2'-position have produced potent mechanism-based inhibitors of RNR.¹⁵⁻¹⁸ 2'-Mercapto-2'-deoxyribonucleoside-5'-diphosphates (SHdNDP) are included among them. The uridine analogue (SHdUDP) inhibits the purified RNR of *E. coli* very efficiently,¹⁹ and the cytidine analogue was found to be the most effective in lowering the deoxynucleotide levels and the proliferation of the human lymphoblastoid cell line CEM/SS, probably due to a more efficient phosphorylation inside the cells.²⁰ The *in vitro* studies with SHdUDP revealed specific features in the reaction mechanism, which suggest a different behavior if compared to similar compounds.¹⁹ RNR inhibition only occurred if the experiment took place in the presence of molecular oxygen. In this situation, subunit R2 was specifically targeted through irreversible scavenging of the essential tyrosyl radical. The role of R1 in RNR activity was not affected. The transient formation of an unstable radical was detected. From the analysis of its EPR spectrum and the results of mutagenic and isotopic labeling studies, it was suggested to be a perthiyl radical located in an active site cysteine, probably Cys₂₂₅. When the experiment was carried out in anaerobic conditions, the enzyme remained active, the tyrosyl radical was not lost, and the transient radical was not formed, suggesting that the reaction proceeded as with the normal substrate.

This work consists of a theoretical study of the interaction between 2'-mercapto-2'-deoxyribonucleotides and RNR, in the

presence and in the absence of molecular oxygen. As a result, we refined and clarified the mechanism by which RNR inactivation was proposed to occur in an oxidative medium.¹⁹ Additionally, we propose the first reaction path for the chemical events that occur in anaerobiosis and which do not affect RNR activity.

Theoretical Approach

The theoretical study of the interaction of SHdNDP with the active site residues of RNR was made with the Gaussian 03 program.²¹ To perform the study, we used a cutoff of the R1 subunit, composed by a chain of seven amino acid residues (Ser₄₃₆, Asn₄₃₇, Leu₄₃₈, Cys₄₃₉, Leu₄₄₀, Glu₄₄₁, and Ile₄₄₂) plus the side chain of Cys₂₂₅. The inhibitor was modeled without the base, the phosphates, and the C5' carbon atom. Two hydrogen atoms were added to C1' and C4'. The system was composed of a total of 130 atoms.

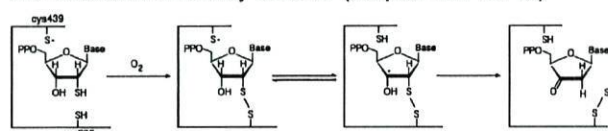
During geometry optimizations to locate the transition state, the reactants, and the products of the considered reactions, our system was divided into two layers within the ONIOM formalism,²² as implemented in Gaussian 03. The higher level layer included the inhibitor model and the side chains of Cys₂₂₅, Cys₄₃₉, and Glu₄₄₁ in a total of 28 atoms; it was treated with density functional theory (DFT) at the unrestricted B3LYP/6-31G(d) level.²³⁻²⁵ The rest of the system was treated with the semiempirical method PM3MM.²⁶ It is important to note that during geometry optimizations the system always kept the conformation of the X-ray crystallographic structure, although no constraints were imposed in the positions of any atom. For each step, we performed a scan of the reaction coordinate with a step value of 0.01 Å and considered the geometry with the higher energy a very good approximation to the geometry of the transition state. From there, we relaxed the system and let it optimize in both directions of the reaction coordinate to obtain the geometries of the respective minima. A single point calculation was then performed on the three stationary points, treating the whole system at the density functional theory level, with the B3LYP functional and the larger 6-31+G(d) basis set. The atomic spin density distributions were calculated with a Mulliken population analysis²⁷ in the higher level calculation.

Results and Discussion

We based ourselves in the available experimental data and in earlier findings about RNR natural catalysis and suicide inhibition, to search plausible mechanistic pathways for RNR

- (11) Stubbe, J.; Ator, M.; Krenitsky, T. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 1625.
- (12) Mao, S. S.; Yu, G. X.; Chalfoun, D.; Stubbe, J. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9752.
- (13) Lenz, R.; Giese, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2784.
- (14) Fernandes, P. A.; Eriksson, L. A.; Ramos, M. *J. Theor. Chem. Acc.* **2002**, *108*, 352.
- (15) Thelander, L.; Larsson, B.; Hobbs, J.; Eckstein, F. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 1398.
- (16) Stubbe, J.; Kozarich, J. W. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 5511.
- (17) Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J.; Lippert, B.; Jarvi, E.; Resvick, R. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1879.
- (18) van der Donk, W. A.; Yu, G.; Silva, D. J.; Stubbe, J.; McCarthy, J. R.; Jarvi, E. T.; Matthews, D. P.; Resvick, R. J.; Wagner, E. *Biochemistry* **1996**, *35*, 8381.
- (19) Covès, J.; de Fallois, L. L. H.; Le Pape, L.; Décout, J.-L.; Fontecave, M. *Biochemistry* **1996**, *35*, 8595.
- (20) Roy, B.; Chambert, S.; Lepoivre, M.; Décout, J.-L. *Nucleosides Nucleotides* **2003**, *22*, 883.

- (21) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, revision B.04; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 2003.
- (22) Vreven, T.; Morokuma, K. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1419.
- (23) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
- (24) Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.
- (25) Hertwig, R. W.; Koch, W. *J. Comput. Chem.* **1995**, *16*, 576.
- (26) Stewart, J. J. P. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 221.
- (27) Mulliken, R. S. *J. Chem. Phys.* **1955**, *23*, 1833.

Scheme 2. Mechanism Previously Proposed by Covès et al. for the Inactivation of RNR by SHdUDP (Adapted from Ref 19)^a^a The base is uracyl.

interaction with SHdNDP. Several possibilities were initially considered, and the ones that were found less favorable, from a kinetic or thermodynamic point of view, were gradually discarded. Schemes 3 and 4 represent the reaction mechanisms that we propose as more viable in the presence and in the absence of molecular oxygen, respectively. Both situations shall now be discussed in detail.

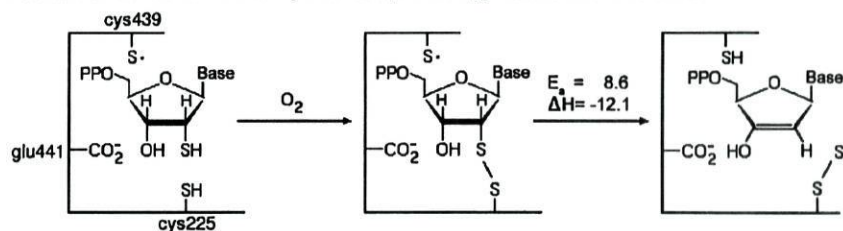
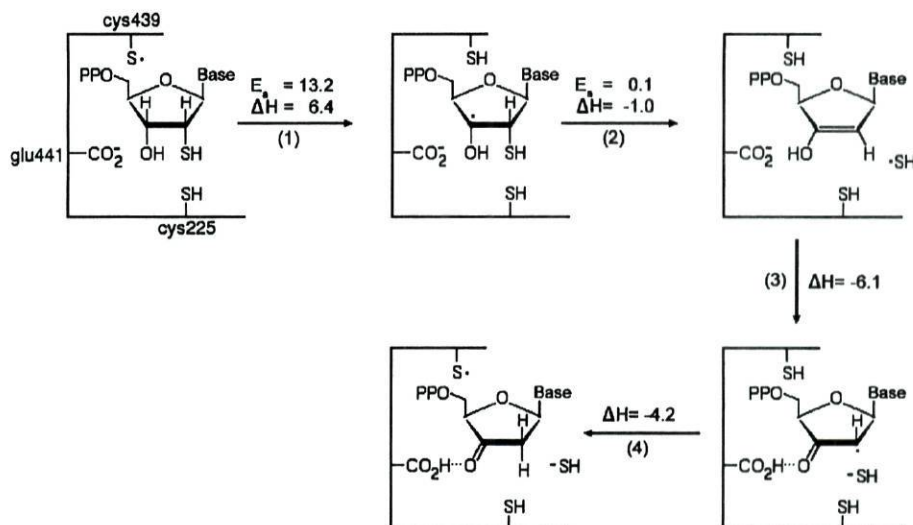
In the Presence of O₂. In experimental studies, Covès et al. found that SHdUDP inhibited purified RNR in a stoichiometric proportion when there was molecular oxygen available in the medium.¹⁹ During inactivation, the loss of the essential tyrosyl radical and the transient formation of a postulated perthiyl radical attached to an active site cysteine was observed. It was proposed that in the presence of O₂ occurred the formation of a disulfide bridge between the 2'-SH group and the SH of Cys₂₂₅. A subsequent homolytic cleavage of the C2'-S bond would generate the perthiyl radical. This mechanism is represented in Scheme 2.

We think that the readily formation of the disulfide bridge between Cys₂₂₅ and the inhibitor, in the presence of O₂, is a very good assumption. In fact, taking into account the redox potentials of the two species, one can conclude that the reduction

of O₂ to water with concomitant oxidation of the SH groups is very favorable. There are three cysteine residues in the RNR active site. Cys₄₃₉ is located above the inhibitor ring and cannot interact with its thiol group nor with the other two active site cysteines. Cys₄₆₂ is also prevented from interacting with the 2'-SH by the presence of Cys₂₂₅ in between. In principle, molecular oxygen could oxidize the Cys₂₂₅-Cys₄₆₂ pair to a disulfide, but these cysteines would be readily reduced by the pair Cys₇₅₄-Cys₇₅₉, as it occurs in the natural substrate mechanism. This leaves us with the only reasonable option being the formation of a disulfide bond between the inhibitor and Cys₂₂₅. This disulfide should be prevented from reduction by Cys₇₅₄-Cys₇₅₉ due to its different position and orientation when compared to the Cys₂₂₅-Cys₄₆₂ disulfide.

On the basis of these facts, we started the study with a structure where the sulfur atoms of the inhibitor and of Cys₂₂₅ were already oxidized to a disulfide and estimated the energetic of the reactions that would follow the sulfur oxidation and lead to the perthiyl radical formation. Our results are summarized in Scheme 3.

The first step of RNR natural catalysis is the abstraction of the 3'-H atom by the radical sulfur of Cys₄₃₉.¹² The same reaction with the SHdNDP disulfide-bonded to Cys₂₂₅ is energetically and thermodynamically favorable, having an energetic barrier of 8.6 kcal/mol and a reaction enthalpy of -12.1 kcal/mol. Figure 1 represents the geometry of the transition state. At this point, the 3'-H is halfway between the sulfur and the C3', the C3'-O and C3'-C2' bonds are 0.05 and 0.03 Å shorter than in the reactants, and the C2'-S bond is somewhat elongated.

Scheme 3. Proposed Mechanism for RNR Inhibition by SHdNDP; All Energy Values Are in kcal/mol**Scheme 4.** Proposed Mechanism for the Interaction of SHdNDP with RNR in the Absence of Molecular Oxygen; All Energy Values Are in kcal/mol

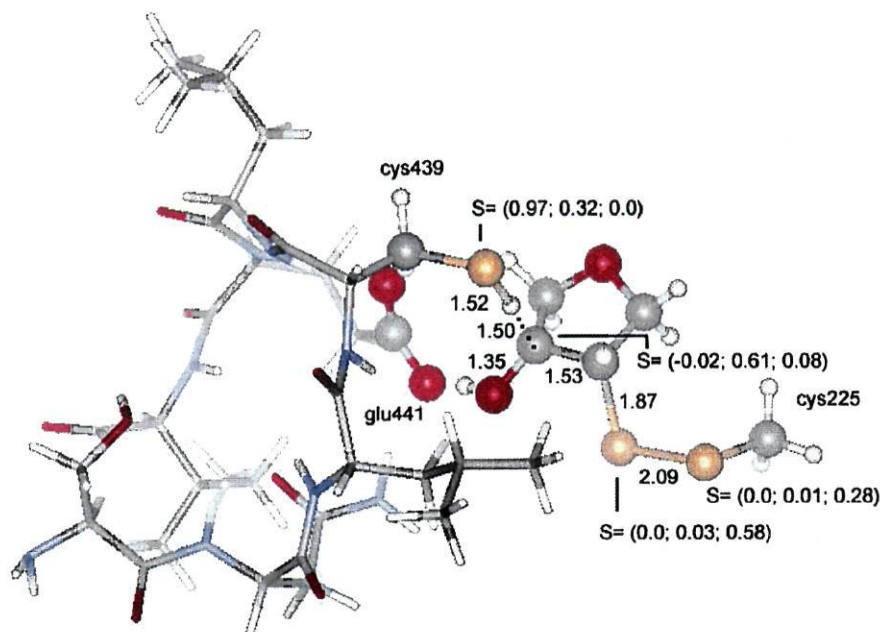


Figure 1. Geometry of the transition state labeled with relevant bond lengths (in Å) and the spin density distribution (S) in au of the three geometries (reactants, transition state, products, respectively).

During optimization of the products, the sulfur bound to the 2' position detached spontaneously from the carbon, through homolytic cleavage of the C–S bond. Thus, this reaction produces directly the perthiyl radical that had been postulated in the literature to be the one detected transiently during RNR inactivation. In the optimized structure of the products, the C3'–C2' and C3'–O bonds are further shortened to 1.35 and 1.33 Å, respectively, the inhibitor sulfur is 3.35 Å away from C2', and the spin density is in fact concentrated in the two bonded sulfur atoms (0.86 au in total). The spontaneous elimination of a 2' substituent from nucleotide analogues upon 3'-H atom abstraction has been observed before with other RNR mechanism-based inhibitors, e.g. with 2'-azido-2'-deoxyribonucleotides²⁸ and 2'-chloro-2'-deoxyribonucleotides.²⁹

Figure 2 depicts the energetic profile of the reaction that we propose to occur during RNR inactivation by SHdNDP, after the oxidation of the inhibitor's and the Cys₂₂₅ thiol groups.

These results give strong support to the proposal that had been made in the literature based solely on experimental work. In fact, our study clarifies the chemical pathway that leads to the transient radical formation and confirms the nature of that radical as being a perthiyl one, which results from an energetically favored reaction. Our proposal deviates from the earlier one in one important aspect: the perthiyl radical is spontaneously formed upon the 3'-H atom abstraction and does not result from an elongated stepwise mechanism. The overall success of this theoretical study in reproducing and refining the experimentally deduced pathway motivated us to use the same models and method in the unraveling of the reaction course that takes place in anaerobiosis.

In the Absence of O₂. From experimental studies, it is known that in the absence of molecular oxygen SHdNDP does not inactivate RNR.¹⁹ If anaerobiosis is maintained for a consider-

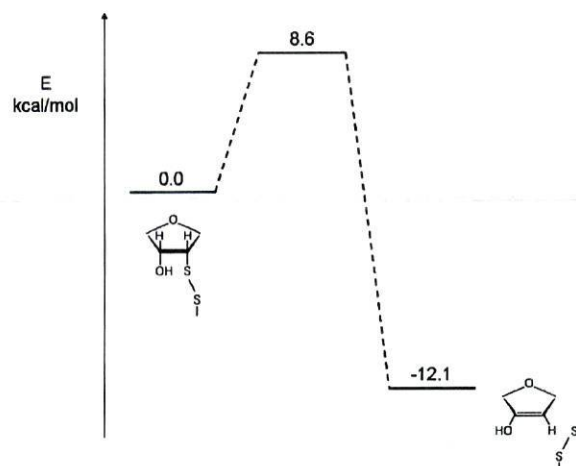


Figure 2. Energetics of the proposed mechanism for RNR inhibition by SHdNDP.

able amount of time and then the medium is oxygenated, RNR still remains active. This means that the compound interacts with the enzyme and suffers modifications that lead to the loss of its inhibitory power, otherwise shown in an oxidative medium. The fact that the enzyme modifies the molecule and remains catalytically active led to the suggestion that the reactions involved in the process could match the ones responsible for the reduction of the natural substrates.¹⁹ However, the results of our study indicate important deviations from the natural catalysis. The chemical pathway that we propose to occur in this situation is represented in Scheme 4.

Reaction 1. The first step is the abstraction of the 3'-H atom by the radical sulfur of Cys₄₃₉, just as it is known to happen in normal catalysis. The activation energy for this reaction is 13.2 kcal/mol, and the reaction enthalpy is 6.4 kcal/mol.

Figure 3 depicts the geometry of the transition state, where the 3'-H atom is 1.53 Å away from the sulfur and 1.39 Å from

(28) Pereira, S.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 227.

(29) Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *Chem.-Eur. J.* **2003**, *9*, 5916.

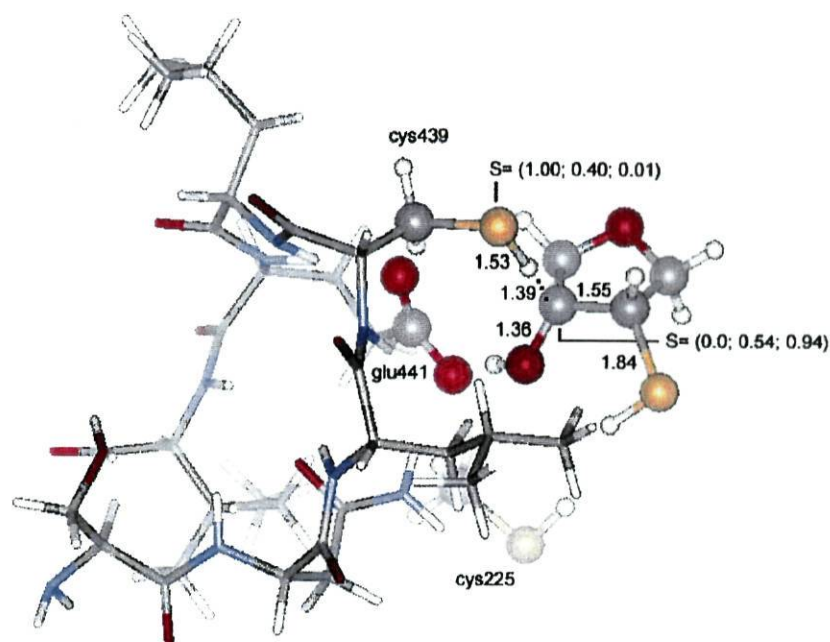


Figure 3. Geometry of the transition state for reaction 1, labeled with relevant bond lengths (in Å) and the spin density distribution (S) in au of the three geometries (reactants, transition state, products, respectively).

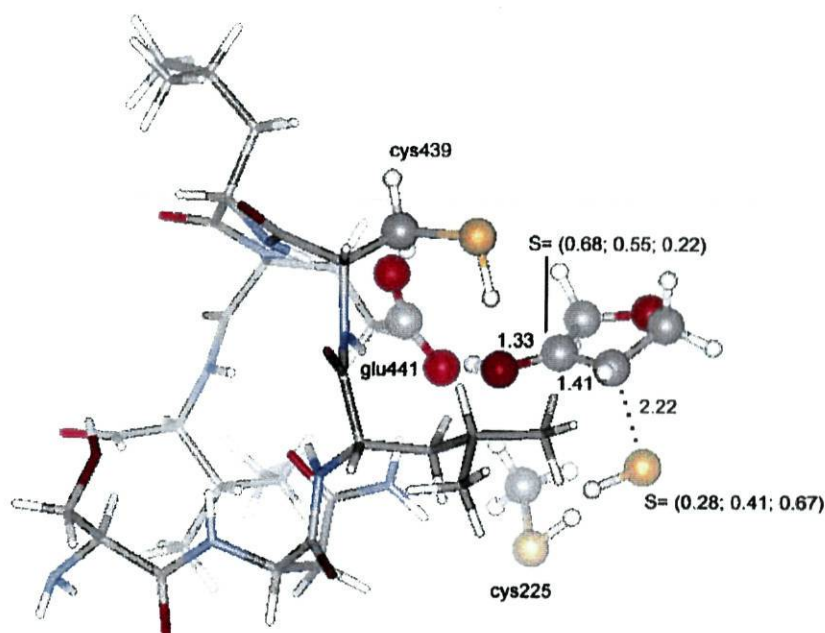


Figure 4. Geometry of the transition state for reaction 2, labeled with relevant bond lengths (in Å) and the spin density distribution (S) in au of the three geometries (reactants, transition state, products, respectively).

the carbon C3'. The C3'–O bond is 0.05 Å shorter than in the reactants (1.41 to 1.36 Å), and the hydrogen bond with Glu₄₄₁ is also shorter by 0.13 Å (1.75 to 1.62 Å). The spin density is no longer concentrated in the Cys₄₃₉ sulfur but is now largely delocalized to the carbon C3'.

In the products, the C3'–C2' and C3'–O bonds are shortened to 1.47 and 1.34 Å, respectively, and the C2'–S bond is elongated to 1.96 Å. The spin density is concentrated in the C3' atom.

Reaction 2. At the end of reaction 1, the C2'–S bond has been elongated to 1.96 Å, which is evidence that this bond can be easily broken. Indeed, we found that such reaction was almost

spontaneous, with a vanishing barrier of 0.1 kcal/mol and an enthalpy of reaction of –1.0 kcal/mol.

The transition state for reaction 2 is represented in Figure 4. At this point, the C2'–S bond is further elongated to 2.22 Å and the spin density is almost equally shared by these two atoms, indicating a homolytic cleavage of the covalent bond.

In the optimized structure of the products, the sulfur atom is 2.75 Å away from the carbon C2' and the C2'–C3' bond is 0.07 Å shorter than in the reactants (1.44 to 1.37 Å); the spin density is mainly located at the sulfur although it is still delocalized to the carbon C3'.

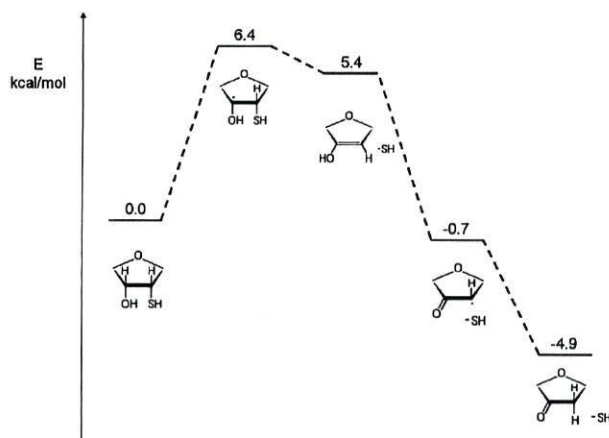


Figure 5. Energetic profile of the mechanism proposed for the RNR interaction with SHdNDP in the absence of molecular oxygen.

The elimination of the SH group is an important deviation from the natural substrate mechanistic pathway. In the natural catalysis, the 2'-OH group is protonated by Cys₂₂₅ and leaves the ribose in the form of a water molecule. Here, the protonation of the thiol group is not thermodynamically favored.

Reaction 3. The third reaction consists of the transfer of a proton from the 3'-O atom to the glutamate residue glu441. This rearrangement of the system is thermodynamically favorable, with a ΔH of -6.1 kcal/mol, and leads to the formation of a radical ribose-derived furanone. As a result, the negative charge of the system becomes mainly localized in the SH group (0.63 au), and the spin density becomes delocalized between the carbon C2' (0.53 au), the 3'-O atom (0.17 au), and the sulfur of the thiol group (0.27 au).

Reaction 4. It is experimentally known that the protein radical is regenerated in anaerobic conditions.¹⁹ At this point of the reaction pathway, there is clearly one step that would lead to that regeneration. It consists of the donation of the thiol hydrogen atom of Cys₄₃₉ to the carbon C2'. As a consequence, the initial thiyl radical is regenerated and the enzyme is ready for another catalytic turnover. This mechanistic step has been proposed before to occur with other nucleotide analogues at the active site of RNR, e.g. with 2'-chloro-2'-deoxyribonucleotides²⁹ and 2',2'-difluoro-2'-deoxyribonucleotides.³⁰

We found the step to be thermodynamically favorable with an enthalpy of reaction of -4.2 kcal/mol. In the products, the spin density is, in fact, concentrated in the cys439 sulfur atom (0.87 au) and is only slightly delocalized to the sulfur of the thiol group (0.11 au); the negative charge of the system is still mainly located in the SH group (-0.62 au). The C3'-O bond is 0.05 Å shorter (1.27 to 1.22 Å) and the C3'-C2' bond is 0.11 Å longer (1.40 to 1.51 Å) than in the reactants, which reflects the formation of a ketone.

This reaction pathway is similar to the RNR inhibition mechanism by 2'-chloro-2'-deoxyribonucleotide.^{29,31} The chloride also leaves spontaneously the ring in the ionic form, and the tyrosyl radical is regenerated through the donation of an H atom by cys439 to the C2' carbon. In that case, RNR becomes inactivated when the newly formed ketone leaves the active site,

(30) Pereira, S.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1286.

(31) Ator, M. A.; Stubbe, J. *Biochemistry* **1985**, *24*, 7214.

loses the base and the phosphates in solution, and interacts with external residues of R1. The interaction is detected by the formation of a characteristic chromophore with absorption at 320 nm and is prevented by the existence of reductive species in solution, which intercept the furanone. In the studies with SHdNDP, the detection of the chromophore was not reported, but its formation cannot be discarded as all experiments were performed with reductants present in the medium.

In Figure 5, we present the energetic profile of this mechanistic pathway. It has an overall reaction energy of -4.9 kcal/mol and is therefore thermodynamically favored, especially if we consider the easy escape of the thiolate group from the active site and its solvation in the aqueous solvent.

Conclusion

A theoretical study was conducted on the interaction of RNR with SHdNDP, in the absence and in the presence of molecular oxygen. The calculations to model the chemical events in the presence of O₂ were made assuming the prompt formation of a disulfide bridge between the thiol groups of the inhibitor and of Cys₂₂₅. This was proposed in the literature as a plausible way to form the transient radical, which was detected in *in vitro* experiments and postulated to be a perthiyl one.¹⁹

As a result of this work, we propose a refined proposal for the reaction path in aerobiosis and the first mechanistic pathway for the interaction of SHdNDP with RNR in anaerobiosis.

In both situations, the first step is the 3'-H atom abstraction by the radical sulfur of Cys₄₃₉ with subsequent cleavage of the C2'-S bond.

In anaerobiosis, the second step produces an SH group that remains interacting with the ribose in a radical-anionic/keto-enolic equilibrium. Cys₄₃₉ then donates an H-atom to the C2' carbon, regenerating the initial thiyl radical. A ribose-derived furanone is formed, and the SH group leaves the active site in the anionic form. The furanone that constitutes the end-product of the mechanism is known to inhibit subunit R1, producing a chromophore with a characteristic absorption at 320 nm, but this interaction is prevented by the presence of reductants in solution. Thus, the nondetection of the chromophore in the experimental studies performed with SHdNDP and the fact that RNR remains active can be explained by the existence of reductive species in all of the experiments.

In the presence of O₂, the C2'-S cleavage is spontaneous and produces the perthiyl radical Cys₂₂₅-S-S· that was proposed to be the one detected experimentally. The thiyl radical is not regenerated, and subunit R2 becomes inactivated. Subunit R1 was found to remain active, which suggests that Cys₂₂₅ will be reduced by the enzymatic machinery as happens with the disulfide bridge formed in the natural catalysis between this cysteine and Cys₄₆₂. The proposed mechanistic pathway is in agreement with the earlier experimental proposal, contributing to a clarification and detailing of the elementary chemical steps.

Acknowledgment. We thank the FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) for a doctoral scholarship for S.P. and for financial support (Projecto Pocti/35736/99, Portugal), and the NFCR (National Foundation for Cancer Research) Centre for Drug Discovery, University of Oxford, UK.

Supporting Information Available: Cartesian coordinates of all of the stationary points discussed. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA046662W

Referências

- Blomberg MRA, Siegbahn PEM, Babcock GT (1998) Modeling electron transfer in biochemistry: a quantum chemical study of charge separation in *Rhodobacter sphaeroides* and photosystem II. *J Am Chem Soc* 120 (34): 8812-8824
- Cerqueira NMFS, Fernandes PA, Eriksson LA, Ramos MJ (2006) Dehydration of ribonucleotides catalyzed by ribonucleotide reductase: the role of the enzyme. *Biophys J* 90 (6): 2109-2119
- Covès J, de Fallois LLH, Le Pape L, Décout J-L, Fontecave M (1996) Inactivation of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase by 2'-deoxy-2'-mercaptouridine 5'-diphosphate. Electron paramagnetic resonance evidence for a transient protein perthiyl radical. *Biochemistry* 35 (26): 8595-8602
- Fernandes PA, Eriksson LA, Ramos MJ (2002) The reduction of ribonucleotides catalyzed by the enzyme ribonucleotide reductase. *Theor Chem Acc* 108 (6): 352-364
- Fritscher J, Artin E, Wnuk S, Bar G, Robblee JH, Kacprzak S, Kaupp M, Griffin RG, Bennati M, Stubbe J (2005) Structure of the nitrogen-centered radical formed during inactivation of *E. coli* ribonucleotide reductase by 2'-azido-2'-deoxyuridine-5'-diphosphate: Trapping of the 3'-ketonucleotide. *J Am Chem Soc* 127 (21): 7729-7738
- Harris G, Ator M, Stubbe J (1984) Mechanism of inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus leichmannii* ribonucleotide reductases by 2'-chloro-2'-deoxynucleotides: evidence for generation of 2-methylene-3(2H)-furanone. *Biochemistry* 23 (22): 5214-5225
- Hattori H, Tanaka M, Fukushima M, Sasaki T, Matsuda A (1996) Nucleosides and nucleotides. 158. 1-(3-C-ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)-cytosine, 1-(3-C-ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)uracil, and their nucleobase analogues as new potential multifunctional antitumor nucleosides with a broad spectrum of activity. *J Med Chem* 39 (25): 5005-5011
- Jung PMJ, Dauvergne J, Burger A, Biellman J-F (1997) Cyclization by free radical addition of stannyl or thiyl radical to 3'- β -ethynyl uridine. Is the 3'- β -ethynyl group a spin trap in ribonucleotide reductase? *Tetrahedron Letters* 38 (33): 5877-5880
- Matsuda A, Hattori H, Tanaka M, Sasaki T (1996) Nucleosides and nucleotides. 152. 1-(3-C-ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)uracil as a broad spectrum antitumor nucleoside. *BioMed*

Chem Lett 6 (16): 1887-1892

Roy B, Chambert S, Lepoivre M, Décout J-L (2003) Thionucleotides as inhibitors of ribonucleotide reductase. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 22 (5-8): 883-885

Siegbahn PEM (1998) Theoretical study of the substrate mechanism of ribonucleotide reductase. *J Am Chem Soc* 120 (33): 8417-8429

Siegbahn PEM, Eriksson L, Himo F, Pavlov M (1998) Hydrogen atom transfer in ribonucleotide reductase (RNR). *J Phys Chem B* 102 (51): 10622-10629

Stubbe J (1990) Ribonucleotide reductases: amazing and confusing. *J Biol Chem* 265 (10): 5329-5332

van der Donk WA, Stubbe J, Gerfen GJ, Bellre BF, Griffin RG (1995) EPR investigations of the inactivation of *E. coli* ribonucleotide reductase with 2'-azido-2'-deoxyuridine 5'-diphosphate: evidence for the involvement of the thiyl radical of C225-R1. *J Am Chem Soc* 117 (35): 8908-8916

van der Donk WA, Yu G, Pérez L, Sanchez RJ, Stubbe J, Samano V, Robins MJ (1998) Detection of a new substrate-derived radical during inactivation of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* by gemcitabine 5'-diphosphate. *Biochemistry* 37 (18): 6419-6426

4. Considerações Finais

A Ribonucleótido Redutase constitui um grande desafio em termos de investigação. Por um lado é caracterizada por uma química bastante complexa que envolve a formação de um radical orgânico por intermédio de um centro metálico, a transferência desse radical para o centro activo após a entrada do substrato e uma sequência intrigante de reacções até à redução final dos substratos, processos que só começaram a ficar esclarecidos depois de inúmeros estudos, quer computacionais quer experimentais, incluindo espectroscopia de EPR, mutagénesis direccionada e marcação isotópica.

Por outro lado a RNR assume uma grande importância no campo da medicina devido à sua posição privilegiada no controlo da síntese do ADN e da consequente divisão celular. A importância da sua inibição insere-se no campo do tratamento de patologias tão graves como o cancro e o SIDA, flagelos actuais que ainda não são combatidos de forma eficaz.

De facto, apesar do esforço investido na investigação para o combate ao cancro e da descoberta contínua de novos fármacos, este continua a ser uma das principais causas de morbilidade e mortalidade no mundo. Uma grande dificuldade no tratamento das doenças cancerosas está relacionada com o facto das células tumorais serem governadas por mecanismos bioquímicos em larga escala semelhantes aos das células “normais”, o que torna bastante complicado impedir a proliferação daquelas sem infligir danos nestas e obriga a uma ponderação constante entre os benefícios e os prejuízos causados pelo tratamento.

O caminho ideal a seguir é o do desenvolvimento de fármacos selectivos que consigam tirar partido de determinadas características específicas de cada linha celular tumoral, ou em alternativa, o desenvolvimento de formulações selectivas que explorem essas diferenças para vectorizar a distribuição dos fármacos não selectivos para os tecidos tumorais (Neerman 2006). Os inibidores da RNR apresentam alguma selectividade para os tumores, pelo facto de interferirem em maior grau com os tecidos de proliferação mais acelerada, mas esta é apenas uma selectividade parcial, uma vez que há tecidos em que a proliferação acelerada é um estado normal (caso da medula óssea, por exemplo, responsável pela renovação constante das células sanguíneas).

No entanto, a utilização de fármacos menos selectivos, onde se incluem os inibidores suicidas da RNR, continua a merecer a atenção da comunidade científica e farmacêutica, em parte devido à possibilidade de anular os efeitos secundários nocivos através da vectorização eficaz da sua distribuição para o tumor, mas também porque, no caso de tumores mais “virulentos” e/ou em que ainda não foi possível explorar terapêuticamente qualquer diferença em relação aos tecidos normais, a relação benefício/prejuízo destes fármacos é particularmente viciada pela falta de alternativas.

Neste trabalho procedeu-se ao estudo computacional do mecanismo de inibição da RNR por quatro análogos dos substratos. Este tipo de estudos providencia informação que não poderia ser obtida utilizando exclusivamente aproximações experimentais, constituindo um complemento de bastante valor, que ajuda a confirmar ou a rebater hipóteses anteriormente avançadas ou a sugerir hipóteses novas. No que diz respeito ao estudo de mecanismos reaccionais, um dos aspectos mais úteis dos métodos de química quântica é a possibilidade de “observar” espécies químicas instáveis, o que possibilita obter estruturas e energias de estados de transição, de intermediários transitórios ou inclusivamente de espécies radicalares,

particularmente importantes no caso da RNR.

Em relação ao primeiro grupo de análogos estudados – os N₃dNDP – o estudo computacional pretendeu avaliar a viabilidade do mecanismo proposto com base nos dados experimentais, testando simultaneamente a existência de um caminho diferente, mais favorável cinética e/ou termodinamicamente. Tendo sido um dos primeiros inibidores suicidas da RNR a ser identificados, este grupo de análogos tinha sido objecto de um número suficiente de estudos experimentais para que o seu mecanismo de inibição parecesse praticamente estabelecido. Um dos principais dados experimentais tinha sido a detecção de um intermediário radicalar – primeira evidência observável da química radicalar da enzima – cuja identificação estava reduzida a duas possibilidades. Com base em todos os dados experimentais, tinha sido proposto um esquema mecanístico com dois caminhos reaccionais correspondentes à formação das duas estruturas possíveis para o radical.

O estudo computacional realizado permitiu, por um lado, a identificação do intermediário radicalar de entre as duas hipóteses possíveis e, por outro, a proposta de um novo caminho reaccional que inclui a formação deste radical e a produção subsequente da furanona efectivamente responsável pela inibição da enzima. O novo mecanismo é, até à data, o mais favorável cineticamente e, para além de estar de acordo com todos os dados experimentais anteriores, foi também confirmado pelos resultados de um estudo recente (Fritscher *et al.* 2005).

A gemcitabina tem a particularidade de ser o inibidor suicida da RNR mais eficaz em termos clínicos, tendo já a sua utilização sido aprovada para o tratamento de vários tipos de cancro. Deste modo, a compreensão do respectivo mecanismo de inibição é fundamental para o desenho de inibidores suicidas igualmente promissores. Estudos experimentais haviam detectado diferenças no mecanismo de inibição dependendo da existência, ou não, de espécies redutoras disponíveis no meio.

O estudo computacional realizado levou à primeira proposta para o mecanismo de inibição na ausência de redutores. As primeiras reacções do mecanismo proposto correspondem às da catálise normal da RNR, com a ressalva do grupo eliminado ser uma molécula de HF e não de H₂O. Apenas no que corresponde ao último passo da catálise, quando o resíduo Cis439 doaria

o átomo de hidrogénio de volta à posição 3' do açúcar, produzindo o desoxirribonucleótido final, neste caso, o mesmo grupo tiol interage preferencialmente com o segundo átomo de flúor da posição 2', originando a eliminação de uma segunda molécula de HF e impedindo a regeneração do radical tirosilo.

As diferenças no mecanismo de inibição provocadas pela presença de redutores parecem estar relacionadas com a redução da ponte dissulfureto formada entre os resíduos Cis225 e Cis462; assim, a parte inicial do mecanismo deverá ser idêntica nas duas situações, divergindo apenas após a formação dessa ponte, sendo que havendo redutores disponíveis os dois resíduos de cisteína deverão ser reduzidos e originar um conjunto de eventos que leve à regeneração do radical tirosilo e à formação de um aducto particularmente estável que inactive a enzima.

Ainda que o estudo computacional tenha permitido um maior esclarecimento da interacção da gemcitabina com a RNR apenas na ausência de redutores, este é já um contributo importante para se conhecer melhor as características que fazem deste composto um inibidor particularmente eficaz em termos clínicos. É possível antever que os análogos de nucleótidos com dois substituintes na posição 2', que possam ser eliminados na forma protonada, deverão comportar-se de forma semelhante à gemcitabina, e poderão originar inibidores suicidas promissores.

O grupo de análogos com o grupo etinilo na posição 3'- β demonstrou propriedades anti-tumorais *in vitro* e *in vivo*, com intensidade dependente da base azotada apresentada. Foi sugerido que a capacidade de interferir com a proliferação celular estaria relacionada, pelo menos parcialmente, com a inibição da RNR, através de um mecanismo simples bietápico que resultaria na formação de um aducto cíclico estável.

O estudo computacional da interacção dos EtNDP com o centro activo da RNR pretendeu elucidar o mecanismo de inibição, verificando a viabilidade cinética e termodinâmica do que havia sido proposto, e averiguar a existência de uma correlação entre a estabilidade do produto resultante da reacção de ciclização com cada uma das bases azotadas e o grau de actividade anti-tumoral apresentado pelo respectivo análogo.

Enquanto as energias calculadas permitem afirmar que o mecanismo é plausível, não ficou confirmado de forma inequívoca que a reacção de ciclização ocorra preferencialmente com a base azotada; para explorar a possibilidade da reacção ocorrer com um resíduo do centro

activo seria necessário aumentar o sistema considerado, de modo a averiguar quais os resíduos em posição de serem atacados pelo carbono radicalar e calcular as energias envolvidas nessa reacção.

Quanto à correlação esperada entre a estabilidade do produto final e a actividade experimental do respectivo análogo, ela não foi observada, o que pode significar que não existe e que, mesmo que a inibição da RNR tenha um papel na actividade dos EtNDP, haverá outro factor responsável pela influência da base azotada, ou que, mais uma vez, o sistema considerado não foi o adequado para incluir todos os parâmetros necessários à sua detecção.

O último grupo de inibidores estudados – o dos SHdNDP – apresenta a particularidade de inibir a RNR apenas na presença de O₂, originando a perda do radical tirosilo e a formação de um novo radical localizado no centro activo. Em meio anaeróbio, a enzima permanece activa, o radical tirosilo é regenerado e não se detecta a formação do novo radical, o que sugere que a interacção prossegue como se tratasse do substrato natural.

Como resultado do estudo computacional, foi possível esclarecer o mecanismo responsável pela inibição da RNR na presença de O₂ e fazer uma primeira proposta para os eventos químicos na ausência de oxigénio, que não afectam a actividade da RNR. A diferença crucial entre as duas situações está relacionada com a formação, em meio oxidante, de uma ponte dissulfureto entre o grupo SH do resíduo de cisteína Cis225 e o SH na posição 2' do análogo. Assim, enquanto no meio anaeróbio o segundo passo do mecanismo resulta na eliminação do grupo SH na forma aniónica, sendo que o resíduo de cisteína Cis439 pode devolver o hidrogénio à posição 3' de forma a regenerar o radical tirosilo, no meio oxidante ocorre a clivagem homolítica da ligação C2'-S e a formação do radical pertiilo 'S-S-CH₂-(Cis225) que impede a regeneração do radical tirosilo.

A compreensão detalhada da actividade da RNR e dos mecanismos de inibição de que é alvo, em particular pelos análogos dos substratos, constitui uma mais-valia para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e porventura mais selectivos. Espera-se que os esclarecimentos adicionais providenciados pelos estudos computacionais apresentados nesta tese contribuam para alcançar esse objectivo.

Referências

Neerman MF (2006) Enhancing the site-specific targeting of macromolecular anticancer drug delivery systems. *Curr Drug Targets* 7 (2): 229-235

Fritscher J, Artin E, Wnuk S, Bar G, Robblee JH, Kacprzak S, Kaupp M, Griffin RG, Bennati M, Stubbe J (2005) Structure of the nitrogen-centered radical formed during inactivation of *E. coli* ribonucleotide reductase by 2'-azido-2'-deoxyuridine-5'-diphosphate: Trapping of the 3'-ketonucleotide. *J Am Chem Soc* 127 (21): 7729-7738