



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

**MECANISMO DE AÇÃO DE ADJUVANTES DE
ENOVAMENTO PROTÉICO: MODULAÇÃO
CONFORMACIONAL DA PROTEÍNA
APOMIOGLOBINA COMO SISTEMA MODELO**

Vivian de Almeida Silva

RIO DE JANEIRO

2006

VIVIAN DE ALMEIDA SILVA

**MECANISMO DE AÇÃO DE ADJUVANTES DE
ENOVAMENTO PROTÉICO: MODULAÇÃO
CONFORMACIONAL DA PROTEÍNA APOMIOGLOBINA
COMO SISTEMA MODELO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luís Maurício T. R. Lima

Rio de Janeiro

2006

VIVIAN DE ALMEIDA SILVA

**MECANISMO DE AÇÃO DE ADJUVANTES DE ENOVELAMENTO
PROTÉICO: MODULAÇÃO CONFORMACIONAL DA PROTEÍNA
APOMIOGLOBINA COMO SISTEMA MODELO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

Prof. Dr. Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano
Instituto de Biologia – UERJ

Profa. Dra. Yraima Moura Lopes Cordeiro
Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ

Profa. Dra. Maria Bernadete Riemma Pierre
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Aos meus pais, Waldeck e Sonia, pelo amor, apoio e dedicação em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Luís Maurício Lima, por quem tenho enorme admiração, não só por sua competência e dedicação, mas também por ser essa pessoa amiga e sempre disposta a ajudar, agradeço por tudo.

Ao professor Márcio Colombo, co-orientador deste trabalho, pelo incentivo e colaboração durante toda a pesquisa.

Aos professores Mauro Sola Penna e Valéria Pereira, pela revisão deste trabalho, trazendo importantes contribuições.

Aos professores do LabCQ: Nádia Volpato, Sheila Garcia e Valéria Pereira pelas orientações.

Aos amigos do LabCQ: Bianca, Laís, Tailane, Raquel, Adriana, Joana, Eliane, Ana Paula, Carol, Vinícius, Mariana, Daniela, Edilene, Aninha, Bianca, Márcio R., Márcio M., Zaida, Renata, Emeli e tantos outros pelo apoio e pelos bons momentos compartilhados.

Aos professores do programa de pós-graduação pelos ensinamentos.

Aos professores Julio Mignaco, Hector Barrabin e Helena Scoffano do Laboratório de Bioenergética Aplicada IBqM, UFRJ, prof. Jerson L. Silva (LTPV) e Débora Foguel (LAPA) – IBqM, UFRJ e prof. Pedro L. Oliveira – IBqM, UFRJ, por permitirem a realização de medidas em seus laboratórios.

Ao professor Roland Winter e Shuang Zhao, Universidade de Dortmund, pela contribuição na parte prática deste trabalho.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS) por permitir a realização de medidas de SAXS.

Ao CNPq, FAPERJ e Fundação Universitária José Bonifácio pelo apoio financeiro.

Aos professores e funcionários da UFRJ que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese.

Aos amigos por torcerem pelo meu sucesso.

A toda a minha família pelo apoio, carinho e paciência sempre.

RESUMO

Silva, Vivian de Almeida. **Mecanismo de ação de adjuvantes de enovelamento protéico: modulação conformacional da proteína apomioglobina como sistema modelo**. Rio de Janeiro, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

Esta tese tem o objetivo de entender o mecanismo pelo qual adjuvantes químicos atuam sobre a superfície de proteínas, e como os mesmos conseguem proteger a sua estrutura reenovelada contra perturbações, tais como pH, temperatura e pressão. A proteína de escolha para o estudo foi a apomioglobina de coração de cavalo (apoMb), visto que a apoMb é uma proteína bem estudada, sua estrutura está elucidada, assim como suas vias de enovelamento-desenovelamento em equilíbrio e cinética. A espectroscopia de fluorescência foi usada para monitorar mudanças conformacionais na estrutura terciária. A pH 7, a apoMb está enovelada (estado N) e desenovela-se em duas etapas quando o pH é diminuído. Para valores de pH entre 4 e 5 a proteína assume um estado parcialmente desenovelado, o estado intermediário (I). Para valores de pH abaixo de 4, a proteína continua o desenovelamento até o estado desnaturado (D). O estudo da influência de pressão e temperatura sobre a estrutura protéica através das técnicas de alta pressão e calorimetria acoplada a perturbação por pressão contribuiu para melhor compreensão das forças que regem o enovelamento da apoMb, demonstrando que o principal fator envolvido no processo é a variação de volume (ΔV) do sistema e não forças entálpicas como pensado anteriormente. Todos os adjuvantes testados estabilizam uma estrutura intermediária (I), que apresenta as mesmas propriedades espectroscópicas do estado parcialmente enovelado de pH 4, o que validamos por análises dos parâmetros estruturais raio de giro e distância máxima, a partir de medidas de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) da proteína a pH 2,5 na presença de tais co-solutos. A dependência da concentração de co-soluto no valor de energia livre de transição em equilíbrio entre D e I foi interpretada em função da atividade da água. O grau de hidratação protéica, associado com a reação de enovelamento foi calculado. Esta modificação é representada pela mudança do

número de moléculas de água, dN_w , que são excluídas da superfície da proteína quando esta se enovela. Os resultados indicaram que dN_w varia com o tamanho do cosoluto e, dentro de uma faixa, está linearmente relacionado com o volume específico parcial dos solutos usados para regular a atividade da água. Essa dependência atinge um *plateau* de $dN_w = 600$, que está em total concordância com dados da literatura para a diferença de hidratação entre a apoMb a pH 2,5 e a pH 4 estimados por espectroscopia dielétrica de microondas. Medidas de cinética rápida de reenovelamento monitoradas por fluorescência revelaram que nem o tamanho nem a concentração de soluto empregada influencia a velocidade de transição $D \rightarrow I$, sugerindo que a estabilidade do intermediário de enovelamento em equilíbrio I é então determinada pela reação de transição $I \rightarrow D$. Os esforços empregados no sentido do entendimento do mecanismo de ação de solutos sobre estruturas protéicas vai além da compreensão das forças envolvidas no enovelamento, visando também à melhoria da eficácia de agentes terapêuticos protéicos e demais sistemas macromoleculares.

ABSTRACT

Silva, Vivian de Almeida. **Mecanismo de ação de adjuvantes de enovelamento protéico: modulação conformacional da proteína apomioglobina como sistema modelo.** Rio de Janeiro, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

This dissertation has the aim to understand the mechanism for which chemical adjuvants act on the protein surface, and how they get to protect its structure refolded against perturbations, as pH, temperature and pressure. The protein of choice for studying was the horse heart apomyoglobin (apoMb), since apoMb is a well studied protein, its structure is elucidated, as well as its folding-unfolding equilibrium and kinetic pathways. Fluorescence spectroscopy was used to follow tertiary structure conformational changes. At pH 7, apoMb is folded (N state) and unfolds in two steps by lowering the pH. For pH values between 4 and 5 the protein assume a partially folded state, the intermediate state (I). For pH values bellow 4, the protein further unfolds to the denatured state D. The study of the pressure and temperature influence on the protein structure trough the techniques of high pressure and pressure perturbation calorimetry contributed to better comprehension of the forces that guide the apoMb folding, demonstrating that the main factor involved in the process is the volume change (ΔV) of the system and not the enthalpic forces as thought previously. All tested co-solutes stabilize an intermediate-like structure (I) that presents the same spectroscopic properties of the pH 4 molten globule state, what we validated through analyses of the structural parameters radius of gyration and maximum distance, from measurements of small-angle X-ray scattering (SAXS) of the protein at pH 2,5 in the presence of co-solutes. The dependence of co-solute concentration on the free energy of equilibrium transition between D and I were interpreted in function of water activity. The degree of protein hydration associated with the folding reaction was calculated. This change is represented by the change of number of water molecules, dN_w , that are excluded from the protein surface when it folds. The results indicated that dN_w vary with the size of the co-solute and, within a range, it is linearly related with the partial specific volume of the solutes used to

adjust water activity. This dependence reaches a *plateau* of $dN_w = 600$, that it is in total agreement with data of the literature for the difference of hydration between the apoMb at pH 2,5 and pH 4, estimated by microwaves dielectric spectroscopy. Kinetic fast measurements of refolding followed by fluorescence reveal that neither the size nor the concentration of the solute used influence the velocity of transition $D \rightarrow I$, suggesting that the stability of the folding intermediate I in equilibrium is determined by the reaction of transition $I \rightarrow D$. The efforts used in the direction of the agreement of the mechanism of action of solutes on the protein structures go beyond the understanding of the involved folding forces, also aiming at the improvement of the effectiveness of protein therapeutical agents and too much macromolecular systems.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Diagrama de energia para diferentes estados conformacionais das proteínas.	25
Figura 2	Alguns possíveis estados conformacionais das proteínas.	27
Figura 3	Estrutura cristalográfica da mioglobina (recombinante) de coração de cavalo, não modificada (“selvagem”).	28
Figura 4	Diagrama esquemático da estrutura da apomioglobina.	29
Figura 5	Enovelamento da mioglobina.	30
Figura 6	Deslocamentos químicos da apoMb <i>versus</i> holoMb.	31
Figura 7	Análise comparativa da estabilidade de apoMb de coração de cavalo e de cachalote.	32
Figura 8	Curvas de desnaturação por pressão da apoMb de cachalote selvagem, monitorada por 1D-RMN.	37
Figura 9	Interação de moléculas de água com a superfície da proteína.	42
Figura 10	Interações preferenciais com osmólitos.	44
Figura 11	Diagrama esquemático do sistema de alta pressão hidrostática.	57
Figura 12	Esquema simplificado de um aparelho de cinética.	62
Figura 13	Representação da cinética de (des)enovelamento de proteínas.	63
Figura 14	Espalhamento de luz quando um raio incide sobre a molécula.	69
Figura 15	Simulações de SAXS para diferentes proteínas em função de diferentes estados oligoméricos e da presença de pequenos ligantes.	72
Figura 16	Variação do gráfico de Kratky para uma proteína.	73
Figura 17	A - Gráfico de emissão de fluorescência intrínseca da apoMb versus comprimento de onda à pH 2,5 e 7,0. B - Fluorescência normalizada a partir do gráfico A..	75

Figura 18	Efeito do pH sobre a emissão de fluorescência, indicado A) pelo deslocamento do centro de massa espectral e B) pela intensidade de fluorescência dada pela área espectral.	76
Figura 19	Transição conformacional da apoMb induzida por pressão.	77
Figura 20	Gráfico de Van't Hoff e efeito da temperatura sobre o valor de energia livre de Gibbs.	79
Figura 21	Efeito da temperatura sobre a variação de volume parcial da apoMb nativa (pH 7.0, vermelho) e seu estado intermediário (pH 4.0, azul) sob pressão.	81
Figura 22	Diagrama esquemático representando a hidratação, em termos de moléculas de água para os estados nativo (N), intermediário (A) e desenovelado (U) da apoMb induzido por pH.	83
Figura 23	Curvas de calorimetria de perturbação por pressão da apoMb a pH 7,0, pH 4,0, e pH 2,5.	84
Figura 24	Coeficientes de expansão térmica de L-aminoácidos.	85
Figura 25	Página da Internet com o programa WHAT_IF.	86
Figura 26	Estimativas de coeficientes de expansão térmica da apoMb nas conformações nativa e desenovelada.	87
Figura 27	Transições conformacionais da apoMb induzidas por pH, monitoradas pelo deslocamento do centro de massa espectral.	89
Figura 28	Efeito de sacarose na fluorescência intrínseca de apoMb. Na ausência ou na presença de 1,5 M sacarose.	90
Figura 29	Isoterma de titulação de apoMb por sacarose a pH 2,5.	91
Figura 30	Efeito de concentrações variadas de diferentes solutos sobre o enovelamento da apoMb a pH 2,5, monitorado por sua fluorescência intrínseca.	92
Figura 31	Interpretação do efeito dos solutos sobre a estrutura da apoMb em termos de enovelamento induzido por forças de hidratação.	94
Figura 32	Relação entre variações de hidratação no enovelamento da apoMb a pH 2,5 induzido por soluto e o volume parcial molar do mesmo.	96
Figura 33	Cinética de enovelamento da apoMb em diferentes concentrações de solutos, monitorada por fluorescência.	98

Figura 34	Medidas cinéticas de enovelamento da apoMb induzido por PEG 400 e PEG 600 a pH 2,5 a 20°C.	99
Figura 35	Medidas cinéticas de enovelamento da apoMb induzido por soluto a pH 2,5 e temperatura 21°C.	100
Figura 36	Medidas cinéticas de enovelamento da apoMb em função da atividade da água a pH 2,5 a 21°C.	102
Figura 37	Medidas da constante cinética de reenovelamento da apoMb (5 μ M) em função da temperatura para os PEGs 600 e 400.	103
Figura 38	Perfil de espalhamento de raios X a baixos ângulos.	107
Figura 39	Esquema ilustrativo da densidade eletrônica ρ de uma partícula imersa em um meio de densidade eletrônica ρ_0 compondo uma solução-amostra de densidade eletrônica ρ_M .	108
Figura 40	Dados de espalhamento de raios-X a baixos ângulos corrigidos para intensidade do feixe e atenuação da amostra.	108
Figura 41	Gráficos de Guinier das curvas de espalhamento para apoMb.	111
Figura 42	Gráfico de Kratky a partir das curvas de espalhamento para apoMb em diferentes condições.	115
Figura 43	Gráfico de Kratky para as amostras de apoMb em diferentes meios.	115
Figura 44	Gráfico do total estimado em função da distância máxima.	116
Figura 45	Função de distribuição de pares de distância.	118

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Concentrações de PEG utilizadas para análise	68
Tabela 2 Parâmetros termodinâmicos para transição conformacional da apoMb induzida por pressão	81
Tabela 3 Parâmetros termodinâmicos e estruturais correspondentes aos diversos estados da apoMb	82
Tabela 4 Relação entre variação de hidratação e volume parcial molar dos solutos empregados	95
Tabela 5 Parâmetros estruturais obtidos por SAXS para a apoMb em diferentes condições	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcONa	Acetato de sódio
ANS	1,8-anilinaftalenosulfonato
ApoMb	Apomioglobina
a_w	Atividade da água
α	Coefficiente de expansão térmica aparente
α_{des}	Coefficiente de expansão térmica de desenovelamento
α_M	Contribuição de expansividade inerente a macromolécula
α_{solv}	Coefficiente de expansão térmica do solvente
CPP	Calorimetria com perturbação por pressão
CM	Centro de massa espectral
D	Desenovelado
[D]	Concentração da forma desenovelada
DC	Dicroísmo circular
$D_{m\acute{a}x}$	Dimensão máxima
dN_s	Varição no número de ligantes
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
ΔG°_w	Energia livre de Gibbs
ΔG^*	Energia livre de Gibbs de ativação
ΔH	Entalpia
ΔH^*	Entalpia de ativação
Δp	Varição de pressão
ΔQ_{rev}	Varição de calor no desenovelamento reversível

ΔS	Entropia
ΔS^*	Entropia de ativação
ΔN_w	Variação do grau de hidratação
ΔV	Variação de volume
ΔW_H	Grau de hidratação
F	Fluorescência
γ	Coefficiente pré-exponencial
GuaAc	Acetato de guanidínio
GuaHCl	Cloridrato de guanidínio
GuaSCN	Tiocianato de guanidínio
GuaSO ₄	Sulfato de guanidínio
His	Histidina
HoloMb	Holomioglobina
I	Intermediário
[I]	Concentração da forma intermediária
I(q)	Intensidade espalhamento
K	Constante cinética
K _{ex}	Constante de exclusão
K _F	Constante final de equilíbrio
K _S	Constante de equilíbrio da reação de ligação do soluto à proteína
K _w	Constante de equilíbrio
ln a _w	Logaritmo neperiano da atividade da água
ln K	Logaritmo neperiano da constante de equilíbrio
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncroton

MG	<i>Molten globule</i>
[N]	Concentração da forma nativa
N	Nativo
v_x	Extensão da ligação entre o ligante e a proteína
Osm	Osmolalidade
P	Pressão
PEG	Polietilenoglicol
$P(r)$	Função de distribuição de pares de distância
q	Vetor de espalhamento
r	Raio da partícula
R	Constante universal dos gases ideais
Rg	Raio de giro
RMN	Ressonância magnética nuclear
ρ	Densidade eletrônica
S	Sinal de fluorescência
T	Temperatura
Tris	Tri-hidroximetilaminometano
V_{cel}	Volume da célula de CPP
x	Ligante

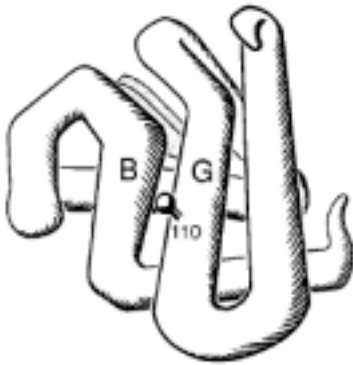
SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 O ENOVELAMENTO DE PROTEÍNAS	24
1.2 APOMIOGLOBINA	28
1.2.1 Caracterização estrutural da apomioglobina nativa	28
1.2.2 Estudos de enovelamento da apomioglobina e caracterização dos estados intermediários	33
1.2.2.1 Estudos de equilíbrio	33
1.2.2.2 Estudos da cinética de enovelamento	35
1.2.2.3 Efeito da pressão sobre o enovelamento	36
1.3 ADIÇÃO DE OSMÓLITOS E ESTABILIDADE PROTÉICA	38
1.3.1 Teoria termodinâmica dos três componentes	41
1.3.2 Interpretação do efeito de solutos no equilíbrio conformacional segundo a relação de Wyman	45
2 OBJETIVOS	49
2.1 OBJETIVO GERAL	49
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 MATERIAIS	51
3.1.1 Proteínas e solutos	51
3.1.2 Reagentes	51
3.1.3 Equipamentos de medida	52

3.2	MÉTODOS	53
3.2.1	Obtenção da apomioglobina	53
3.2.2	Estudo do enovelamento da apoMb e caracterização do estado intermediário	54
3.2.2.1	Efeito do pH no enovelamento protéico	54
3.2.2.2	Efeito da pressão sobre o enovelamento protéico	54
3.2.2.3	Análise dos dados de transição conformacional induzida por pressão	58
3.2.2.4	Estudo por calorimetria de perturbação por pressão	59
3.2.2.5	Análise dos dados de calorimetria de perturbação por pressão	59
3.2.3	Estudo do efeito de solutos no estado desenovelado da apomioglobina	61
3.2.4	Estudo da Cinética de enovelamento da apomioglobina induzido por diferentes solutos	62
3.2.5	Medidas espectrofluorimétricas	63
3.2.6	Análise dos dados de equilíbrio conformacional	65
3.2.7	Estudo conformacional da apomioglobina em diferentes solutos a partir da técnica de Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos (SAXS)	66
3.2.8	Análise dos dados de SAXS	68
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1	DEPENDÊNCIA DO pH NO ENOVELAMENTO DA APOMB	74
4.2	EFEITO DA PRESSÃO SOBRE O ENOVELAMENTO DA APOMB	76
4.3	ESTUDO DO EFEITO DE SOLUTOS NO ESTADO DESENOVELADO DA APOMIOGLOBINA	88
4.4	ESTUDO DA CINÉTICA DE ENOVELAMENTO	97
4.5	ESTUDO CONFORMACIONAL DA APOMIOGLOBINA EM DIFERENTES SOLUTOS A PARTIR DA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS (SAXS)	105

5 CONCLUSÕES	120
REFERÊNCIAS	123
ANEXO A – TABELA: Concentração de PEG (%p/p) versus log a_w	131
ANEXO B – Correlação entre índice de refração e concentração percentual peso/peso dos PEGs utilizados.	133
ANEXO C – TRABALHOS EM CONGRESSOS	135
ANEXO D – TRABALHO - LNLS	137

1 INTRODUÇÃO



A estabilização de estruturas protéicas é sempre uma questão importante a ser levantada, independente do âmbito em que o assunto é envolvido. Isso se deve ao fato de estruturas protéicas estarem susceptíveis a diversos tipos de alterações químicas e físicas, tais como deaminações, proteólise, oxidação, agregação, mudanças conformacionais irreversíveis, inibição química por ligantes, etc. O maior problema por trás de alterações conformacionais de proteínas é que estas nem sempre são perceptíveis a métodos gerais de análise, o que torna complexo a análise estrutural da mesma. Em virtude disso, normalmente um grande conjunto de metodologias tem que ser empregado: eletroforese, gel-filtração, mapeamento proteolítico, atividade ótica (por espectropolarimetria), infravermelho, atividade enzimática (quando pertinente), dentre outras (UNITED States Pharmacopeia, 2005).

Mais além que protocolar metodologias analíticas precisas, específicas e sensíveis à percepção de mudanças estruturais, mesmo que sutis mas capazes de pôr em perda grande quantidade de material, é preciso manter a estrutura nativa protéica, por meio de adjuvantes capazes de evitar que exposição, ainda que breve, de amostras protéicas a condições de *stress* levem à sua desnaturação.

Os adjuvantes são componentes não-terapêuticos (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000) adicionados à formulação com o intuito de facilitar a preparação, melhorar a estabilidade e/ou assegurar o funcionamento da forma farmacêutica como um sistema de liberação do fármaco (AULTON, 2005). Os adjuvantes serão

eventualmente chamados, nesta dissertação, de co-solutos visto que trabalhamos com um sistema líquido contendo a proteína dissolvida em água.

Historicamente tem-se empregado diversos tipos de solutos capazes de estabilizar estruturas protéicas. Esses solutos, ditos inertes, em geral solventes orgânicos, compostos polihídricos e carboidratos, são amplamente empregados mesmo sem o completo entendimento do mecanismo de atuação dos mesmos. Entende-se atualmente que é por modulação da solvatação protéica que esses compostos atuam. Assim, a questão da solvatação das proteínas tem sido alvo de grande atenção nos últimos anos. Isto porque uma característica das reações químicas envolvendo proteínas é a mudança na área superficial que é exposta à água, durante a reação de mudança conformacional, qualquer que sejam os estados inicial e final a que estejam sujeitas: é sempre muito provável que essas mudanças levem a profundas alterações no grau de superfície protéica exposta. Essas mudanças de grau de solvatação também estão envolvidas durante o enovelamento protéico, de uma estrutura desenovelada a uma enovelada. Sendo assim, a compreensão de como a solvatação atua energeticamente sobre o enovelamento proteico é chave no entendimento de dinâmicas conformacionais, interações protéicas - tais como proteína:proteína, proteína:ligante (ex: fármacos), proteína:macromolécula, etc. , manuseio e processamento de produtos protéicos e peptídicos biotecnológicos, modelagem molecular, dentre outros.

Assim sendo, é importante determinar variações em quantidade de moléculas de água que interagem com a proteína durante o curso de reações tais como as mencionadas acima, bem como essas variações ocorrem, pois podem fornecer indicações dos mecanismos físico-químicos envolvidos nesta reação. Esta determinação é mais eficaz, e os dados obtidos tornam-se mais significativos,

quando perturba-se o sistema água-proteína pela adição de um terceiro componente em altas concentrações, um soluto, aqui eventualmente denominado adjuvante químico.

O interesse específico nesse tópico é, portanto, entender como a modulação de condições de solução-amostra pode atuar sobre a estrutura e funcionalidade protéica, podendo-se partir para aplicações diretas em estabilização de produtos biofarmacêuticos, além da compreensão dos fenômenos gerais de enovelamento protéico e interações macromoleculares envolvidos nos diversos sistemas biológicos.

Nesta dissertação, empregou-se como modelo para estudo a apomioglobina de coração de cavalo (apoMb). Mas, porque apoMb? Qual a relação direta dela com produtos biofarmacêuticos? Pode-se dizer que há uma relação direta, ainda que apoMb não seja um fármaco de origem biotecnológica. Trata-se de uma proteína estudada há mais de 40 anos, cuja estrutura é muito bem elucidada, entendida em diversos aspectos, suas vias de enovelamento e desenovelamento por uma série de variáveis também são muito bem exploradas. Assim, ela se torna um modelo excelente para o estudo de mecanismo de ação de adjuvantes químicos sobre o enovelamento e estabilidade protéicos, exatamente por ser conhecido seu comportamento e, assim, qualquer recondução de seu comportamento normal pode ser atribuído e investigado à luz de efeitos desses adjuvantes. Fora isso, a mioglobina é uma proteína que pode ser obtida com alto rendimento e elevadíssima pureza. Entretanto, mantém-se como perspectiva futura, a continuidade deste trabalho com outros sistemas, em especial proteínas que correntemente estejam em prática médica atual, sob objeto de fases clínicas, ou ainda em uso em outros processos biotecnológicos farmacêuticos, tais como enzimas de métodos

diagnósticos, processamento de biofármacos por catálise enzimática, dentre tantas outras áreas.

Para melhor compreensão do trabalho, da proteína em estudo e dos processos de enovelamento/desenovelamento protéicos, segue uma revisão bibliográfica apresentando contribuições científicas importantes que serão a base para a discussão e interpretação dos resultados apresentados.

1.1 O ENOVELAMENTO DE PROTEÍNAS

O mecanismo pelo qual uma proteína se enovela a partir de conformações desordenadas é alvo de estudos há várias décadas. O entendimento desse processo envolve a caracterização de todas as espécies que ocorrem na reação de enovelamento e corresponde à oportunidade de relacionar a seqüência de aminoácidos de uma proteína, sua estrutura, estabilidade e função biológica (KUMAR & YU, 2004).

A cadeia polipeptídica de proteínas globulares é enovelada de forma compacta e esta conformação é importante para a função biológica por elas exercida. Isso foi evidenciado por experimentos de desnaturação protéica induzidos por aquecimento, exposição a valores extremos de pH ou adição de agentes desnaturantes como uréia e cloreto de guanidino. Quando uma proteína globular é desnaturada, seu esqueleto covalente permanece intacto, mas a cadeia polipeptídica desdobra-se ao acaso em conformações espaciais variáveis e irregulares. A maneira como as cadeias polipeptídicas são dobradas determina a estrutura terciária da proteína (NELSON & COX, 2000). Esta pode ser estabilizada por quatro tipos de interação: pontes de hidrogênio entre as cadeias laterais, ou grupos R, de resíduos pertencentes a alças adjacentes, atração iônica entre grupos R com cargas elétricas opostas, interações hidrofóbicas e/ou interações covalentes.

A estrutura terciária de uma proteína depende da sua seqüência de aminoácidos, ou seja, da sua estrutura primária, o que foi evidenciado por experimentos que demonstraram que a desnaturação de algumas proteínas é um processo reversível, ao contrário do que foi pensado durante muitos anos. Um caso clássico de renaturação é dado pela ribonuclease, uma proteína de cadeia única

com quatro pontes dissulfeto intracadeia. Christian Anfinsen demonstrou, na década de 50, que a ribonuclease era desnaturada por uréia e na presença de um agente redutor, perdendo sua atividade catalítica. Entretanto, à medida que essas substâncias eram removidas, a ribonuclease desnaturada readquiria, lenta e espontaneamente, sua estrutura tridimensional correta, restaurando sua atividade catalítica (NELSON & COX, 2000). Esse experimento provou que a seqüência de aminoácidos das proteínas contém toda informação necessária para o enovelamento da cadeia na estrutura tridimensional nativa.

A estrutura nativa, entretanto, coexiste com outras conformações possíveis, e transições reversíveis de uma conformação para outra podem ocorrer quando o ambiente é alterado. Esses outros estados conformacionais apresentam maior mobilidade interna da cadeia conferindo frágil estabilidade à conformação nativa, caracterizada como uma estrutura altamente organizada (TANFORD, 1968). A figura 1 ilustra diferentes estágios energéticos que podem ser apresentados pelas diferentes conformações protéicas.

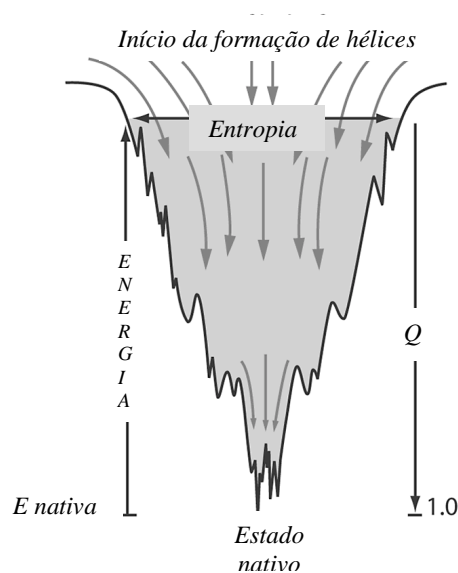


Figura 1 - Diagrama de energia para diferentes estados conformacionais das proteínas. Disponível em: <<http://ww.msstate.edu/~wss2/enzymes>>. Acesso em 25 nov. 2005.

Estudando o processo de enovelamento e desenovelamento protéico, vários pesquisadores verificaram que esse processo nem sempre ocorre em apenas duas etapas, como se pensava inicialmente. Foi identificada a presença de intermediários de enovelamento. Estes foram primeiramente detectados por Tanford que constatou que os processos de desnaturação protéica, induzidos por pH, temperatura, uréia e cloreto de guanidínio não eram equivalentes, gerando formas estruturalmente distintas (TANFORD, 1970).

O estado intermediário de enovelamento foi caracterizado por diversos pesquisadores, que o descreveram como um estado compacto desnaturado, com significativo conteúdo de estrutura secundária, similar à estrutura nativa, e estrutura terciária flexível e desordenada (BARRICK & BALDWIN, 1993).

O estudo da α -lactalbumina por espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) demonstrou que o raio de giro (R_g) do estado intermediário apresentava um valor muito próximo ao estado nativo, tendo um aumento apenas de 10% em relação à forma nativa (DOLGIKH *et al.*, 1981, 1985, PITITSYN, 1992). Por outro lado, o citocromo *c* na forma estabilizada por sais apresentava um R_g 25% maior que a respectiva forma nativa (KATAOKA *et al.*, 1993).

Uma proteína em seu estado nativo quando exposta às condições de estresse, como pH, temperatura, agente desnaturantes, entre outras, tende a se desenovelar e esse processo pode ocorrer em várias etapas, com a formação de um ou mais estados intermediários. O importante é que o equilíbrio esteja sempre deslocado no sentido da forma nativa, impedindo assim a formação de estruturas não funcionais e/ou que apresentem efeito tóxico (figura 2).

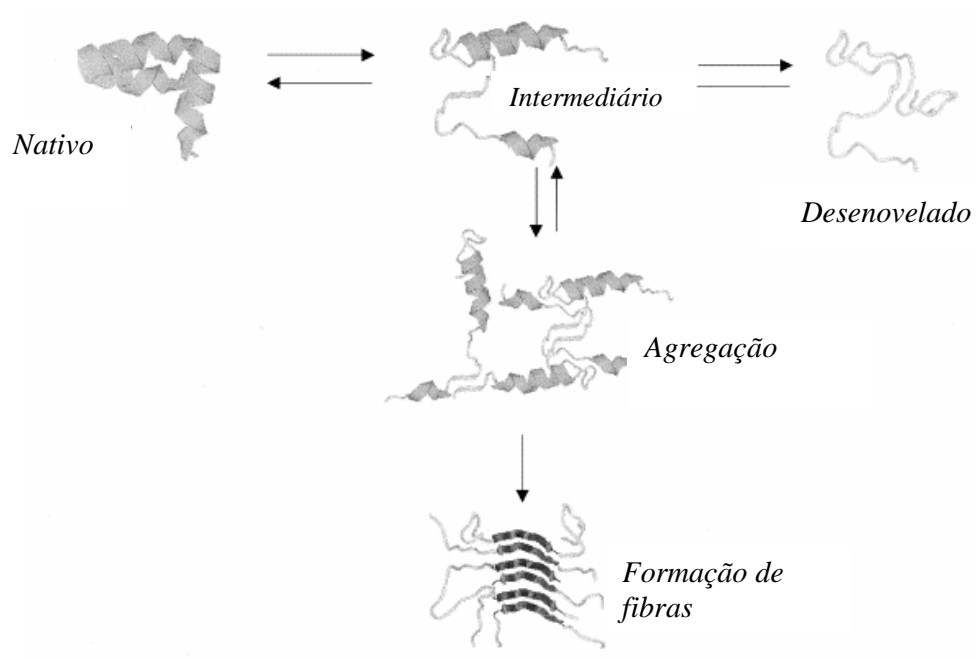


Figura 2 - Alguns possíveis estados conformacionais das proteínas. Fonte: SMELLER, 2002.

1.2 APOMIOGLOBINA

1.2.1 Caracterização estrutural da apomioglobina nativa

A apomioglobina é uma proteína globular na região de pH neutro, derivada da mioglobina - proteína de estocagem de oxigênio nos tecidos musculares dos vertebrados - após a extração do grupo heme. A estrutura secundária é composta de oito hélices α , denominadas pelas letras A a H (NELSON & COX, 2000). Sua estrutura não foi ainda determinada por métodos cristalográficos.

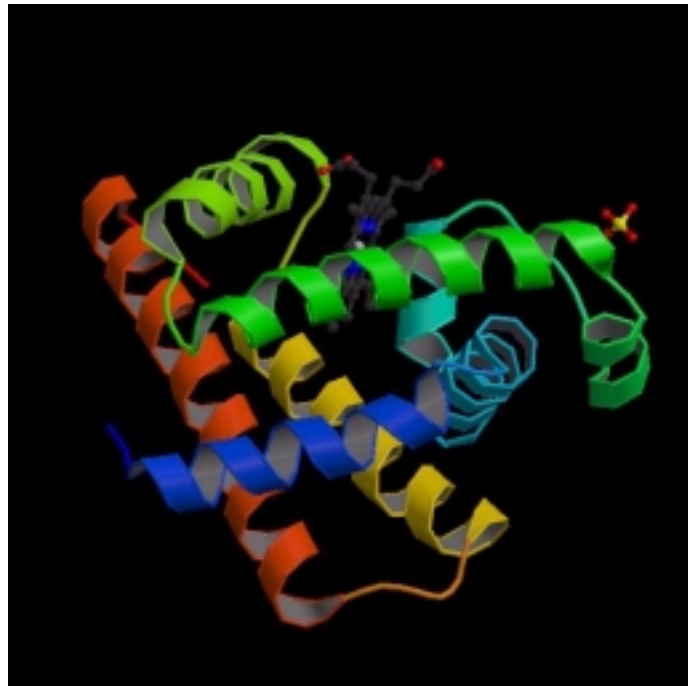


Figura 3 - Estrutura cristalográfica da mioglobina (recombinante) de coração de cavalo, não modificada ("selvagem"). 1WLA.pdb.
Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pdbId=1WLA;page=;job=graphics&bio=1&opt=show&size=500>.

Harrison e Blout (1965) sugeriram que apoMb teria cerca de 20 aminoácidos a menos envolvidos em hélices alfa quando comparada com a holomioglobina, proteína contendo o grupo heme (holoMb). Mais tarde, Griko e Privalov (1988) sugeriram, por experimentos de $^1\text{HRMN}$ e calorimetria, que a apoMb possuía uma conformação tridimensional particular que, apesar de desconhecida, provavelmente lembraria bastante a forma holo. A figura 4 apresenta um diagrama esquemático da apoMb.

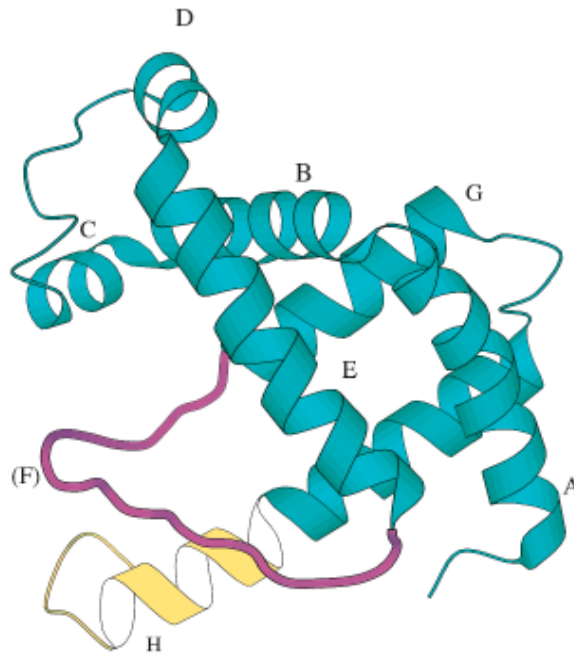


Figura 4 - Diagrama esquemático da estrutura da apomioglobina. Fonte: ELIEZER & WRIGHT, 1996.

A mioglobina de coração de cavalo possui 11 histidinas com pKa bastante diferentes. Medidas comparativas de RMN com apoMb e holoMb eqüinas demonstraram que 8 dessas histidinas possuem constantes de acidez aparentes similares, indicando que muito embora a geometria e dinâmica não sejam

completamente conservadas, a remoção do heme tem efeito limitado sobre a estrutura e compactação dessa proteína (COCCO *et al.* 1992). A figura 5 apresenta o enovelamento da holoMb .

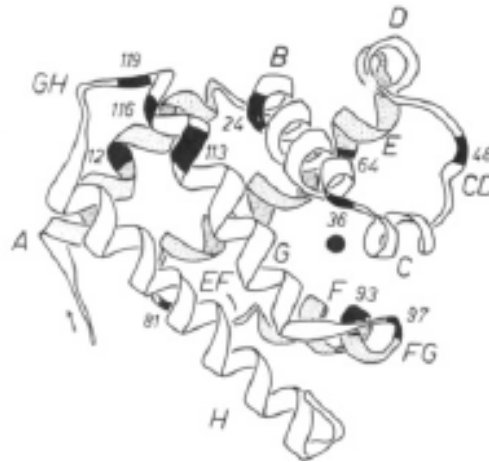


Figura 5 - Enovelamento da mioglobina. As hélices estão representadas por uma única letra e as partes conectadas por duas letras. Os números indicam as posições das histidinas. Fonte: COCCO, 1992.

Estudos recentes de ressonância magnética nuclear (RMN) reforçaram as evidências de que as estruturas secundária e terciária da apomioglobina são muito semelhantes às da holo-proteína, proteína contendo o grupo heme (HUGHSON, WRIGHT & BALDWIN, 1990). A análise por RMN mostrou enorme similaridade entre a forma holo e apo exceto por algumas diferenças nos *loops* EF e FG, na hélice F e na porção N-terminal da hélice G, cujas ressonâncias do esqueleto polipeptídico são alargadas além da capacidade de detecção, sugerindo uma ampla flutuação conformacional (ELIEZER & WRIGHT, 1996).

O estudo comparativo dos deslocamentos químicos dos prótons e nitrogênios amídicos para a forma apo e holo da proteína está apresentado na figura 6.

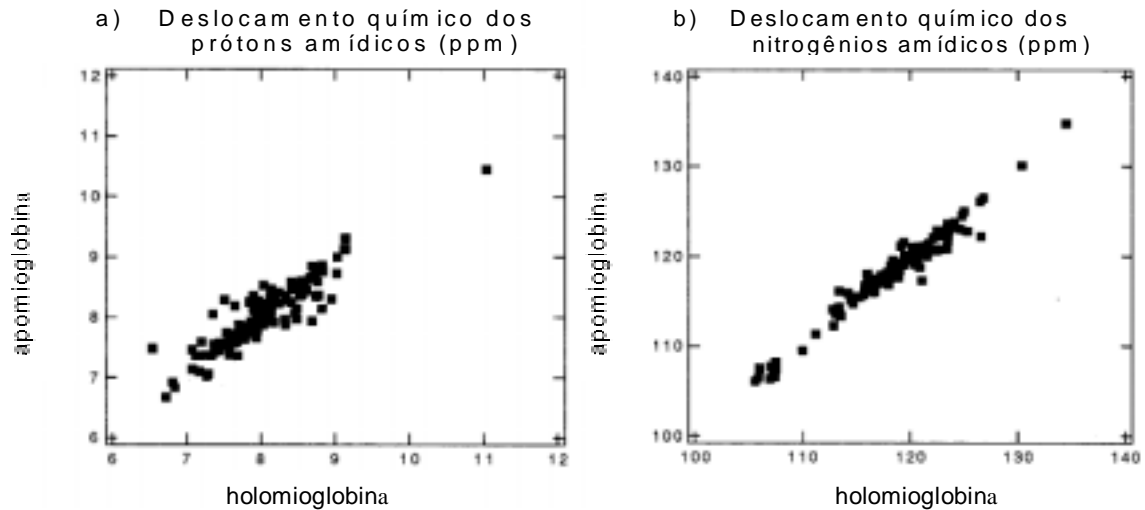


Figura 6 - Deslocamentos químicos da apoMb versus holoMb para (a) prótons amídicos e (b) nitrogênios amídicos. Fonte: ELIEZER E WRIGHT, 1996.

A apoMb contém um extenso núcleo hidrofóbico e muito dos resíduos hidrofóbicos presentes na holo-proteína é conservado na forma apo. Embora semelhante a holo-proteína, apresenta notáveis diferenças tanto em sua estrutura como em suas propriedades. A apomioglobina tem menor elipticidade que a holo-proteína como observado pela técnica de dicroísmo circular (DC), menor estabilidade, diferente capacidade calorífica e apresenta um raio de giro ligeiramente maior (WRIGHT & BALDWIN, 2000).

A apomioglobina em pH 2,5, é descrita como desenovelada (TEALE, 1959), ainda que ela apresente estrutura residual, como sugerido por medidas de dicroísmo circular, por SAXS que revela raio de giro menor que o de uma cadeia polipeptídica completamente desenovelada, e por RMN que demonstra a possibilidade de até 29

resíduos (19%) envolvidos em leve estruturação de alfa-hélice (MOHANA-BORGES *et al.*, 2004).

Os numerosos trabalhos encontrados na literatura estão praticamente divididos em apoMb de cachalote e apoMb proveniente de coração de cavalo. Ambas apresentam grande homologia, entretanto, diferem quanto à estabilidade frente a diferentes agentes perturbadores, como por exemplo, uréia e concentração hidrogeniônica. A concentração de uréia necessária para alcançar o ponto médio de transição entre os estados nativo e desenovelado para a apoMb de baleia é 3,4M, enquanto para a apoMb de cavalo é 2,7M, mostrando a segunda ser menos estável. A apoMb de cavalo é ainda menos resistente ao desenovelamento induzido por ácido quando comparada à de cachalote (REGIS *et al.*, 2005). Esta análise comparativa está apresentada na figura 7.

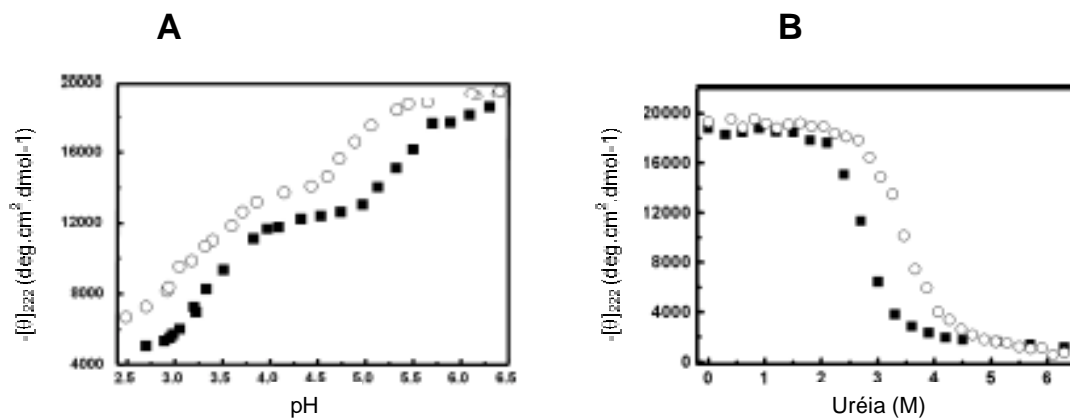


Figura 7 - Análise comparativa da estabilidade de apoMb de coração de cavalo (■) e de cachalote (○). A) Os pontos médios das transições entre os estados nativo e intermediário em função do pH foram de 4,8 para cachalote e 5,3 para coração de cavalo. B) Os pontos médios das transições entre os estados nativo e desnaturado, a pH 7,8, foram de 3,4M para cachalote e 2,7M para coração de cavalo. Fonte: REGIS *et al.*, 2005.

1.2.2 Estudos de enovelamento da apomioglobina e caracterização dos estados intermediários

1.2.2.1 Estudos de equilíbrio

A apomioglobina é uma proteína globular cujo enovelamento é muito bem descrito, sendo conhecida por possuir em equilíbrio, em função de pH, estados nativo (pH 6 a 7), intermediários abundantes na faixa de pH 4,0, e que também ocorrem transientemente, na forma de intermediários de enovelamento, e estado desenovelado a pH 2,5. (BARRICK E BALDWIN, 1993).

O intermediário (I) a pH 4,0 possui todas as características de um glóbulo “fundido” (*molten globule*). Segundo Dolgikh e colaboradores (1985) um estado *molten globule* apresenta-se como um glóbulo compacto com estrutura secundária nativa e com estrutura terciária flutuante. Ainda segundo os autores, a entropia dessas formas intermediárias é maior e sua energia menor que a do estado nativo.

No caso da apoMb, o estado *molten globule* é compacto, porém apresenta um raio de giro maior que o observado nos estados nativos da apo e holo-proteína. (KATAOKA *et al.*, 1995). Três das oito α -hélices presentes na apoMb (A, G e H) estão estruturadas neste intermediário, enquanto as demais parecem estar desenoveladas (LOH, KAY & BALDWIN, 1995). Este modelo sugere um intermediário (I) em que as regiões de hélices A, G e H estão enoveladas formando um núcleo hidrofóbico compacto. Estudos por RMN demonstraram que I contém substancial estrutura secundária (35% de hélices) e ausência de estrutura terciária ordenada (ELIEZER *et al.*, 1997).

Gast e colaboradores (1994) realizaram um estudo comparativo, por SAXS, entre a compactação do estado I da apoMb com os estados intermediários da α -lactalbumina e do apo-citocromo *c*. Verificaram que a compactação dos estados intermediários decresce na ordem α -lactalbumina > apocitocromo *c* > apoMb.

O processo de enovelamento/desenovelamento foi verificado na presença de agentes desnaturantes. Jennings e Wright observaram, em 1993, que a reação de desenovelamento da apoMb induzida por uréia era cooperativa com um ponto médio de transição próximo a 2,2M de uréia. A transição era completamente reversível, visto pelo completo ganho de conteúdo helicoidal nativo quando a concentração de uréia era reduzida (6M \rightarrow 0,8M) e pela habilidade em ligar o grupo heme quantitativamente.

Loh e colaboradores, em 1995, identificaram um segundo estado intermediário (I_2) da apoMb comparando o processo de desnaturação da proteína induzido por ácido e uréia na presença e ausência de tricloroacetato de sódio (hoje se sabe que outros ânions promovem o mesmo efeito), monitorado por medidas de DC e estudos de RMN. Os resultados indicaram que I_2 é mais estruturado e estável que I_1 , se aproximando mais da estrutura nativa. Apresenta as mesmas hélices A, G e H observadas em I_1 e uma quarta hélice – B – incorporada no *molten globule*. Estes dados reforçaram a idéia de que a apoMb se enovela seqüencialmente, com a presença de diversos estados intermediários.

1.2.2.2 Estudos da cinética de enovelamento

A via cinética para enovelamento da apoMb envolve um intermediário que assemelha-se fortemente com o estado *molten globule* observado em equilíbrio, caracterizado sob baixo pH e baixa temperatura. Os estudos realizados por técnicas de cinética rápida (fluxo interrompido – *stopped flow* e fluxo suprimido – *quench flow*), e medidos por RMN e DC indicaram que o primeiro evento detectável no enovelamento da proteína ocorre em 5 ms e corresponde a formação de um intermediário contendo substanciais hélices. As primeiras ligações secundárias ocorrem entre as hélices A, G e H – similar ao intermediário em equilíbrio a pH 4 - seguida da hélice B em aproximadamente 1 s. Posteriormente havia formação das hélices C e E e da alça DC em um tempo de 2,5 s (JENNINGS & WRIGHT, 1993).

Ao menos duas formas de intermediários a pH 4, denominadas Ia e Ib, foram identificadas através de processo cinético acompanhado por espectroscopia de fluorescência (JAMIN & BALDWIN, 1996, 1998). Estas mesmas formas foram evidenciadas em equilíbrio a pH 3,2 e 4,2 (KAY & BALDWIN, 1996) e a razão entre elas dependia do pH, concentração de uréia e presença de espécies iônicas. A forma Ia é a única presente em pH 3; a razão Ib/Ia aumenta em pH acima de 3. A forma Ib é convertida a Ia quando a concentração de uréia é aumentada. Verificou-se que a via de enovelamento e desenovelamento da apoMb era linear ($D \leftrightarrow Ia \leftrightarrow Ib \leftrightarrow N$). Essa interconversão entre as duas formas intermediárias pôde ser observada por experimentos de *stopped flow* (JAMIN & BALDWIN, 1998).

1.2.2.3 Efeito da pressão sobre o enovelamento

Em 1914, Pierce Bridgman demonstrou que alta pressão hidrostática pode levar à desnaturação de albumina, levando-a a um estado similar àquele obtido por elevadas temperaturas. Desde então, estudos estruturais usando alta pressão têm fornecido muitas informações a respeito do processo de enovelamento protéico em adição aos estudos realizados com pH, temperatura e agentes desnaturantes. Este estudo fornece informações termodinâmicas sem alterar a composição química da solução (WEBER & DRICKAMER, 1983; SILVA *et al.*, 2001; SCHARNAGL E FRIEDRICH, 2005).

O efeito da pressão está relacionado a mudanças de volume e compressibilidade que acompanham a transição conformacional protéica (ROYER, 2002). A aplicação de pressão desloca o equilíbrio químico na direção do sistema de menor volume. Portanto, a variação de volume de um sistema, volume ocupado pela proteína e pelo solvente, sob alta pressão é negativa e indica desenovelamento protéico (VIDUGIRIS & ROYER, 1998). Ademais, altas pressões favorecem a partição de moléculas de águas para o interior de proteínas, em regiões hidrofóbicas, como demonstrado por modelagem e dinâmica moleculares (HUMMER *et al.*, 1998) e cristalografia e difração de raios-X sob altas pressões (COLLINS *et al.*, 2005).

A apoMb a pH 5,4 é resistente a pressão até 80 MPa e desnatura entre 80 e 200 MPa gerando um intermediário, estruturado nas hélices A, G e H, sendo portanto similar aos intermediários cinéticos e em equilíbrio observados em função do pH. O aumento da pressão até 500 MPa resulta em sua completa desnaturação (BONDOS, SLIGAR & JONAS, 2000). Os dois triptofanos presentes na hélice A

mantêm-se protegidos do solvente no intermediário, que retém parte da estrutura nativa. A figura 8 ilustra as curvas de desnaturação da apoMb monitoradas por RMN.

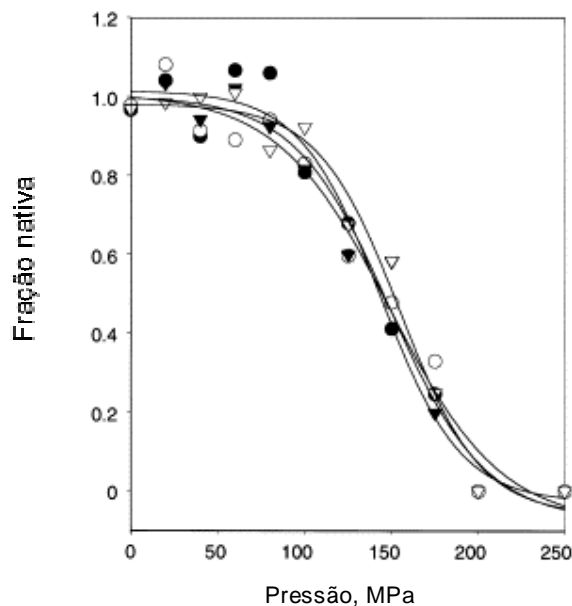


Figura 8 - Curvas de desnaturação por pressão da apoMb de cachalote selvagem, monitorada por 1D-RMN de ^1H de His24 $^{\epsilon}\text{H}$ (●), His36 $^{\epsilon}\text{H}$ (○), His48 $^{\epsilon}\text{H}$ (▼) e His113 $^{\epsilon}\text{H}$ (▽). As amostras foram preparadas em 10 mM bistris, 10 mM TCA, 1.5 mM TSP, pH 5,4. Fonte: BONDOS, SLIGAR & JONAS, 2000.

Estudos com a apoMb revelaram que a transição de seu estado nativo para um estado intermediário induzido por alta pressão, monitorado por espectroscopia de fluorescência, apresentava uma alteração de volume de -70 mL/mol. O completo desenovelamento por pressão, a partir deste intermediário, a pH 4,2 revelou uma mudança de -61 mL/mol (VIDUGIRIS & ROYER, 1998).

Anteriormente já havia sido reportado na literatura que a apoMb, a pH neutro, sob pressão, apresenta-se na forma de intermediário de enovelamento com características similares às observadas no *molten globule* a pH 4,0 (BISMUTO *et al.*, 1996). Verificou-se que a apoMb perdia sua capacidade de ligação à 1,8-anilinaftalenosulfonato (ANS), indicando perda da “bolsa” de ligação ao grupo heme (SIRE, ALPERT & ROYER, 1996).

1.3 ADIÇÃO DE OSMÓLITOS E ESTABILIDADE PROTÉICA

A estabilidade de uma proteína é definida como a persistência de sua integridade molecular ou ação biológica em face de altas temperaturas ou quaisquer outras influências deletérias (FÁGAIN, 1995).

Os osmólitos são substâncias capazes de modular as propriedades osmóticas de uma solução alterando a estabilidade do sistema. Sabe-se que a conformação nativa de muitas proteínas pode ser estabilizada por moléculas polihídricas como o glicerol e a sacarose em altas concentrações ($\geq 1M$). Estudos do mecanismo de interação destes compostos com as proteínas, à temperatura ambiente, demonstraram que eles são preferencialmente excluídos da superfície das proteínas. Isto indica que a adição de co-solutos a soluções aquosas de proteínas é termodinamicamente desfavorável visto que aumenta o potencial químico da proteína em solução e do aditivo (XIE & TIMASHEFF, 1997).

A estabilização da ribonuclease foi estudada através de densitometria por Xie e Timasheff em 1997. Medidas de interação preferencial foram realizadas com a proteína em diferentes valores de pH e temperatura, a fim de avaliar que forças estariam envolvidas no processo de estabilização. Verificou-se que contribuições entálpicas de interação com o sistema co-solvente para estabilização durante desnaturação eram muito pequenas quando comparadas com a mudança de entalpia padrão na ausência da substância estabilizadora. Isto demonstrou que na desnaturação, as interações com os elementos estruturais expostos da proteína seria similar às interações com a superfície da estrutura nativa. Isto corroborou com os resultados de outros pesquisadores, que em trabalhos anteriores avaliaram o efeito de alguns solutos sobre aminoácidos e peptídeos. Estes estudos mostraram

que a sacarose e a sarcosina têm uma baixa afinidade por resíduos polares e apolares e afinidade menor que a água pelos peptídeos (LIU & BOLEN, 1995). Estes experimentos apontam a estabilização protéica como função da exclusão do osmólito do domínio protéico.

Muitos pesquisadores têm investigado a ação estabilizante de polióis, atualmente usados como estabilizantes de formulações biofarmacêuticas, contra os mecanismos de degradação protéica, como agregação, deamidação e oxidação.

Somnath Singh e Jagdish Singh (2003) utilizaram a calorimetria diferencial de varredura para medir parâmetros termodinâmicos, como temperatura de transição e entalpia calorimétrica, para avaliar a estabilidade conformacional da lisozima na presença de polióis (manitol, sacarose, lactose, glicerol e propilenoglicol). Estes pesquisadores sugerem duas possíveis causas para o efeito estabilizante. A primeira é que esses aditivos restringem as mudanças conformacionais pela formação de ligações hidrogênio com grupos na superfície da lisozima. Cada interação tenderia a preservar a conformação nativa da proteína assim como proteger resíduos de aminoácidos da exposição a deamidação, oxidação, agregação ou outras modificações adversas. A segunda possibilidade é que os polióis são preferencialmente excluídos do domínio protéico, aumentando a energia livre do sistema. A exclusão preferencial de polióis leva a estabilização protéica devido ao estado desnaturado da proteína tornar-se termodinamicamente menos favorável na presença de polióis.

No estudo da estabilização do estado intermediário de enovelamento do citocromo c, induzida por polióis, Kamiyama e colaboradores (1999) indicaram que a principal força que rege a formação do estado intermediário é a interação hidrofóbica. Os estudos foram feitos utilizando a técnica de dicroísmo circular e

calorimetria diferencial de varredura. A estabilidade de um estado intermediário (I) da proteína é determinada pelo balanço de interações como repulsão eletrostática entre resíduos carregados e forças opostas como ligações hidrogênio e interações hidrofóbicas. A adição de sais reduz a repulsão eletrostática, mas tem somente pequeno efeito nas ligações de hidrogênio e nas interações hidrofóbicas em baixas concentrações, produzindo uma força líquida favorável à formação de I. Este balanço de forças é completamente oposto com polióis. Estes teriam somente pequenos efeitos nas interações eletrostáticas porque a constante dielétrica da água não é tão marcadamente reduzida a ponto de haver formação de pares iônicos mesmo em altas concentrações de polióis. O efeito dominante dos polióis é a estabilização de interações hidrofóbicas: a energia livre de transferência da água para polióis em solução aquosa é positiva para a maioria dos aminoácidos apolares, e esse valor torna-se maior com o aumento da concentração do poliol e o número de grupamentos hidroxila livres na molécula deste.

O efeito do glicerol sobre a proteína calpastatina foi estudado por espectroscopia de DC. Verificou-se um aumento de elipticidade em função da concentração de glicerol, indicando ganho de estrutura secundária. O glicerol em altas concentrações teria então efeito de hidratação preferencial (KONNO *et al.*, 1997).

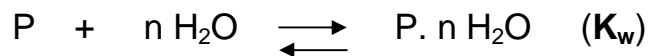
Já foi demonstrado que a adição de alguns solutos leva ao enovelamento da apoMb a pH 2,5 (MARÃO, 2000). Esse comportamento parece estar relacionado à ação de solutos no potencial químico da água e, portanto, levando a proteína a se reenovelar por mudanças no estado de hidratação devido à diminuição da atividade da água por estes solutos. Verificou-se através de experimentos de DC que a adição de solutos, de diferentes classes químicas, alterava o número de moléculas de água

envolvidas no processo de enovelamento e esse número era tanto maior quanto maior fosse o tamanho do soluto empregado (MARÃO, 2000).

Muitas teorias tentam explicar o que ocorre num sistema contendo três componentes: água, proteína e soluto. Elas levam em consideração os fatores termodinâmicos envolvidos no processo de exclusão ou ligação preferencial.

1.3.1 Teoria termodinâmica dos três componentes

Quando uma molécula de proteína é dissolvida em água (TIMASHEFF, 2002), sua superfície tende a interagir com as moléculas de água presentes no sistema, gerando o equilíbrio:



Onde:

P = proteína e P.nH₂O = proteína hidratada.

Estas interações podem ser atrativas ou repulsivas de várias extensões (energia livre), como ilustrado na figura 9. Não há uma camada rígida de água ao redor da proteína e sim uma nuvem flutuante de moléculas de água afetadas termodinamicamente mais ou menos pela proteína (TIMASHEFF, 2002). À essa reação da água com a proteína é associada uma constante de equilíbrio (K_w) e um valor de energia livre ΔG°_w . Quanto maior o valor de K_w e mais negativo o valor de ΔG°_w , mais favorável a interação entre água e proteína (TIMASHEFF, 1998).

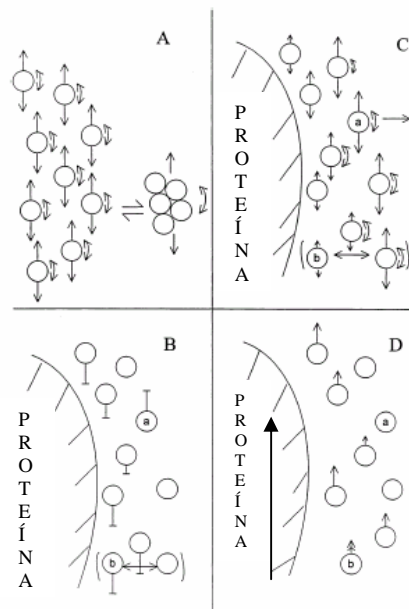
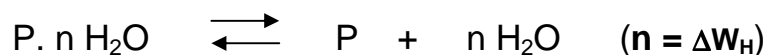
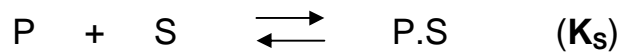


Figura 9 - Interação de moléculas de água com a superfície da proteína. (A) água livre. (B) Introdução da molécula de proteína sua interação com a água em diferentes graus de energia livre. (C) Mudanças referentes a alterações na mobilidade das moléculas de água; a = moléculas de água repelidas do domínio protéico e b = moléculas flutuantes entre forte atração e liberdade. (D) Conseqüências para um processo de transporte. A seta indica movimento pela aplicação de um campo gravitacional ou gradiente eletroquímico. Fonte: TIMASHEFF, 2002.

É característico de reações protéicas que, durante o curso de reação, a área superficial total da proteína em contato com a água muda. Isto pode ser acompanhado pelo grau de hidratação, $\Delta W_H = W_H (\text{produto}) - W_H (\text{reagente})$. A reação pode então ser escrita da seguinte forma:



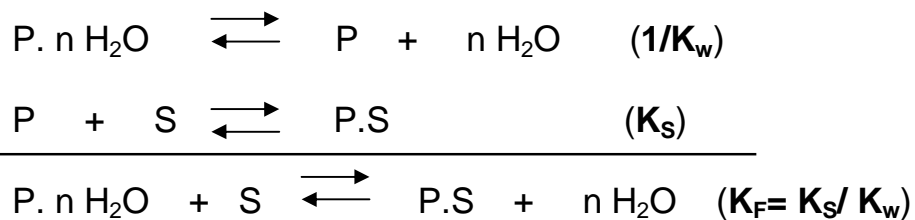
Se o sistema apresenta um terceiro componente, um soluto, a proteína irá interagir com este de acordo com o equilíbrio:



Onde S = soluto e K_S = constante de equilíbrio.

Neste equilíbrio novas interações estão envolvidas, as quais se atribui um valor de energia livre, ΔG°_S , que quanto mais negativo mais favorável é a interação da proteína com o soluto.

O resultado final desse sistema é o balanço de interações entre as moléculas de proteína com a água e com o soluto. A interação da proteína com soluto desloca algumas moléculas de água que anteriormente estavam ligadas à sua superfície. O equilíbrio global pode ser representado como segue:



Se a ligação da proteína ao soluto for tão favorável quanto a sua ligação à água, os valores de K_S e K_w serão iguais e a constante final K_F será 1. Nesse caso, a energia livre do processo será zero, indicando indiferença da proteína com relação à ligação à água ou ao soluto (TIMASHEFF, 2002). Por outro lado, se a interação da proteína com o soluto for mais favorável, a constante K_F será maior que 1 e o valor de ΔG do sistema será negativo, indicando que a reação é favorável. Se a ligação da proteína à água fosse mais favorável, ΔG do sistema seria positivo e

conseqüentemente, a reação desfavorável, ou, em outras palavras, a interação entre o soluto da solução e a superfície protéica teria caráter repulsivo, criando uma região ao redor da proteína rica em água e pobre em soluto.

A figura 10 demonstra os diferentes graus de interação da proteína com os diversos solutos previamente estudados.

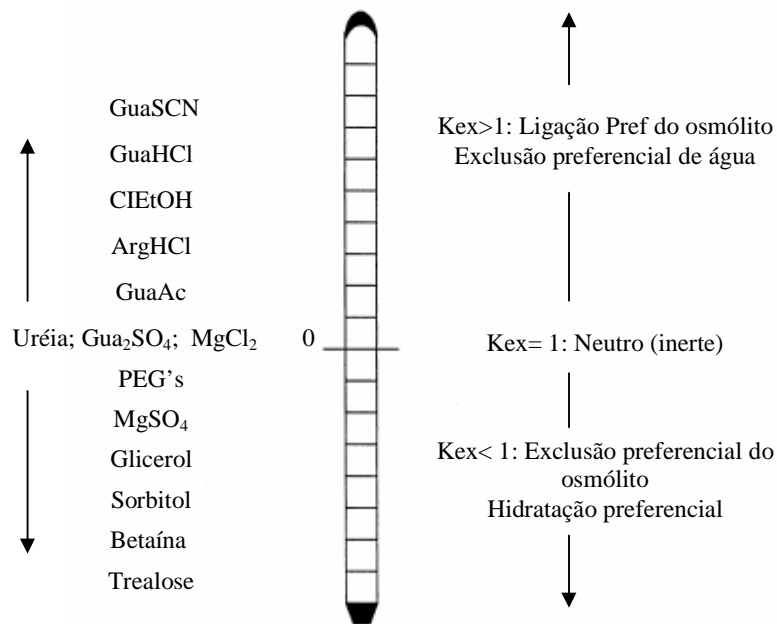


Figura 10 - Interações preferenciais com osmólitos. K_{ex} = constante de exclusão. Fonte: TIMASHEFF, 2002.

Desta forma, podemos então dizer que não basta ser osmólito para ser estabilizador. A estabilização de uma estrutura protéica por solutos pode ser obtida de algumas formas, como por exemplo, a ligação específica (hormônio, fármaco, íons) e manutenção de estrutura local, propagando-se para a estrutura global da macromolécula, bem como pelo efeito de hidratação sugerido acima. Por sua vez, a desestabilização de uma estrutura protéica pode ser atingida por solutos que atuam

sobre o coeficiente de partição protéico (com guanidino, uréia, etc), por desestabilização de contatos iônicos por protonação/desprotonação e efeitos de carga, por adição de tensoativos e rompimento de regiões hidrofóbicas, dentre outros.

1.3.2 Interpretação do efeito de solutos no equilíbrio conformacional segundo a relação de Wyman

A interpretação do efeito de solutos sobre a estabilidade de proteínas parece estar relacionada com o efeito de exclusão preferencial de solutos da superfície de proteínas, ou de outra forma, pelo efeito de hidratação preferencial. Esta análise pode ser conduzida segundo a expansão da relação de Gibbs-Duhem feita por Wyman (1964).

A adição de solutos a uma solução contendo proteína para mantê-la estável, assim como cloridrato de guanidínio ou uréia para desnaturá-la, ou sulfato de amônia para precipitá-la, são práticas comuns há muitos anos. Entretanto, por muito tempo elas tiveram base puramente empírica, e as diferentes ações das substâncias eram tidas como não relacionadas.

Isto assim permaneceu até que o surgimento de teorias que foram combinadas e a articulação de idéias permitiu fundamentar uma base para estes fatos. Esclareceu-se que as ações destas substâncias eram relacionadas, e que, assim o papel das mesmas era idêntico, sendo este a capacidade de controlar ou modular alguns processos envolvendo as proteínas, diferindo apenas a direção em que este controle era feito.

De acordo com a teoria termodinâmica da solução de três componentes os solutos irão competir com a água pela interação com a superfície da proteína. O balanço desta competição resultará numa ligação ou exclusão preferencial da água ou do co-solvente, conforme o caso, e este efeito põe em jogo uma quantidade de energia em solução.

Durante o processo de desnaturação, a interação da superfície da proteína com as moléculas de água muda a medida que os produtos vão sendo formados. Considerando o equilíbrio $N \rightarrow D$, podemos dizer que a interação com a água muda devido à mudança no estado físico do reagente, a proteína nativa.

Como apresentado anteriormente, os solutos irão competir com a água pela interação com a proteína e essa competição irá acarretar uma diferença no balanço final de afinidade da água pela proteína nativa (estado inicial) e pelo estado final, desenovelado. A equação de Wyman procura interpretar esse efeito a partir da relação:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial \ln a_x} \right)_{T,P,a_j \neq x} = v_x^{\text{Prod}} - v_x^{\text{Reag}} = \Delta v_x$$

Onde:

K = constante de equilíbrio da reação;

x = ligante (soluto)

a_x = atividade do ligante

v_x = extensão da ligação entre o ligante e a proteína

T = temperatura em Kelvin

P = pressão do sistema

Pode-se afirmar que numa reação bioquímica modulada por um ligante a extensão da ligação se altera ao longo da reação, pois a ligação desse fator aos

produtos será diferente da sua ligação aos reagentes. Graças a esse fato, a constante de equilíbrio do processo será alterada, pois existem dois eventos ocorrendo simultaneamente no sistema: a reação e a ligação do fator à proteína. A mudança de um induz a mudança do outro.

Se o soluto se ligar ao longo da reação, esta será mais espontânea à medida que a atividade do ligante aumentar, visto que a extensão da ligação (Δv_x) será positiva. Este é o caso da desnaturação da proteína que torna-se mais espontânea na presença de concentrações cada vez maiores de guanidina ou uréia, visto que estas substâncias ligam-se mais à forma desnaturada do que à forma nativa da proteína. Estes agentes ligam-se preferencialmente ao longo da reação, então $v_x^{\text{Prod}} - v_x^{\text{Reag}}$ será positivo e conseqüentemente $\partial \ln K / \partial \ln a_x$ será positivo indicando que a constante de equilíbrio aumentará com o aumento da atividade do soluto (TIMASHEFF, 1993).

O oposto ocorre quando se adiciona sacarose ao sistema. Por ser um soluto que se exclui da superfície da proteína à medida em que a mesma se desnatura, irá diminuir a constante de equilíbrio desta reação, tornando-a menos espontânea, ou seja, mantendo a macromolécula na forma nativa. Isso se estende a todos os solutos que se liguem preferencialmente à forma nativa, $v_x^{\text{Prod}} - v_x^{\text{Reag}}$ será negativo, assim como o valor de $\partial \ln K / \partial \ln a_x$, indicando diminuição da constante de equilíbrio em função do aumento da atividade do soluto.

A equação de Wyman torna-se, então importante na interpretação das reações bioquímicas, visto que informa em que direção o equilíbrio será deslocado quando um soluto é ligado ou excluído da superfície de uma macromolécula.

A interpretação da adição de um soluto a uma solução contendo proteína, e o efeito que é gerado sobre a estrutura desta, pode ser descrita aparentemente como

efeito direto do soluto ou mediado por água. Buscou-se explorar essa interpretação nesta tese.

A interpretação do efeito de soluto, portanto, pode ser feita construindo-se gráficos de correlação entre efeito ($\log K$) *versus* \log da atividade do soluto (ou de sua concentração, em condições ideais). Por sua vez, a interpretação do efeito de água sobre a atividade do soluto pode ser feita construindo-se o gráfico $\log K$ em função do \log da atividade da água. A atividade da água em uma solução pode ser facilmente calculada a partir da correlação:

$$\ln a_w = - Osm / 55,55$$

sendo a_w a atividade da água em uma solução de osmolalidade Osm , e 55,55 o volume molar da água.

Esses conceitos foram empregados no desenvolvimento deste trabalho contribuindo para a interpretação dos resultados apresentados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

❖ Elucidar o mecanismo de ação de adjuvantes de enovelamento protéico utilizando a apomioglobina como proteína modelo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

❖ Inferir a energética e compressibilidade de transição entre os estados conformacionais da apoMb por perturbação com alta pressão hidrostática.

❖ Investigar uma série de solutos por fluorescência intrínseca quanto a seus efeitos sobre a apoMb no equilíbrio.

❖ Analisar os dados em termos de hidratação, interação preferencial de solutos (e água) com a proteína.

❖ Realizar medidas cinéticas de enovelamento e desenovelamento a pH 2,5 em função de concentração de diferentes solutos, determinando como os mesmos modulam a cinética de enovelamento protéico.

❖ Traçar correlações entre todos os efeitos medidos com concentração molar, peso/peso, osmolalidade, atividade de água, dentre outros parâmetros físico-

químicos, em busca de maiores evidências do mecanismo comum pelo qual esses solutos levam a um enovelamento de proteínas.

❖ Realizar análise de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) correlacionando os resultados termodinâmicos com medidas estruturais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Proteínas e Solutos

- ✓ Mioglobina de coração de cavalo (SIGMA-ALDRICH);
- ✓ Lisozima de clara de ovo (SIGMA-ALDRICH);
- ✓ Sacarose (INVITROGEN);
- ✓ Xilitol (ALDRICH);
- ✓ Trealose (VETEC);
- ✓ Glicerol (VETEC);
- ✓ Polietilenoglicóis: 400 (SIGMA), 600 (SIGMA), 1000 (SIGMA), 1500 (FARMOS), 3350 (SIGMA), 6000 (SIGMA), 8000 (SIGMA), 10000 (SIGMA).

3.1.2 Reagentes

- ✓ Ácido clorídrico P.A. (QUIMEX);
- ✓ Etanol P.A. (VETEC);
- ✓ Hidróxido de sódio (VETEC);
- ✓ Metil-etil-cetona P.A.;(QUIMEX);
- ✓ Tampão bistris/acetato de sódio (MERCK);
- ✓ Soluções Tampão pH 4 e 7 (MERCK).

3.1.3 Equipamentos de Medida

- ✓ Balança analítica METTLER TOLEDO – AG204;
- ✓ Potenciômetro (Mettler toledo MPC 227) com eletrodo de vidro e calomelano para íons hidrogênio;
- ✓ Refratômetro (Carl Zeiss);
- ✓ Espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu 2401PC);
- ✓ Espectrofluorímetro modelo ISSPC1 (photocounting);
- ✓ Espectrofluorímetro (Cary Eclipse Varian);
- ✓ Aparelho de medidas de fluorescência por filtro e absorbância com resolução em milisegundos (cinética rápida por fluxo interrompido, *stopped-flow*) Applied Photophysics SM18X;
- ✓ Aparelho de calorimetria com perturbação por pressão (Microcal).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção da Apomioglobina

A partir da mioglobina de coração de cavalo, obtida da Sigma-Aldrich, seguiu-se o método de extração do grupo heme pela metil-etil-cetona após desenovelamento da proteína por redução do pH com HCl (TEALE, 1959). O protocolo utilizado foi o seguinte: pesou-se aproximadamente 10 mg de mioglobina que foi dissolvida em 3 mL de água purificada. A solução foi levada a pH 2,0 por adição lenta e gradual de alíquotas de HCl 1 M. Adicionou-se 3 mL de metil-etil-cetona gelada e agitou-se vigorosamente. Deixou-se descansar por alguns minutos para a separação das fases: uma fase orgânica, cetônica, escura e que contém o grupo heme e, outra fase aquosa, clara, onde está a apoproteína desenovelada. A fase orgânica foi descartada e a extração repetida duas vezes. Todas as etapas acima descritas foram feitas em banho de gelo. A fase contendo a apoproteína foi dialisada contra água em geladeira por aproximadamente 18 horas. Obteve-se a apoproteína livre de resíduos cetônicos e impurezas. Esta solução deve ter uma cor amarelada e transparente e para ser estocada, à 4°C, é necessário elevar seu pH para 7,0 para a proteína retornar ao seu estado nativo (TEALE, 1959).

A concentração de apomioglobina na preparação foi obtida a partir do seu coeficiente de extinção molar, $\epsilon_{280} = 1,43 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ASCOLI, FANELLI & ANTONINI, 1981). O nível de contaminação residual por heme foi avaliado pelo coeficiente de extinção molar $\epsilon_{410} = 1,59 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, sendo este sempre menor que 0,5% mol/mol (ASCOLI, FANELLI & ANTONINI, 1981). O conteúdo de holomioglobina foi estimado espectrofotometricamente usando-se coeficiente de extinção molar a 409 nm ($\epsilon_{410} = 160,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.2.2 Estudo do Enovelamento da ApoMb e Caracterização do Estado Intermediário

3.2.2.1 Efeito do pH no enovelamento protéico

Às amostras contendo a apoMb em água - concentração: 2 μ M - foi adicionado ácido clorídrico em diferentes proporções, a fim de avaliar alterações na estrutura protéica à medida que o pH era diminuído, induzindo o desenovelamento da proteína. Foram preparados brancos referentes a cada amostra para eliminar interferências dos solutos. As amostras foram incubadas por uma hora, à temperatura ambiente, e posteriormente analisadas.

Um espectrofluorímetro CARY Eclipse Varian foi utilizado para monitorar as mudanças conformacionais. As amostras foram excitadas à 280 nm e a emissão foi varrida de 300 nm a 420 nm.

3.2.2.2 Efeito da pressão sobre o enovelamento protéico

A determinação da estrutura e dinâmica de intermediários de enovelamento e estados desnaturados da proteína é de grande importância para o entendimento do mecanismo de enovelamento. O uso de alta pressão como agente perturbador tem sido muito empregado por exercer diferentes efeitos sobre a conformação das proteínas quando comparada aos efeitos de temperatura ou composição do solvente (HEREMANS & SMELLER, 1998). Em geral, uma molécula de proteína em solução flutua não só em energia, mas também em volume. Esta flutuação pode envolver

além de confômeros enovelados, confômeros parcialmente enovelados ou desenovelados. A pressão atua sobre o volume, denominado volume parcial molar de uma proteína, e desloca o equilíbrio conformacional em favor do confômero de menor volume. Conseqüentemente a população de estruturas de menor volume irá aumentar (KAMATARI *et al.*, 2004). O uso de técnicas espectroscópicas combinadas com alta pressão permite a análise estrutural das proteínas facilitando o entendimento do mecanismo de enovelamento e, assim, possibilita esclarecer melhor o processo de enovelamento da apoMb.

Neste estudo utilizou-se a espectroscopia de fluorescência para monitorar as alterações na estrutura da apoMb provocadas por alta pressão. Em pH neutro, sob pressão, a fluorescência intrínseca dos dois resíduos de triptofano na hélice A da apoMb exibem um aumento de intensidade e um deslocamento do espectro para comprimentos de onda maiores, característica do estado intermediário de enovelamento (BISMUTO *et al.*, 1996). A apoMb pode ser parcialmente desnaturada por altas pressões até 200 MPa para uma estrutura equivalente a espécie intermediária (VIDUGIRIS & ROYER, 1998). Nosso objetivo foi medir a energética das transições conformacionais da apoMb entre os estados nativo, intermediário e desenovelado.

As medidas de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro modelo ISSPC1 (photoncounting). Para obter as isotermas de pressão utilizamos uma célula de alta pressão acoplada ao fluorímetro. O processo de desnaturação foi acompanhado pela excitação da proteína a 280 nm e mediu-se a emissão de fluorescência entre 300 e 420 nm. Esses espectrofluorímetros possuem como fonte luminosa lâmpadas de xenônio, com sistema de monocromadores de grade para varredura de luz tanto na excitação quanto na emissão. A velocidade de varredura

usualmente utilizada era de 0,5 a 1,0 nm x s⁻¹. As medidas de fluorescência eram acumuladas com a temperatura mantida constante (variação de ± 0,5°C) com auxílio de um banho circulador de mistura de iguais volumes de água:etilenoglicol, e controlado por um termômetro digital acoplado diretamente à célula de pressão.

Os espectros de fluorescência a uma dada condição “u” foram quantificados especificando-se o seu centro de massa espectral $\langle v_u \rangle$:

$$\langle v_u \rangle = \frac{\sum v_i F_i}{\sum F_i}$$

sendo F_i a fluorescência emitida a um número de ondas v_i e $\sum F_i$ a soma da fluorescência ao longo de toda a faixa medida de emissão.

A relação entre o desvio do espectro de emissão de fluorescência intrínseca e o meio em que o dado fluoróforo está localizado foi baseada em observações de que a emissão de fluorescência destes é extremamente dependente da polaridade do ambiente no qual os fluoróforos se encontram (MACGREGOR & WEBER, 1986).

As medidas espectroscópicas realizadas sob altas pressões hidrostáticas (até 3.000 atm) envolveram um sistema descrito na literatura (PALADINI & WEBER, 1981), onde a amostra foi introduzida em uma cubeta com formato de garrafa, e selada com um tubo flexível de polietileno vedado em uma extremidade (Figura 11a), que funciona como transdutor/equalizador da pressão entre a amostra e líquido de pressurização. A amostra, na garrafa, foi então transferida para o interior de um compartimento denominado bomba de alta pressão, construída em aço vascomax temperado capaz de suportar altas pressões. Esta pode ser monitorada por luz através de 3 janelas de quartzo ou safira acopladas ao compartimento, sendo uma delas para a luz de incidência (excitação) e as outras duas, 90° em relação a esta, para a luz emitida. O compartimento de alta pressão foi então apropriadamente

acoplado ao espectrofluorímetro e conectado a um sistema de geração de pressão (Figura 11b). O líquido pressurizante usado foi etanol (> 99^o), de grau analítico. A amostra foi então submetida à mudança de pressão e, somente após 10 minutos de equilíbrio, as medidas foram realizadas. Esse tempo indicado para equilíbrio foi satisfatório, visto que os valores espectrais medidos não variavam em intervalos de 10 a 120 min. Todas as medidas sob alta pressão hidrostática foram realizadas usando-se como agente tamponante mistura 10 mM bis-tris / 10 mM acetato de sódio, acertado o pH com HCl / NaOH. A escolha desses tampões se deve ao fato de possuírem pequenos volumes de reação de ionização sendo, portanto, a variação de pH desprezível para a faixa de pressão usada (KITAMURA & TETSUROH, 1987). A outra razão de escolha desse sistema tamponante é a sua não interferência sobre estrutura protéica por ligação específica.

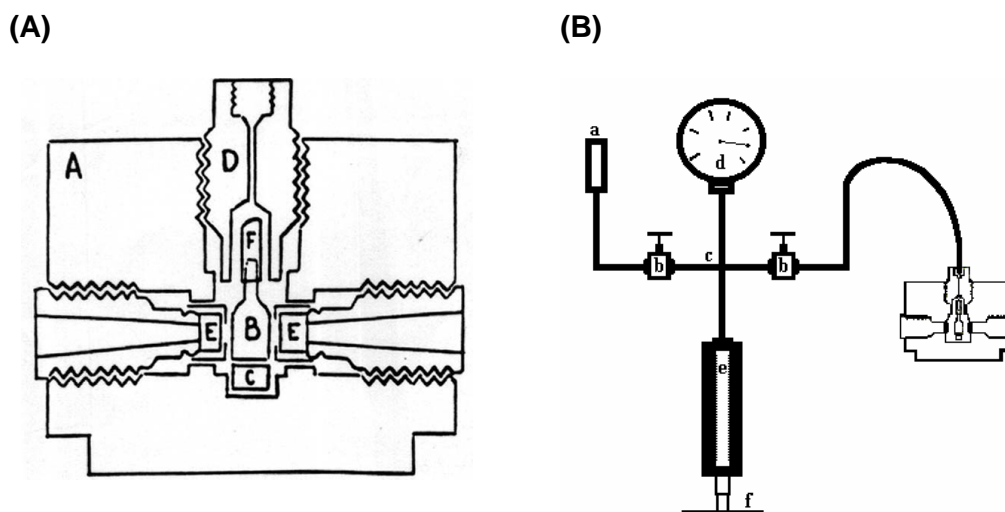


Figura 11 - Diagrama esquemático do sistema de alta pressão hidrostática. (A) O esquema representa um corte longitudinal do compartimento de alta pressão para medidas espectroscópicas, estando nele representados: (a) carcaça de aço; (b) célula de quartzo em formato de garrafa; (c) suporte da célula; (d) anel de conexão do gerador de alta pressão; (e) janelas de quartzo ou safira; (f) tubo de polietileno usado na vedação da célula-amostra. (B) O sistema de geração de alta pressão hidrostática é composto por: (a) um reservatório de etanol; (b) duas válvulas para vedação da linha de pressão; (c) uma tubulação de aço; (d) um manômetro; (e) um pistão em parafuso que comprime o etanol da linha de tubulação e (f) um sistema de geração de pressão propriamente dito.

3.2.2.3 Análise dos dados de transição conformacional induzida por pressão

Os dados foram analisados considerando uma transição reversível entre dois estados, um enovelado (N) e um desenovelado (D), respectivamente proteína nativa e *molten globule* a pH 7,0 ou *molten globule* e proteína desenovelada a pH 4,0, de acordo com o equilíbrio:



Então:

$$K_d^p = [D] / [N] = \exp (- \Delta G_d^p / RT)$$

onde K_d^p e ΔG_d^p são respectivamente a constante de equilíbrio e a energia livre de desnaturação a pressão p e temperatura T . ΔG_d^p está relacionado à pressão da seguinte forma:

$$\Delta G_d^p = \Delta G_d^0 + p \Delta V / RT$$

e

$$K_d^p = K_d^0 \exp (p \Delta V / RT)$$

A fração de espécies desnaturadas a cada valor de pressão, α^p , pode ser descrita como:

$$\alpha^p = (\langle v^p \rangle - \langle v^N \rangle) / (\langle v^D \rangle - \langle v^N \rangle) = [D] / ([N] + [D])$$

onde $\langle v^N \rangle$ e $\langle v^D \rangle$ são os limites assintóticos da curva, os valores inicial (estado enovelado N) e final (estado desenovelado D) de centro de massa espectral, respectivamente. Considerando as equações anteriores temos:

$$\langle v^p \rangle = \langle v^N \rangle - (\langle v^N \rangle - \langle v^D \rangle) * \{ K_d^0 \exp ((p \Delta V / RT)) \}$$

Os valores de entalpia e entropia de transição foram calculados considerando a influência da temperatura sobre a constante de equilíbrio, de acordo com a equação de Van't Hoff:

$$K_d^0 = \exp (\Delta S/R - \Delta H/RT)$$

3.2.2.4 Estudo por calorimetria de perturbação por pressão

As medidas de calorimetria de perturbação por pressão (CPP) foram realizadas em calorímetro usando acessório MicroCal PPC. O volume das células de referência, contendo apenas tampão fosfato 10mM, e amostra, contendo apoMb dissolvida em tampão foi idêntico (0,5 mL). Foi aplicada uma pressão de 5 bar a ambas as células utilizando gás nitrogênio. O instrumento foi operado com uma taxa de aquecimento de 20°C/ hora. A concentração de apoMb utilizada foi 2 mg/mL e as medidas foram realizadas em valores de pH iguais a 7,0, 4,0 e 2,5.

3.2.2.5 Análise dos dados de calorimetria de perturbação por pressão

De acordo com a segunda lei da termodinâmica, a variação de entropia para um processo reversível à temperatura T, cuja variação de aquecimento é dQ_{rev} , pode ser escrita como $dS = dQ_{rev}/T$. Considerando a variação de pressão e temperatura constante temos: $(\partial Q_{rev}/\partial p)_T = T (\partial S/\partial p)_T$. Empregando a relação de Maxwell $(\partial S/\partial p)_T = - (\partial V/\partial T)_p$, obtém-se:

$$(\partial Q_{\text{rev}}/\partial p)_T = -T (\partial V/\partial T)_p = -T.V.\alpha$$

onde V é o volume e α é o coeficiente de expansão térmica. Integrando esta equação, à temperatura constante, sob uma pequena variação de pressão, Δp , obtém-se a equação para o cálculo de α :

$$\alpha = -\Delta Q_{\text{rev}} / T.V. \Delta p$$

O coeficiente de expansão térmica pode ser determinado a partir de medidas isotérmicas do calor consumido ou liberado sob pequenas variações de pressão. ΔQ_{rev} é a diferença de calor entre a célula amostra e a célula referência, sob variação de pressão Δp . As variações de volume $\Delta V/V$ da transição de desenovelamento a uma faixa de temperatura de T_o a T_c , podem ser obtidas pela equação:

$$\Delta V/V = \int_{T_o}^{T_c} \alpha \cdot dT$$

Considerando o coeficiente de expansão térmica do solvente (α_{solv}) e o volume da célula (V_{cel}) pode-se escrever:

$$\alpha = \alpha_{\text{solv}} - (\Delta Q_{\text{rev}} / T.V_{\text{cel}} \cdot \Delta p)$$

Assim, é possível determinar a variação de expansividade entre a solução contendo a proteína (célula amostra) e o tampão (célula referência). As medidas incluem a variação de hidratação da superfície protéica considerando o sistema solvente.

3.2.3 Estudo do efeito de solutos no estado desenovelado da apomioglobina

Foram utilizados sacarose, glicerol e polietilenoglicóis de diversas massas moleculares como solutos e a escolha obedeceu aos seguintes critérios: são solutos quimicamente inertes no que se refere a reatividade/ligação com a proteína (TIMASHEFF, 2002), são de grupos funcionais distintos e têm massas moleculares que abrangem um intervalo bastante amplo.

Em geral, foram preparadas soluções desses solutos em água com concentrações molar e molal conhecidas (a primeira pesando os solutos e completando o volume em balão volumétrico com água; a segunda pesando tanto o soluto quanto a água) e foi medido o índice de refração destas soluções para obtenção de curvas de calibração, de concentração de soluto contra índice de refração. O cálculo de osmolalidade das soluções foi realizado conforme descrito a partir de valores tabelados (WOLF *et al.*, 1986; PARSEGIAN, 1994).

As amostras para ensaio foram preparadas misturando-se a proteína com água (pH 2,5) e concentrações variadas de soluto (pH 2,5) a partir de suas soluções estoque concentradas. Após preparo das amostras e respectivos brancos foi determinado o índice de refração. A concentração exata de soluto ali presente foi obtida por interpolação em sua respectiva curva de calibração (anexo A). Somente depois as amostras foram então levadas ao espectrofluorímetro para medidas espectrais. O tempo médio de incubação da proteína com os solutos foi de 60 minutos, tempo suficiente para atingir o equilíbrio. Após leitura espectrofluorimétrica as amostras foram novamente conferidas quanto ao pH, para garantir a interpretação dos resultados visto que o pH influencia em grande amplitude no grau de enovelamento da apoMb.

3.2.4 Estudo da Cinética de enovelamento da apomioglobina induzido por diferentes solutos

Investigou-se a influência dos solutos por estudos cinéticos no processo de enovelamento da apoMb, comparando os resultados obtidos com os observados em equilíbrio.

O estudo foi feito em equipamento de mistura rápida (*stopped flow* SX18MX, da Applied Photophysics), com leitor de fluorescência, capaz de resolver processos cinéticos em até 10 milissegundos. Foi selecionado 280 nm como comprimento de onda de excitação. O equipamento possui um termostato, o que permitiu a rápida modulação da temperatura e medidas de cinética de enovelamento. Foi realizada a mistura proteína:soluto na proporção de 1:10, possibilitando obter efeito de enovelamento por alta concentração de soluto. Foram realizadas medidas com os adjuvantes PEG 400, PEG 600 e PEG 1500, todos em pH 2,5. A concentração final de apoMb foi de 5 μ M.

A figura 12 apresenta, em esquema simplificado, um aparelho para estudos de cinética.

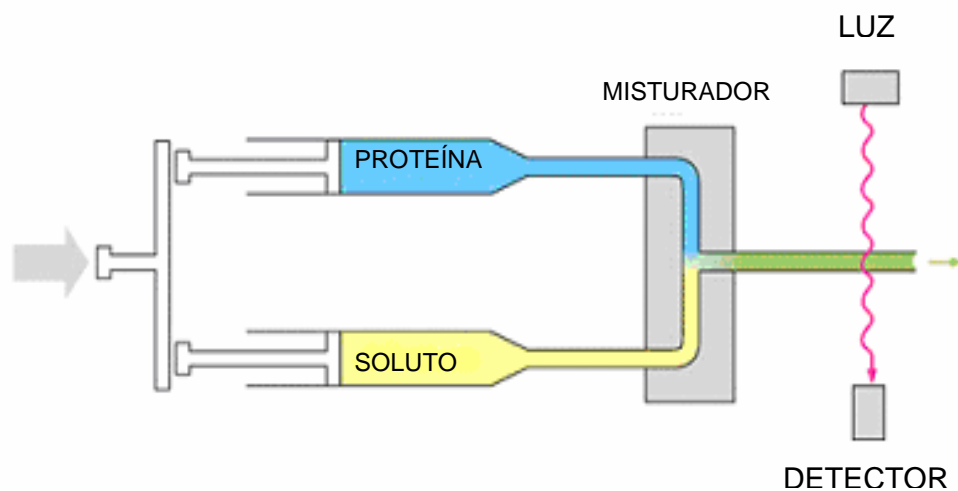


Figura 12 - Esquema simplificado de um aparelho de cinética.

Os valores de constante cinética e amplitude de mudança foram calculados considerando-se a transição em apenas dois estados ($D \rightarrow I$), por uma exponencial simples, empregando-se o software do próprio equipamento. A figura 13 ilustra o processo de (des)enovelamento de proteínas cuja constante cinética pode ser obtida a partir da curva sinal *versus* tempo obtida.

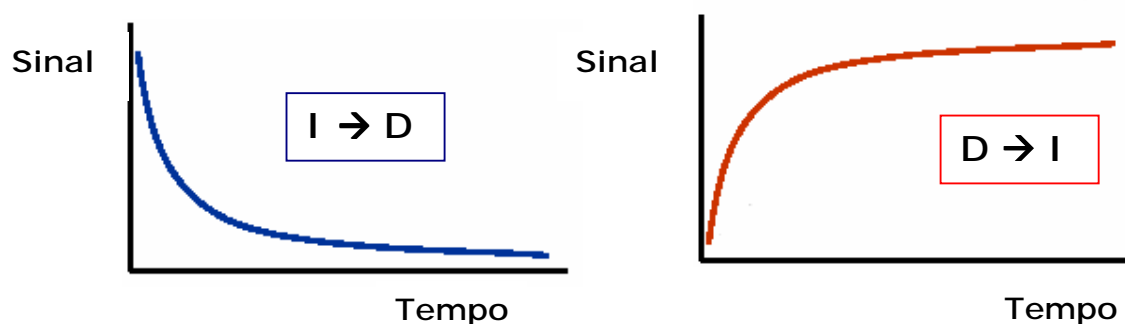


Figura 13 - Representação da cinética de (des)enovelamento de proteínas. A transição do estado intermediário para o estado desenovelado é seguida pelo decréscimo da intensidade de fluorescência, enquanto o reenovelamento do estado D para I é seguido por aumento de intensidade de fluorescência.

3.2.5 Medidas espectrofluorimétricas

Mudanças estruturais da apoMb foram monitoradas por propriedades espectrais, em termos de alteração na fluorescência intrínseca. A fluorescência intrínseca da proteína está relacionada à capacidade de emissão de luz – fluorescência, após ser excitada por luz em torno de 280 nm - por resíduos de triptofano e tirosina, tendo o primeiro maior contribuição que o segundo devido à

maior presença nesta proteína, maior extinção molar e maior rendimento quântico (LACKOWISCZ, 1999). Nas medidas apresentadas neste trabalho, excitação a 280 nm (não-seletiva) ou a 295 nm (seletiva para triptofano, sem contribuição de tirosinas) não apresenta diferença. Optou-se, portanto, por trabalhar com excitação a 280 nm por ser mais sensível. A emissão foi varrida de 300 nm a 420 nm. Os dados espectrais foram analisados em termos de:

- *intensidade de fluorescência normalizada (F)*: tendo o valor da fluorescência da proteína na ausência de solutos (F_0) como 1,0, como segue:

$$F = F_i/F_0$$

sendo F_i a fluorescência na condição i em relação ao parâmetro inicial, F_0 .

- *centro de massa espectral (CM)*: o centro de massa espectral é o ponto de comprimento de onda que divide o espectro em duas metades de áreas iguais, sendo indicativo do centro de distribuição de energia. Este parâmetro, CM, serve para monitorar o deslocamento espectral. O centro de massa foi calculado segundo:

$$CM = (\sum F_i \cdot \lambda_i) / \sum F_i$$

sendo F_i a fluorescência no comprimento de onda λ_i e $\sum F_i$ o somatório da intensidade de fluorescência ao longo de todos os pontos de comprimento de onda λ_i , ou seja, a área espectral (integral espectral).

Todos os dados apresentados correspondem à fluorescência da amostra subtraída da fluorescência de seu respectivo “branco”, ou seja, similar à amostra,

porém tendo volume equivalente de água em vez de proteína. Todos os dados foram analisados empregando-se o programa SigmaPlot® (Jandel Scientific).

3.2.6 Análise dos dados de equilíbrio conformacional

Considerou-se que a pH 2,5, pela adição de solutos, a apoMb sofre deslocamento de equilíbrio conformacional para uma estrutura mais enovelada, conforme confirmado por evidências anteriores de estrutura secundária por medidas de dicroísmo circular (MARÃO, 2000). Essa transição se dá entre dois estados, sem evidências de intermediários acumuláveis (medidas no equilíbrio) ou transientes (medidas cinéticas) entre esses, apresentados mais à frente.

Assim, considerando-se a reação de dois estados abaixo,



temos que a constante de equilíbrio Keq é descrita simplificada por:

$$Keq = [N]/[U]$$

Sabendo-se que as frações de N e U somam 1, tem-se que:

$$Keq = [N]/(1-[N])$$

Sabendo-se que a fração de proteína enovelada N equivale a:

$$f_N = (S_{obs} - S_N) / (S_U - S_N)$$

sendo S_{obs} o sinal observado, S_N e S_U o sinal correspondente a 100 % de proteína enovelada e desenovelada, respectivamente. Assim, tem-se:

$$Keq = [N]/(1-[N]) = f_N / (1-f_N)$$

que permite calcular a constante de equilíbrio K_{eq} em qualquer condição ao longo da variável observada. Assim, o gráfico de $\ln K_{eq}$ versus $\ln a_S$, sendo a_S a atividade do ligante S sob investigação, obtém-se o referido “plote de Wyman”, que é uma relação aproximada da função de Hill (HILL, 1910), que para sistemas perfeitamente cooperativos a inclinação corresponde à estequiometria da ligação do ligante S (WYMAN & GILL, 1990).

Desenvolvendo-se um pouco mais essas equações, unindo-a com a relação de Wyman, chega-se à função abaixo:

$$S = S_N - (S_N - S_U) * (k_0 * \exp(dN_S * x)) / (1 + (k_0 * \exp(dN_S * x)))$$

sendo K_0 a constante de equilíbrio na ausência do agente perturbador, dN_S a variação no número de ligantes S na transição entre estados enovelado (N) e desenovelado (U), e x o log natural da atividade do ligante S. Assim, pode-se extrair os valores de K_0 e dN_S diretamente do ajuste iterativo da equação acima para um gráfico de sinal monitorado *versus* log natural da atividade de um ligante.

3.2.7 Estudo conformacional da apomioglobina em diferentes solutos a partir da técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS)

Espalhamento de raios X a baixos ângulos é uma técnica aplicável a uma grande variedade de condições e tamanhos de partículas e por isso, permite a análise de macromoléculas biológicas e seus complexos em condições próximas às

fisiológicas, além de permitir um estudo direto das mudanças estruturais que podem ocorrer quando alteramos as condições externas (OLIVEIRA, 2002).

Quando uma amostra é irradiada por ondas eletromagnéticas associadas aos raios X, os elétrons dos átomos dessa amostra sofrem oscilações, comportando-se como se fossem livres. Partículas livres carregadas oscilantes produzem ondas espalhadas coerentes com a onda incidente em todas as direções. A intensidade $I(q)$ produzida por um sistema monodisperso diluído de macromoléculas em solução é proporcional à amplitude de espalhamento da macromolécula.

Esta técnica nos permite obter dados sobre a configuração e globularidade de estados conformacionais intermediários a partir do cálculo do raio de giro (R_g) e da dimensão máxima ($d_{máx}$) da molécula.

O estudo foi realizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), linha D11SAS, localizado em Campinas, São Paulo. As amostras foram preparadas misturando-se a proteína dissolvida em água à pH 2,5 com soluções variadas de PEGs a partir de soluções estoque concentradas (pH 2,5). As amostras foram centrifugadas antes da análise (9 KRPM - 15min). A concentração final de apoMb nas preparações foi 5 mg/mL e utilizou-se a concentração máxima que poderia se obter de PEG, de acordo com a tabela 1. Foram feitas também medidas de SAXS com a apoMb em HCl 5 mM (pH 2,5) estando a proteína em seu estado desenovelado, e em tampão bistris AcONa 2 mM pH 6,0 e pH 4,0 caracterizando os estados nativo e intermediário (*molten globule*), respectivamente. Para evitar qualquer variação durante as análises, a temperatura foi mantida constante à 25°C. A intensidade de espalhamento foi medida em um detector PSD unidimensional sendo a distância detector-amostra 444,9 mm e o comprimento de onda utilizado para detecção 1,488 Å. O volume do porta-amostra foi 100 µL.

Utilizou-se como padrão de análise a lisozima (19 mg/mL), adicionando PEGs nas mesmas concentrações que as utilizadas para a apoMb com e sem adição de HCl 1M para ajustar o pH em 2,5. Mediu-se ainda a intensidade de espalhamento de luz pela amostra na presença de tampão AcONa 50 mM em substituição à água, com e sem adição de PEGs. O uso desse controle facilitou a interpretação dos resultados.

Tabela 1 - Concentrações de PEG utilizadas para análise:

PEG	Concentração
PEG 400	0,90 M
PEG 600	0,63 M
PEG 1500	0,18 M
PEG 6000	0,04 M
PEG 10000	0,017 M

3.2.8 Análise dos dados de SAXS

A análise dos dados de SAXS fornece informações estruturais do sistema espalhador (raio de giro, dimensão máxima, área superficial e volume), diretamente da curva de espalhamento.

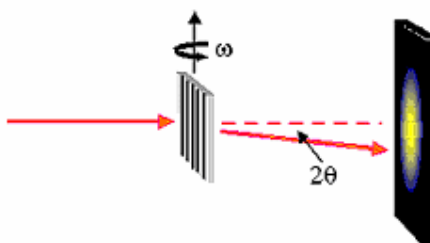


Figura 14 - Espalhamento de luz quando um raio incide sobre a molécula. Disponível em: <<http://polymers.msel.gov/highlights/structures-small-angle-x-ray-scattering>>. Acesso em 25 jan. 2005>.

A intensidade de espalhamento é medida como uma função do vetor de espalhamento, \mathbf{q} . Se 2θ é o ângulo de espalhamento a partir da radiação incidente, então:

$$q = (4\pi / \lambda) \text{sen } 2\theta$$

onde λ é o comprimento de onda de detecção. A intensidade espalhada $I(q)$ a partir da partícula em solução é máxima quando $q = 0$ e diminui com uma taxa que depende do tamanho e da conformação da partícula. Se considerarmos a partícula em solução como um sistema bifásico, isto é, partícula e solvente, então a densidade eletrônica do solvente deve ser considerada de acordo com a equação a seguir:

$$I(q) = n \left(\left| \int_V [\rho(r) - \rho_s] e^{-iqr} d^3r \right|^2 \right)$$

onde $I(q)$ é a intensidade de espalhamento, n é o número de partículas por unidade de volume, $\rho(r)$ é a densidade eletrônica da partícula, ρ_s é a densidade eletrônica do

solvente e “r” denota a posição relativa da partícula. A integral é a média de todas as orientações e o conjunto de estruturas presentes em solução.

Para um sistema diluído, uma solução monodispersa de partículas homogêneas, a intensidade $I(q)$ está relacionada ao raio de giro (R_g) de uma partícula segundo a lei de Guinier:

$$\ln [I(q)] = \ln [I(0)] - (qR_g)^2 / 3$$

O gráfico de Guinier está limitado a casos onde $q.R_g < 1,3$. Fornece evidências da presença ou ausência de agregação, que se manifesta como uma elevação nos dados em baixos valores de “q”, ou artefatos devido à interferências interpartícula, que se manifesta como um declínio nos dados de baixos valores de “q”.

O raio de giro é então calculado a partir do gráfico $\ln(I)$ versus q^2 , onde a inclinação da reta corresponde a $-R_g^2/3$.

Uma análise adicional dos dados foi realizada a fim de se obter informações sobre a conformação e a dimensão máxima ($d_{m\acute{a}x}$) da partícula.

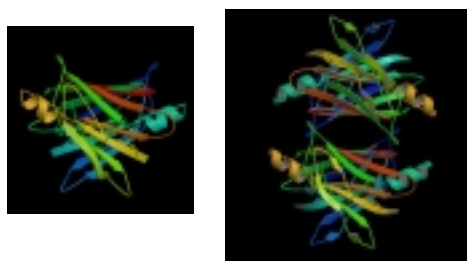
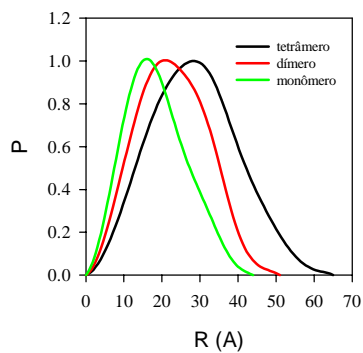
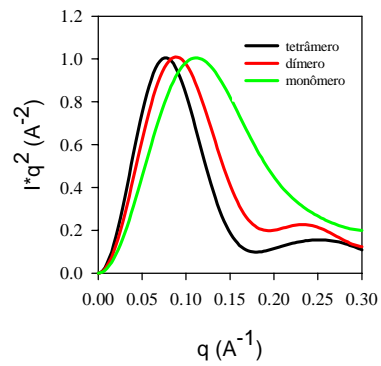
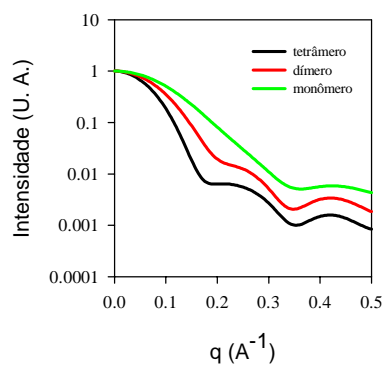
Invertendo a segunda equação dada obtém-se a função de distribuição de pares de distância $P(r)$ a partir da curva experimental $I(q)$ usando a transformada de Fourier:

$$P(r) = 1/2\pi^2 (\int_0^\infty dq (qr) I(q) \sin (qr))$$

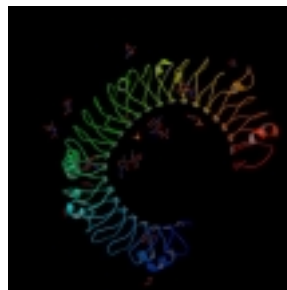
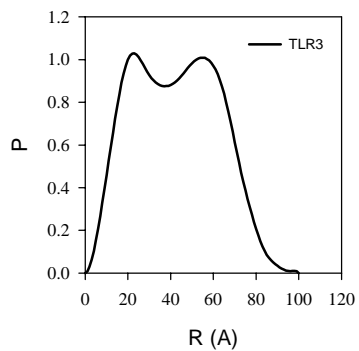
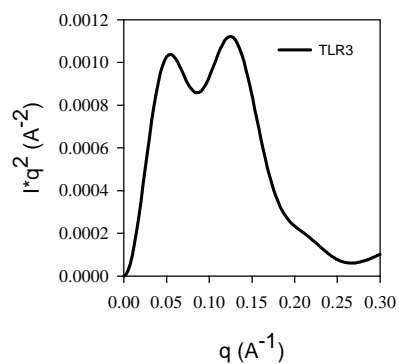
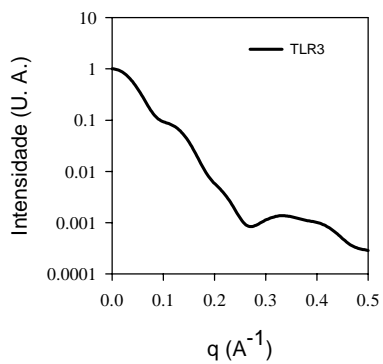
A função $P(r)$ foi avaliada empregando o programa GNOM (SVERGUN, 1992). Embora contenha a mesma informação da intensidade de espalhamento $I(q)$, a representação no espaço real permite inferirmos a forma e anisotropia das partículas espalhadoras.

A figura 15 apresenta simulações de SAXS, demonstrando os diversos perfis que podem ser obtidos dependendo das características da macromolécula.

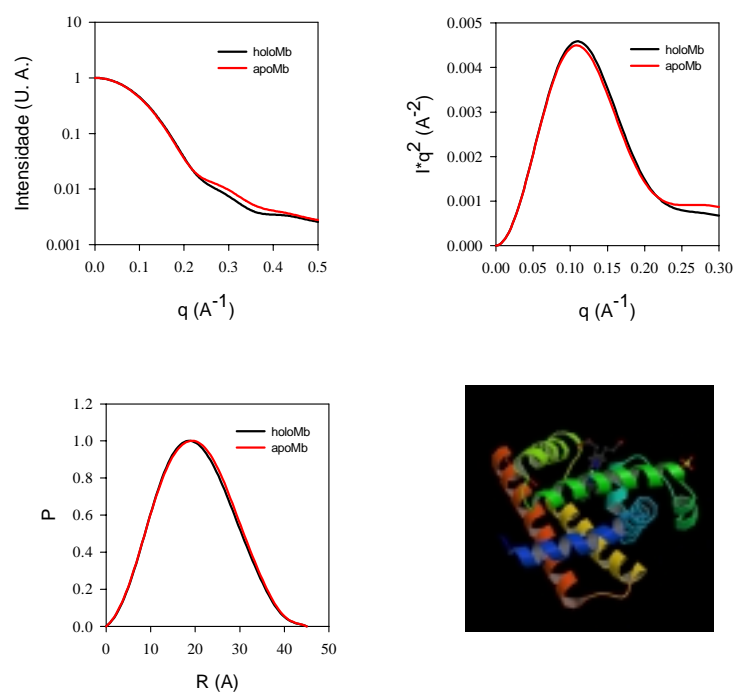
A)



B)



C)



D)

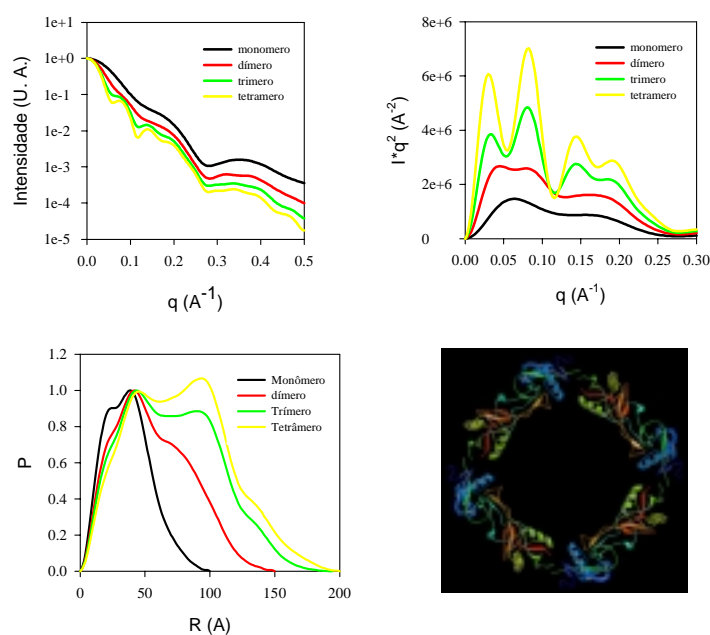


Figura 15 - Simulações de SAXS para diferentes proteínas em função de diferentes estados oligoméricos e da presença de pequenos ligantes. Representação dos gráficos de espalhamento de luz, distribuição de pares de distância ($P(r)$) e Kratky. A) transtirretina humana (1BMZ.pdb); B) receptor tipo *tol*-3(1ZIW.pdb); C) mioglobina de coração de cavalo (1WLA.pdb); D) 1UMR.pdb. Essas simulações foram geradas com o programa Crysol a partir dos pdb acima mencionado para se obter as $I(q)$ e, subsequentemente, com o programa GNOM para calcular as $P(r)$. Os estados "oligoméricos" foram estimados a partir das operações de simetria dadas pelo grupo espacial da estrutura cristalográfica de tais pdb's, usando-se o programa COOT.

Outra característica que pode ser obtida a partir dos dados de espalhamento é o grau de enovelamento da partícula espalhadora. Para esta análise utilizamos os Gráficos de Kratky ($I \cdot q^2$ versus q).

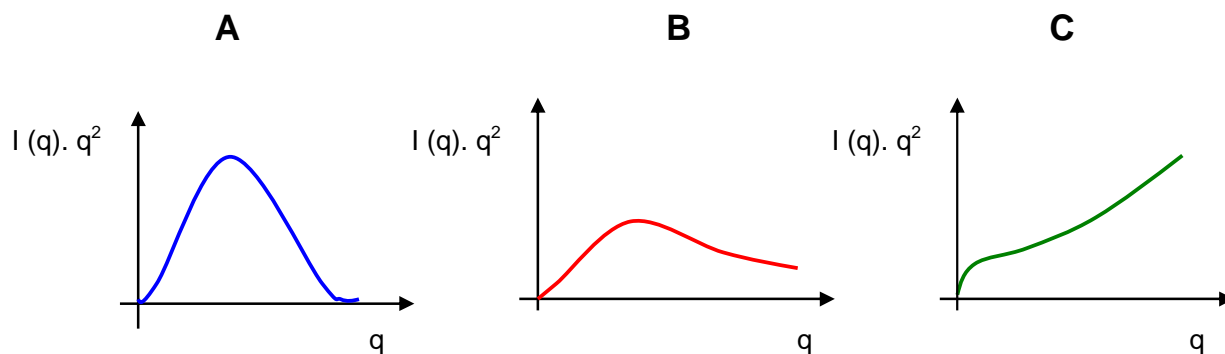


Figura 16 - Variação do gráfico de Kratky para uma proteína. (A) Gráfico de Kratky para proteína globular compacta, (B) em estado intermediário ou de crescente desenovelamento e (C) completamente desenovelada.

A curva de espalhamento para uma partícula globular segue a lei de Porod's, $I(q) \propto q^{-4}$. (KATAOKA *et al.*, 1995) e apresenta um pico bem definido ao contrário da forma desenovelada, como demonstrado na figura 16.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

“Volume and enthalpy changes are equally fundamental properties of the unfolding process, and no model can be considered acceptable unless it accounts for the entire thermodynamics behaviour.”

Walter Kauzmann (1987) Nature 325: 763

4.1 DEPENDÊNCIA DO pH NO ENOVELAMENTO DA APOMB

Conforme descrito anteriormente, nossos objetivos eram investigar os parâmetros termodinâmicos, energéticos e volumétricos, em equilíbrio e cinético, determinantes da estabilidade dos estados conformacionais da apoMb a pH 4,0 e 7,0, e por que meios os adjuvantes químicos aqui testados modulam esses parâmetros. Já foi reportado na literatura, repetidas vezes, as dependências de pH sobre o enovelamento da apoMb tanto de cachalote quanto eqüina, com transições acompanhadas por espectrofluorimetria, espectropolarimetria e até RMN. Entretanto, as medidas espectrofluorimétricas sob alta pressão que realizamos envolveram deslocamento espectral (já empregado por Vidugiris e Royer, 1998), que é mais sensível a modificações do ambiente químico de triptofano e tirosina, ambos observados pelos parâmetros que usamos (excitação 280 nm e emissão 300 nm a 420 nm), menos sensíveis a erros, e uma medida absoluta (enquanto intensidade de fluorescência é uma medida relativa).

A figura 17 A mostra os espectros obtidos para a apoMb em pH 7,0 e pH 2,5. Foi observado uma maior intensidade de fluorescência para a apoMb em pH 7,0 (estado nativo) quando comparada com o espectro em pH 2,5 (estado desenovelado). Observou-se ainda através da figura 17 B, o deslocamento espectral. Em pH ácido o espectro é deslocado para comprimentos de onda maiores,

indicativo da exposição dos resíduos de triptofano em ambiente aquoso, caracterizando o desenovelamento da proteína.

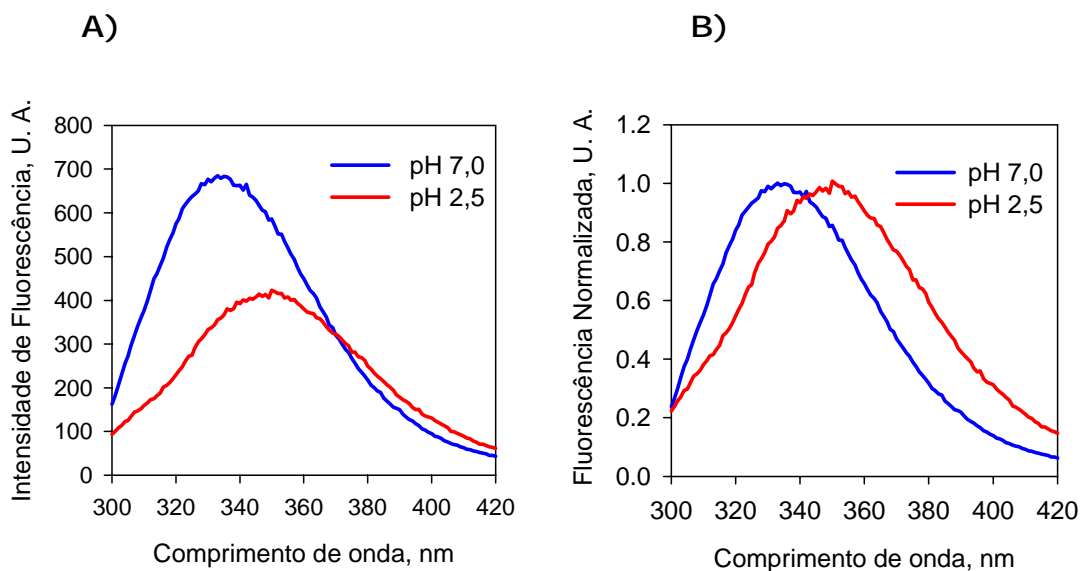


Figura 17 - A) Gráfico de emissão de fluorescência intrínseca da apoMb versus comprimento de onda à pH 2,5 e 7,0. B) Fluorescência normalizada a partir do gráfico A. ApoMb 2 μ M, tampão bis-tris/AcONa, 25°C (excitação: 280 nm, emissão: 300 – 420 nm).

O espectro a pH 7 corresponde ao espectro típico do estado nativo (N). À medida que o pH é diminuído, a estrutura nativa é desestabilizada mudando de conformação. A primeira etapa do processo de desnaturação ácida corresponde à transição entre o estado nativo e um estado parcialmente desenovelado, o estado intermediário (I), que pôde ser observado pela formação de um *plateau* em valores de pH entre 5 e 4 (figura 18). A segunda etapa de desnaturação está relacionada à transição do estado I para um estado totalmente desenovelado, em virtude do abaixamento do pH até valores em torno de 2. As transições seguidas pelo deslocamento espectral são então compatíveis com aquelas reportadas na literatura,

seguidas por medidas de dicroísmo circular e intensidade de fluorescência (ver figura 7, item 1.2.1).

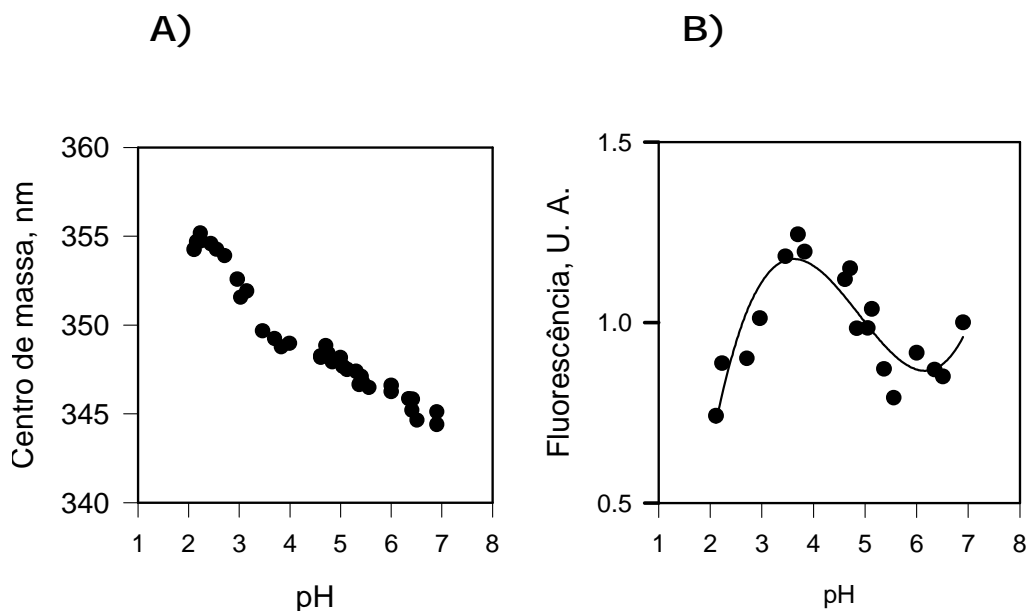


Figura 18 - Efeito do pH sobre a emissão de fluorescência, indicado A) pelo deslocamento do centro de massa espectral e B) pela intensidade de fluorescência dada pela área espectral. Condições de ensaio: apoMb 2 μ M, 25mM de tampão bis-tris/AcONa. Excitação 280 nm, emissão 300 nm a 420 nm. $CM = \frac{\sum I_i \lambda_i}{\sum I_i}$. A linha contínua em (B) é o melhor ajuste de uma função polinomial de terceira ordem, apenas para indicar as transições.

4.2 EFEITO DA PRESSÃO SOBRE O ENOVELAMENTO DA APOMB

Na figura 19 observamos que o aumento da pressão promove um deslocamento do espectro da apoMb em pH 7,0, observado pelos valores de centro de massa, para comprimentos de onda maiores. Esse comportamento é característico da transferência do triptofano para ambiente aquoso, sugerindo um efeito de desenovelamento da apoMb. O mesmo foi observado para pH 4,0, onde a proteína se encontra preferencialmente em seu estado I. O gráfico demonstra uma

curva sigmóide para ambos estados conformacionais alcançados, em pH 7,0 e pH 4,0, com platôs bem definidos, revelando uma transição em dois estados. Essa transição em dois estados coincide com duas medidas anteriores de alta pressão hidrostática, apesar desses trabalhos possuírem condições diferentes das que empregamos nessas medidas. A primeira, por RMN (BONDOS, SLIGAR & JONAS, 2000), empregou apoMb de cachalote e foi conduzida a pH 5,4. A segunda, acompanhada por espectrofluorimetria (VIDUGIRIS & ROYER, 1998), ainda que tenha empregado apoMb de equino, foi conduzida a pH 6,0, condição em que existe grande heterogeneidade de população (N e I), visto que o *plateau* da transição é a pH 7,0 (COCCO *et al.*, 1992).

A diminuição da temperatura desloca o ponto médio de transição das isotermas para pressões menores, indicando uma aparente perda de estabilidade para as transições: N \leftrightarrow I (pH 7,0, figura 19A) e I \leftrightarrow D (pH 4,0, figura 19B).

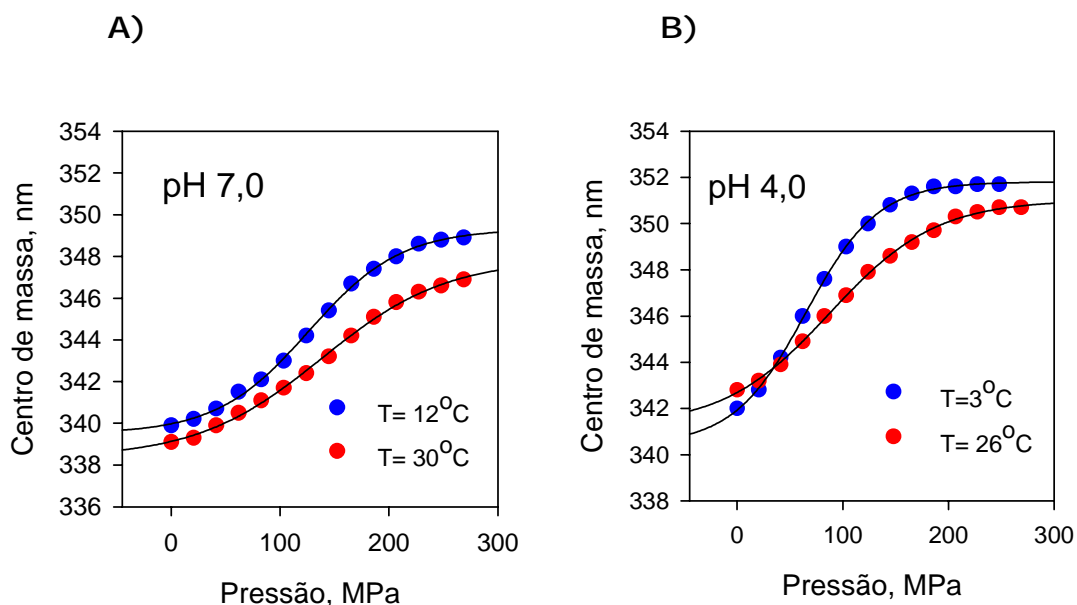


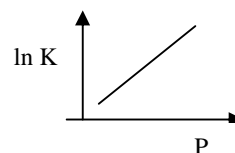
Figura 19 - Transição conformacional da apoMb induzida por pressão, observada através do deslocamento do centro de massa espectral. ApoMb 5 μ M em tampão bistris AcONa 25mM.

A partir dos dados do gráfico obtiveram-se os valores de constante de equilíbrio, K . Considerando a transição em dois estados, $N \rightleftharpoons D$, a constante K pode ser expressa como:

$$K = [D] / [N] = \text{fração D} / (1 - \text{fração D})$$

Construindo o gráfico $\ln K$ em função da pressão, P , obtêm-se os valores de energia livre de Gibbs, ΔG^0 e a variação de volume (ΔV) para essas transições.

$$-RT \cdot \ln K = \Delta G^0 - p \cdot \Delta V$$



Logo,

$$\ln K = - \Delta G^0 / RT + \Delta V / RT \cdot p$$



onde:

$$y = a + b \cdot x$$

As constantes de equilíbrio determinadas à pressão atmosférica, K^0 , foram analisadas em termos energéticos pelo gráfico de Van't Hoff (figura 20). De acordo com o gráfico, não se observa dependência da temperatura para a constante de equilíbrio na transição induzida por pressão de $I \rightleftharpoons D$ (pH 4,0). Entretanto, uma dependência linear é observada para o equilíbrio entre os estados $N \rightleftharpoons I$ (pH 7,0). Para cada transição ($I \rightleftharpoons D$ e $N \rightleftharpoons I$) determinou-se a entalpia padrão (ΔH) e a entropia (ΔS) pela equação de Van't Hoff.

Os resultados mostraram que a entalpia de Van't Hoff de desenovelamento para o estado intermediário (I), obtido por perturbação por pressão, é praticamente zero. Isto já foi previamente sugerido por medidas calorimétricas por Griko e Privalov (1988) e por Jamin e Baldwin (2000). Estes pesquisadores tentaram medir o calor de transição entre I e D e então sugeriram, sem quantificação direta, que esse valor seria próximo de zero. Os valores de ΔH e ΔS estão apresentados na tabela 2.

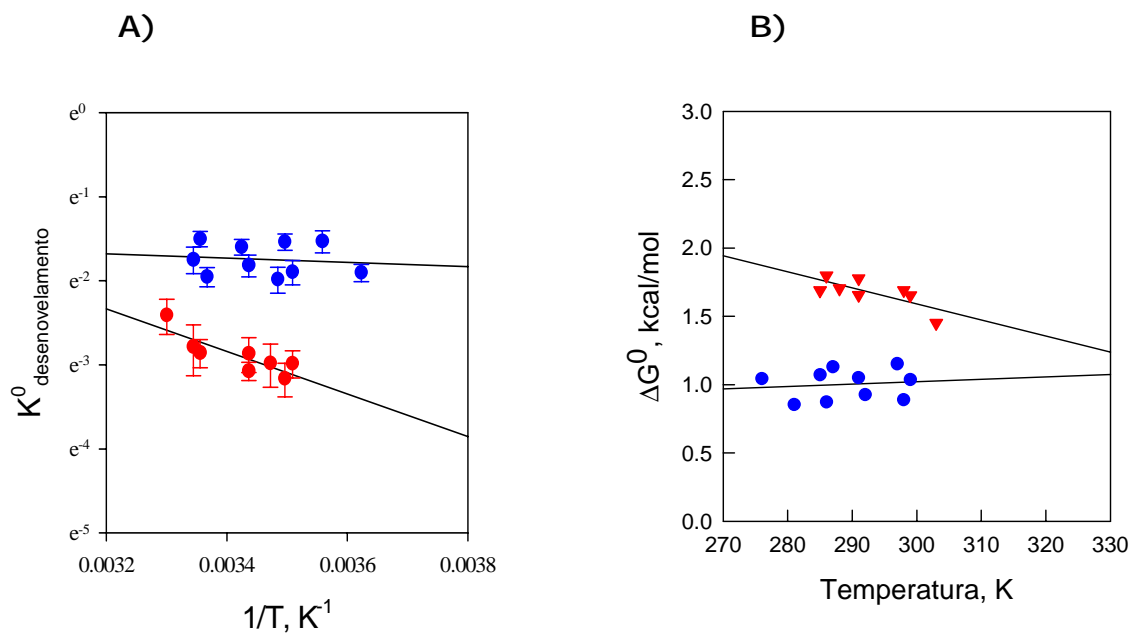


Figura 20 - A) Gráfico de Van't Hoff. Análise do processo de desenovelamento induzido por pressão da apoMb nativa (pH 7,0, vermelho) e seu estado intermediário (pH 4,0, azul). B) Efeito da temperatura sobre o valor de energia livre de Gibbs.

Para melhor comparação dos valores de variação de volume (ΔV) obtidos para as duas transições estudadas, foi construído o gráfico ΔV versus temperatura (figura 21). Verificou-se que, na faixa de temperatura estudada, todos os valores de ΔV calculados são negativos. Isto corresponde ao desenovelamento da proteína induzido por alta pressão. O aumento da temperatura resultou em um decréscimo linear na perda de volume parcial molar para ambas transições: $N \rightleftharpoons I$ ($\Delta V_{N \rightarrow I}$) e $I \rightleftharpoons D$ ($\Delta V_{I \rightarrow D}$). Essa relação entre a variação de volume de desenovelamento e a temperatura pode ser analisada por uma função polinomial de primeira ordem:

$$\Delta V_{N \rightarrow I} = 0,731 (\pm 0,104) T - 266$$

e

$$\Delta V_{I \rightarrow D} = 0,690 (\pm 0,191) T - 256$$

O coeficiente angular dessas retas corresponde ao coeficiente de expansão térmica de desenovelamento, $\Delta\alpha_{des}$ (ZIPP & KAUZMANN, 1973). Os coeficientes de expansão térmica para $N \rightleftharpoons I$ e $I \rightleftharpoons D$ são similares considerando os desvios obtidos (tabelas 2 e 3).

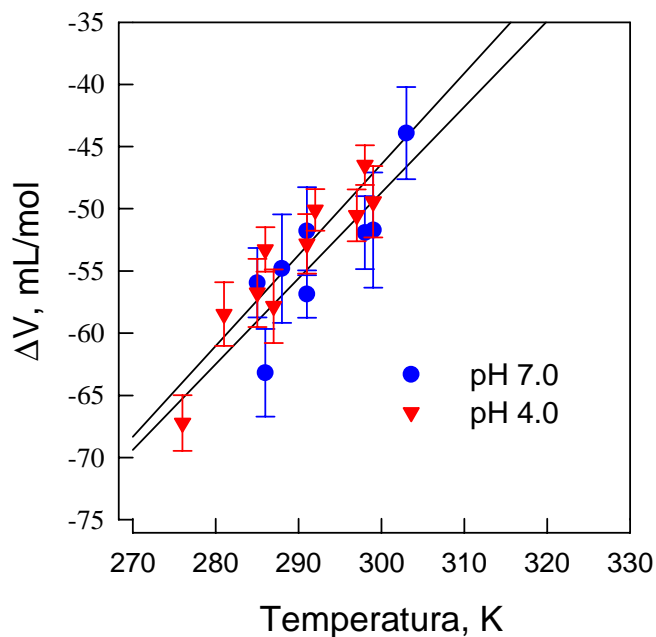


Figura 21 - Efeito da temperatura sobre a variação de volume parcial da apoMb nativa (pH 7,0, vermelho) e seu estado intermediário (pH 4,0, azul) sob pressão.

Tabela 2 - Parâmetros termodinâmicos para transição conformacional da apoMb induzida por pressão.

pH	$\Delta H_{\text{Van't Hoff}}$ (Kcal/mol)	$\Delta S_{\text{Van't Hoff}}$ (cal/mol)	$\Delta V/T$ (mL/mol.K)
4,0 (I=D)	$0,48 \pm 1,5$	$-1,78 \pm 5,5$	$0,731 \pm 0,104$
7,0 (N=I)	$5,8 \pm 1,4$	$14,03 \pm 4,7$	$0,690 \pm 0,191$

Tabela 3 - Parâmetros termodinâmicos e estruturais correspondentes aos diversos estados da apoMb

	N _{pH 7,0}	I _{pH 4,0}	D _{pH 2,5}
$\alpha (10^3 \text{ K}^{-1})_{12^\circ \text{C}}$	1,37	0,93	0,85
Rg ^a	19,7 ± 0,6	23,1 ± 1,3	30,2 ± 2,5
d _{máx} ^a	62,5 ± 2,5	72,5 ± 2,5	110 ± 10
Elipticidade molar (°·cm ² ·dmol ⁻¹ b)	20.000	12.000	5.000

^a KATAOKA *et al.*, 1995, ^b REGIS *et al.*, 2005.

Os dados obtidos mostraram que, apesar da larga variação de volume envolvida nas transições entre os estados N ⇌ I e I ⇌ D, não há, aparentemente, nenhuma contribuição energética, ou seja, em termos de calor de ligação, na manutenção do estado intermediário em relação ao estado desenovelado. Isso significa dizer que, para essa transição, não existem diferenças entre a entalpia de interação proteína:proteína e proteína:água. Da mesma forma, o balanço entrópico entre os estados I e D é zero dentro do erro, o que leva a entender que a entropia conformacional do desenovelamento é compensada na mesma extensão pelo aumento da hidratação protéica (Figura 22), o que levaria a decréscimo entrópico em função da transferência de água da vizinhança para a superfície protéica.

Acredita-se que a estabilização do estado I em relação à D ocorra devido a grandes mudanças de hidratação protéica durante as transições. Kamei e colaboradores (2002) já haviam demonstrado diferenças no grau de hidratação da apoMb nos diferentes estados conformacionais. Os resultados demonstraram ainda que a transição entre I e D é somente determinada por variação de volume.

Experimentos posteriores foram importantes para avaliar estas primeiras observações.

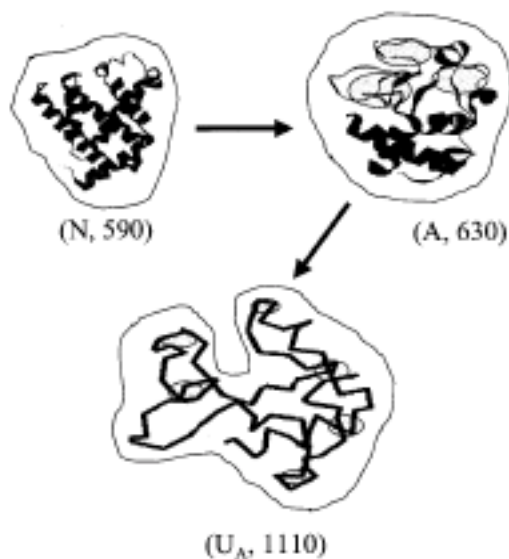


Figura 22 - Diagrama esquemático representando a hidratação, em termos de moléculas de água (números em parênteses), para os estados nativo (N), intermediário (A) e desenovelado (U) da apoMb induzido por pH. Fonte: KAMEI *et al.*, 2002).

Assumindo que o coeficiente de expansão térmica é constante em ampla faixa de temperatura, é possível estimar que $\Delta V_{N \rightarrow I}$ e $\Delta V_{I \rightarrow D}$ atingem o valor zero em temperaturas semelhantes, respectivamente 363 K e 370 K. Porém, apenas a realização de medidas à altas temperaturas poderiam comprovar esse resultado.

Foram realizadas medidas por CPP (LIN *et al.*, 2002; RAVINDRA *et al.*, 2004; COOPER *et al.*, 2001) para melhor explorar as variações do coeficiente de expansão térmica da apoMb em cada estado conformacional (tabela 3). O coeficiente de expansão térmica aparente, α , é descrito como uma função de temperatura entre 10 e 90°C. Tanto pH 7,0 (nativa) como pH 4,0 (intermediário) mostram um valor positivo para α a baixas temperaturas (10°C), que decresce com o aumento da temperatura

até 90°C. Estas transições ocorrem sem nenhum pico identificável nas curvas de α versus T (figura 23). Isto sugere que o processo de desenovelamento induzido por aquecimento (nestes valores de pH) não envolve variação de volume detectável. O decréscimo do pH promove o desenovelamento progressivo da apoMb e conseqüente exposição de sítios alifáticos anteriormente protegidos do meio hidrofílico. Isto resulta em uma diminuição dos valores de α a baixas temperaturas assim como o coeficiente angular da reta α/T . Essa dependência está relacionada às propriedades dos grupos hidrofílicos presentes na estrutura, que diminui em função do abaixamento do pH devido ao progressivo desenovelamento e exposição dos resíduos hidrofóbicos. Entretanto, ambos valores, α (12°C) e α/T para pH 4,0 (I) são mais próximos aos valores encontrados para o estado D que para o estado N. Os dados estruturais reportados na literatura (tabela 3) não demonstram essa similaridade.

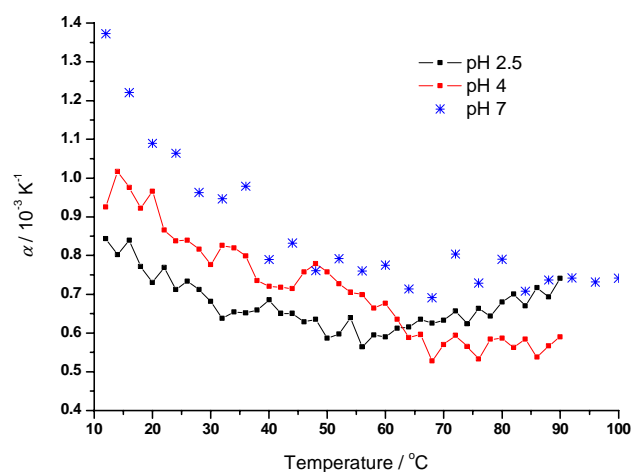


Figura 23 – Curvas de calorimetria de perturbação por pressão da apoMb a pH 7,0 (azul), pH 4,0 (vermelho), e pH 2,5 (preto). Concentração de apoMb: 2 mg/mL. Taxa de aquecimento: 10°C/h.

A variação das propriedades de expansividade térmica medidas por CPP estão correlacionadas com a capacidade de estruturação / desestruturação de moléculas de águas ao redor dos solutos em avaliação. Desta forma, tanto o valor absoluto a uma dada temperatura quanto a dependência dos valores de expansividade em função da temperatura serão uma propriedade particular para cada soluto e, portanto, para cada aminoácido. Lin e colaboradores (2002) investigaram as propriedades de soluções de L-aminoácidos separados, em meio aquoso, por DSC-CPP, e observaram que aminoácidos hidrofílicos apresentam valores de alfa positivo a baixa temperatura, que decresce com o aumento da temperatura. Aminoácidos alifáticos apresentam comportamento oposto, com valores de alfa negativos a baixa temperatura e que aumentam conforme o incremento desta variável. Aminoácidos aromáticos apresentam comportamento mais similar aos hidrofílicos que os alifáticos (figura 24).

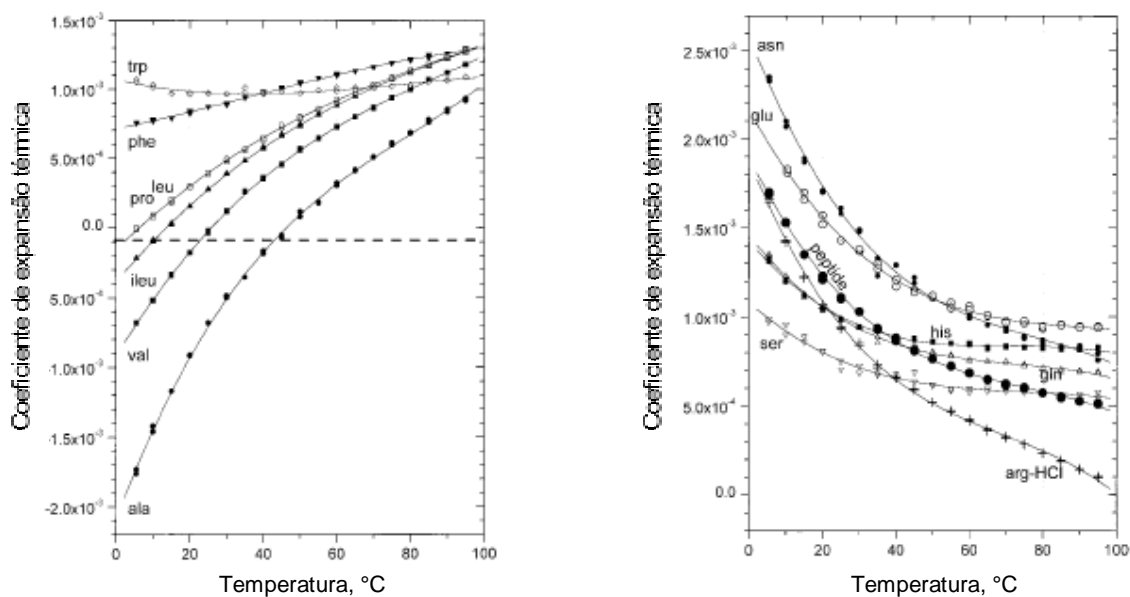


Figura 24 - Coeficientes de expansão térmica de L-aminoácidos . Fonte: LIN *et al*, 2002.

Desta forma, resolvemos avaliar se as medidas de CPP obtidas com apoMb nas diferentes de condição de pH são propriedades resultantes de propriedades aditivas da extensão da exposição de cada aminoácido à medida que a proteína se enovela ou não, o que neste caso levantaria a hipótese de existência de alguma outra contribuição sobre os parâmetros termodinâmicos avaliados.

A partir da estrutura da holoMb (1WLA.pdb), do qual removemos as coordenadas correspondentes ao grupamento prostético heme e as moléculas de água cristalográficas, obtivemos o arquivo “apo_1WLA.pdb”, que foi usado na estimativa da área de superfície exposta a solvente da apoMb. Para esse cálculo, empregamos o programa WHAT_IF (<http://swift.cmbi.kun.nl/WIWWWI/>). A figura 25 apresenta a página da Internet com esse programa.

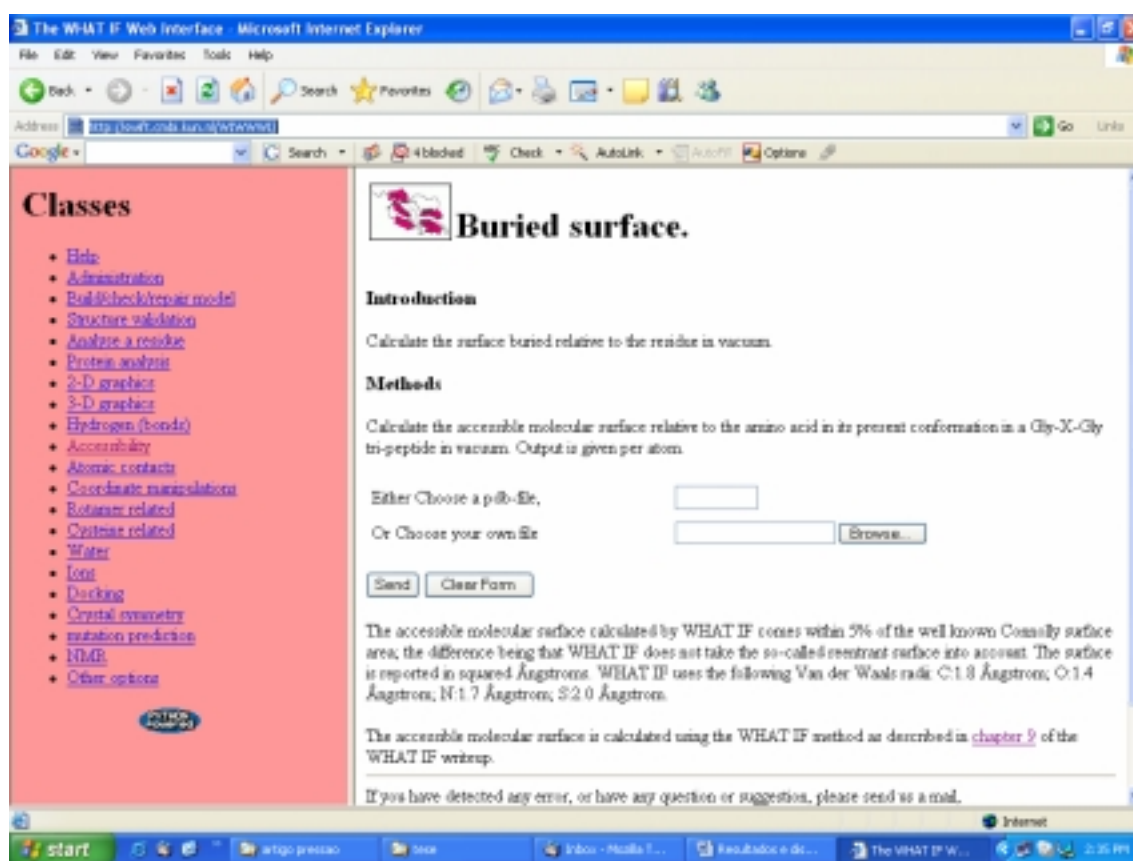


Figura 25 - Página da Internet com o programa WHAT_IF. Fonte: <http://swift.cmbi.kun.nl/WIWWWI/>.

A saída dada pelo programa é a área de superfície acessível a solvente de cada aminoácido relativa ao mesmo aminoácido, denominado X, em uma conformação Gly-X-Gly no vácuo. Para cada um dos 153 aminoácidos da apoMb temos, então, o percentual exposto ao solvente, que colocamos em termos de fração (de zero a um). A partir dos dados obtidos por Lin e colaboradores (2002) para a função de temperatura da expansividade térmica dos aminoácidos livre em solução (Figura 26), podemos estimar o coeficiente de expansão térmica da proteína na sua conformação enovelada (calculado a partir de WHAT_IF como descrito acima) e desenovelada, assumindo completo estado randômico e, portanto, fração de exposição a solvente para cada aminoácido igual à unidade (figura 26).

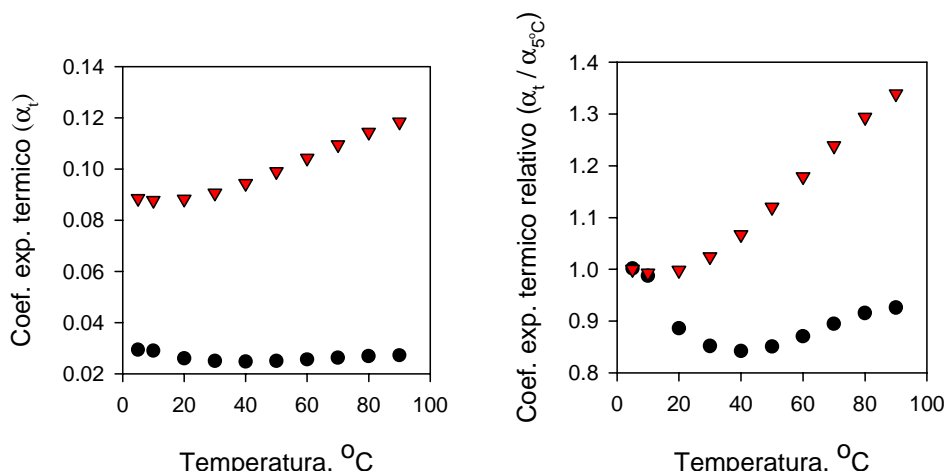


Figura 26 - Estimativas de coeficientes de expansão térmicos da apoMb nas conformações nativa (círculos) e desenovelada (triângulos), a partir dos valores de expansividade térmicos de cada aminoácido dados por Lin *et al.* (2002), tendo-se empregado acessibilidade de 100 % para a proteína desenovelada e acessibilidade a solvente para a proteína nativa calculados com WHAT_IFF (<http://swift.cmbi.kun.nl/WIWWWI/>) usando-se as coordenadas de 1WLA.pdb, segundo $\alpha_t = \text{soma} [(\alpha_{i-t}) * (\text{fração}_{i-t})]$ sendo α_t o valor de expansividade térmica da proteína na temperatura t , α_{i-t} o valor de expansividade térmica do aminoácido i na temperatura t , fração _{$i-t$} o valor de fração de superfície exposta a solvente calculado como descrito no texto.

Pelo que se observou, existe uma grande diferença entre os valores medidos e estimados para apoMb nativa e desenovelada. Essas discrepâncias podem ser devido a diversas origens, a saber:

- interações protéicas intramoleculares que não foram levadas em consideração (por não haver dados sobre elas) nos cálculos estimativos, o que torna questionável essa abordagem de cálculo aditivo dos valores de expansividade a partir dos produtos dos solutos individuais pela sua fração de área exposta a solvente;

- diferenças nos valores de expansividade associados à ionização de grupamentos dos aminoácidos;

- a contribuição de expansividade inerente a macromolécula, α_M , além dos valores acima correspondentes as mudanças de expansividade do solvente imediatamente solvatando a vizinhança de cada aminoácido da macromolécula.

4.3 ESTUDO DO EFEITO DE SOLUTOS NO ESTADO DESENOVELADO DA APOMIOGLOBINA

A figura 27 mostra o efeito da diminuição do pH na presença de polietilenoglicol 10K. A curva obtida para a apoMb na presença do soluto é semelhante à curva da proteína em água na faixa de pH entre 7,0 e 3,0. Isto demonstra que a diminuição do pH promove a desestabilização da estrutura nativa mesmo na presença do soluto, deslocando o equilíbrio $N \rightleftharpoons I$ para a formação do estado intermediário, como observado para a proteína em solução aquosa. Entretanto, a presença do PEG

impediu o total desenovelamento da proteína quando se reduziu o pH para valores próximos a 2,0. O valor de centro de massa espectral observado foi cerca de 349 nm em pH 2,0 e 347 nm em pH 4,0. Este resultado demonstra que o soluto estabiliza o estado intermediário da apoMb mesmo em valores baixos de pH, nos quais a proteína estaria completamente desenovelada.

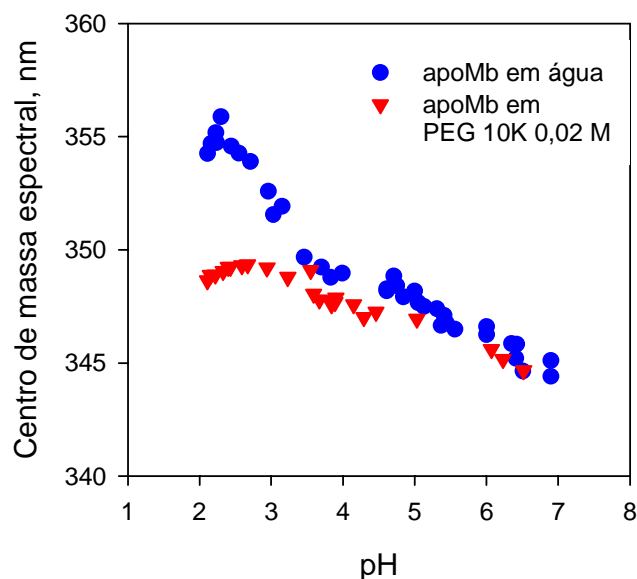


Figura 27 - Transições conformacionais da apoMb induzidas por pH, monitoradas pelo deslocamento do centro de massa espectral. Excitação: 280 nm; emissão: 300 a 420 nm.

Na figura 28 estão apresentados espectros da apoMb na ausência e na presença de 1,5 M de sacarose. Pode-se observar, no painel A, que a sacarose leva a um aumento da intensidade de fluorescência da apoMb. No painel B, esses espectros foram normalizados para o mesmo máximo de emissão, o que possibilita a constatação de que há, além do aumento de intensidade de fluorescência devido à presença de sacarose, um deslocamento espectral para menores comprimentos de onda, comportamento característico da transferência do triptofano para ambiente

mais apolar, longe do ambiente aquoso, sugerindo um efeito de enovelamento da proteína devido à presença de sacarose.

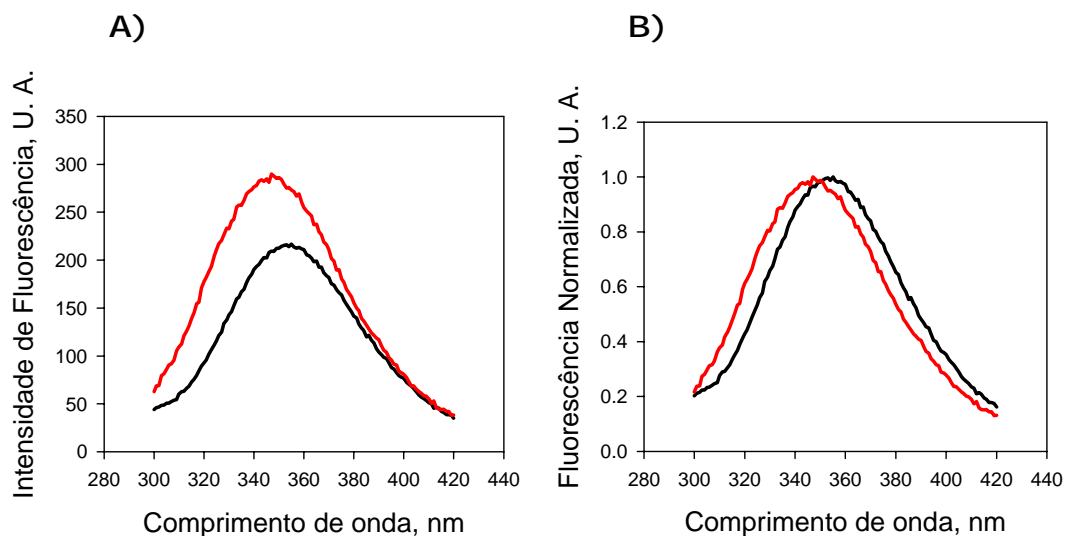


Figura 28 - Efeito de sacarose na fluorescência intrínseca de apoMb. ApoMb ($2 \mu\text{M}$) foi incubada em meio aquoso a pH 2,5, acidificado com HCl, na ausência (preto) ou na presença (vermelho) de 1,5 M sacarose. Demais detalhes em materiais e métodos.

Na figura 29 está apresentado o efeito de quantidades progressivamente maiores de sacarose sobre a fluorescência intrínseca da apoMb a pH 2,5. Podemos observar que existe um concomitante aumento da intensidade de fluorescência (painel A) e do deslocamento espectral para menores comprimentos de onda, de aproximadamente 357 nm (ausência de sacarose) para aproximadamente 350 nm (presença de 2,4 M de sacarose). Isto sugere que existe um progressivo aumento do grau de enovelamento protéico em função de concentrações crescentes de sacarose, tendendo a um efeito máximo (*plateau*) em torno de 2,5 M de sacarose.

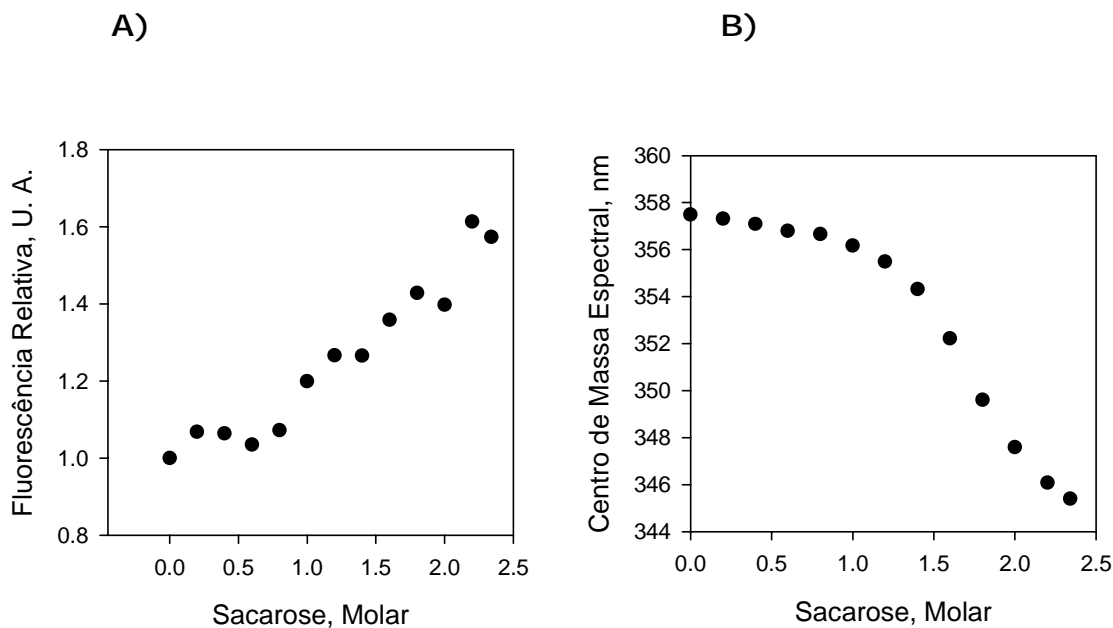


Figura 29 - Isoterma de titulação de apoMb por sacarose a pH 2,5. Diferentes amostras de apoMb (2 μ M) foram incubadas em meio aquoso a pH 2,5, acidificado com HCl, em concentrações crescentes de sacarose, e sua fluorescência intrínseca foi monitorada. O efeito de sacarose é apresentado em função de intensidade de fluorescência intrínseca (painel A) e de centro de massa espectral (painel B). Demais detalhes em materiais e métodos.

Para saber se este efeito é uma propriedade exclusiva da sacarose ou um mecanismo comum a outros compostos, partiu-se para a caracterização do efeito de outros compostos polihídricos, tais como glicerol e polietilenoglicóis. Na figura 30 apresentamos o efeito destes compostos sobre a fluorescência intrínseca da apoMb a pH 2,5.

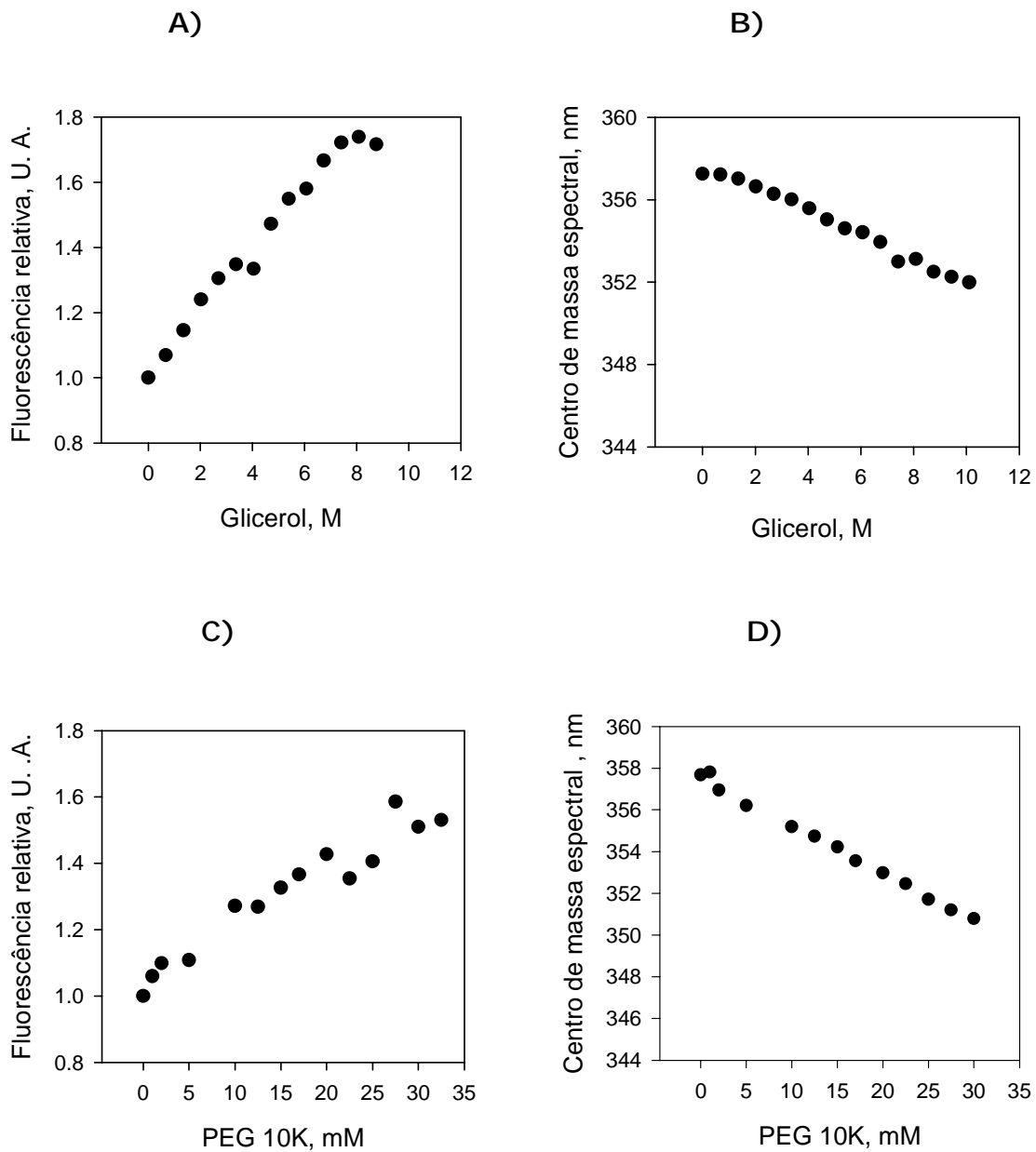
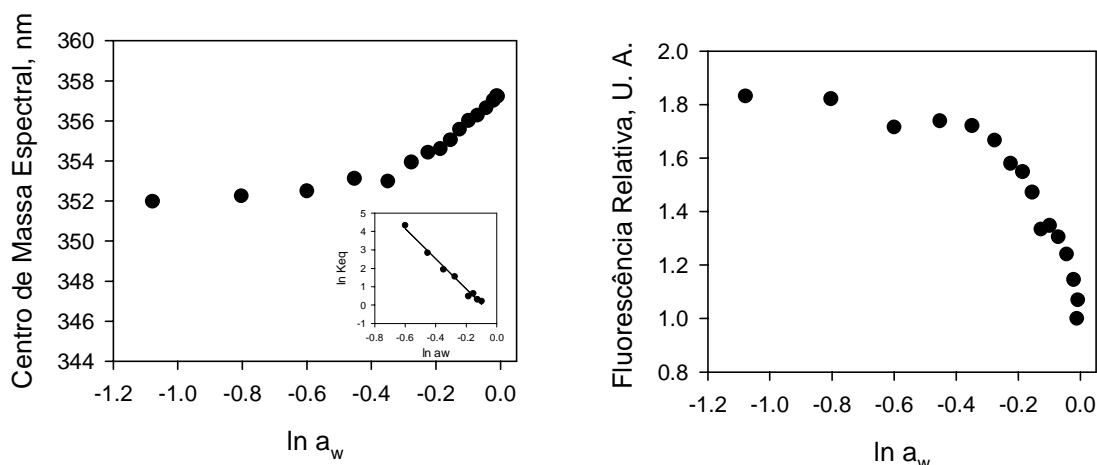


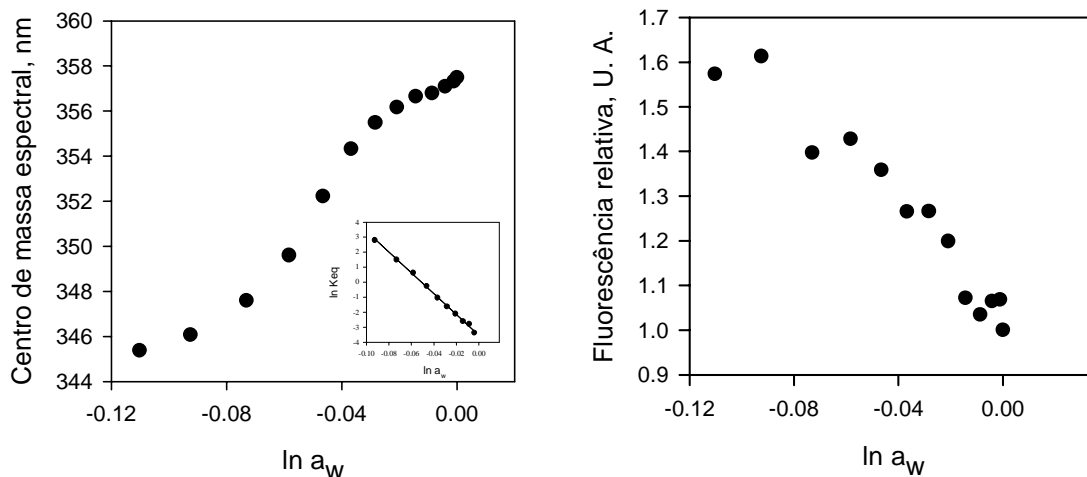
Figura 30 - Efeito de concentrações variadas de diferentes solutos sobre o enovelamento da apoMb a pH 2,5, monitorado por sua fluorescência intrínseca.

É demonstrado que essas classes de compostos polihídricos são preferencialmente excluídos da superfície protéica (TIMASHEF, 2002), exercendo, portanto, pouco efeito de ligação direta. Sendo assim, podemos entender o efeito desses solutos sobre a estrutura da apoMb por um mecanismo indireto, via ajuste do potencial químico da água por tais compostos. Sendo assim, passamos a interpretar as curvas de reenovelamento monitoradas pelo deslocamento do centro espectral da emissão de fluorescência como uma função da atividade da água. Essa forma interpreta a água como agente atuante sobre a proteína, sobre as forças de reenovelamento. Na figura seguinte (31) temos os mesmos dados da figura anterior (30), porém em gráficos de centro de massa em função da atividade da água para cada soluto específico.

A) Glicerol



B) Sacarose



C) PEG 10K

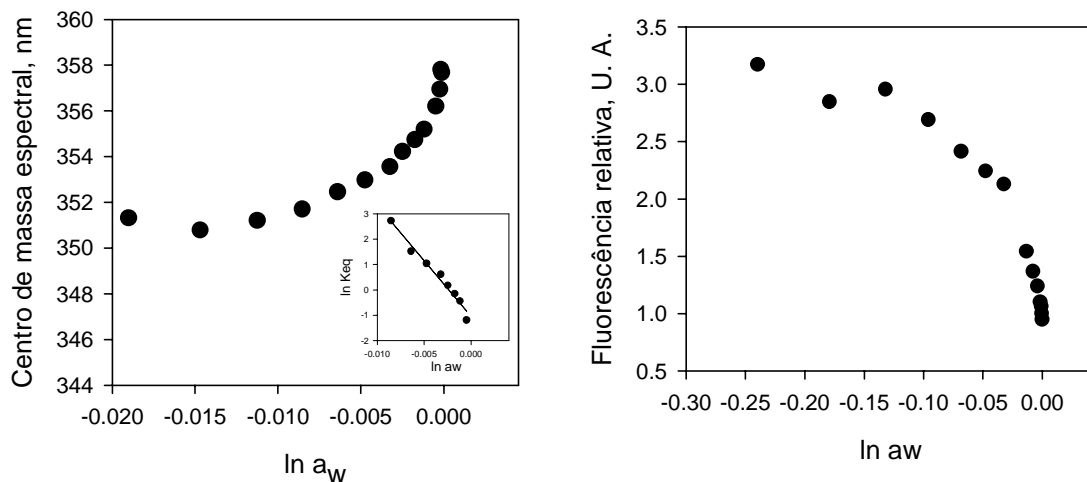


Figura 31 - Interpretação do efeito dos solutos sobre a estrutura da apoMb em termos de envelhecimento induzido por forças de hidratação.

Foram construídos os mesmos gráficos para os demais solutos: PEG 400, 600, 1000, 3350, 6K e 8K, tendo sido obtido resultados com perfis semelhantes (dados não apresentados).

Com a adição de solutos, a atividade da água diminui e desloca o equilíbrio $D \rightleftharpoons I$ para o estado menos hidratado (I). Os gráficos de logaritmo da constante de equilíbrio versus logaritmo da atividade da água (apresentados na figura 31 em tamanho menor) medem o número de moléculas de água de hidratação liberadas na reação de enovelamento protéico. Uma forma direta de avaliar a influência dos solutos é empregar a relação de Wyman, através da equação:

$$S = S_N - (S_N - S_U) * (k_o * \exp(dN_S * x)) / (1 + (k_o * \exp(dN_S * x)))$$

descrita anteriormente no item 3.2.6, que permite estimar qual seria a mudança no grau de hidratação da proteína entre os estados desenovelado e enovelado. Essa mudança no grau de hidratação é representada pelo número de moléculas de água que são excluídas da superfície protéica quando esta se enovela. Na tabela 4 apresentamos esses valores.

Tabela 4 - Relação entre variação de hidratação e volume parcial molar dos solutos empregados.

Soluto	ΔN_w	Massa Molecular
Glicerol	10,98 ± 0,92	92
Sacarose	62,59 ± 2,09	342
PEG 400	70,55 ± 19,38	400
PEG 600	170,3 ± 30,57	600
PEG 1000	230,0 ± 35,68	1000
PEG 1500	239,3 ± 58,81	1500
PEG 6000	168,6 ± 24,52	6000
PEG 8000	441,5 ± 20,17	8000
PEG 10000	436,1 ± 29,86	10000

Podemos observar que esse efeito é diferente conforme o tamanho do soluto, representado aqui por sua massa molecular. A figura 32 apresenta a correlação entre mudança no grau de hidratação e a massa molecular do soluto.

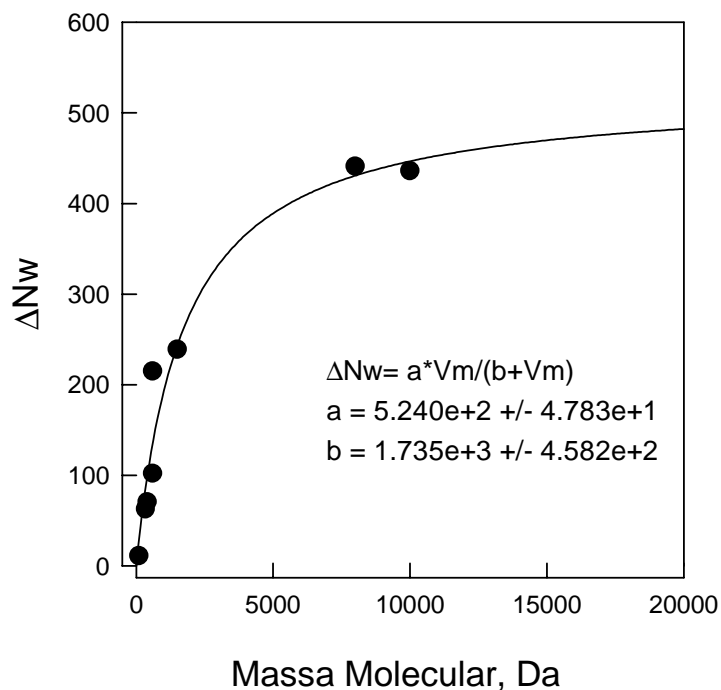


Figura 32 - Relação entre variações de hidratação no enovelamento da apoMb a pH 2,5 induzido por soluto e a massa molecular do mesmo.

Pode-se observar uma boa correlação entre essas duas quantidades. Isso sugere que quanto maior o soluto, ou seja, o volume que ocupa em solução, mais pronunciado é o efeito. Entretanto observa-se a tendência de formação de um *plateau* a medida em que a massa molecular do soluto ultrapassa 10000Da. Pode-se dizer que os diferentes solutos empregados estabilizam estados intermediários com diferentes graus de hidratação, não sendo, portanto estruturas idênticas.

4.4 ESTUDO DA CINÉTICA DE ENOVELAMENTO

Tem-se nesse trabalho interesse em também entender como os solutos podem estar afetando a cinética de enovelamento. Para isso, submeteu-se a mistura da proteína com diferentes solutos, em diferentes concentrações, tudo a pH 2,5, e monitorou-se ao longo do tempo o que ocorre. Foi verificado que o processo atinge o equilíbrio em poucos segundos. Para seguir a cinética de um processo tão rápido empregou-se, como descrito no item 3.2.4, um equipamento modular que rapidamente realiza a mistura das soluções já na microcubeta, tendo seu sinal monitorado em linha, com resolução em milisegundos. O que se observa é um perfil de aumento de intensidade de fluorescência ao longo do tempo (figura 33), com apenas um componente exponencial, sugerindo uma única etapa de enovelamento cinético, entre apenas dois estados.

A figura 33 mostra que, durante o tempo de experimento, a intensidade de fluorescência aumenta e alcança um *plateau* em cerca de 5 s, com todos os solutos testados, indicando que a mistura foi completa e, portanto, os dados obtidos a partir do gráfico são confiáveis.

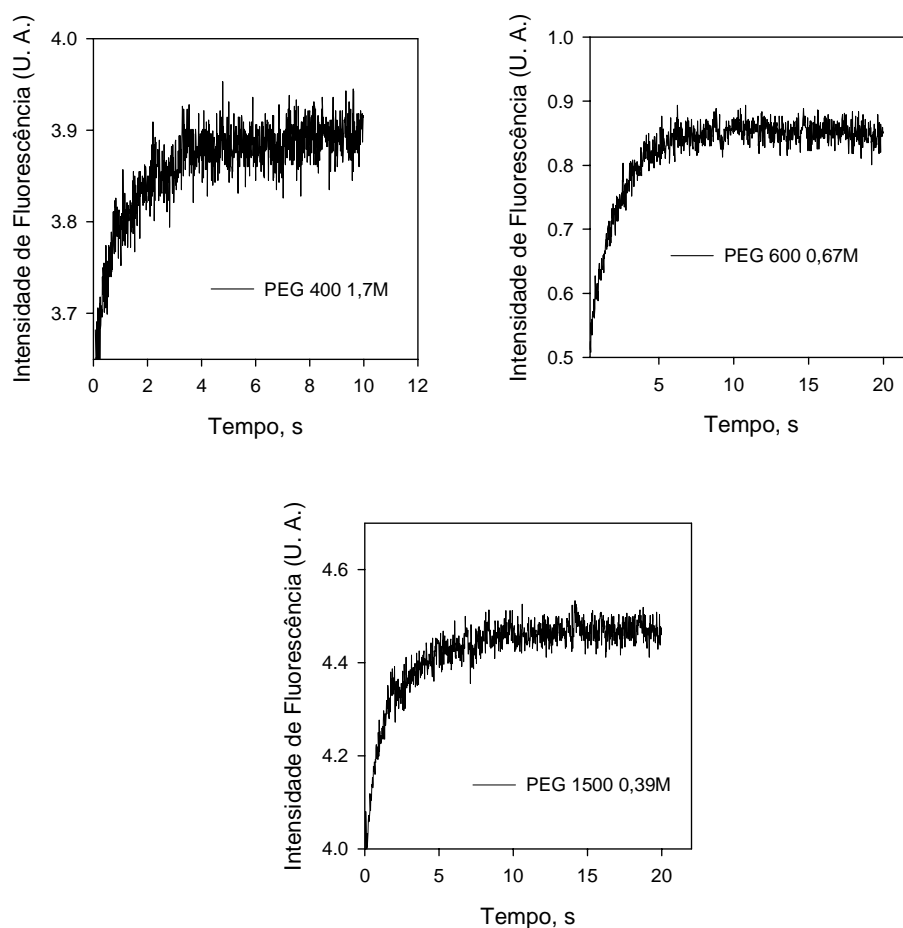


Figura 33 - Cinética de enovelamento da apoMb ($5\mu\text{M}$) em diferentes concentrações de solutos, monitorada por fluorescência.

Esse aumento na intensidade de fluorescência está de acordo com o observado no equilíbrio (figuras anteriores). A amplitude de mudança de fluorescência na reação cinética de reenovelamento é dependente da concentração dos solutos (figura 34), similar ao que ocorre com as medidas em equilíbrio (figura 30), sugerindo que o processo cinético é compatível com as medidas observadas em equilíbrio. Interessante é notar que, dentro do erro, não ocorre mudanças nas constantes cinéticas (k) de enovelamento em função da concentração do soluto, independentemente do adjuvante empregado (figura 35).

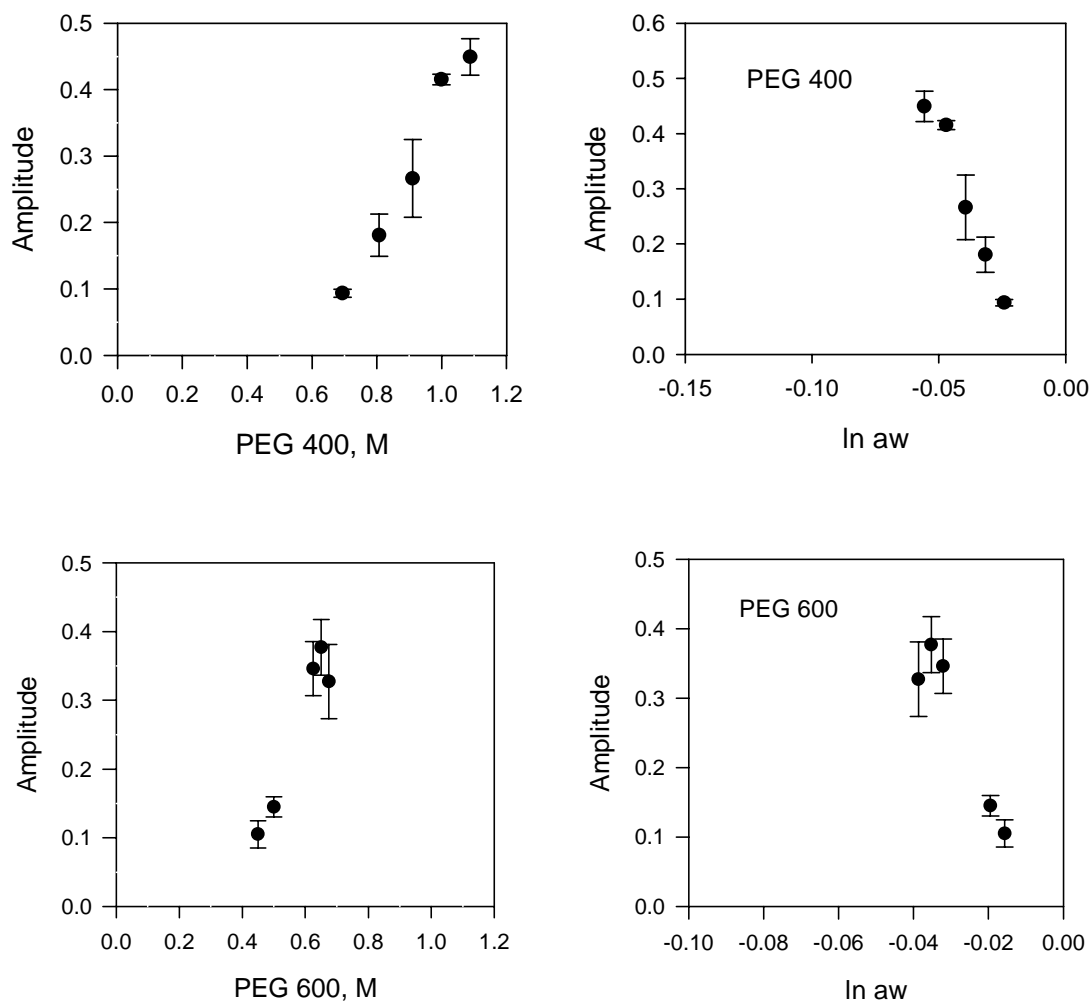


Figura 34 - Medidas cinéticas de envelhecimento da apoMb induzido por PEG 400 e PEG 600 a pH 2,5 a 20°C. Os dados expressam a variação da amplitude de mudança no sinal de fluorescência em função da concentração de soluto. ApoMb foi misturada com diferentes quantidades de PEG 400, rendendo as concentrações de 5 μM de proteína e as concentrações indicadas nos eixos de PEG 400 e 600. Os valores de atividade da água foram calculados como descrito em Materiais e Métodos.

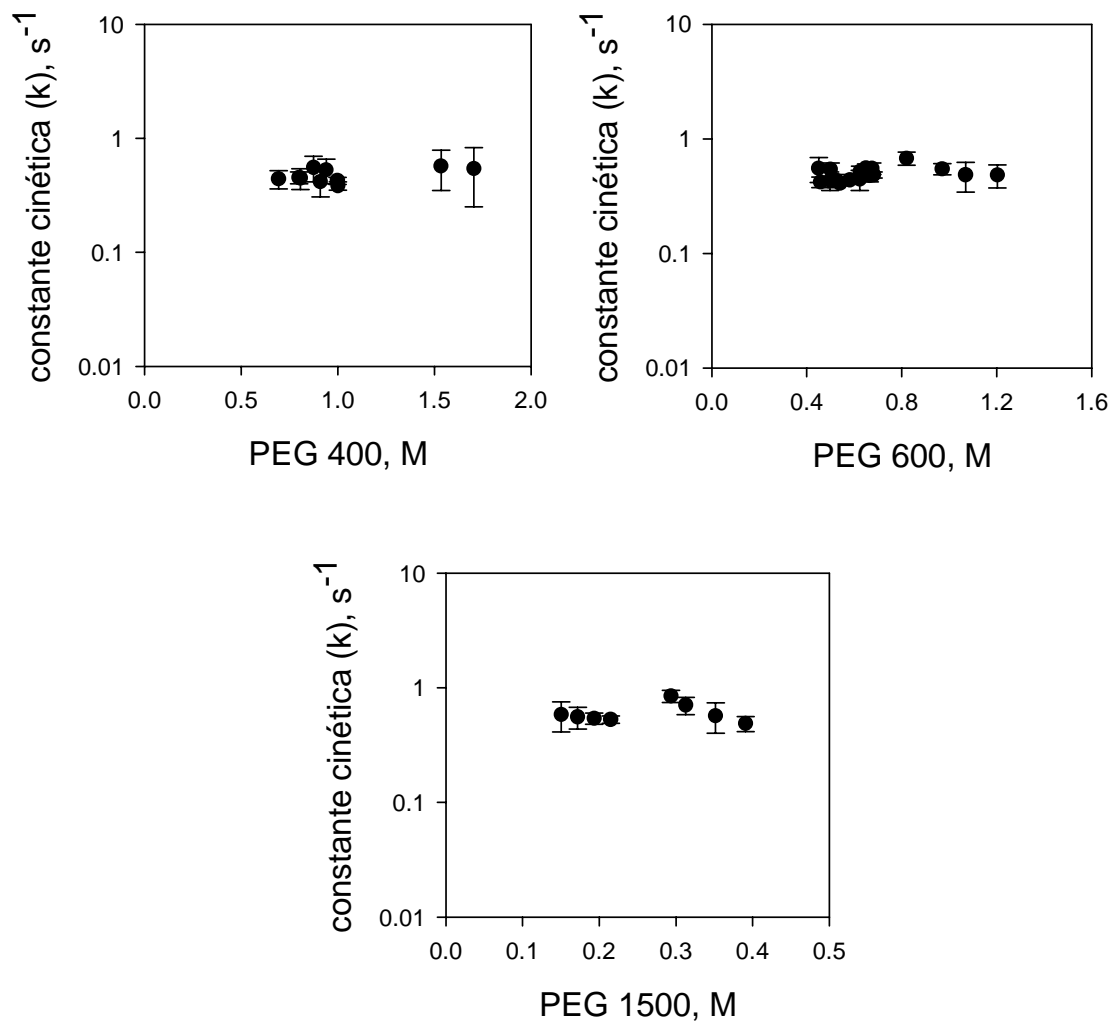


Figura 35 - Medidas cinéticas de envelhecimento da apoMb induzido por soluto a pH 2,5 e temperatura 21°C. ApoMb foi misturada com diferentes quantidades de PEG, rendendo as concentrações de 5 μ M de proteína e as concentrações de PEG indicadas na abscissa.

Para todos os solutos testados o valor da constante cinética encontra-se próximo a 0,5, indicando que a velocidade de transição do estado desenovelado (pH 2,5) para um estado intermediário é a mesma, independentemente do tamanho do soluto empregado e de sua concentração final. Os diferentes solutos podem deslocar a reação $D \Rightarrow I$ para a formação de intermediários estruturalmente distintos, porém, com a mesma velocidade.

As constantes cinéticas foram avaliadas em função da atividade da água, para interpretarmos o resultado não como efeito direto dos PEGs, mas como uma mudança no grau de hidratação da proteína (figura 36). Pode-se observar que a diminuição da atividade da água não alterou significativamente o valor da constante cinética.

Não foi possível trabalhar com concentrações maiores de PEGs porque as soluções formadas eram muito viscosas, o que dificultava o processo de mistura em tempo rápido. O mesmo ocorreu quando se tentou empregar PEGs de tamanhos maiores como o PEG 6K e o PEG 10K. Para algumas concentrações empregadas foi possível observar o aumento de intensidade de fluorescência até alcançar um *plateau*. O valor de constante cinética obtido era similar aos demais PEGs testados, porém não se conseguiu trabalhar em várias concentrações devido à dificuldade de mistura.

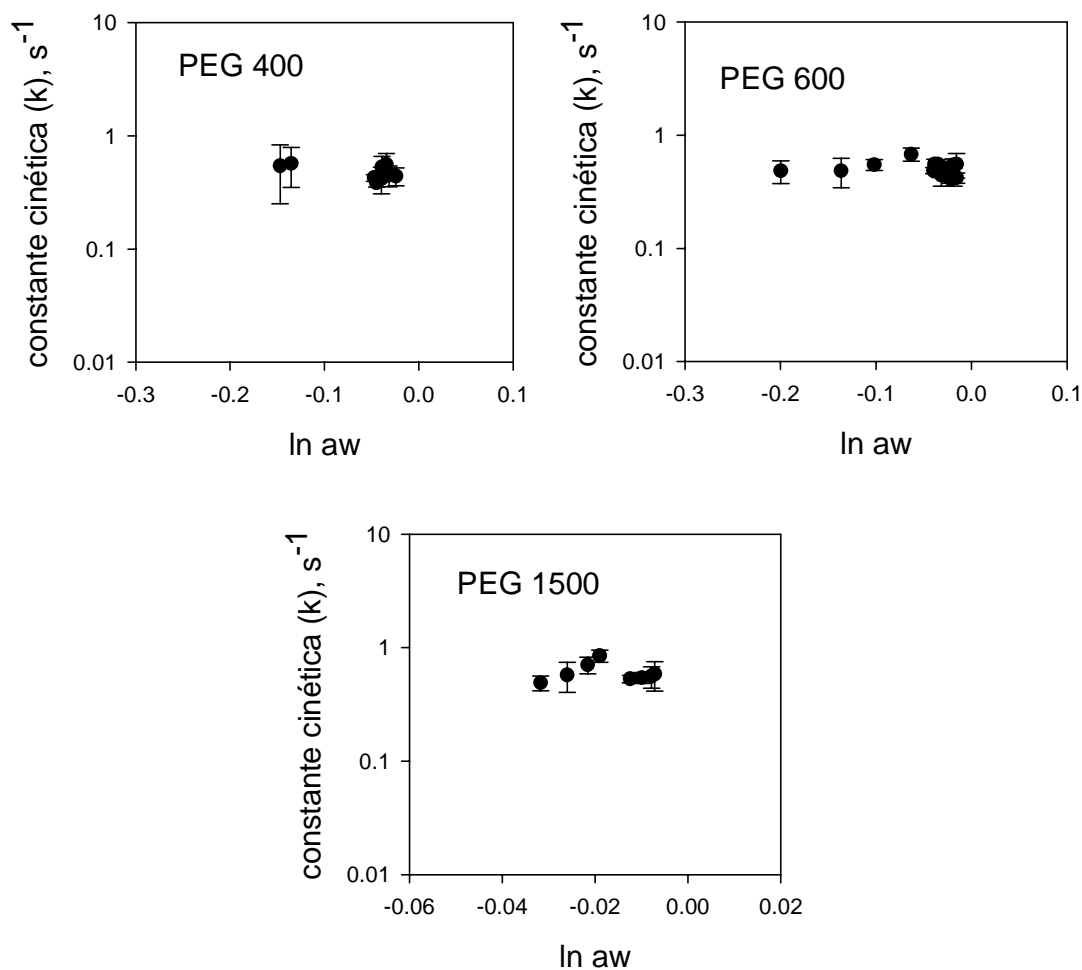


Figura 36 - Medidas cinéticas de envelhecimento da apoMb em função da atividade da água a pH 2,5 a 21°C. ApoMb foi misturada com diferentes quantidades de PEG 400, 600 e 1500 rendendo as concentrações de 5 μ M de proteína e concentrações variadas de solutos. Os valores de atividade da água foram calculados como descrito em Materiais e Métodos.

Desejando também estimar as energias de ativação envolvidas no reenovelamento da apoMb induzido por soluto, realizamos experimentos de cinética por *stopped flow* em temperaturas variando de 30°C a 16°C. Interessantemente vimos, que os valores de constantes cinéticas de reenovelamento não variam em função dessas temperaturas para nenhum dos solutos testados (figura 37).

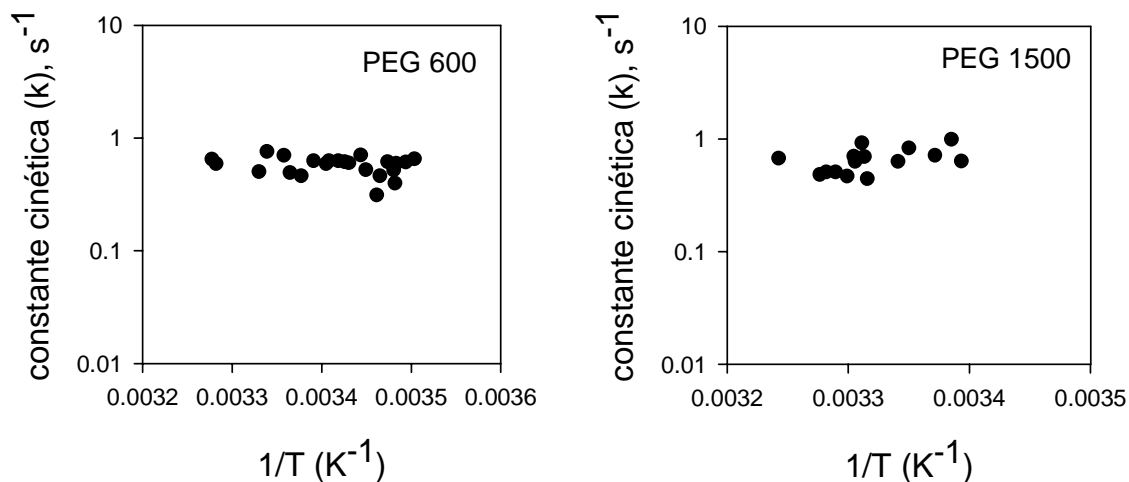


Figura 37 - Medidas da constante cinética de reenovelamento da apoMb (5 μ M) em função da temperatura para os PEGs 600 e 400.

De acordo com a equação de Arrhenius:

$$K = \gamma \exp(-\Delta E^* / RT)$$

a inclinação de um gráfico de $\ln k$ versus $1/RT$ fornece a energia de ativação ΔE^* para a reação sob investigação. Neste caso, para a reação de reenovelamento observamos que a constante cinética k independe da temperatura na faixa explorada, indicando que a energia – entalpia - de ativação neste processo é (próxima de) zero. Isso significa dizer que não existem diferenças energéticas entálpicas significativas entre os estados desenovelado e o ativado. Se agora considerarmos a teoria do estado de transição, podemos estimar a energia livre de Gibbs de ativação, ΔG^* , e a entropia de ativação, ΔS^* , a partir das constantes cinéticas determinadas:

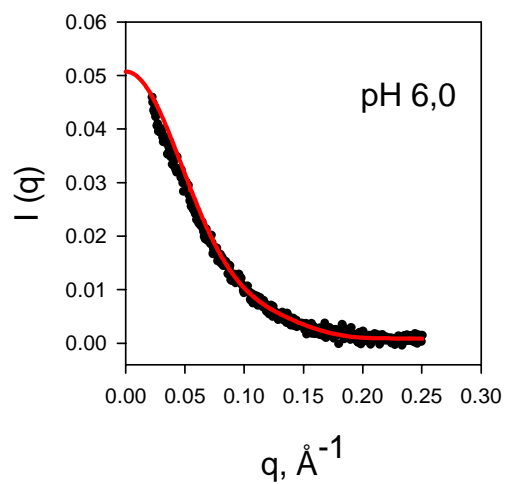
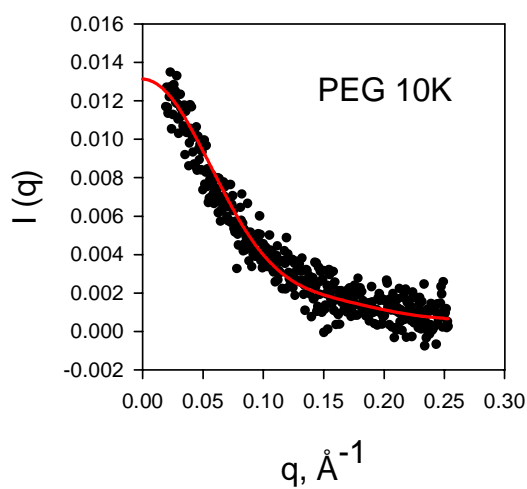
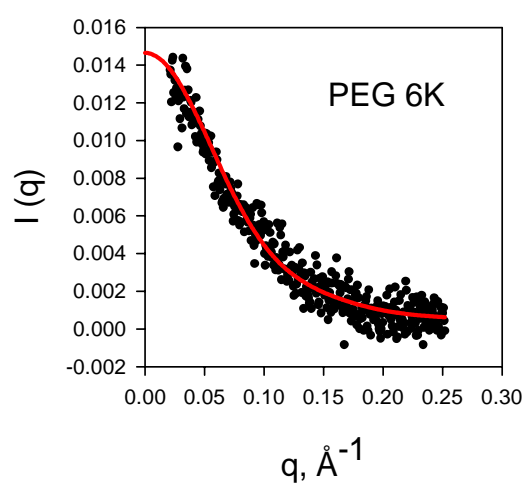
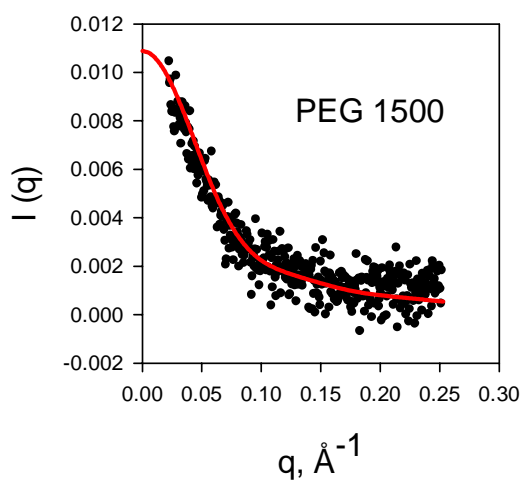
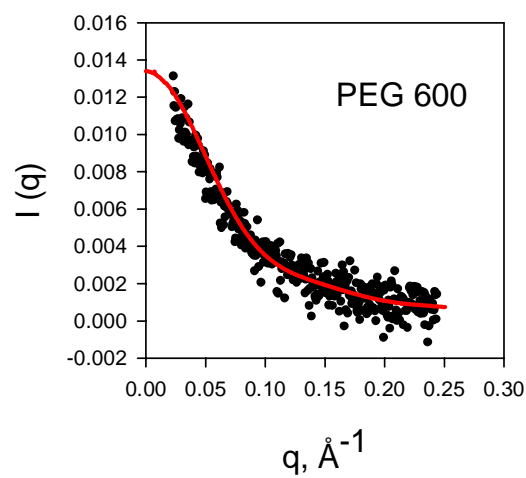
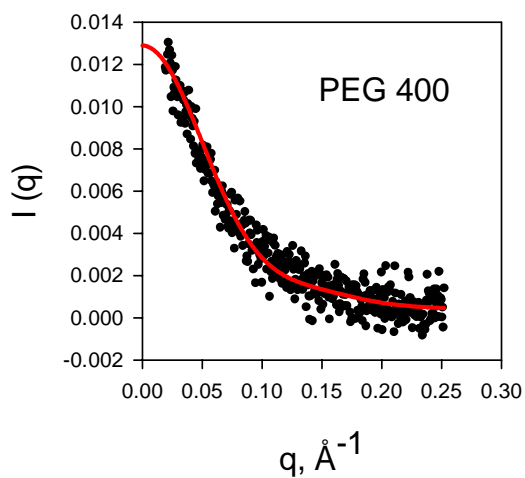
$$K = \gamma \exp(-\Delta E^*/RT) = \gamma \exp(-\Delta H^*/RT) \exp(\Delta S^*/R)$$

Entretanto, diferente de ΔH^* , quantidade que independe do coeficiente pré-exponencial, as quantidades ΔG^* e ΔS^* dependem do coeficiente pré-exponencial γ , valor não bem determinado ainda e que pode variar (BILSEL & MATTHEWS, 2000) entre $6,2 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ conforme formalismo de Eyring (GLASSTONE, LAIDLER & EYRING, 1940) a $3,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, formalismo de Kramers (KRAMERS, 1940). Desta forma, podemos então assumir que a maior contribuição na energia livre de Gibbs de ativação durante o enovelamento cinético é oriunda do termo entrópico de ativação. Outro dado importante é o fato de não haver desvio de linearidade, significando que não há contribuição de termo de capacidade calorífica na reação de reenovelamento. É bem conhecido que mudanças de capacidade calorífica em reações de enovelamento protéicos estão associadas a mudanças no balanço total de hidratação de regiões hidrofóbicas/alifáticas (MAKHATADZE & PRIVALOV, 1995). Sendo assim, este dado indica que regiões apolares que estão acessíveis ao solvente no estado desenovelado ainda continuam expostas à água no estado de transição.

4.5 ESTUDO CONFORMACIONAL DA APOMIOGLOBINA EM DIFERENTES SOLUTOS A PARTIR DA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS (SAXS)

Para compreender melhor o processo de enovelamento da apoMb e qual a influência da adição de PEGs a soluções ácidas contendo a proteína em seu estado desenovelado, empregou-se a técnica de SAXS. A compactação e a forma são duas propriedades críticas que descrevem o grau de enovelamento da proteína. O SAXS é uma técnica efetiva para medir essas propriedades quantitativamente, permitindo a caracterização de estados conformacionais intermediários. (KATAOKA *et al*, 1995).

Na figura 38 está apresentado o perfil de espalhamento de raios X da apoMb em diferentes condições: na presença de PEGs variados em pH 2,5 e na ausência destes, em diferentes valores de pH. Os gráficos apresentam os valores de intensidade em função do vetor de espalhamento (q).



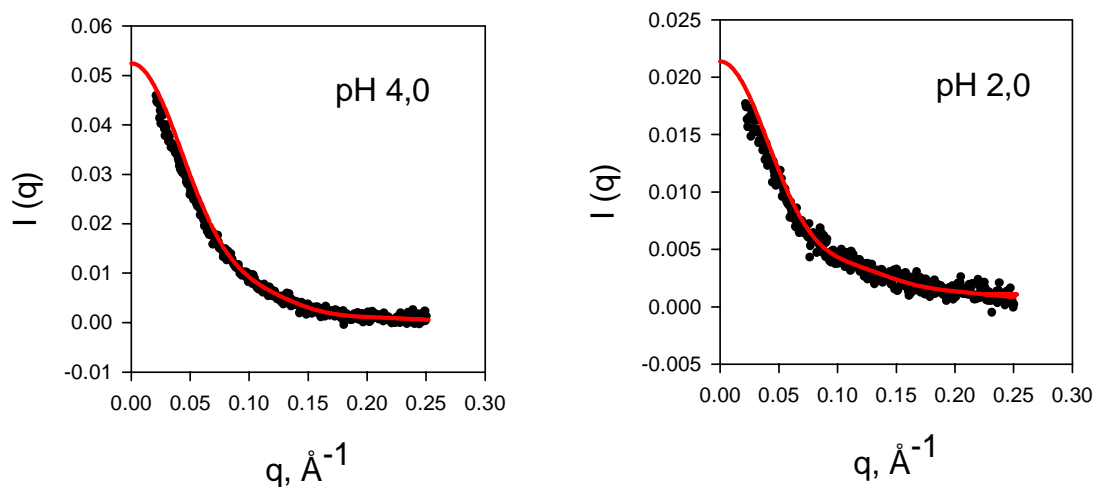


Figura 38 - Perfil de espalhamento de raios X a baixos ângulos. ApoMb (5 mg/mL) foi incubada em meio aquoso a pH 2,5, acidificado com HCl, na ausência ou presença de PEG ou em tampão bistris AcONa como descrito em materiais e métodos.

Chama a atenção o fato das curvas a pH 6,0, 4,0 e 2,0 serem menos dispersas em seu espalhamento do que as curvas obtidas na presença dos PEGs. Isso se deve ao fato da intensidade de espalhamento de uma partícula (macromolécula, proteína neste caso) ser uma função do contraste de densidade eletrônica ($\Delta\rho$) entre a solução-amostra de macromolécula M (ρ_M) e o “branco”, solvente/solução S (ρ_S):

$$\Delta\rho = \rho_M - \rho_S$$

A figura 39 apresenta um esquema ilustrativo da diferença de densidade eletrônica entre a solução amostra e o “branco”.

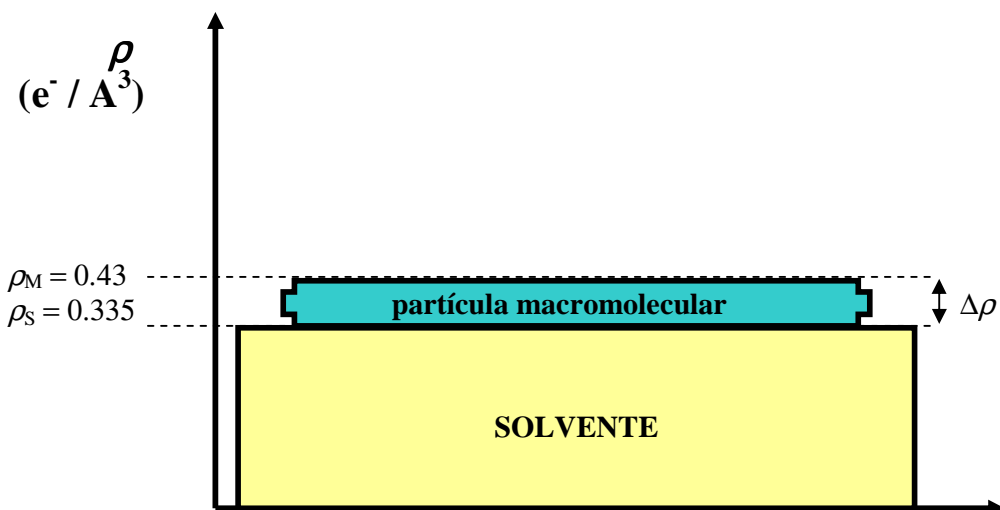


Figura 39 - Esquema ilustrativo da densidade eletrônica ρ de uma partícula imersa em um meio de densidade eletrônica ρ_0 , compondo uma solução-amostra de densidade eletrônica ρ_M . Neste caso aqui apresentado, $\rho_S = 0,335$ corresponde à densidade eletrônica da água (H_2O).

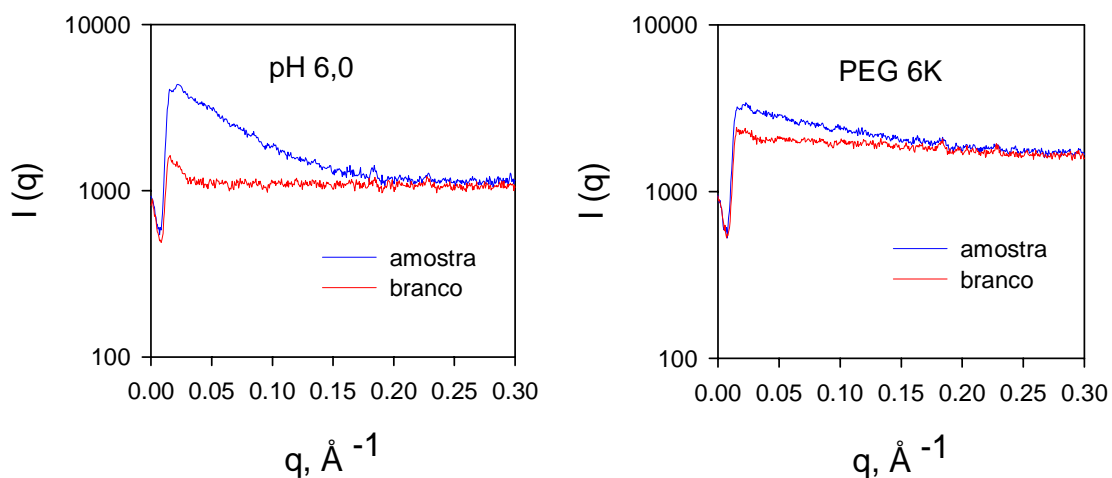


Figura 40 - Dados de espalhamento de raios-X a baixos ângulos corrigidos para intensidade do feixe e atenuação da amostra. No painel A: vermelho - tampão pH 6,0; azul - apoMb em tampão pH 6,0. No painel B: vermelho - PEG 6K; azul - apoMb em PEG 6K.

Ocorre, portanto, que a intensidade de espalhamento da solução contendo apenas os PEGs em água, é muito intensa quando comparada com a intensidade de espalhamento da solução-amostra ou apenas água (figura 40). Desta forma, o sinal de espalhamento da partícula é muito pequeno comparado ao espalhamento total, o que torna o sinal relativamente ruidoso. Desta forma, demos preferência a usar os dados coletados a 5 mg/mL de apoMb visto que obtivemos sinal satisfatório (ainda que um pouco ruidoso) e com comportamento monomérico, sem contaminação por sinal oriundo de agregação / oligomerização.

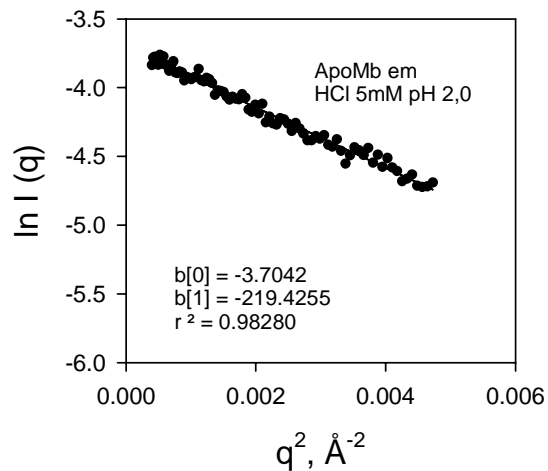
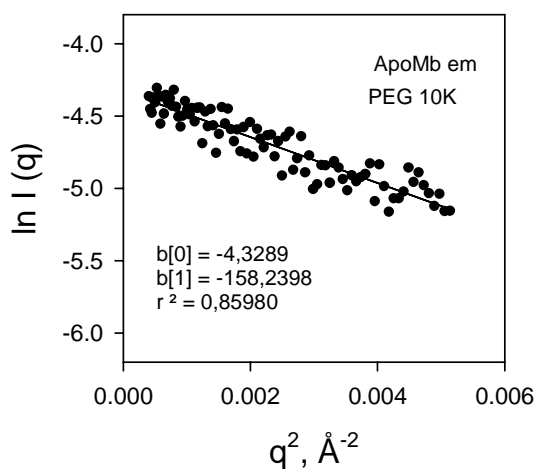
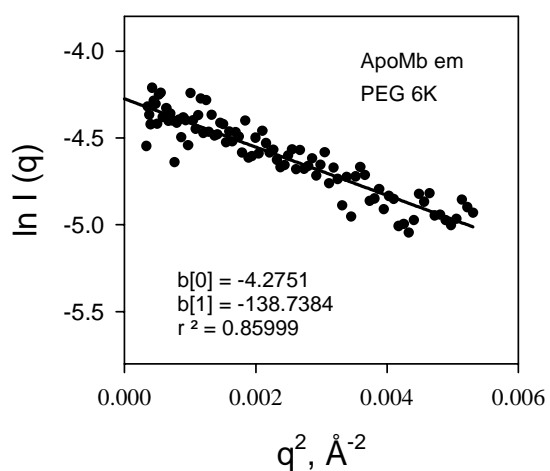
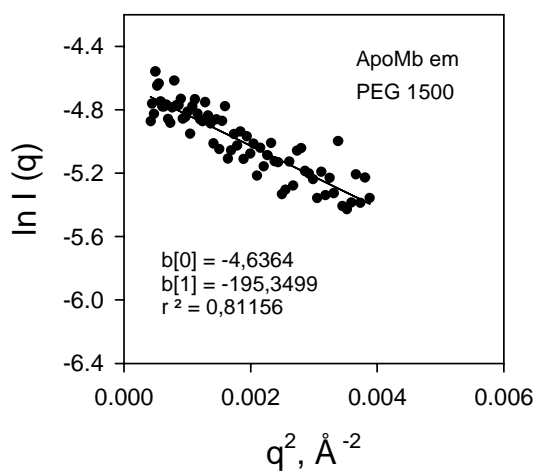
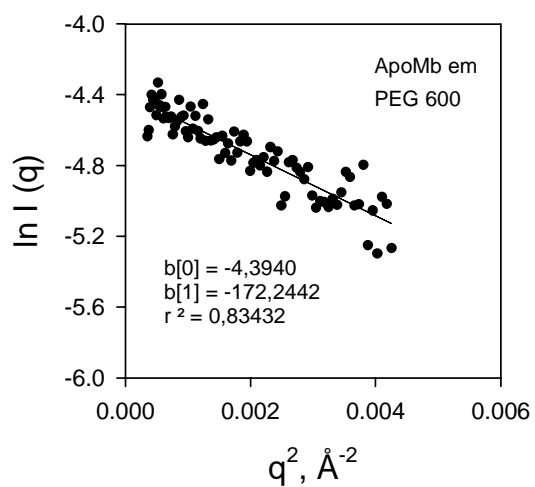
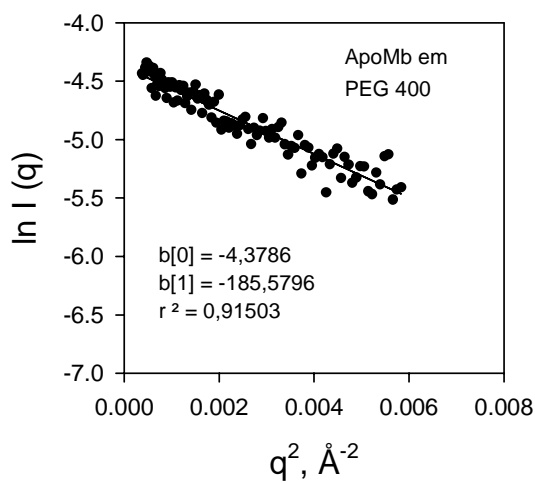
A partir desses dados foram feitos os gráficos de Guinier ($\ln I$ vs q^2) a fim de obter os valores de raio de giro (R_g) da molécula nas diferentes condições testadas. Os resultados estão mostrados na figura 41. O comportamento linear indica que não houve agregação significativa das moléculas e nem interferência interpartícula na região avaliada. Se as amostras estivessem agregadas o gráfico de Guinier mostraria um desvio positivo da linearidade.

A inclinação da reta ($b[1]$) nos fornece o R_g da partícula visto que:

$$\ln(I) = \ln(k) - R_g^2 / 3 \cdot q^2$$

↓ ↓ ↓ ↓

onde: $y = b[0] - b[1] \cdot x$



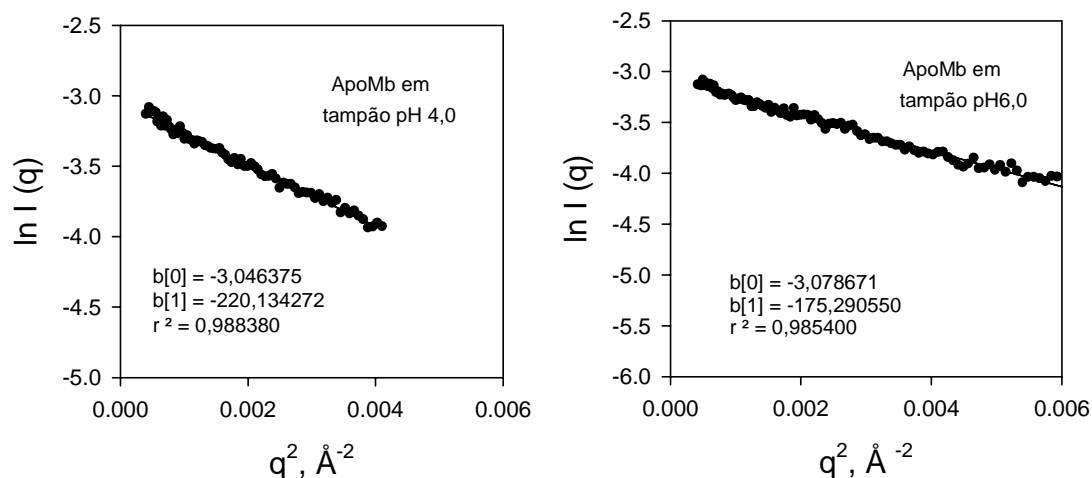


Figura 41 - Gráficos de Guinier das curvas de espalhamento para apoMb 5mg/mL na presença de PEG em pH 2,5, acidificado com HCl 1M; e em tampão bistris AcONa pH 2,5; 4,0 e 6,0. Os símbolos $b[0]$, $b[1]$ e r indicam coeficiente linear, coeficiente angular e coeficiente de linearidade, respectivamente.

O R_g encontrado para a proteína no estado nativo, pH 6,0, através da análise dos dados de Guinier foi 23,13 Å enquanto o valor encontrado para a apoMb em pH 2,0 foi 25,66 Å. O aumento de R_g observado demonstra que a conformação da apoMb difere com a alteração do pH. Essa diferença pode estar relacionada ao grau de hidratação da molécula. Este depende das condições de incubação da proteína: pH e presença de solutos. Os resultados indicaram que em pH ácido, na presença de PEGs, ocorre um decréscimo do R_g quando comparado com o valor encontrado para a proteína em HCl 5 mM. O mesmo é observado quando utilizamos os valores de R_g obtidos pelo programa GNOM. O R_g variou também em função do PEG utilizado.

Os raios de giro foram determinados dentro do limite de confiança ($q_{\text{máx}} \cdot R_g < 1,3$) e encontram-se calculados na tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros estruturais obtidos por SAXS para a apoMb em diferentes condições:

Condição	I(0)	Rg – Guinier (Å)	q máx	Rg – GNOM (Å)	d _{máx} (Å)
PEG 400 0,9 M	0,01292 ± 0,0012	23,59 ± 0,73	0,042	23,13 ± 0,24	69 ± 1
PEG 600 0,63 M	0,01412 ± 0,0003	22,73 ± 1,15	0,043	22,82 ± 0,10	65 ± 1
PEG 1500 0,18 M	0,01084 ± 0,0001	24,19 ± 1,40	0,041	25,83 ± 0,24	75 ± 1
PEG 6K 0,04 M	0,01402 ± 0,0005	20,30 ± 0,85	0,040	18,90 ± 0,12	53 ± 1
PEG 10K 0,017 M	0,01313 ± 0,0008	21,79 ± 0,94	0,046	20,22 ± 0,21	58 ± 1
Tampão pH 6,0	0,05075 ± 0,0002	23,13 ± 0,29	0,043	24,17 ± 0,13	69 ± 1
Tampão pH 4,0	0,05246 ± 0,0002	25,70 ± 0,32	0,039	26,53 ± 0,13	77 ± 1
HCl 5mM pH 2,0	0,02136 ± 0,0001	25,66 ± 0,37	0,039	27,34 ± 0,19	78 ± 1

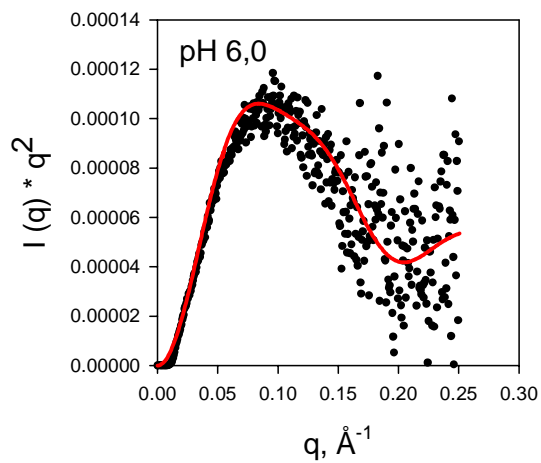
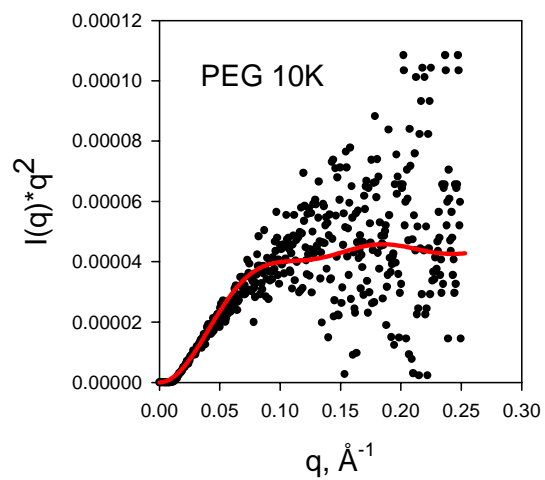
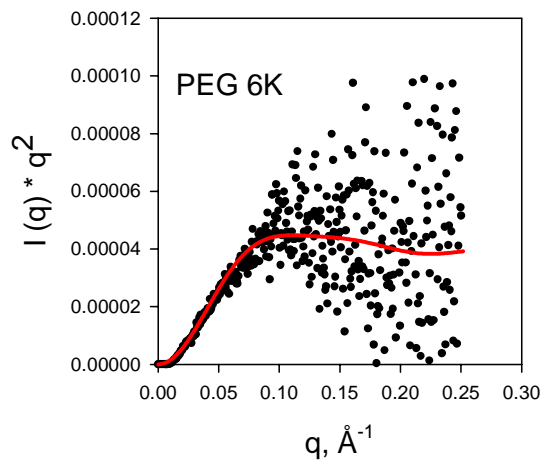
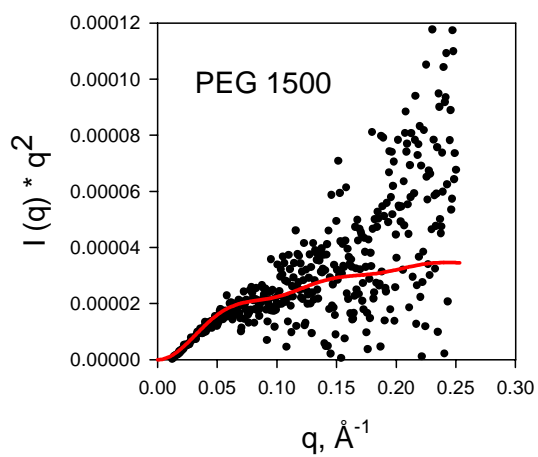
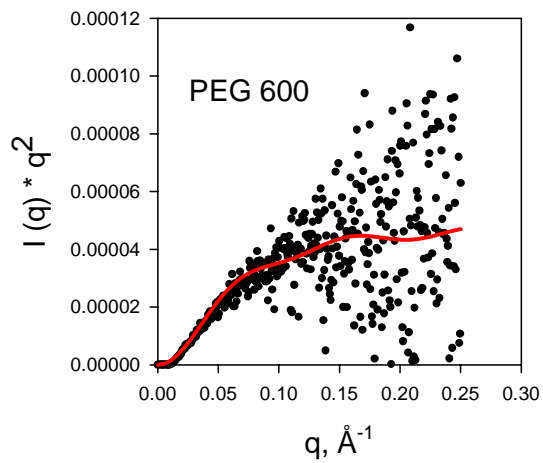
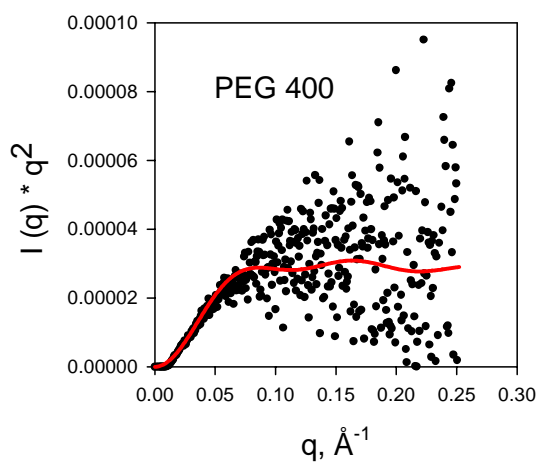
Os estudos realizados com a lisozima demonstraram que na presença de PEG a proteína não tem sua conformação alterada significativamente mesmo na presença de ácido (dados não apresentados).

Realizamos medidas a uma concentração mais elevada dos PEGs num outro turno de uso da linha D11-SAS do LNLS em Setembro de 2005. Porém, esses dados não puderam ser utilizados em cálculos de parâmetros estruturais por apresentarem forte sinal de espalhamento oriundo de grandes agregados protéicos formados na mistura de apoMb com os PEGs a pH 2,5 mesmo após 30 minutos de centrifugação a 13000 RPM à 4°C. Tanto antes, quanto após esse passo de centrifugação, a solução se apresenta completamente límpida tanto por inspeção visual a olho nu quanto em aumento de 120 vezes, tanto a 5 mg/mL quanto a 25 mg/mL de proteína (dado não mostrado).

As medidas de SAXS são bastante úteis para avaliar não apenas parâmetros de formas e dimensões médias, mas também das propriedades dinâmicas em solução (o que não é redundante, porque mesmo estruturas cristalográficas de macromoléculas, ou seja, estado sólido, podem dar informações de dinâmica). A função de Kratky (GLATTER & KRATKY, 1982; SEMISOTNOV *et al.*, 1996; BOTELHO *et al.*, 2003; TIROLI, *et al.*, 2005) demonstra que um gráfico ($Iq^2 \times q$) deverá apresentar um perfil sinoidal para proteínas compactas e pouco flexíveis, que apresentem uma interface bem definida entre si e a solução, com dependência acentuada de Iq^2 com q , atingindo um máximo em torno de 0,07 Å seguido de decréscimo. Por outro lado, proteínas completamente randômicas atingirão um *plateau* seguido por um aumento monotônico a altos ângulos de espalhamento (valores de q). Por outro lado, partículas (macromoléculas) compactas que apresentem domínios flexíveis terão um gráfico de Kratky com valores de Iq^2 estáveis após atingirem um *plateau* ao longo do vetor de espalhamento q .

A figura 42 mostra o gráfico de Kratky para a apoMb nas diferentes condições testadas. A curva da apoMb em pH 2,0 não mostra um pico bem definido - indicativo de um estado de elevada dinâmica conformacional – ao contrário do resultado observado para a apoMb em pH 4 e 6, que se apresentam como glóbulos de interfaces mais bem definidas.

Observando os resultados obtidos com a apoMb em presença de PEGs, pode-se afirmar que em PEG 6K a proteína apresentou maior estado compactado quando comparado com os demais, visto pelo menor raio de giro apresentado, ainda que com grande flexibilidade como evidenciado pelo gráfico de Kratky (figura 42).



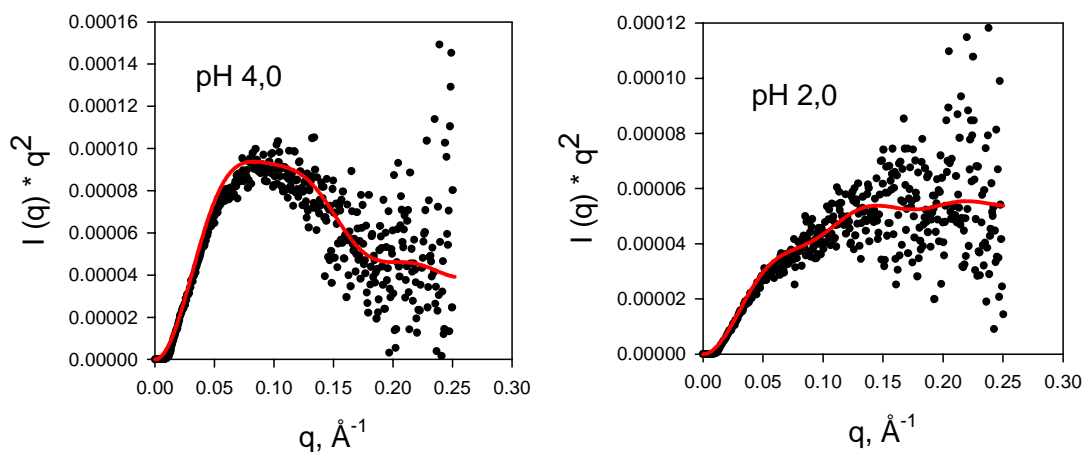


Figura 42 - Gráfico de Kratky a partir das curvas de espalhamento para apoMb em diferentes condições.

Para melhor comparação dos resultados, as curvas de Kratky foram reunidas em um só gráfico (figura 43) demonstrando que a apoMb mesmo na presença de PEGs não apresenta a mesma configuração globular que a apresentada pela proteína nativa e em pH 4,0.

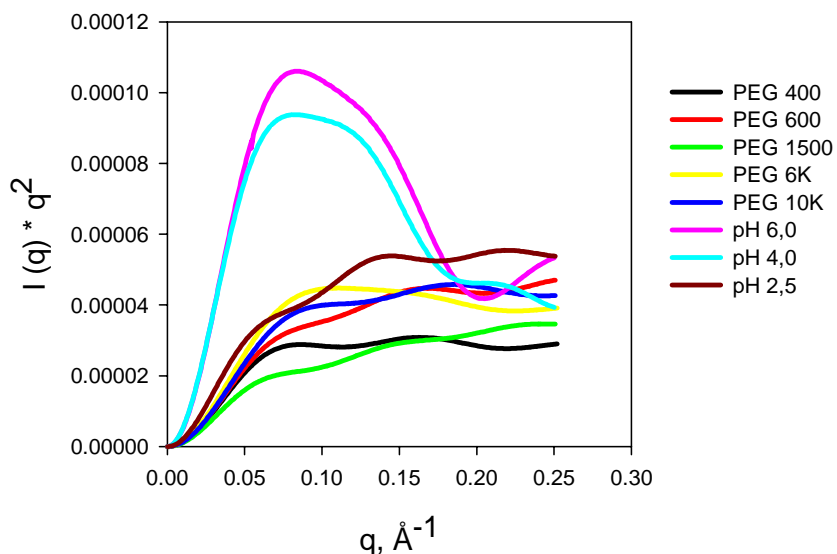


Figura 43 - Gráfico de Kratky para as amostras de apoMb em diferentes meios.

Para obter mais informações partiu-se para a análise da função de distribuição de distâncias, $P(r)$, que pode ser obtida através da transformada de Fourier da função de intensidade. A $P(r)$ permite-nos observar a conformação adquirida pela proteína em diferentes condições a fim de caracterizar os diferentes estágios de enovelamento. De acordo com os dados da figura 45 vemos diferentes perfis de $P(r)$ para a apoMb em diferentes meios. Isso indica que a proteína se apresenta em diferentes conformações de acordo com o meio em que se encontra. Pode estar numa forma mais ou menos compactada ainda que não se observe diferença significativa nos valores de $d_{\text{máx}}$. A $d_{\text{máx}}$ é o ponto onde a função $P(r)$ é zero.

Para verificar os valores mais adequados de $d_{\text{máx}}$ antes de avaliar a $P(r)$, construiu-se o gráfico do total estimado, um parâmetro estatístico obtido pelo programa GNOM *versus* $d_{\text{máx}}$ (figura 44). O ponto máximo da ordenada corresponde à dimensão máxima da partícula. Trabalha-se com o valor mais alto, pois é o ponto onde o dado experimental está mais próximo do ajuste fornecido pelo programa.

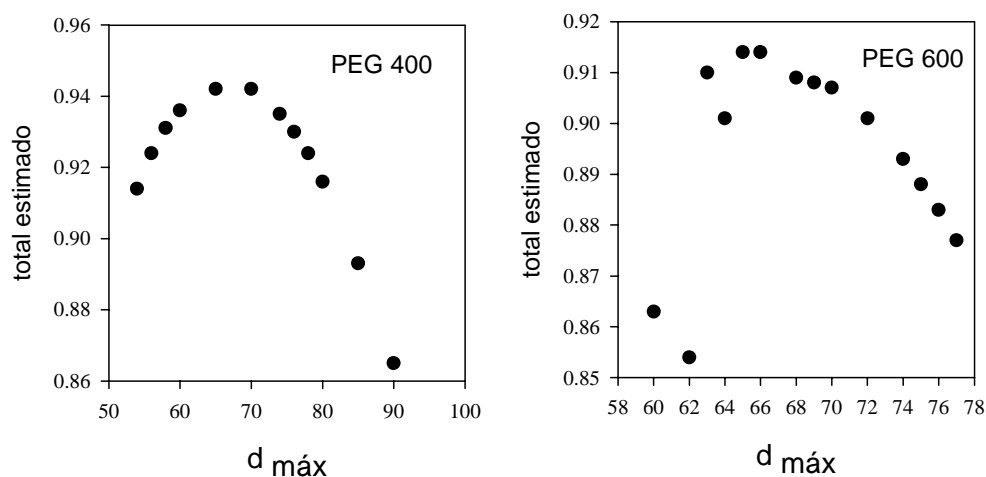
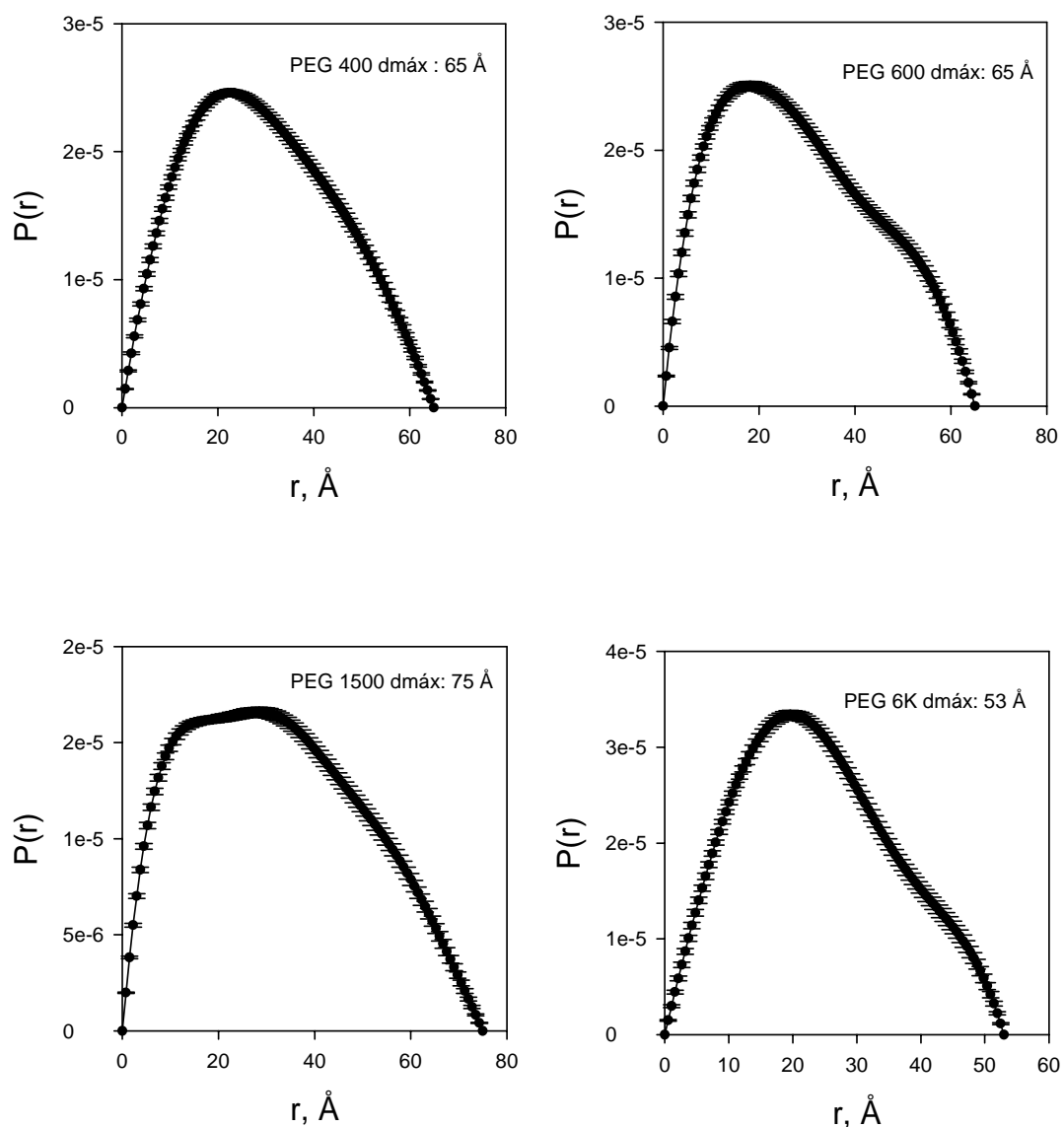


Figura 44 - Gráfico do total estimado em função da distância máxima para algumas condições testadas.

Observou-se que a dimensão máxima da proteína aumenta com o decréscimo do pH indicando o desenovelamento. Na presença de PEGs a menor $d_{\text{máx}}$ foi observada com a adição de PEG 6K. O valor de raio de giro obtido para esta condição através da $P(r)$ foi 18,90 Å, resultado muito semelhante ao descrito na literatura por Kataoka e colaboradores (1995) para o estado nativo da apoMb ($19,7 \pm 0,6$ Å).



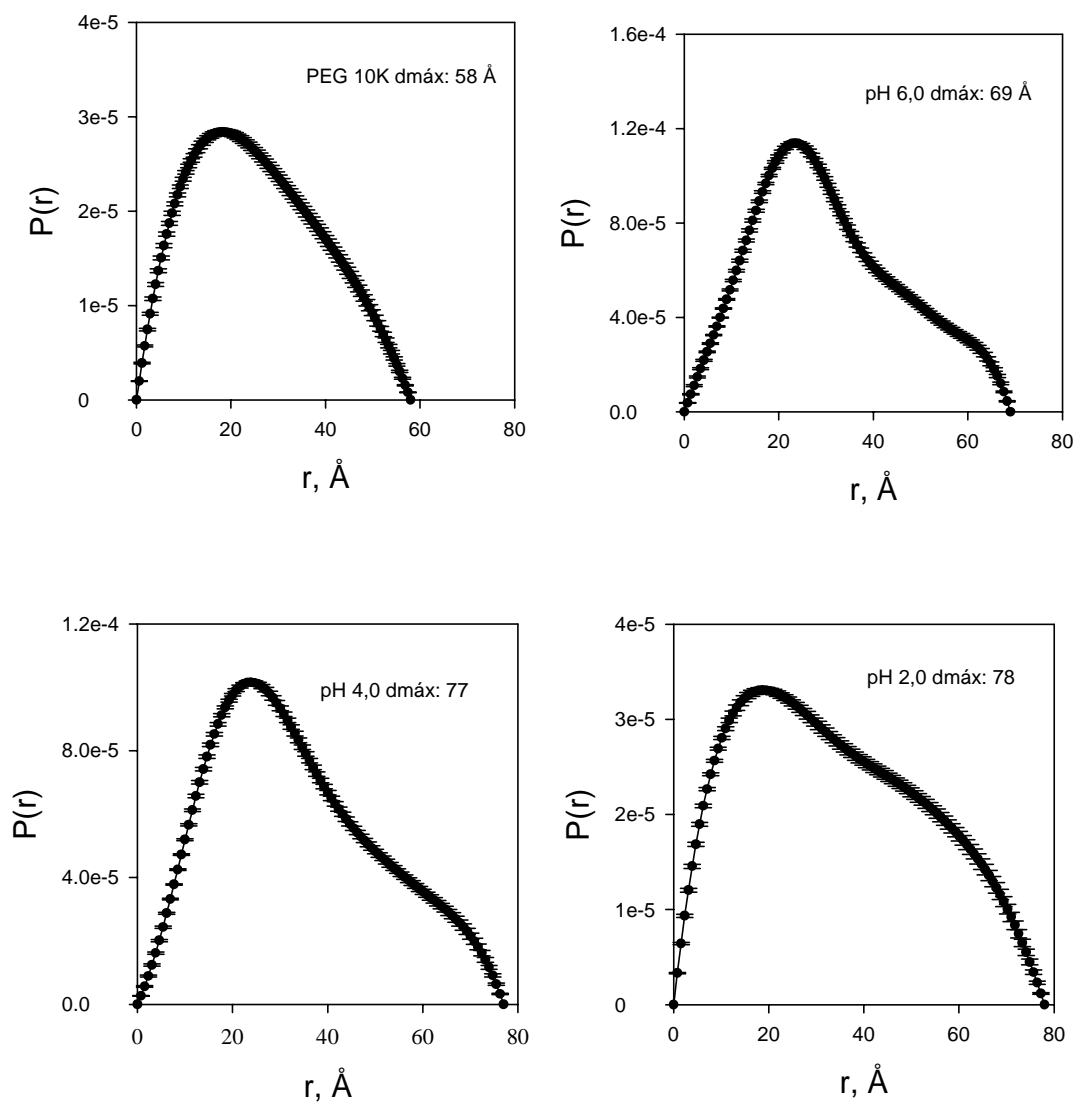


Figura 45 - Função de distribuição de pares de distância. ApoMb 5mg/mL na presença de PEGs em pH 2,5, em HCl 1M, pH 2,0 e em tampão bistris AcONa pH 4,0 e 6,0. As funções $P(r)$ foram obtidas a partir dos dados mostrados na figura 40.

Os resultados obtidos por SAXS corroboram com os dados obtidos em equilíbrio. Com estes, verificamos primeiramente que o uso de concentrações e tamanhos elevados de PEG leva à obtenção um estado conformacional com o menor número de moléculas de água na superfície e, portanto, mais enovelado e compactado. O mesmo foi observado por SAXS: o emprego de PEG 6K e 10K acarretou na diminuição do R_g da proteína quando comparado com o R_g encontrado para solutos de tamanho menor.

Desta forma, vimos que a presença de co-solutos hidrofílicos preferencialmente excluídos da superfície de proteínas, tais como os glicóis e glicosídeos aqui empregados, são capazes de estabilizar um estado enovelado protéico frente à perturbação química (aumento do potencial hidrogeniônico), estado este de dimensões comparáveis ao da proteína enovelada, com estrutura secundária similar ao do intermediário de enovelamento de pH 4,0, mas que apresenta dinâmica conformacional. Esse estado estabilizado por co-solutos tem a cinética de enovelamento independente da concentração e tamanho dos solutos, indicando que se a reação é em apenas dois estados, a estabilidade do estado enovelado em equilíbrio é determinada pelo passo cinético de desenovelamento. Este estado estabilizado por co-solutos tem também a cinética de enovelamento independente da temperatura, o que significa que a entalpia de ativação para a reação $D \rightleftharpoons ET$ (sendo ET o estado de transição) é próxima de zero, indicando que a energia entálpica do estado desenovelado é similar ao do estado de transição e, portanto esses dois estados conformacionais são muito próximos entre si. A maior barreira energética que impede o desenovelamento da apoMb é, portanto, o custo entálpico e de hidratação do passo enovelado \rightarrow estado de transição.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho investigou a ação de adjuvantes de enovelamento, procurando elucidar o mecanismo pelo qual estes atuam, estabilizando a estrutura protéica. Diversos pesquisadores têm estudado os processos de enovelamento-desenovelamento de macromoléculas e muito se tem especulado a respeito. Os resultados aqui apresentados trazem novas descobertas para a área. Para tal, empregamos uma proteína bastante estudada há alguns anos, a apomioglobina (apoMb). Esta proteína enovela-se em equilíbrio e cineticamente em três estados, nativa a pH 7,0 e desenovelada a pH 2,5, mas com intermediários de enovelamento na faixa de pH entre 4 e 5.

Para entender o mecanismo de ação desses compostos sobre proteínas – neste caso a apoMb - primeiramente avaliamos a energética e volumetria de transição entre esses três estados conformacionais, empregando para isso alta pressão hidrostática, temperatura e pH como variáveis físicas e química de perturbação. Altas pressões promovem a desestabilização da estrutura nativa (pH 7,0) favorecendo a formação de um estado conformacional equivalente ao intermediário de enovelamento em equilíbrio a pH 4,0 (I), assim como promove o desenovelamento de I (pH 4,0). A diminuição de temperatura acompanhada de perturbação por pressão provoca perda de estabilidade para as transições: $N \rightleftharpoons I$ (pH 7,0) e $I \rightleftharpoons D$ (pH 4,0). A constante de equilíbrio da transição induzida por pressão de $I \rightleftharpoons D$ (pH 4,0) independe da temperatura. Porém existe uma dependência linear para o equilíbrio entre os estados $N \rightleftharpoons I$ (pH 7,0). O valor da entalpia de Van't Hoff de desenovelamento para o estado intermediário (I), obtido por perturbação por pressão, é zero, não havendo então contribuição entálpica para

manutenção de sua estrutura. A entalpia assim como a entropia conformacional do desenovelamento é compensada pelo aumento da hidratação protéica. A transição entre I e D obtida por perturbação por pressão é somente determinada por variação de volume.

Empregando-se a técnica de calorimetria acoplada a perturbação por pulsos de pressão (CPP), observamos que o processo de desenovelamento induzido por aquecimento, em valores de pH 2,5, 4,0 e 7,0 não envolve variação de volume detectável. Em adição, observamos que a expansividade térmica observada para os diferentes estados da apoMb está relacionada com a capacidade de estruturação / desestruturação de moléculas de águas ao redor da estrutura protéica.

Uma vez entendida a energética e volumetria envolvida nessas transições, exploramos a modulação das transições entre os estados conformacionais I e D cineticamente e em equilíbrio. A presença de solutos estabiliza o estado intermediário da apoMb mesmo à pH 2,5. Esse efeito é aumentado à medida que se aumenta o tamanho do soluto e a concentração do mesmo. Entretanto, solutos de massa molecular superior a 6000Da tendem a estabilizar estados conformacionais de mesmo grau de hidratação. Todas essas medidas espectroscópicas foram corroboradas pelos ensaios de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), revelando que os valores de R_g para a proteína a pH 2,5 decrescem à medida que o tamanho do soluto empregado aumenta, sendo o mesmo efeito observado para os valores de $D_{máx}$, igualando-se os valores do estado intermediário a pH 4,0 na ausência de cosolutos.

Por fim, medidas de cinética rápida de reenovelamento monitoradas por fluorescência revelaram que nem o tamanho nem a concentração de soluto

empregada não influencia a velocidade de transição $D \rightarrow I$, sugerindo então que a estabilidade do intermediário de enovelamento em equilíbrio I é então determinada pela reação de transição $I \rightarrow D$, regida exclusivamente por variação de volume com contribuições entálpica e entrópica nulas ou desprezíveis.

Nossos esforços aqui apresentados no sentido do entendimento do mecanismo de ação de solutos sobre estruturas protéicas vai além da compreensão das forças envolvidas no enovelamento, visando também à melhoria da eficácia de agentes terapêuticos protéicos e demais sistemas macromoleculares.

REFERÊNCIAS

ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN, L. V. Farmacotécnica – Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 6 ed. Editorial Premier, São Paulo, 2002, p. 2.

ASCOLI, F., FANELLI, M. R., R. ANTONINI, E. Preparation and properties of apohemoglobin and reconstituted hemoglobins. **Methods in Enzimology**, v. 76, p. 72-78, 1981.

AULTON, M. E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2 ed. Editora: Artmed, Porto Alegre, 2005, p. 261.

BARRICK, D., BALDWIN, R. Three state analysis of sperm whale apomyoglobin folding. **Biochemistry**, v. 32, p. 3790-3796, 1993.

BILSEL, O., MATTHEWS, C. R. Barriers in protein folding reactions. **Advances in Protein Chemistry**, v. 53, p. 153-207, 2000.

BISMUTO, E. SIRANGELO, I., IRACE, G. GRATTON, E. Pressure-induced perturbation of apomyoglobin structure: fluorescence studies on native and acidic compact forms, **Biochemistry**, v. 35, p. 1173-1178, 1996.

BONDOS, S. E., SLIGAR, S., JONAS, J. High pressure denaturation of apomyoglobin. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1480, p. 353-364, 2000.

BOTELHO, M. G., GRALLE, M., OLIVEIRA, C. L. P., TORRIANI, I., FERREIRA, S. Folding and stability of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 34259-34267, 2003.

BRIDGMAN, P. W. The coagulation of albumen by pressure. **Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences**, xlix, p. 627-628, 1914.

COCCO, M. KAO, Y. H., PHILLIPS, A. T., LECOMTE, J. T. Structural comparison of apomyoglobin and metaquomyoglobin: pH titration of histidines by NMR spectroscopy. **Biochemistry**, v. 31, p. 6481-6491, 1992.

COLLINS, M. D., HUMMER, G., QUILLIN, M. L. MATHEWS, B. W., GRUNER, S. M. Cooperative water filling of a nonpolar protein cavity observed by high-pressure crystallography and simulation. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 102(46), p. 16668-16671, 2005.

COOPER, A., JOHNSON, C. M., LAKEY J, H., NOLLMANN, M. Heat does not come in different colours: entropy-enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. **Biophysical Chemistry**, v. 2-3, p. 215-30, 2001.

DOLGIKH, D. A., GILMANSHIN, R. I., BRAZHNIKOV, E. V., BYCHKOVA, V. E., SEMISOTONOV, G. V., VENYAMINOV, S. Y., PTITSYN, O. B. Alpha-lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? **FEBS Letters**, v. 136, p. 311-315, 1981.

DOLGIKH, D. A., ABATUROV, L. V., BOLOTINA, I. A., BRAZHNIKOV, E. V., BYCHKOVA, V. E., GILMANSHIN, R. I. LEBEDEV, Y. O., SEMISOTONOV, G. V., TIKTOPULO, E. I., PTITSYN, O. B. Compact state of a protein molecule with pronounced small-scale mobility: bovine alpha-lactalbumin. **European Biophysics Journal**, vol 13, p. 109-121, 1985.

ELIEZER, D., WRIGHT, P. Is apomyoglobin a molten globule? Structural characterization by NMR, **Journal of Molecular Biology**, v. 263, p. 531, 1996.

ELIEZER, D. JENNINGS, P. A., DYSON, H. J., WRIGHT, P. E. Populating the equilibrium molten globule state of apomyoglobin under conditions suitable for characterization by NMR. **FEBS Letters**, v. 417, p. 92, 1997.

FÁGAIN, C. O. Understanding and increasing protein stability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1252, p. 1-14, 1995.

GAST, K., DAMASCHUM H., MISSELWITZ, R., MULLER-FROHNE, M., ZIRWER, D., DAMASCHUM, G. Compactness of protein molten globules: Temperature-induced structural changes of apomyoglobin folding intermediate. **European Biophysics Journal**, v. 23, p. 297, 1994.

GLASSTONE, S., LAIDLER, K. J., EYRING, H. Theory of rate process, Mc Graw Hill, New York, 1940.

GLATTER, O., KRATKY, O. Small Angle X-ray Scattering. Academic Press, New York, 1982.

GRIKO Y. V., PRIVALOV P. L., VENYAMINOV S. Y., KUTYSHENKO V. P. Thermodynamic study of the apomyoglobin structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 202, p. 127-138, 1988.

HARRISON, S. C., BLOUT, E. R. Reversible conformational changes of myoglobin and apomyoglobin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 240, p.299-303,1965.

HEREMANS, K., SMELLER, L. Protein structure and dynamics at high pressure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1386, p. 353-370, 1998.

HILL, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on the dissociation curves. **Journal of Physiology** (London), v. 40: iv-vii, 1910.

HUGHSON F.M., WRIGHT, P. E.; BALDWIN, R. L., Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate. **Science**, v. 249, p. 1544-1548, 1990.

HUMMER, G., GARDE, S., GARCIA, A. E. PAULATIS, M. E., PRATT, L. R. The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 95(4), p. 1552-1555, 1998.

JAMIN, M., BALDWIN, R. Refolding and unfolding kinetics of the equilibrium folding intermediate of apomyoglobin. **Nature Structural Biology**, v. 3, p. 613-618, 1996.

JAMIN, M., BALDWIN, R. Two forms of the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, p. 613-618, 1998.

JAMIN, M., ANTALIK, M., LOH, S.N., BOLEN, D. W., BALDWIN, R. L. The unfolding enthalpy of the pH 4 molten globule of apomyoglobin measured by isothermal titration calorimetry. **Protein Science**, v. 7, p.1340-1346, 2000.

JENNINGS, P.A. , WRIGHT, P. E. Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. **Science**, v. 262, p. 892-896, 1993.

KAMATARI, Y. O. KITAHARA, R., YAMADA, H. YOKOYAMA, S., AKASAKA, K.. High-pressure NMR spectroscopy for characterizing folding intermediates and denatured states of proteins. **Methods**, v. 34, p. 133-143, 2004.

KAMEI, T.; OBATAKE, M.; SUZUKI, M. Hydration of apomyoglobin in native, molten globule, and unfolded states by using microwave dielectric spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 82, p. 418-425, 2002.

KAMIYAMA, T., SADAHIDE, Y., NOGUSA, Y., GEKKO, K. Polyol-induced molten globule of cytochrome c: na evidence for stabilization by hydrofobic interaction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1434 p. 44-57, 1999.

KATAOKA, M., HAGIHARA, Y., MIHARA, K., GOTO, Y. Molten globule of citocrome c studied by the small angle X-ray scattering. **Journal of Molecular Biology**, v. 229, p. 591-596, 1993.

KATAOKA, M., NISHII, I., FUJISAWA, T. UEKI, F. T., GOTO, Y. Structural characterization of the molten globule and native states of apomyoglobin by solution X-ray scattering. **Journal of Molecular Biology**, v. 249, p. 215-228, 1995.

KAUZMANN, W. Thermodynamics of unfolding. **Nature**, v. 325, p. 763-764, 1987.

KAY, M. S., BALDWIN, R. L. Packing interactions in the apomyoglobin folding intermediate. *Nature Structure Biology*, v. 3, p. 439-445, 1996.

KITAMURA, Y., TETSUROH, I. Reaction volume of protonic ionization for buffering agents. Prediction of pressure dependence of pH anh pOH. **Journal of Solution Chemistry**, v. 16, p. 715-725, 1987.

KONNO, T., TANAKA, N., KATAOKA, M., TAKANO, E. MAKI, M. A circular dichroism study of preferential hydration and alcohol effects on a denatured protein, pig calpastatin domain I. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1342, p. 73-82, 1997.

KRAMERS, H. A. Brownian motion in a field of force and the diffusional model of chemical reactions, **Physica**, v. 7, p. 284-304, 1940.

KUMAR, T. K.; YU, C. Monitoring protein folding at atomic resolution. **Accounts of Chemical Research**., v. 37, p. 929-936, 2004.

LACKOWICZ, J. R., Principles of Fluorescence spectroscopy, Plenum Press, 2 ed. New York, USA., 1999.

LIN, L. N., BRANDTS, J. F., BRANDTS, J. M., PLOTNIKOV, V. Determination of the volumetric properties and other solutes using pressure perturbation calorimetry. **Analytical Biochemistry**, v. 302, p. 144-160, 2002.

LIU, Y., BOLEN, D. W. The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. **Biochemistry**, v. 34, p. 12884-12891, 1995.

LOH, S. N., KAY, M., BALDWIN, R. Structure and stability of a second molten globule intermediate in the apomyoglobin folding pathway. **Biochemistry**, v.92, p. 5446-5450, 1995.

MACGREGOR, R. B., WEBER, G. Estimation of the polarity of the protein interior by optical spectroscopy. **Nature**, v. 319, p. 70-73, 1986.

MAKHATADZE, G. I., PRIVALOV, P. L. Energetics of protein structure, **Advances in Protein Chemistry**, v. 47, p. 307-425, 1995.

MARÃO, S. R. Sobre o efeito de hidratação e volume excluído no enovelamento da apo-mioglobina na presença de osmólitos. 2000. 125f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP, São Paulo, 2000.

MOHANA-BORGES R., SILVA J. L., RUIZ-SANZ J., DE PRAT-GAY G. Folding of a pressure-denatured model protein. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 14, p. 7888-7893, 1999.

MOHANA-BORGES R., GOTO N. K., KROON G. J., DYSON H.J., WRIGHT P. E. Structural characterization of unfolded states of apomyoglobin using residual dipolar couplings. **Journal of Molecular Biology**, v. 5, p. 1131-1142, 2004.

NELSON, D. L., COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3 ed. New York: Worth Publishers, 2000. p. 170-200.

OLIVEIRA, C. L. P. Estudo de espalhamento de raios x a baixos ângulos por sistemas biológicos: teoria e aplicações. Dissertação (Doutorado) – Instituto de Física, Universidade de Campinas, UNICAMP, São Paulo, 2002.

PALADINI, A. A., WEBER, G. Pressure-induced reversible dissociation of enolase. **Biochemistry**, v. 20, p. 2587-2593, 1981.

PARSEGHIAN, V., RAND, R. P., COLOMBO, M. F., RAU, D. C. Water at the Macromolecular Surface: Solvation energy and functional control. **Biomembrane Electrochemistry**, v. 235, p. 177-196, 1994.

PTITSYN, O. B. The molten globule state. **In Protein Folding**. Thomas E. Creighton Editor. W. H. Freeman and Company, New York. cap. 6, p. 243-300, 1992.

RAVINDRA, R. ZHAO, S., GIES, H., WINTER, R. Protein encapsulation in mesoporous silicate: the effects of confinement on protein stability, hydration, and volumetric properties. **JACS**, v. 126, p. 12224-12225, 2004.

REGIS, W. C. B., FATTORI, J. SANTORO, M., JAMIN, M. RAMOS, C. H. I. On the difference in stability between horse and sperm whale myoglobins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 436, p. 168-177, 2005.

ROYER, C. A. Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1595, p. 201-209, 2002.

SEMISOTNOV, G. V., KIHARA, H., KOTOVA, N. V., KIMURA, K., AMEMIYA, Y., WAKABAYASHI, K., SERDYUK, I. N., TIMCHENKO, A. A., CHIBA, K., NIKAIDO, K., IKURA, T., KUWAJIMA, K. Protein globularization during folding. A study by synchrotron small-angle X-ray scattering. **Journal of Molecular Biology**, v. 262(4), p. 559-74, 1996.

SCHAR NAGL, C. E., REIF, M., FRIEDRICH, J. Stability of proteins: temperature, pressure and the role solvent. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1749(2), p. 187-213, 2005.

SILVA, J. L., FOGUEL, D., ROYER, C. A. Pressure provides new insight into protein folding, dynamics and structure. **Trends in Biochemical Science**, v. 26, p.612-618, 2001.

SINGH, S., SINGH, J. Effect of polyols on the conformational stability and biological activity of a model protein lysozyme. **AAPS Pharmaceutical Science**, v. 4, p.1-9, 2003.

SIRE, O., ALPERT, B., ROYER, C. A. Probing pH and pressure effects on the apomyoglobin heme pocket with the 2'-(N-N-dimethylamino)-6-naphthoyl-4-trans-cyclohexanoic acid fluorophore. **Biophysical Journal**, v. 70, p. 2903-2914, 1996.

SMELLER, L. Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1595, p. 11-29, 2002.

SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in the indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal Applied Crystallography**. v. 25, p. 945-503, 1992.

TANFORD, C. Protein denaturation. **Advances in Protein Chemistry**, v. 23, p. 121-282. Part A and B, 1968.

TANFORD, C. Protein denaturation. **Advances in Protein Chemistry**, v. 24, p. 1-67. Part C, 1970.

TEALE, F. W. Cleavage of the haem-protein link by acid methylethylketone. **Biochimica et Biophysica Acta**, v 35, p. 543, 1959.

TIMASHEFF, S. N. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**. v 22, p. 67-97, 1993.

TIMASHEFF, S. N. In disperse solution, "osmotic stress" is a restrict case of preferential interactions. **Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 95, p. 7363-7367, 1998.

TIMASHEFF, S. N. Protein hydration, thermodynamic binding and preferential hydration. **Biochemistry**, v. 41, p. 13473-13482, 2002.

TIROLI, A. O., TASIC, L., OLIVEIRA, C. L., BLOCH, C. J. R., TORRIANI, I., FARAH, C. S., RAMOS, C. H. Mapping contacts between regulatory domains of skeletal muscle TnC and TnI by analyses of single-chain chimeras. **FEBS Journal**, v. 272(3), p. 779-90, 2005.

UNITED States Pharmacopeia. General Chapter. 24. ed. Rockville: United States Pharmacopeical Convention, 2005. p. 2481.

VIDUGIRIS, G. J. A. & ROYER, C. A. Determination of the volume changes for pressure-induced transitions of apomyoglobin between the native, molten globule, and unfolded states. **Biophysical Journal**, v. 75, p. 463-470, 1998.

WEBER, G., DRICKAMER, H. G. The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 16 (1), p. 89-112, 1983.

WOLF, A. V., BROWN, M. G., PRENTISS, P. G. CRC Handbook of Chemical and Physics, Editora R.T. Weast, CRC Press, Boca Raton, FL, anexo D, 1986-1987.

WRIGHT, P. E., BALDWIN, R. L. Case study 1: The folding process of apomyoglobin. In: PAIN, R. H. Mechanisms of Protein Folding. 2 ed. Oxford, University Press, 2000, p. 309-324.

WYMAN, J. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. **Advances in Protein Chemistry**, v. 19, p. 223-286, 1964.

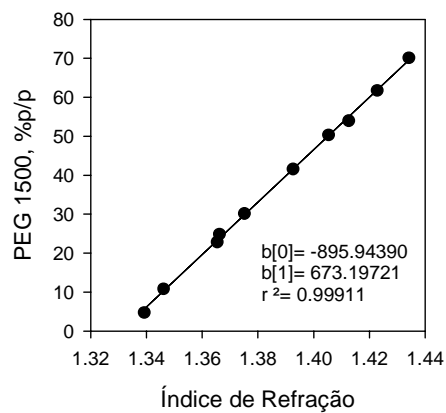
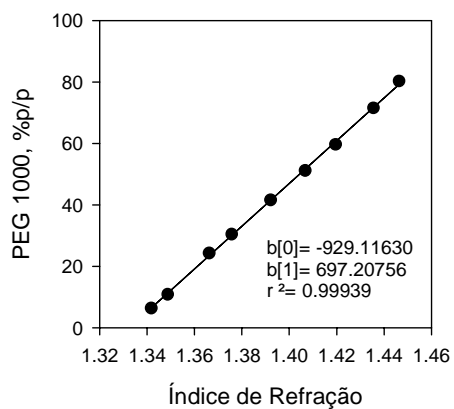
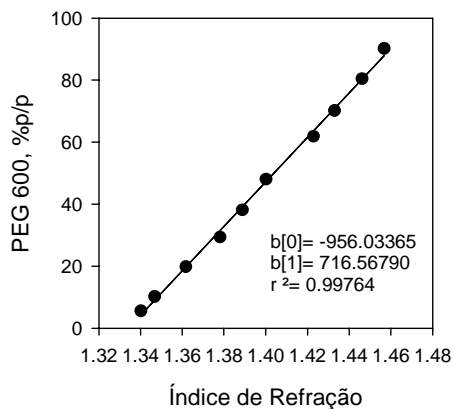
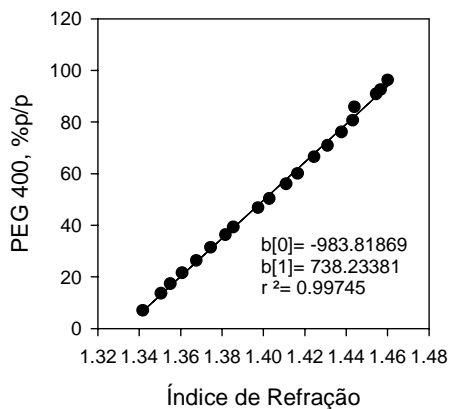
WYMAN, J., GILL, S. Binding and Linkage – Functional Chemistry of Biological Macromolecules. University Science Books, California, USA, 1990.

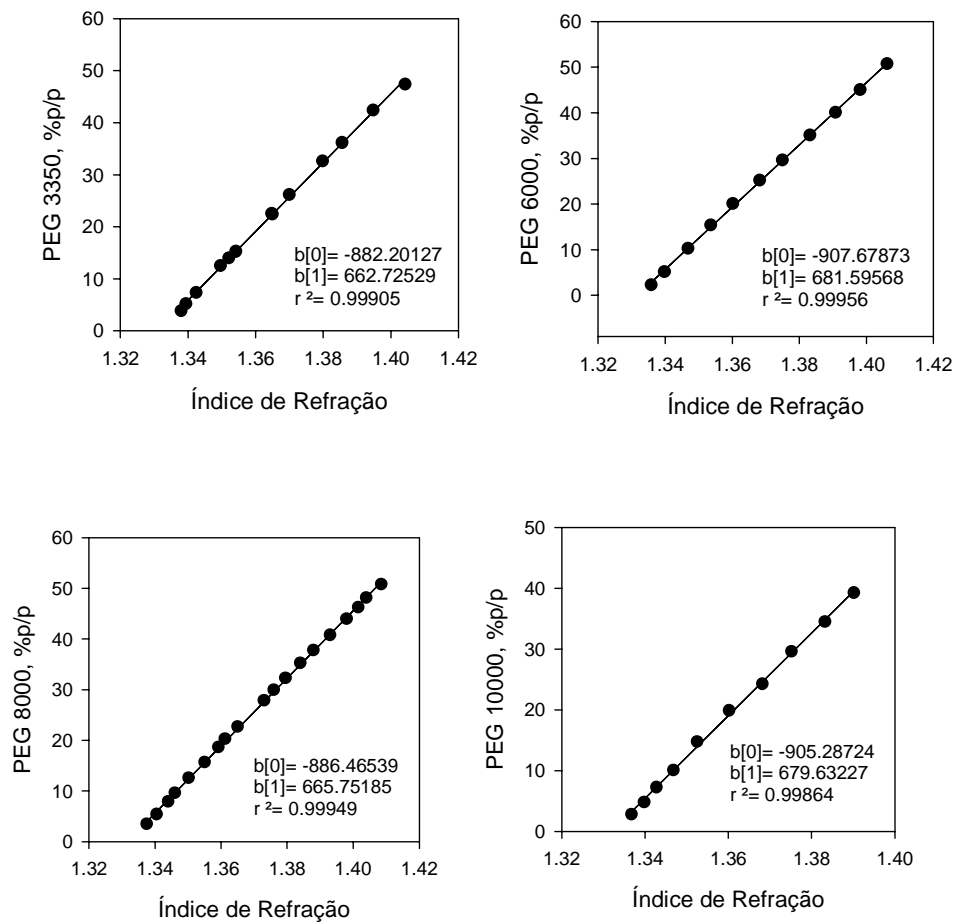
XIE, G., TIMASHEFF, S.N. The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trealose. **Biophysical Chemistry**, v. 64, p. 25-43, 1997.

ZIPP, A., KAUZMANN, W. Pressure denaturation of metmyoglobin. **Biochemistry**, v. 12, p. 4217-4228, 1973.

ANEXO A

Correlação entre índice de refração e concentração percentual peso/peso dos PEGs utilizados.





Os símbolos $b[0]$, $b[1]$ e r indicam coeficiente linear, coeficiente angular e coeficiente de linearidade, respectivamente.

ANEXO B

TABELAS - Concentração de PEG (%p/p) *versus* log a_w **PEG 400**

%p/p	log P (dinas/cm ²)
2.5	6.30
5.0	6.5
10.0	6.93
15.0	7.14
20.0	7.33
25.0	7.50
30.0	7.65

Equação da reta:

$$\log P = a + b * (\%p/p)^c$$

onde a = 5.29, b = 0.73 e c = 0.34

PEG 1000

%p/p	log P (dinas/cm ²)
5.0	6.07
10.0	6.61
15.0	6.82
20.0	7.08
25.0	7.34
30.0	7.46
35.0	7.55
40.0	7.65
45.0	7.79
50.0	7.89
55.0	7.93
60.0	7.95
2.5	6.11
5.0	6.27
10.0	6.54
15.0	6.86
20.0	7.05
25.0	7.26
30.0	7.43
35.0	7.58

Equação da reta:

$$\log P = a + b * (\%p/p)^c$$

onde a = 4.87, b = 0.80 e c = 0.34

PEG 600

%p/p	log P (dinas/cm ²)
2.5	6.22
5.0	6.43
10.0	6.80
15.0	7.01
20.0	7.20
25.0	7.38
30.0	7.53
35.0	7.68
5.0	6.15
10.0	6.72
15.0	6.96
20.0	7.13
25.0	7.30
30.4	7.42
35.2	7.57
40.5	7.64
45.0	7.92
61.5	8.35
67.5	8.49
45.0	7.92
40.0	7.80
5.0	6.34

Equação da reta:

$$\log P = a + b * (\%p/p)^c$$

onde a = 5.63, b = 0.33 e c = 0.51

PEG 6000

%p/p	log P (dinas/cm ²)
10.0	6.23
15.0	6.51
20.0	6.79
25.0	7.02
30.0	7.23
35.0	7.43

Equação da reta:

$$\log P = a + b * (\%p/p)^c$$

onde a = 5.12, b = 0.28 e c = 0.59

PEG 8000

%p/p	log P (dinas/cm ²)
10.0	6.15
15.0	6.48
20.0	6.77
25.0	7.00
30.0	7.23
35.0	7.44
20.0	6.82
25.5	6.98
30.2	7.28
35.5	7.38

Equação da reta:

$$\log P = a + b * (\%p/p) ^ c$$

onde a = 3.96, b = 0.95 e c = 0.36

PEG 10.000

%p/p	log P (dinas/cm ²)
10.0	6.16
15.0	6.45
20.0	6.75
25.0	7.00
30.0	7.24
35.0	7.43

Equação da reta:

$$\log P = a + b * (\%p/p) ^ c$$

onde a = 4.99, b = 0.29 e c = 0.60

Disponível em: http://www.brocku.ca/researchers/peter_rand/osmotic/osfile.html#data.
Acesso em: 10 dez. 2005

ANEXO C

TRABALHOS EM CONGRESSOS

THERMODYNAMIC CHARACTERIZATION OF TRANSITIONS BETWEEN NATIVE, MOLTEN GLOBULE AND UNFOLDED STATES OF APOMYOGLOBIN INDUCED BY HIGH PRESSURE.

Vivian de Almeida Silva and Luís Maurício T. R. Lima
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil, 21941-590.
mauricio@pharma.ufrj.br
vivianwal@yahoo.com.br

Our aim is to measure the energetic of conformational transitions of apomyoglobin (apoMb) between the native (N), molten globule (MG) and unfolded (U) states. Pressure-induced reversible conformational changes of horse heart apoMb have been studied up to 2.5 kbar at different pH and temperature. Fluorescence spectroscopy was used to follow the transitions. At pH 4.0, the intrinsic fluorescence emission is shifted to longer wavelength, indicating a high degree of exposure to solvent of the tryptophan residues. At neutral pH, increasing pressure shifts the intrinsic fluorescence of the apomyoglobin to longer wavelength, characteristic of the MG intermediate. The plot of the average emission wavelength as a function of pressure in values of pH 4.0 and 7.0 reveals a sigmoidal behavior characteristic of a cooperative transition. Unfolding transition between N = MG and MG = U are accompanied by a loss of partial molar volume, which increases with decreasing temperature. Moreover, the Van't Hoff analysis of unfolding energies allowed us to characterize the enthalpy and entropy of the transitions between N =MG and MG = U states. We present an overall mechanism with a description of all species in energetic terms.

HYDRATION EFFECTS ON EQUILIBRIUM PROTEIN FOLDING REACTION

Vivian de Almeida Silva¹, Márcio F. Colombo² and Luís Maurício T. R. Lima¹

1 Faculdade de Farmácia, UFRJ, Brasil

2 Departamento de Física, IBILCE, UNESP, Brasil

vivianwal@yahoo.com.br

Our aim is to investigate the hydration effects on the folding mechanisms of a polypeptide chain. This can be obtained by the addition of cosolutes of different chemical classes and sizes to the solution. We used apomyoglobin from horse heart (apoMb) on this work since apoMb is a well studied protein, its structure is elucidated, as well as its folding-unfolding equilibrium and kinetic pathways. Fluorescence spectroscopy was used to follow tertiary structure conformational changes. Lowering the pH from 7.0 to 2.5 apoMb can be denatured (D) from the fully folded structure (N), with the accumulation of an intermediate molten globule structure (I), which can be accessed both by concerted changes in intensity and shift in spectral center of mass of intrinsic fluorescence emission. All tested cosolutes stabilize an intermediate-like structure (I) that presents the same spectroscopic properties of the pH 4.0 molten globule state. The dependence of cosolute concentration on the free energy of equilibrium transition between D and I were interpreted in function of water activity. The degree of protein hydration associated with the folding reaction was calculated. This change is represented by the change of number of water molecules, dN_w , that are excluded from the protein surface when it folds. We observed that dN_w vary with the size of the cosolute and, within a range, it is linearly related with the partial specific volume of the solutes used to adjust water activity. We interpret our data in the view of excluded volume effects, which contributes to condensation of the protein chain due to limitations of the conformational space.

ANEXO D

TRABALHO – LNLS

SAXS investigation of protein folding intermediates: cosolute-induced folding of apomyoglobin.

Silva, V. A.,¹ Colombo M. F.,² and Lima, L. M. T. R.¹

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro RJ Brazil

²Universidade Estadual Paulista - São José do Rio Preto - São José do Rio Preto SP Brazil

INTRODUCTION

Our aim is to investigate the hydration effects on the folding mechanisms of a polypeptide chain. This can be obtained by the addition of cosolutes of different chemical classes and sizes to the solution. We used apomyoglobin from horse heart (apoMb) on this work since apoMb is a well studied protein, its structure is elucidated, as well as its folding-unfolding equilibrium and kinetic pathways. Lowering the pH from 7.0 to 2.5 apoMb can be denatured (D) from the fully folded structure (N), with the accumulation of an intermediate molten globule structure (I). Several cosolutes stabilize an intermediate-like structure (I), that presents the same spectroscopic properties of the pH 4.0 molten globule state. The dependence of cosolute concentration on the free energy of equilibrium transition between D and I is well characterized by our group, and can be interpreted in function of water activity, giving access to changes in degree of protein hydration associated with the folding reaction (number of water molecules, dN_w) ([1]). Our aim is to correlate observed thermodynamic quantities with structural changes in apoMb in folding reactions induced by these cosolutes. To address this question, we investigated by SAXS overall structural changes (R_g and D_{max}) of apoMb at pH 2.5 in several cosolutes conditions.

EXPERIMENT

SAXS data were collected using a one-dimensional position-sensitive detector, with quartz capillary sample holder and wavelength 0.1488 nm, at 22 °C. Data acquisition was performed by taking several frames of each sample, which allowed the control of any possible radiation damage. Monodispersity of the samples was confirmed by Guinier plots of the data ([2]). and molecular weight calculation using hen egg lysozyme as standard. Data were corrected for detector homogeneity, incident beam intensity, sample absorption and blank subtracted. Data fitting was performed using the

GNOM computer program ([3]).

RESULTS AND DISCUSSION

We measured R_g of apoMb at pH 2.5 in the presence of different concentrations of several PEG (close to saturation effect as estimated from thermodynamic data), and all of them induced a decrease in R_g of apoMb with R_g varying from 20.2 to 24.2 angstroms, close to that described for the MG conformational state ([4]).

CONCLUSION

We observed a close correlation between thermodynamic and structural data for the cosolute-induced folding reaction.

ACKNOWLEDGEMENTS

Acknowledgments This work was supported by FAPERJ, CNPq, PIBIC-CNPq, PRONEX, PADCT-III, FUJB, CAPES, FAPESP and ABTLuS LNLS (under project number 2919). We also thank Thomas Privelic and José Fernando Q. Reis for assistance in the SAXS beamline setup.

-
- [1] Colombo MF, Rau DC, Parsegian VA. (1992) Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin. *Science*. 256, 655-9. .
 - [2] Guinier, A., and Fournet, G. (1955). *Small Angle Scattering of X-Ray* (Ed. Wiley, New York, EUA).
 - [3] Svergun D.I. (1991) Mathematical methods in small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.* 24, 485-492
 - [4] Kataoka, M., I. Nishii, T. Fujisawa, T. Ueki, F. Tokunaga, and Y. Goto (1995) Structural characterization of the molten globule and native states of apomyoglobin by solution x-ray scattering. *J. Mol. Biol.* 249:215-228