

Raquel Kely Bortoleto

Mudanças Conformacionais numa Proteína
Formadora de Canal: A -
Toxina de Staphylococcus



1910000763



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO**

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFÍSICA

**MUDANÇAS CONFORMACIONAIS NUMA PROTEÍNA
FORMADORA DE CANAL : α -TOXINA DE *Staphylococcus
aureus***

RAQUEL KELLY BORTOLETO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São
José do Rio Preto - UNESP, como parte das
exigências para obtenção do Título de MESTRE
EM FÍSICA - Área de concentração BIOFÍSICA
MOLECULAR.



763/98

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

NOVEMBRO - 1996

4



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFÍSICA

MUDANÇAS CONFORMACIONAIS NUMA
PROTEÍNA FORMADORA DE CANAL α -TOXINA
DE *Staphylococcus aureus*

RAQUEL KELLY BORTOLETO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São
José do Rio Preto - UNESP, como parte das
exigências para obtenção do Título de MESTRE
EM FÍSICA - Área: BIOFÍSICA MOLECULAR.

Área de Concentração:

Biofísica Molecular

Orientador:

Richard John Ward

Co-Orientador:

João Ruggiero Neto

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

NOVEMBRO - 1996

AGRADECIMENTOS

DEDICATÓRIA

A FAPESP pela bolsa e sugestões do parecer. A FUNDUNESP pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto.

Aos meu orientador Prof. Dr. Richard Ward pelo incentivo durante o trabalho, pela amizade e principalmente pelos dias de laboratório que tanto foram úteis na minha formação.

Aos professores João Ruggieri e Roberto de Fátima pela orientação e sugestões.

Ao professor Dr. Augusto seu amor, dedicação e por me ensinarem a viver. e da direcção.

Ao Prof. Dr. Richard Dietrich e Prof. Dr. Michael Palmer pela hospedagem de São Carlos Y1030 (pDU1212) e Maria Alencastro.

Ao Prof. Dr. Roy Larson da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP, pelas sugestões para o

A minha irmã Ana Reni, pela amizade e

Ao Prof. Dr. Lázaro Mota pelo empréstimo do Espectrofotômetro e ao Prof. Dr. Mário pelas sugestões - Departamento de Química - UNESP/USP.

colaboração, e pelos momentos compartilhados.

Aos técnicos Paulo Santos, Antônio Martins (Grupo de Física) e em especial a Tânia (Tina Almeida) pelo uso de alguns equipamentos no início da montagem do novo laboratório.

Ao amigo Carlos Roberto Bonato e Adriana Rodrigues Alves pela amizade e incentivo nas horas difíceis.

A Iza pelo auxílio nos problemas burocráticos e ao Milton por seu amor, paciência e pela sua

Ao Milton por seu amor, paciência e pela sua

A Nanci, Oscar, Rosimar e Cidilda da seção de pós-graduação.

grande ajuda na elaboração desse trabalho.

Aos estagiários Arthur, Roberto e Juliana por serem amigos.

Aos colegas, funcionários e professores do departamento.

A todas que direta ou indiretamente colaboraram na realização desse trabalho.

A nossa filhinha Mariane, que acompanhou

tudo bem de perto

MUITO OBRIGADO

Muito obrigado

AGRADECIMENTOS

A **FAPESP** pela bolsa e sugestões do assessor . A **FUNDUNESP** pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto.

Ao meu orientador Prof. Dr. Richard Ward pelo incentivo durante o trabalho, pela amizade e principalmente pelos dias de laboratório que tanto foram úteis na minha formação.

Aos professores João Ruggiero Neto, Raghuvir K. Arni e Marinônio Cornélio pelas discussões e sugestões.

Ao professor Dr. Augusto Agostinho Neto pelas sugestões no decorrer do trabalho e leitura da dissertação.

Ao Prof. Dr. Suchart Bhakdi e Prof. Dr. Michael Palmer pela linhagem de *S. aureus* Y1090 (pDU1212) - Mainz Alemanha.

Ao Prof. Dr. Roy Larson, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP, pelos reagentes para o "cross-linking"

Ao Prof. Dr. Laerte Miola pelo empréstimo do Espectrofluorímetro e ao Prof. Dr. Márcio pelas sugestões - Departamento de Química - UNESP/CSJRP.

Aos técnicos Paulo Salinas, Antonio Barbosa (Depto de Física) e em especial a Tânia (Eng. Alimentos) pelo uso de alguns equipamentos no início da montagem do nosso laboratório.

Ao amigo Carlos Roberto Benatti, e Adriana Rodrigues Alves pela amizade e incentivo nas horas difíceis.

A Ilva pelo auxílio nos problemas burocráticos e a D. Aparecida Mansour, Francisca e Antonia por serem sempre solícitas.

A Nanci, Oscar, Rosimar e Onilda da sessão de pós-graduação

Aos estagiários Arthur, Roberto e Juliana pela ajuda e amizade.

Aos colegas, funcionários e professores do departamento.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADO.



RESUMO

Tanto as investigações teóricas como experimentais tem mostrado que na vizinhança da superfície da membrana, o pH é significativamente reduzido em comparação com o solvente do meio. Estudos com proteínas formadoras de canal com α -hélice como a colicina e toxina da difiteria tem mostrado que a diminuição do pH de 7 para 4,5-5,5 induz mudanças nas estruturas terciária (Col) e secundárias (DT), nas quais tem implicado na transição da proteína com conformações intermediárias no processo de formação do canal. Monitorando as mudanças no sinal da fluorescência intrínseca do triptofano com uréia e Cloridrato de guanidina induzindo a desnaturação da α -toxina de *S. aureus* formadora de poro, permitindo a estimativa do estado nativo da energia livre de Gibbs (ΔG_0 , uma medida da estabilidade da proteína) entre os pHs 5 à 7,5. Em adição, uma análise do deslocamento e posição das curvas de desnaturação fornece informação sobre intermediários no processo de desnaturação.

Em pH 7,0, as curvas de desnaturação são deslocadas para altas concentrações do desnaturante com o aumento da concentração da proteína, este efeito não é observado em pH 5. Este deslocamento indica que a desnaturação para pH altos, envolve uma forma multimérica da α -toxina, porém para valores menores de pH, é encontrada somente a forma monomérica. Para pH < 6 as curvas de desnaturação mostram uma transição simples enquanto que para pH > 6 uma transição envolvendo duas conformações em equilíbrio é encontrada, indicando um processo com dois passos. O primeiro passo é caracterizado pelo ΔG_0 de 2 kcal e é independente do pH porém, o segundo passo envolve valores maiores de ΔG_0 , e diminuição não linear com a queda do pH. O modelo proposto é que na α -toxina existe um multímero para pH maiores e está estabilizado por interação hidrofóbica independente do pH. Para pH menores a dissociação do multímero com concomitante diminuição do pH na estabilidade do monomero. A diminuição da estabilidade pode causar a redução da barreira de energia para a conversão da forma intermediária no processo de formação do canal.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 2: TEORIA

ABSTRACT

Both theoretical and experimental investigations have shown that in the vicinity of a lipid membrane surface, the pH is significantly reduced in comparison to the bulk solvent. Studies with the α -helical channel forming proteins colicin and diphtheria toxin show that decreasing pH from 7 to 4,5-5,5 induces both secondary (DT) and tertiary (Col) structural changes, which have been implicated in the transitions to intermediate protein conformations involved in the process of membrane channel forming. Monitoring the intrinsic tryptofan fluorescence signal changes of the urea and guanidinium chloride induced equilibrium denaturation of the pore-forming α -toxin from *S. aureus*, allows the estimation the native state Gibbs free energy (ΔG_0 , a measure of protein stability) over the select pH range of 5 to 7,5. In addition, an analysis of the shape and position of the denaturation curves provides information about intermediates in the denaturation process. At pH 7, the denaturation curve is shifted to higher denaturant concentrations with increased protein concentration no such effect is observed at pH 5. This shift indicates that the denaturation at higher pH involves a multimeric form of α -toxin, whereas at lower pH the monomeric form alone is present. At pH < 6 the denaturation curves show a single transition whereas at pH > 6 biphasic behaviour is observed, indicating a two step process. The first step is characterized by a ΔG_0 of 2 kcal and is independent of pH whereas the second step involves higher values of ΔG_0 and decreases non-linearly with decreasing pH. A model is proposed in which the α -toxin exists as a multimer at high pH which is stabilized by hydrophobic, pH independent, interactions. At lower pH the multimer dissociates to monomers with a concomitant pH-dependent decrease in monomer stability. The decreased stability can act to reduce the energy barrier for the conversion to an intermediary in the channel forming process.

3.5.1. Fluorescência

3.5.2. Separação da Fluorescência

3.5.3. Tratamento dos Dados dos Espectros de Fluorescência

3.5.4. Microscopia Circular

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2: TEORIA	7
2.1. Purificação da α -toxina.....	7
2.1.1. Cromatografia.....	7
2.1.1.1. Filtração em Gel.....	8
2.1.1.2. Troca Catiônica.....	8
2.2. Fluorescência.....	9
2.2.1. Supressão de fluorescência.....	12
2.3. Dobramento e Estabilidade da Proteína.....	13
2.4. Dicroísmo Circular.....	15
CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODO.....	16
3.1. Crescimento da Linhagem Recombinante.....	16
3.2. Centrifugação e Precipitação com Sal.....	16
3.3. Diálise.....	17
3.4. Cromatografia.....	17
3.5. Estudos Biofísicos.....	18
3.5.1. Fluorescência.....	18
3.5.2. Supressão da Fluorescência.....	19
3.5.3. Tratamento dos Dados dos Espectros de Fluorescência.....	19
3.5.4. Dicroísmo Circular.....	22

CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....	23
4.1 - Cromatografia.....	23
4.2 - Desnaturação por Uréia e GdnHcl.....	24
4.3 - Efeito de pH no ΔG_D	29
4.4 - Efeito de pH na Ausência do Desnaturante.....	33
CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO.....	36
CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO.....	42
INTRODUÇÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	45

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) foi inicialmente descrita por Ogston em 1881, como um micrococci com potencial patogênico para humanos (Ogston, 1881). Esta bactéria produz diversas toxinas entre elas, a α -toxina. Vários estudos foram realizados no período de 1940-1960, onde a proteína α -toxina foi considerada como a causadora de dermatites e, dependendo da dose, letal para certos animais. Entre os diferentes organismos estudados, ocorreram variações na susceptibilidade para a lise dos eritrócitos. As reações causadas por essa proteína incluem liberação de enzimas e contração muscular (Jeljaszewicz et al, 1965). Nas últimas décadas, a α -toxina tem sido considerado como o principal agente causador de infecções bacterianas em seres humanos, sendo responsável por doenças epidérmicas comuns e até septicemias hospitalares. Após seu isolamento em laboratório, foi descoberta sua ação hemolítica pelo cultivo das linhagens em placas com

sangue com a produção de zonas claras, sendo esta uma característica para diagnosticar a bactéria *S. aureus*. Macrófagos, células epiteliais, células de rins de coelho, fibroblastos, células musculares, além dos eritrócitos, são suscetíveis ao ataque da α -toxina.

Esses dados indicaram que a ação da α -toxina não está restrita apenas aos eritrócitos, mas pode também ser estendida a células nucleadas que respondem ao ataque da proteína com uma variedade de reações secundárias.

As reações são diferentes nas células em consequência da presença de receptores, como nos eritrócitos de coelhos e em humanos nas plaquetas e monócitos que são altamente sensíveis à α -toxina. Verifica-se, que é necessário uma concentração 400 vezes maior de α -toxina para lisar eritrócitos humanos quando comparados com os de coelho. Estudos investigando a ação da α -toxina em outras células como plaquetas humanas (Bhakdi et al, 1988), mostra que a proteína induz agregação acompanhada de um efeito pró-coagulatório. Monócitos e células endoteliais humanas foram identificadas como altamente susceptíveis ao ataque da α -toxina.

A α -toxina foi purificada e isolada por volta de 1960 (Bernheimer et al., 1963; Bhakdi et al., 1983). Estudos anteriores (Bhakdi et al., 1981) corroboram a hipótese que a α -toxina é uma molécula hidrofílica que está presente na forma monomérica em solução aquosa. O peso molecular do monômero foi determinado por equilíbrio de sedimentação como sendo 33 a 34 kDa com coeficiente de sedimentação em 3,3S (Bhakdi et al., 1981).

Arbuthnott e Bernheimer sugeriram que membranas tratadas com altas doses de α -toxina produzem estruturas anelares com aproximadamente 10 nm de diâmetro que podem ser detectados com o auxílio de microscópio eletrônico (Arbuthnott et al., 1967; Bernheimer et al., 1965). Em trabalhos mais recentes, foram aplicadas técnicas de averiguação rotacional para



verificar partículas simples na membrana e reconstrução de imagem para cristais hexagonais bidimensionais reconstruídos com 6 picos arranjados simetricamente (Oloffson et al, 1990; Ward et al, 1992). Resultados obtidos por SDS-PAGE (Bhakdi et al, 1981; Tobkes et al, 1985), na qual o oligomero de α -toxina é estável, filtração em gel (Bhakdi et al, 1981; Tobkes et al, 1985), análise por sedimentação (Bhakdi et al, 1981; Tobkes et al, 1985) e "cross-linking" químico (Tobkes et al, 1985) confirmavam o pressuposto que o canal formado pela ação lítica da α -toxina era mesmo causado pela formação de um hexâmero. Entretanto, em estudos recentes (Gouaux et al 1994), através de difração de raios - X do cristal simples e estudos com α -toxina marcada com sonda radioativa na membrana do eritrócito, foi demonstrando que o estado de oligomerização da α -toxina é heptamérico e não hexamérico como aceito por mais de 25 anos.

O gene que codifica para a produção da α -toxina está presente em cópia única, é cromossomal. Foi clonado, sequenciado (O'Reilly et al., 1986) e expressado nos hospedeiros bacterinos *S. aureus* (Bhakdi et al, 1988) e *E. coli* (Walker, 1992). Os sistemas da expressão da proteína recombinante permite estudos da função da α -toxina utilizando mutagênese sitio dirigida. O gene que codifica a α -toxina foi expressado na linhagem Y1090 de *S. aureus* no plasmídeo pDU1212, onde estão bem definidos os elementos de regulação e sinalização da proteína nativa. O vetor tem origem de replicação tanto para *E. coli* onde é selecionado com ampicilina, como para *S. aureus*; selecionado com cloranfenicol, sendo portanto um "shuttle vector", o que facilita a clonagem dos mutantes, por permitir a transformação tanto em *E. coli* como em *S. aureus*. A figura 1 representa o mapa de restrição do plasmídeo pDU1212, com os sítios para as enzimas de restrições EcoRI e HindIII.

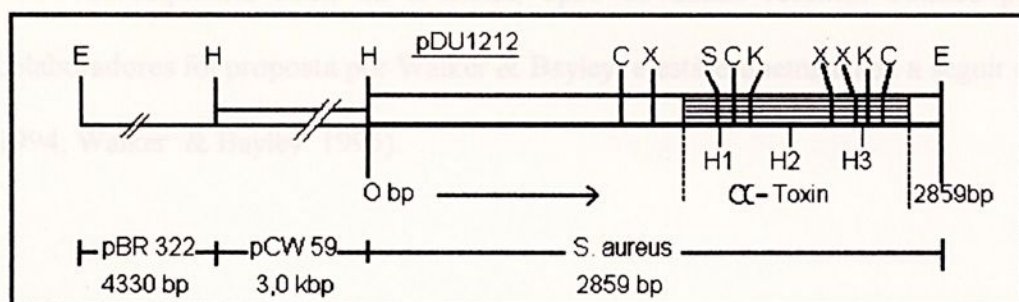


Figura 1: Mapa de restrição para o plasmídeo pDU1212 clonado com o gene para a expressão da α -toxina com os principais sítios para enzimas de restrição .

A sequência primária da α -toxina é composta por 293 aminoácidos na cadeia polipeptídica subdividida em três regiões funcionais: os domínios das regiões N- e C- terminal e o "loop" central rico em glicina. A região N terminal é responsável juntamente com o loop central rico em glicina, pelo processo final de formação do poro (Fig.2; sequencia 3→4). Pequenas alterações nesta região permitem a oligomerização, porém eliminam a atividade lítica da α -toxina (Walker et al, 1992). O "loop" central é altamente sensível à digestão proteolítica do monômero em solução.

A região C terminal da α -toxina foi a última a ser entendida em termos de função. Os mutantes da região C terminal ligam-se aos eritrócitos de coelho como monômeros fracamente agrupados dentro dos poros funcionais, sugerindo que a região C - terminal é importante para uma eficiente oligomerização (Walker et al., 1992). As hipóteses formuladas com mutantes encontraram corroboração em estudos anteriores que sugeriram que o C-terminal pode estar localizado na parte do poro que projeta mais de 5 nm sobre a superfície da membrana (Fussle et al, 1981; Ward et al, 1992).

A sequência lítica da α -toxina, após os dados recentes obtidos por Gouaux e colaboradores foi proposta por Walker & Bayley e está esquematizada a seguir (Gouaux et al, 1994; Walker & Bayley 1995).

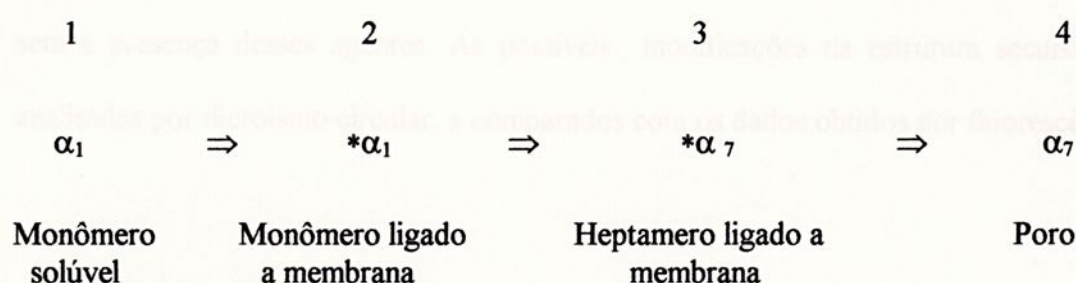


Figura 2: Estruturas para a sequência lítica da α -toxina proposta por Walker & Bayley, 1995 (* pré-poro).

As mudanças estruturais ocorridas na α -toxina não estão totalmente exploradas. Análise por dicroísmo circular indica abundância de folhas β (68%) e menor quantidade de α -hélice (10%). Nos estudos realizados, a oligomerização não envolve mudanças bruscas na estrutura secundária da proteína (Tokles et al 1985; Ikigai & Nakae, 1985). A ação lítica da α -toxina inclui primeiramente a ligação da proteína solúvel à membrana, o que provavelmente deve estar relacionada com mudanças conformacionais da proteína, o que caracteriza a proteína como anfifílica. Porém, ainda não está esclarecido quais os fatores que influenciam esta transição e qual a sua natureza.

Nosso objetivo foi avaliar os efeitos do pH na estabilidade conformacional da α -toxina. Convém lembrar que α -toxina não apresenta cisteínas, o que torna interessante analisar quais forças estão interagindo para manter sua estabilidade num ambiente bastante adverso como o citoplasma, onde por exemplo, ocorre um gradiente de pH e um forte campo elétrico próximo

à membrana. A motivação surgiu depois das várias tentativas para obter um protocolo de purificação para a proteína, onde fosse possível conciliar rendimento com a proteína nativa pura. Utilizamos então, a titulação de pH na presença dos agentes desnaturantes uréia e Cloridrato de guanidina (GndHCl) com a técnica de fluorescência para analisar as mudanças na estrutura terciária da proteína juntamente com a supressão de fluorescência por acrilamida sem a presença desses agentes. As possíveis modificações na estrutura secundária foram analisadas por dicroísmo circular, e comparados com os dados obtidos por fluorescência.

TEORIA

2.1. Purificação da proteína

2.1.1. Cromatografia

Todos os processos de cromatografia foram feitos utilizando o equipamento para Cromatografia a Fluxo de Baixa Pressão (FLC). O FLC é um sistema que possibilita a purificação das proteínas com ótima reprodução das técnicas empregadas. Foram utilizadas duas técnicas básicas para a purificação da proteína: 1- Filtração em Gel e 2- Troca Iônica. A primeira etapa teve como finalidade uma pré-purificação para retirar todo o material que ainda restou do meio de cultura bem como, outros contaminantes presentes e na segunda etapa, a obtenção da proteína pura.

2.1.1.1. Filtração em gel

CAPÍTULO 2

TEORIA

2.1. Purificação da α -toxina

2.1.1. Cromatografia

Todos os processos de cromatografia foram feitos utilizando o equipamento para Cromatografia a Fluxo de Baixa Pressão (FPLC). O FPLC é um sistema que possibilita a purificação das proteínas com ótima reprodução das técnicas empregadas. Foram utilizadas duas técnicas básicas para a purificação da proteína : 1- Filtração em Gel e 2- Troca Catiônica. A primeira etapa teve como finalidade uma pré-purificação para retirar sais, impurezas que ainda restam do meio de cultura bem como, outros contaminantes menores; e na segunda etapa, a obtenção da proteína pura.



2.1.1.1. Filtração em gel

Na matriz utilizada para esta técnica, os poros da resina possuem tamanhos diferentes específicos para cada tamanho de proteína. As proteínas pequenas ou sais, permanecem no interior do gel matriz e as proteínas que ultrapassam o tamanho de exclusão da matriz são eluídas de acordo como seu peso molecular, as proteínas com peso molecular maior são eluídas primeiro e as menores em seguida.

O gel matriz utilizado foi o Sephadex. Esta matriz é formada pelo dextran "cross-linking" com epíclorohidrina. A resina Sephadex G-25 tem sua matriz entre 50-150 μm e seu fracionamento para proteínas globulares está entre 10-50 kD. O pico para α -toxina com peso molecular de 34 kD é eluída no volume livre ("void") e foi caracterizado pelo teste de lise em eritrócitos de coelho. Desta forma, a Sephadex G-25 é importante nesta etapa inicial de cromatografia para eliminar pequenas moléculas contaminantes que se encontram no meio de cultura e excesso de sal decorrente da precipitação.

2.1.1.2. Troca Catiônica

A separação por cromatografia de troca iônica, depende das cargas para uma imobilização do grupo iônico de carga oposta. A separação das proteínas é obtida desde que substâncias diferentes tenham diferentes graus de interação com a resina de troca iônica, o que se deve a diferenças nas suas cargas. Estas condições são controladas pela variação de pH e força iônica. Apesar das diferenças nas propriedades das cargas dos componentes biológicos serem muitas vezes consideráveis, a troca iônica pode separar espécies com variação muito pequena destas propriedades.

A matriz utilizada para a troca iônica, consiste de uma matriz de poro insolúvel com grupos carregados ligados a matriz por ligação covalente. As cargas dos grupos estão associadas com a mobilidade dos contra-íons. Estes contra-íons podem ser reversivelmente trocados com outros por algumas mudanças que alteram o exterior da matriz, e existem matrizes para moléculas com cargas positivas e negativas. Moléculas com cargas positivas tem contra-íons carregados negativamente (ânions) - troca aniônica. Moléculas com cargas negativas têm contra-íons positivos - troca catiônica.

A matriz pode ser feita com componentes orgânicos, resinas sintéticas e polissacarídeos. A característica da matriz é determinada por suas propriedades cromatográficas como a resolução, capacidade e a recuperação das propriedades fisiológicas como a atividade da proteína, extensão mecânica e propriedades do fluxo. A natureza da matriz afeta a atividade biológica da substância a ser purificada.

A α -toxina apresenta ponto isoelétrico (pI) 8,6 e foi utilizado na purificação tampão com pH 5,5; desta forma, a proteína está distante do seu pI e está carregada positivamente sendo necessário uma resina de troca catiônica - carregada negativamente.

2.2. Fluorescência

Ainda hoje, o tipo de fotoluminescência mais utilizado em química analítica é a fluorescência. A espectroscopia de fluorescência está baseada na emissão de fótons com o decaimento de um átomo ou molécula eletronicamente excitada, do primeiro estado singlete excitado para seu estado fundamental. O tempo de vida de fluorescência, isto é, o intervalo de tempo médio que um fluoróforo permanece no estado excitado está compreendido entre 0,1 a 10 ns, onde podem ocorrer vários processos que alteram as características espectrais do fluoróforo.

A absorção e a emissão de luz estão ilustradas pelo diagrama de Jablonski (Fig 3), onde estão representados o estado fundamental (S_0) e o primeiro estado singlete excitado (S_1).

O processo de absorção ocorre num intervalo de tempo de 10^{-15} segundos e está sujeito a vários processos de decaimento do estado excitado. Um desses processos é o decaimento vibracional da molécula ou conversão interna para o nível mais baixo vibracional S_1 , que ocorre 10^{-12} segundos após a absorção. Dessa forma, a emissão fluorescente resulta geralmente do nível vibracional mais baixo do estado singlete excitado. Como ocorre uma perda de energia por conversão interna, o fluoróforo emitirá num comprimento de onda maior que o de sua excitação. O deslocamento do espectro de emissão fluorescente em relação ao comprimento de onda de excitação é chamado de deslocamento de Stokes.

Um outro processo que ocorre é o cruzamento inter-sistema, onde as moléculas no estado S_1 podem sofrer conversão para o primeiro estado tripleto T_1 . Porém, a transição T_1 para o estado fundamental é proibida pela regra da seleção de Pauli. É importante lembrar que as regras de seleção não proíbem totalmente as transições que as violam, mas simplesmente tornam tais transições muito pouco prováveis, o que resulta numa taxa muito pequena quando comparada com a taxa de fluorescência.

Durante o tempo de vida de fluorescência podem ocorrer vários processos moleculares, que influenciam as características espectrais do fluoróforo. Esta característica confere à técnica sensibilidade para investigar proteínas e outras macromoléculas, com a vantagem de utilizar baixa concentração de proteína, quando comparada com outros métodos como o dicroísmo circular. As formas dos espectros de fluorescência podem variar dependendo da estrutura química do fluoróforo e do microambiente a que estão expostos.

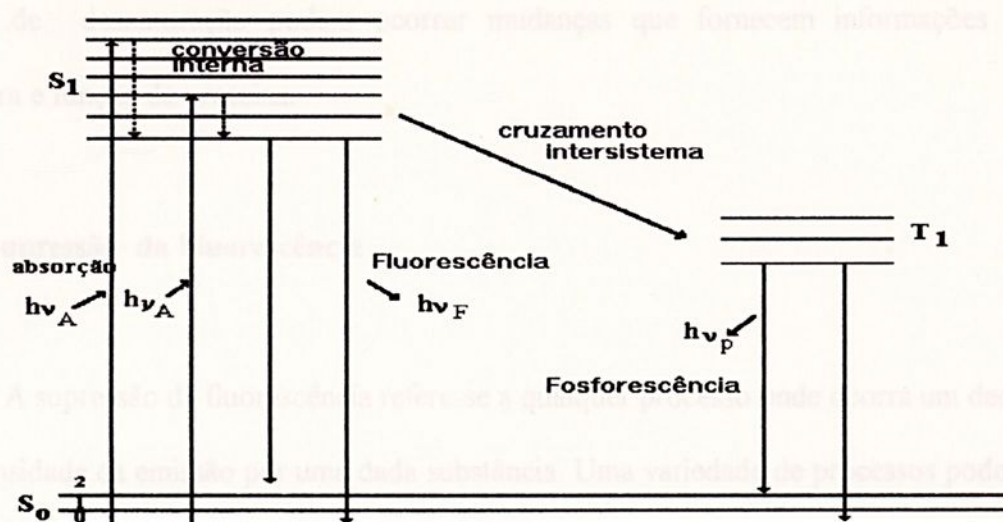


Figura 3: Diagrama de Jablonski, ilustrando a absorção de luz, os processos de decaimento radiativos e a conversão interna no estado excitado, onde : S_0 é o estado fundamental; S_1 o primeiro estado singleto excitado; T_1 o primeiro estado tripleto excitado e seus subníveis vibracionais.

Na maioria das proteínas podem-se encontrar presentes fluoróforos naturais, que são os aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano. A fluorescência das proteínas geralmente é dominada pelos resíduos de triptofano e de seus núcleos indol que são fluoróforos naturais altamente sensíveis a polaridade do solvente. Dessa forma, o espectro de emissão dos triptofanos pode refletir a polaridade do microambiente no interior da proteína. (Lakowicz, 1983).

A sensibilidade da metodologia dos espectros de fluorescência permite a análise das alterações nas estruturas terciárias através da emissão desses fluoróforos, provocadas pelos desnaturantes uréia e Cloridrato de guanidina (GdnHCl). Com a adição do desnaturante, a razão dos espectros de emissão tirosina - triptofano sofre modificações que são específicas para cada proteína, pois dependem da quantidade de fluoróforos naturais presentes na proteína. A α -toxina na forma monomérica apresenta 8 triptofanos, e 14 tirosinas.

Medidas de fluorescência com a titulação de desnaturantes fornecem informações sobre a estabilidade da proteína pela avaliação da energia livre de Gibbs (Pace, 1986). Durante a

reação de desnaturação podem ocorrer mudanças que fornecem informações sobre a estrutura e função da proteína.

2.2.1 Supressão da Fluorescência

A supressão da fluorescência refere-se a qualquer processo onde ocorra um decrescimo na intensidade da emissão por uma dada substância. Uma variedade de processos pode resultar na supressão, como por exemplo as reações do estado excitado, transferência de energia, formação de complexos e a supressão por colisão. A supressão por colisão é o tipo mais comum e envolve a remoção da energia de uma molécula excitada por outra molécula, resultante da colisão ou do encontro entre o fluoróforo e o supressor.

A supressão da fluorescência tem sido estudada como fenômeno fundamental, e aplicada para auxiliar nos problemas bioquímicos. Tanto a supressão estática como a dinâmica requer o contato molecular entre o fluoróforo e o supressor. No caso da supressão dinâmica, o supressor deve difundir em direção ao fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado. Caso não haja contato, o fluoróforo retorna ao estado fundamental com emissão de fluorescência. No caso da supressão estática, um complexo é formado entre o fluoróforo e o supressor, e este complexo é não-fluorescente. Este pré-requisito, resulta em numerosas aplicações da supressão, como por exemplo, a acessibilidade do supressor ao fluoróforo. Se um dado solvente é muito viscoso, então a difusão é muito lenta e a supressão é inibida. Assim, a supressão também revela a razão da difusão dos supressores.

2.3 Dobramento e estabilidade de proteínas

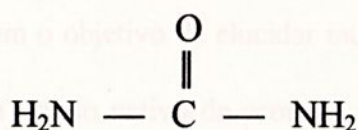
Estado desnaturado é o termo usado para se referir especificamente a subgrupos de conformações diferentes que estão altamente abertos ao solvente do meio, obtidos geralmente em condições altamente desnaturantes como pH baixo ou alta concentração de ureia. Um segundo subgrupo de estados desnaturados é referido como “desnaturado compacto”, obtido dentro das condições fracas de desnaturação. Estimativas da contribuição de diferentes tipos de interações moleculares para a energia livre de estabilização da proteína, mostram que a mesma se organiza em temperaturas fisiológicas e é determinada principalmente pelo aumento da entropia causada pela água liberada dos resíduos não-polar e polares, bem como pelas interações de Van der Waals (Dill, 1990).

A energia livre é um parâmetro importante para quantificar a estabilidade da proteína. A desnaturação-equilíbrio, é um método frequentemente usado para determinar as mudanças na energia livre de Gibbs (ΔG_0) de uma proteína induzida pela ação de agentes desnaturantes como uréia e GdnHCl (Pace et al, 1986). O desdobramento ocorre porque há um grande número de sítios idênticos que não interagem na conformação desnaturada quando comparados com a conformação nativa (Tanford, 1970; Creighton, 1993). A reação de desnaturação é difícil de ser interpretada pela complexidade das estruturas das proteínas e pela compreensão limitada do processo que envolve o agente desnaturante e a proteína, bem como, a dificuldade em separar os efeitos múltiplos que estão envolvidos em sua estabilidade.

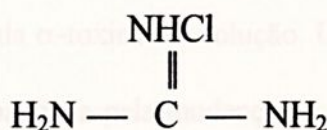
A reação desnaturante-proteína tem sofrido um novo enfoque nos últimos anos. Os agentes desnaturantes uréia e GdnHCl são os mais utilizados na reação de desnaturação. Existem grupos que consideram que os efeitos na estabilidade da proteína são independentes do agente desnaturante (Greene e Pace, 1974; Bolen e Santoro, 1988; Santoro e Bolen, 1988; Pace et al., 1990), e outros indicando que a estabilidade da proteína sofre influências do agente

desnaturante (Pace et al., 1990; Monera et al., 1993, 1994). O potencial dos agentes desnaturantes ureia e GdnHCl tem sido explorado, porém sem levar em conta as diferenças básicas como as características iônicas na desnaturação da proteína. Em 1974, Greene e Pace afirmaram que GdnHCl é 2.8 vezes mais potente como agente desnaturante que uréia para a ribonuclease e somente 1.7 vezes mais efetivo para lisozima, pois cadeias polipeptídicas diferentes apresentam características diferentes - a ribonuclease é mais polar quando comparada com a lisozima. Segundo Pace (Pace, 1990), a alta força iônica da GdnHCl em solução pode suprimir o efeito da interação eletrostática dos grupos carregados na proteína, sendo impossível distinguir a contribuição desse efeito.

A uréia e a GdnHCl apresentam características diferentes. A ação da uréia (fig. 4A) que é uma molécula não carregada, apresenta habilidade de ligação à proteína (Tanford, 1970; Pace, 1986), sem interferir na interação intermolecular e intramolecular, indicando o que está envolvido na estabilidade da proteína. A GdnHCl como um sal (fig. 4B) ioniza em solução, e quando em baixas concentrações, Gnd^+ e Cl^- mascaram as cargas positivas e negativas da cadeia de aminoácidos, reduzindo ou eliminando as interações eletrostáticas. GdnHCl é a mais apropriada na determinação das contribuições específicas de hidrofobicidade ou interações não-iônicas na estabilidade da proteína. Os dados obtidos com uréia e GdnHCl são particularmente importantes na estimativa da energia livre do desdobramento das proteínas. Quando analisados conjuntamente os dados dos dois agentes desnaturantes, é possível analisar a contribuição das interações hidrofóbicas na estabilidade das proteínas (Monera et al, 1994).



URÉIA (A)



GdnHCl (B)

Figura 4 : Fórmula estrutural da uréia (A), e em (B) da GdnHCl (Cloridrato de guanidina).

2.4. Dicroísmo circular

Uma outra técnica que pode ser utilizada para elucidar a conformação de macromoléculas em solução é o dicroísmo circular. A atividade óptica de pequenas moléculas é devido à sua assimetria principalmente pela presença de átomos de carbono α produzindo o chamado efeito quiral, e da interferência desses átomos nos cromóforos vizinhos.

O dicroísmo circular (CD) é utilizado para medir a atividade óptica das moléculas assimétricas em solução. As bandas de CD ocorrem em duas regiões do espectro. Na região compreendida como UV-distante (170-250 nm) onde está dominada pela contribuição de ligação peptídica, e na região UV-próximo (250-300 nm) onde a contribuição é dada pelos aminoácidos aromáticos.

As bandas da região UV-distante contém informações sobre a ligação peptídica e da estrutura secundária da proteína e são frequentemente empregados para monitorar a estrutura secundária no curso das transições estruturais. Em particular, a α -hélice e folha- β dispõe de espectro de CD característico na região do UV-distante. Nas proteínas nativas, a composição dos elementos de estrutura secundária é altamente definida, o que resulta num espectro CD característico. Certas condições como a desnaturação, que alteram a estrutura secundária da proteína, resultando na mudança do sinal de CD. O espectro de UV-próximo representa um critério altamente sensível para caracterizar o estado nativo da proteína, neste caso podendo até mesmo ser usado para correlacionar o dobramento da proteína.

A técnica de dicroísmo circular (CD) foi utilizada simultaneamente à fluorescência com o objetivo de elucidar mudanças na conformação da α -toxina em solução. Uma mudança no estado nativo da proteína com pH pode ser acompanhada pela mudança na sua estrutura secundária. Esta possibilidade pode ser testada medindo-se o sinal de dicroísmo circular para UV distantes.



CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Crescimento da Linhagem Recombinante

Para a obtenção da proteína, foi lançada uma colônia da linhagem Y1090 isolada em um pré-inóculo com 3 ml de meio de cultura de extrato da soja triptico (Oxoid), com 12,5 µg/ml de cloranfenicol. Após 8-10 horas com agitação moderada 37°C obteve-se o material para lançar a cultura em escala grande. Uma cultura de escala 500-1000 ml com cloranfenicol foi inoculada e incubada por 12-14 horas à 37 °C. O protocolo usado para purificação foi completado nas etapas seguintes.

3.2. Centrifugação e Precipitação com sal

As proteínas secretadas e presentes no sobrenadante da cultura foram obtidas por centrifugação a 4°C por 20 minutos a 5000 rpm (Sorvall RC 5B), e em seguida precipitadas com 40% de sulfato de amônio (Merck) com adição fracionada, na presença de 100µM de

Fluorido Fenilmetilsufonil (PMSF- SIGMA), que é um inibidor para serina-proteases para evitar a degradação da α -toxina. O processo foi realizado a 4°C por 10-12 horas.

3.3. Diálise

A proteína precipitada foi centrifugada novamente por 30 minutos a 20.000 rpm a 4°C em Sorvall RC 5B. Os “pellets” foram ressuspensos em tampão 20 mM de acetato de sódio; 150 mM de cloreto de sódio pH 5,5. A diálise foi processada com membrana com corte de peso molecular menor que 14 KD, contra o mesmo tampão por 12-14 horas a 4°C.

3.4. Cromatografia

Foram utilizados duas técnicas básicas para purificação: a filtração em gel e a troca catiônica. O processo de purificação foi feita em equipamento FPLC (Pharmacia). No processo que envolve a filtração em gel foi utilizada a coluna 20x5 (Pharmacia) empacotada com a resina Sepharose G-25, pré-equilibrada com tampão 20 mM acetato de sódio (Merck), 10 mM de cloreto de sódio (Merck) pH 5,5, com fluxo de 1,0 ml/min, monitorando a absorção em 280 nm.

Na troca catiônica, foi utilizada a resina Sepharose CM-25 e coluna XK-16 (Pharmacia) com jaqueta termostatizável mantida à 10-12°C, com fluxo de 1,5 ml/min, monitorado a absorção em 280 nm e equilibrada com tampão 20 mM de acetato de sódio (Sigma) pH 5.5; 20 mM cloreto de sódio (Merck), condutividade 2,95 mScm⁻¹. A eluição foi feita em 20 mM de acetato de sódio pH 5.5 com um gradiente de 0.01 até 0.5 M NaCl, a proteína pura elui da coluna em 90 mM acetato de sódio.

A qualidade das amostras foi analisada em gel de SDS-poliacrilamida (Laemli, 1970) e corados com nitrato de prata.

3.5. Estudos Biofísicos

3.5.1. Fluorescência

O ensaio biofísico compreendeu o efeito do pH, a desnaturação com os agentes desnaturantes uréia e GdnHCl. Os estudos foram realizados utilizando-se a fluorescência intrínseca do triptofano (FIT); supressão do FIT com acrilamida em função do pH, e dicroísmo circular em função do pH.

Os espectros de fluorescência foram obtidos em espectrofluorímetro Hitachi F-4500, com a temperatura de 25 °C. As medidas foram feitas em célula de quartzo com caminho óptico de 1cm. Os parâmetros foram: excitação 295 nm e emissão em 300-450 nm com abertura para emissão e excitação de 5 nm, com voltagem na fotomultiplicadora de 950 V. Os controles foram feitos nas mesmas condições, depois subtraídos dos espectros encontrados para proteína, e a intensidade de emissão foi calculada pela integração total entre 305-450 nm.

Nesses experimentos, as amostras foram preparadas individualmente com uma solução estoque de monômero puro a 400 mgml⁻¹ previamente dialisadas. A GdnHCl e uréia foram preparadas em 20 mM acetato de sódio, 150 mM cloreto de sódio para os pHs 5,0; 5,5; 6,0; 6,5, 7,0 e 7,5. Amostras da proteína foram incubadas por 6 horas antes da aquisição dos espectros de fluorescência com concentrações entre 0-8 M no caso da uréia, e 0-6 M para GdnHCl

3.5.2. Supressão da fluorescência

Os experimentos de supressão com acrilamida foram feitos com monômero puro com concentração 100µg/ml para pHs 5,0 e 7,0 na ausência dos agentes desnaturantes. A acrilamida foi adicionada sequencialmente para a concentração final de 250 mM. A intensidade final foi corrigida para os efeitos de diluição, e a supressão de fluorescência calculada usando a relação $[(F/F_0) - 1]$, onde F e F_0 são as medidas das intensidades com e sem a adição de acrilamida respectivamente. As constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}) foram obtidas para gráficos de $[(F_0/F) - 1]$ vs concentração de acrilamida por regressão linear.

3.5.3 Tratamento dos dados dos espectros de fluorescência

O estudo da estabilidade da α -toxina foi realizado através das alterações nos espectros de fluorescência induzidas pelo desenrolamento da proteína pela adição de agentes desnaturantes. A análise de desnaturação é feita com base no modelo convencional de dois estados (Pace, 1986). Segundo esse modelo, o deslocamento do centro de massa da linha de emissão, composta pelas tirosinas e triptofanos, definem os estados nativo, desnaturado e intermediário.

A partir dos dados de intensidade de fluorescência foi realizada uma conversão dos valores do comprimento de onda (λ) para número de onda (λ^{-1}) e então foram calculados as posições do centro de massa (CM) do espectro através da seguinte equação:



$$CM = \frac{\sum I_{\lambda^{-1}} \cdot \lambda^{-1}}{\sum I_{\lambda^{-1}}} \quad (1)$$

onde $I_{\lambda^{-1}}$ é a intensidade da fluorescência correspondente número de onda λ^{-1} .

O cálculo da energia livre de Gibbs (ΔG_0) foi feito a partir do gráfico da posição do centro de massa (CM) em função da concentração do desnaturante. Estes gráficos em geral, são sigmóides e qualquer ponto desta curva pode ser representada como uma média de diferentes conformações, como as encontradas para as frações de proteína desnaturada (f_d) e da proteína nativa (f_n). As tangentes aos dois patamares da sigmóide definem as posições do centro de massa correspondente aos estados nativo (y_n) e desnaturado (y_d). A posição para um ponto intermediário (y) é definida como:

$$y = y_n f_n + y_d f_d \quad (2)$$

$$y = y_n(1-f_d) + y_d f_d$$

$$y = y_n - y_n f_d + y_d f_d$$

$$y - y_n = (y_d - y_n) f_d$$

sendo que:

$$f_d = \frac{y - y_n}{y_d - y_n} \quad (3)$$

$$f_d = 1 - f_n$$

$$y = y_n f_n + y_d (1 - f_n)$$

$$y = y_n f_n + y_d - y_d f_n$$

$$y - y_d = (y_n - y_d) f_n$$

sendo que :

$$f_n = \frac{y - y_d}{y_n - y_d} \quad (4)$$

Assim a constante de equilíbrio, K_D para o desdobramento protéico é obtida usando as relações abaixo.

$$G = H - TS \text{ (energia livre de Gibbs)}$$

$$dG = dH - TdS - SdT$$

$$dG = dE + VdP + PdV - SdT - TdS$$

$$dE = TdS - PdV$$

$$dG = VdP - SdT, \text{ se reversível } dG = 0$$

para desnaturação proteica :

$$\Delta G = \Delta H_{\text{desn}} - T\Delta S_{\text{desn}}$$

$$\Delta S_{\text{desn}} = R \ln (W_{\text{desn}} / W_{\text{nat}}), \text{ onde } W \text{ representa o número de estados}$$

Distribuição de Boltzmann

$$\frac{n_{\text{desn}}}{n_{\text{nat}}} = \frac{\delta_d}{\delta_n} e^{-(E_d - E_n)/KT}$$

$$\frac{n_{\text{desn}}}{n_{\text{nat}}} = e^{\ln(W_d/W_n)} e^{-(E_d - E_n)/KT}$$

$$\frac{n_{\text{desn}}}{n_{\text{nat}}} = e^{-[(E_d - E_n) - KT \ln(W_d/W_n)]/KT}$$

$$\frac{n_{\text{desn}}}{n_{\text{nat}}} = e^{-[(E_d - E_n) - RT \ln(W_d/W_n)]/RT}$$

$$\frac{n_{\text{desn}}}{n_{\text{nat}}} = e^{-(\Delta H - T\Delta S)/RT}$$



$$\frac{n_{desn}}{n_{nat}} = e^{-\Delta G/RT} = K_D \quad (5)$$

onde ΔG é a energia livre de Gibbs em kcal mol^{-1} , R a constante dos gases e T a temperatura absoluta.

Foram encontrados a partir das curvas de desnaturação, valores para a inclinação da reta (m).

O valor de m foi obtido através da equação :

$$\Delta G_D = \Delta G_D^{H_2O} - m [\text{desnaturante}] \quad (6)$$

Para estimar o $\Delta G_D^{H_2O}$ assume-se uma dependência linear entre a energia livre de desnaturação (ΔG_D) e a concentração do desnaturante observado na região de transição continua para a concentração zero. O “fit” dos dados foi encontrado pela equação acima (6), onde $m_{[desnat]}$ é definido como $d(\Delta G)/d[\text{desnaturante}]$, a razão na mudança da energia livre em função da concentração do desnaturante. Os valores de m podem ser definidos como mudanças no processo de desnaturação reversíveis que acompanham mudanças na estrutura da proteína. Assim, quanto maior o valor de m , maior a cooperatividade dos sítios que estão envolvidos neste processo (Shortle, 1995).

3.5.4. Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram feitos com monômero puro dialisado para os pHs de 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 sem incluir os agentes desnaturantes. As amostras foram dialisadas como descrito para os experimentos de fluorescência e depois concentradas para um terço do volume em Centricon 10. A razão da elipicidade molar foi calculada entre 200 nm e 218 nm (Q_{200}/Q_{218}), referentes a razão da α -helice e folhas β .



CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 - Cromatografia.

A expressão da proteína foi bem sucedida com a produção da α -toxina pela bactéria. O resultado da expressão da proteína tem continuidade com as etapas seguintes de purificação.

Na figura 5 é mostrado um gel SDS-PAGE 12% com sistema descontinuo de pH (6,3 e 8,8) com um resultado típico da purificação da α -toxina (Laemmli,1970). Nas canaletas : 1 e 2; a amostra após a coluna de filtração em gel. 3 e 4; amostra aplicada na coluna de troca catiônica onde a α -toxina se liga à resina. 5 - 8; monômero puro eluído da coluna de troca catiônica após 25% do gradiente de sal (125 mM de NaCl). 9 - 10; outras proteínas que estão ligadas mais fortemente a resina eluídas com maior concentração de NaCl.

A pureza das amostras com este protocolo foi consistente e reprodutível, com um rendimento de 10-15 mg/L da cultura.

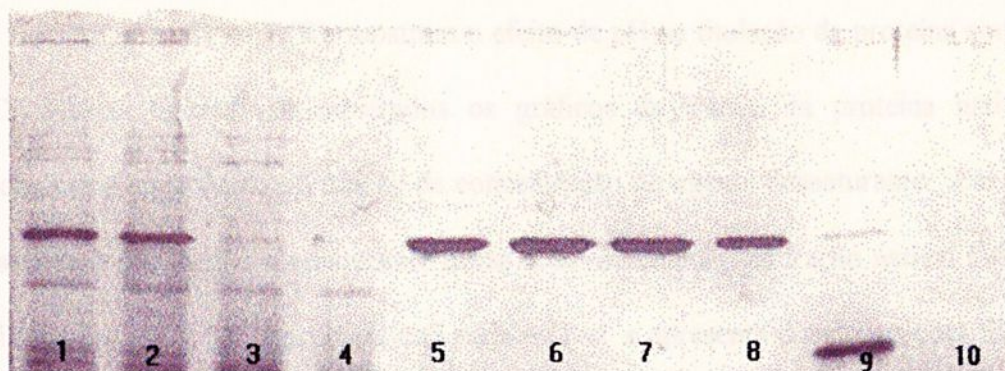


Figura 5: SDS-PAGE 12% das amostras obtidas na purificação utilizando 2 técnicas: Na canaleta 1 e 2: após filtração em gel; 3 e 4: após a coluna de troca catiônica; 5 - 8: α -toxina (monômero) eluída com 25% do gradiente; 9 e 10: outras proteínas eluídas após 25% do gradiente.

4.2 - Desnaturação por ureia e GdnHCl

Na figura 6, temos os espectros de emissão da α -toxina para a proteína nativa com pico característico em 336 nm (0 molar uréia), proteína parcialmente desnaturada (2M uréia) e desnaturada (8M uréia).

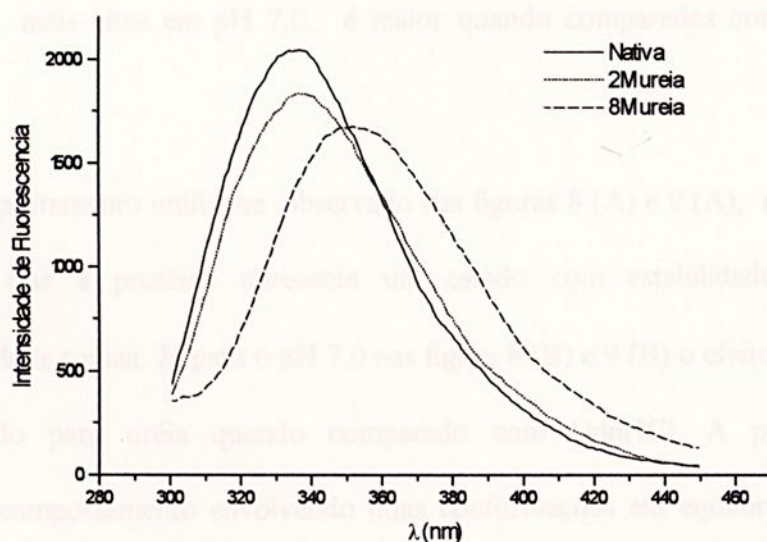


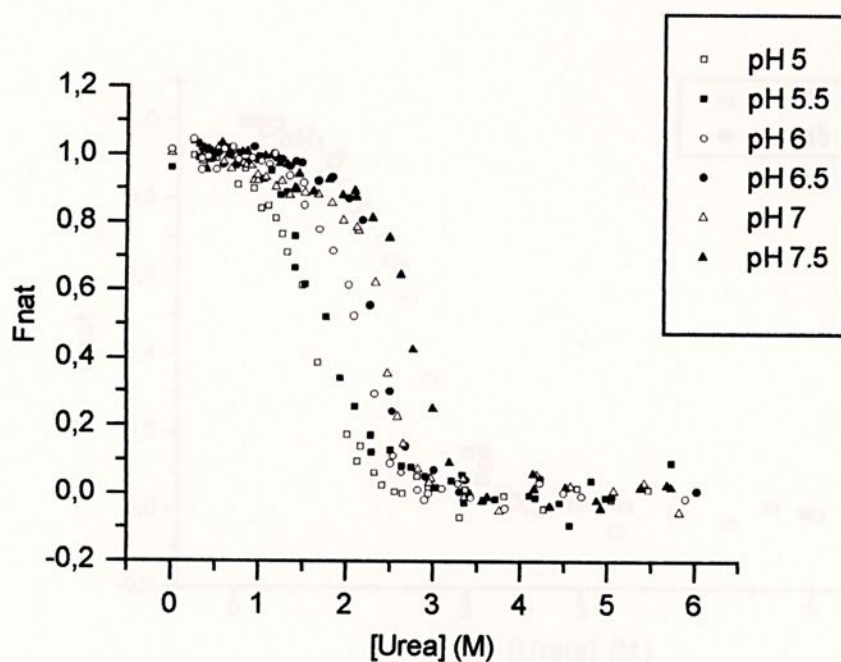
Figura 6: Espectro de emissão da α -toxina, excitada em 295 nm em tampão 20 mM acetato de sódio; 150 mM NaCl, pH 5,0; para concentrações de uréia : 0 molar —; 2M - - - ; 8 M - - - -.

As figuras 7 (A) e 7 (B), mostram o efeito de pH na titulação da proteína com uréia e GdnHCl. Nestas figuras são mostrados os gráficos da fração da proteína nativa (F_{nat}) calculado com a equação 4, em função da concentração do agente desnaturante. Em todos os pH, o aumento do, agente desnaturante causa uma diminuição na fração nativa. Pela análise dessa figura, em $pH > 6,0$, a proteína está mais estável e apresenta duas transições. Em $pH < 6,0$, a α -toxina apresenta apenas uma transição e sua estabilidade diminui quando comparada com valores encontrados para $pH > 6,0$.

Nas figuras 8 (A) e 8 (B) são mostrados os valores da fração de proteína nativa em função da concentração de uréia, para os valores diferentes de pH (5,0 e 7,0) para diferentes concentrações de α -toxina. Estes gráficos mostram que para pH 5,0 as curvas de desnaturação são coincidentes, ao passo que para pH 7,0 para uma concentração maior de proteína, foi necessário uma maior concentração de uréia para atingir a desnaturação completa. Isto sugere que, em pH 7,0 a proteína pode estar no estado multimérica, sendo este estado mais estável que o monomérico. Com uréia, o deslocamento das curvas de desnaturação para as concentrações mais altas em pH 7,0, é maior quando comparadas com GdnHCl (figura 9(B)).

O comportamento uniforme observado nas figuras 8 (A) e 9 (A), nos valores para pH 5,0, indicam que a proteína apresenta um estado com estabilidade independente da concentração da α -toxina. Já para o pH 7,0 nas figura 8 (B) e 9 (B) o efeito da desnaturação é mais acentuado para uréia quando comparado com GdnHCl. A proteína tem como característica comportamento envolvendo duas conformações em equilíbrio e dependente da concentração da α -toxina, sugerindo a ocorrência de um equilíbrio entre as formas multimérica e monomérica. Entretanto, esse comportamento não é encontrado para valores menores de pH, onde obteve-se somente uma transição.

(A)



(B)

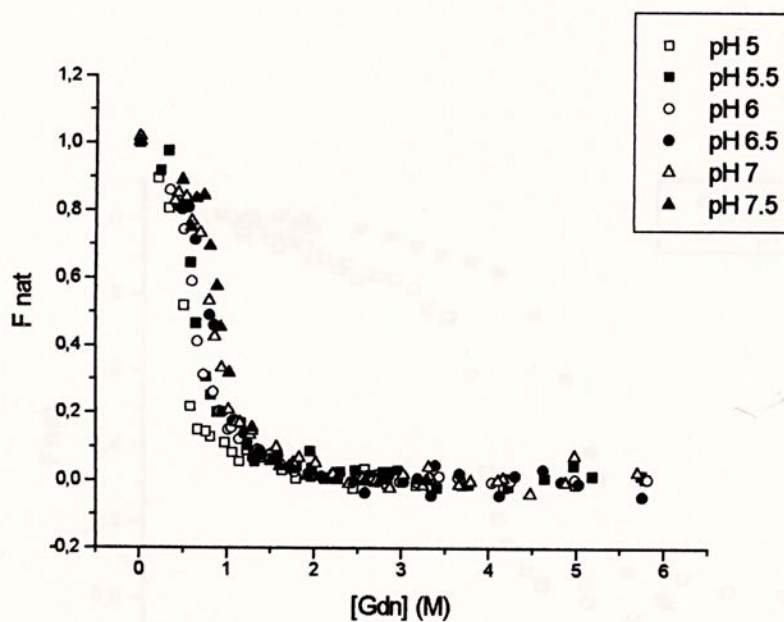
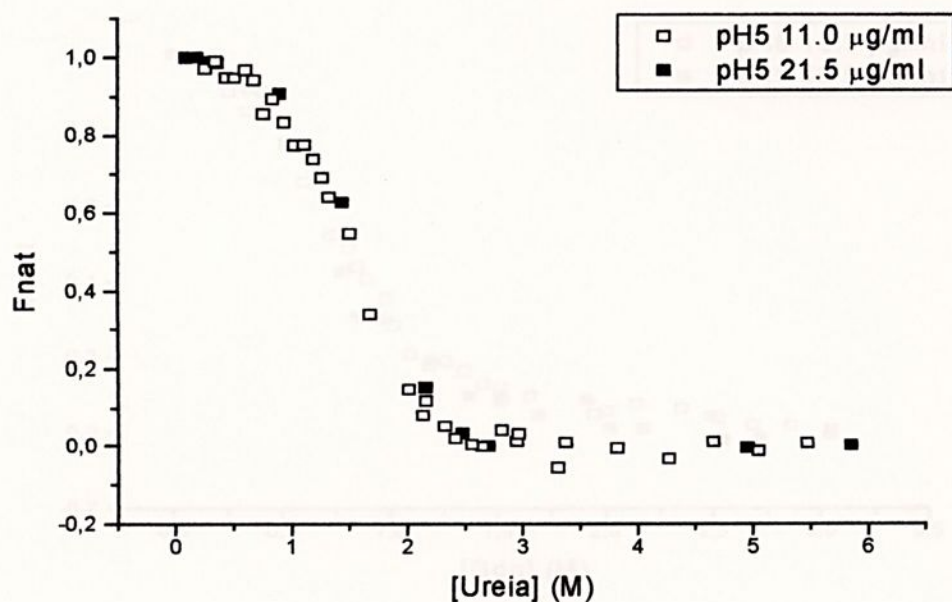


Figura 7: Curvas de desnaturação das frações de proteína nativa vs concentração de desnaturante. (A) uréia e (B) GdnHCl.

(A)



(B)

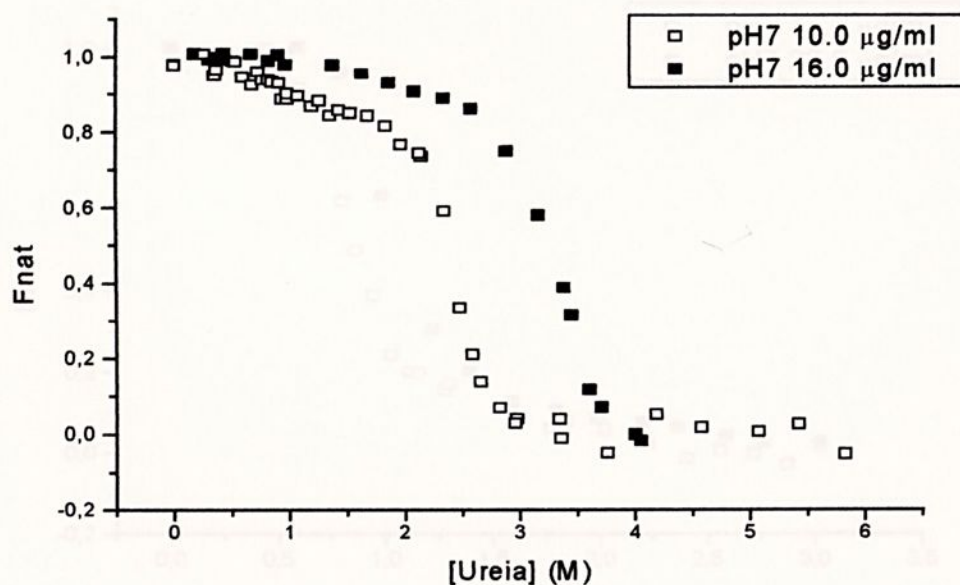
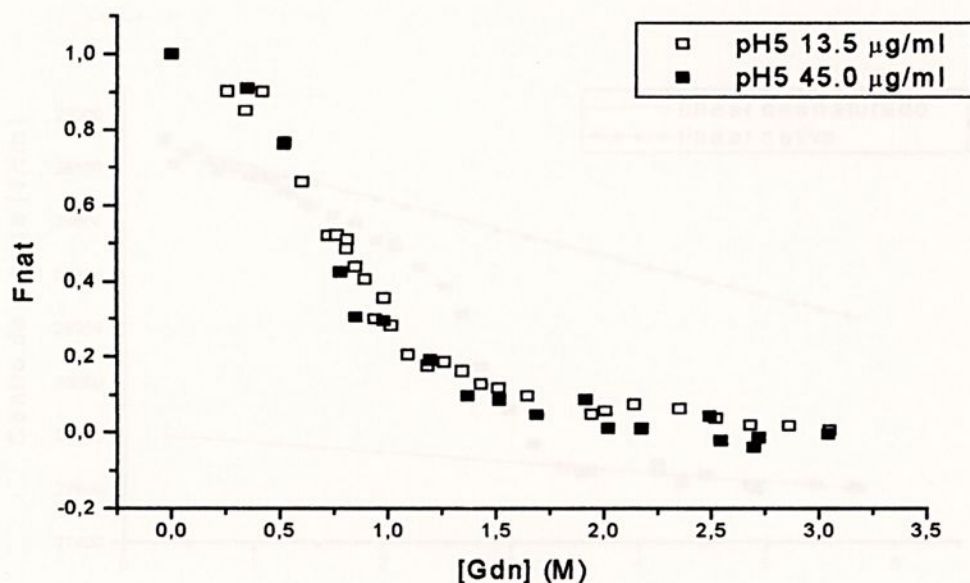


Figura 8: Curvas de desnaturação : fração de α -toxina nativa vs concentração de desnaturante - com uréia para pH 5,0 (A) e pH 7,0 (B).

(A)



(B)

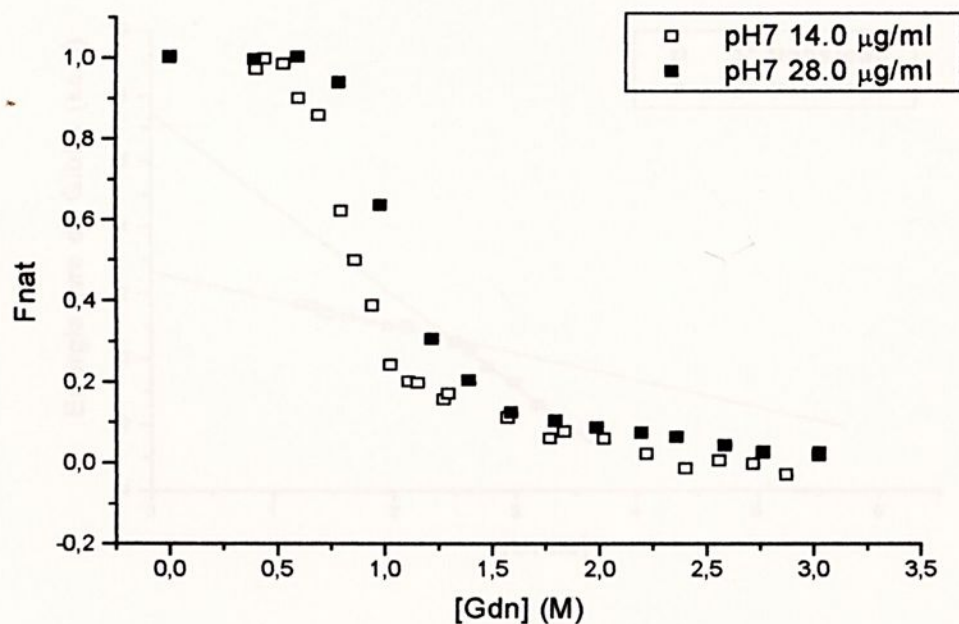
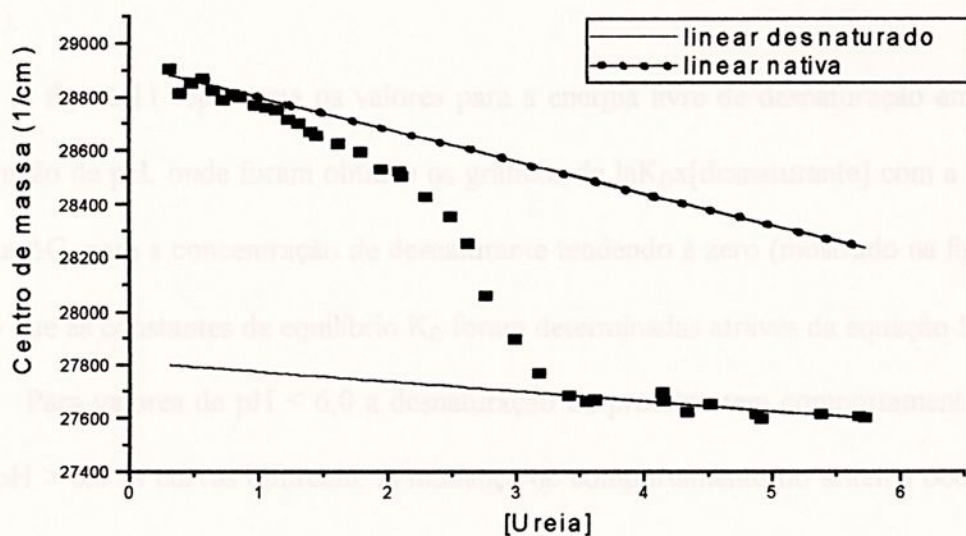


Figura 9: Curvas de desnaturação : fração de α -toxina nativa vs concentração de desnaturante GdnHCl pH 5,0 (A) e pH 7,0 (B).

4.3 - Efeito do pH no ΔG_D

(A)



(B)

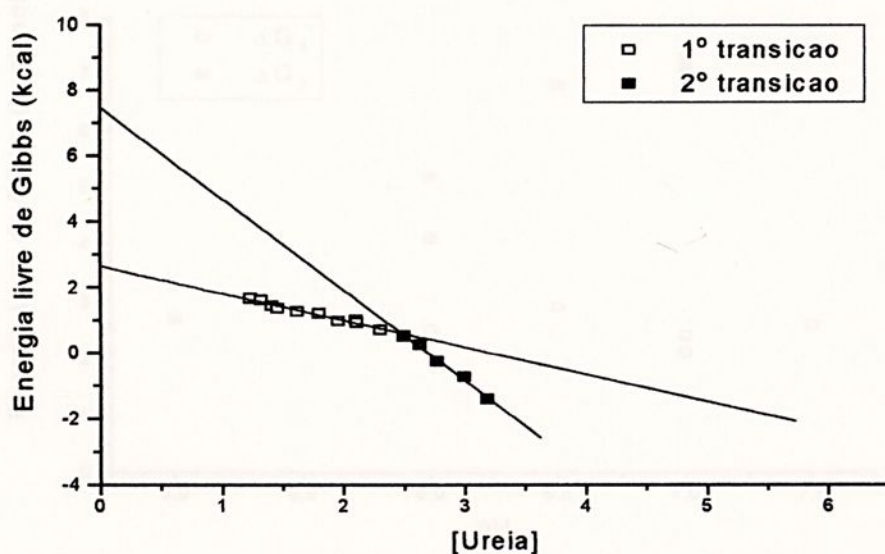


Figura 10: Dados obtidos para exemplificar o cálculo da energia livre de Gibbs (ΔG_0) :
(A) valores do centro de massa vs concentração de uréia para pH 7,5 utilizado para calcular a energia livre de Gibbs vs concentração de uréia do gráfico (B) a partir da extrapolação para o zero.

A figura 10 (A) representa os valores dos centros de massa originais para as diversas concentrações de uréia para pH 7,5 utilizado para exemplificar as retas usadas para corrigir efeitos inespecíficos do desnaturante para calcular os valores do ΔG_0 encontrados no gráfico 10 (B).

A figura 11 representa os valores para a energia livre de desnaturação em água (ΔG_0) em função de pH, onde foram obtidos os gráficos de $\ln K_D \times [\text{desnaturante}]$ com a extrapolação da reta ΔG_0 para a concentração de desnaturante tendendo à zero (mostrado na figura 10 (B)), sendo que as constantes de equilíbrio K_D foram determinadas através da equação 5.

Para valores de pH < 6,0 a desnaturação da proteína tem comportamento uniforme e para pH > 6,0 as curvas bifurcam. A mudança de comportamento do sistema ocorre entre os pHs 6,0→6,5.

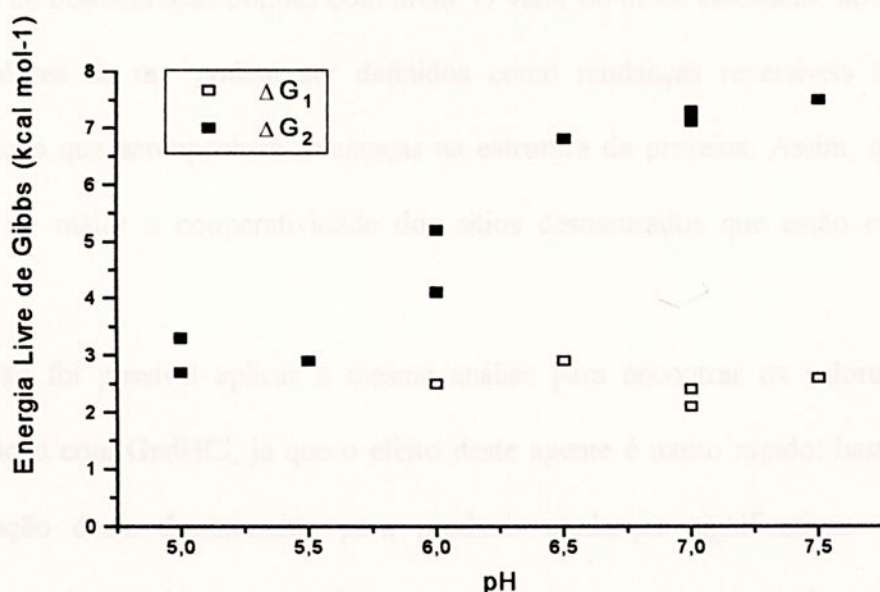


Figura 11 : Análise do ΔG_0 de desnaturação vs gradiente de pH.



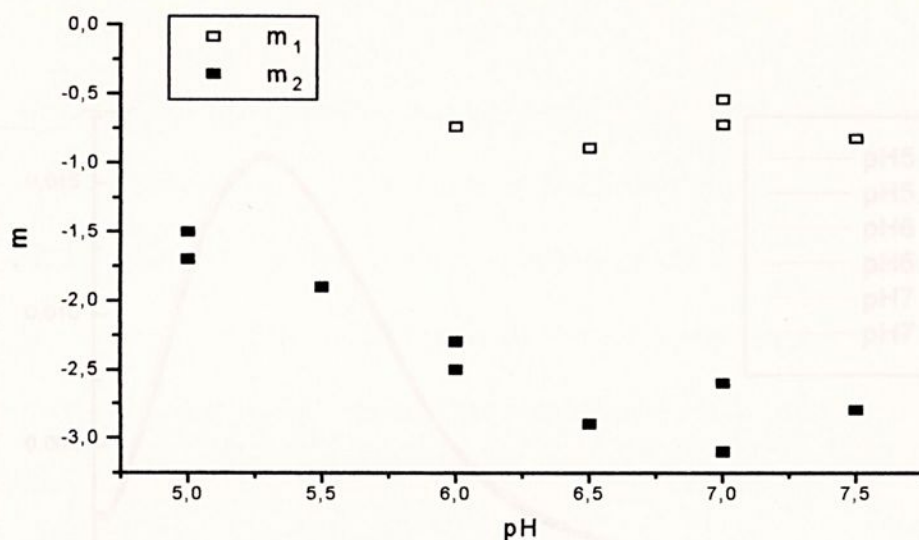


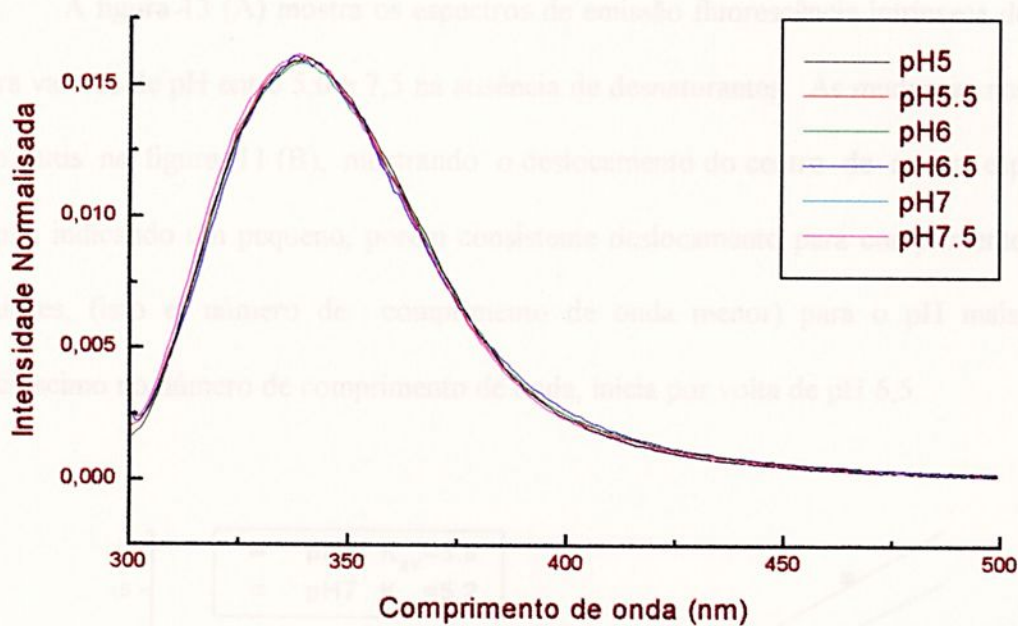
Figura 12: Valores de m (inclinação da reta) vs pH para uréia.

A figura 12 mostra dois valores encontrados para a inclinação da reta (m) referentes às curvas de desnaturação obtidas com uréia. O valor de m foi calculado através da equação 6. Os valores de m podem ser definidos como mudanças reversíveis no processo de desnaturação que acompanham mudanças na estrutura da proteína. Assim, quanto maior o valor de m , maior a cooperatividade dos sítios desnaturados que estão envolvidos neste processo.

Não foi possível aplicar a mesma análise para encontrar os valores de m para a desnaturação com GndHCl, já que o efeito deste agente é muito rápido; basta uma pequena concentração deste desnaturante para produzir mudanças significativas no espectro de fluorescência da proteína, o que reduz o patamar que caracteriza o estado nativo da proteína, podendo dessa forma introduzir erros significativos na determinação desses valores.

Figura 13: (A) Fluorescência intrínseca do triptofano entre pHs 5.0 e 7.5 com aumento de 0.5 unidades e na figura (B) a análise da curva de m.

(A)



(B)

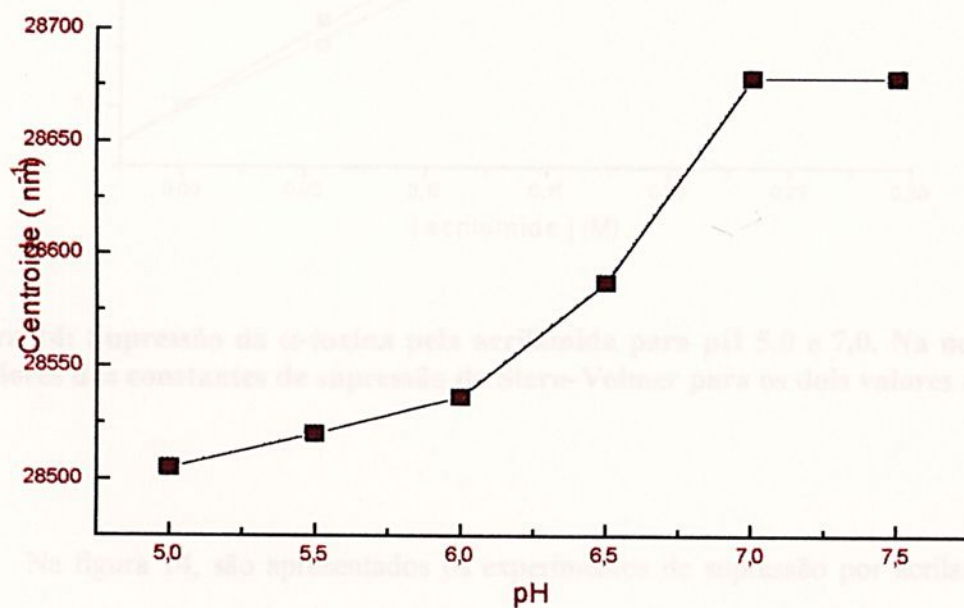


Figura 13 : (A) Fluorescência intrínseca do triptofano entre pHs 5,0 e 7,5 com aumento de 0,5 unidades e na figura (B) a análise do centro de massa.

4.4 - Efeito de pH na ausência do desnaturante.

A figura 13 (A) mostra os espectros de emissão fluorescência intrínseca do triptofano para valores de pH entre 5,0 e 7,5 na ausência de desnaturantes. As mudanças nos espectros são sutis na figura 11 (B), mostrando o deslocamento do centro de massa espectral com o pH, indicando um pequeno, porém consistente deslocamento para comprimentos de ondas maiores, (isto é, número de comprimento de onda menor) para o pH mais baixos. O decréscimo no número de comprimento de onda, inicia por volta de pH 6,5.

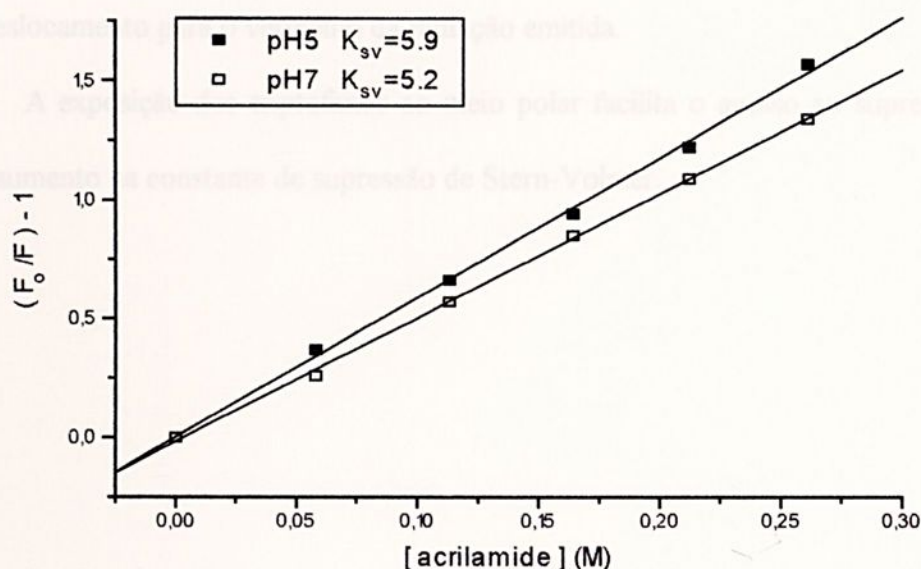


Figura 14: Supressão da α -toxina pela acrilamida para pH 5,0 e 7,0. Na nota superior, os valores das constantes de supressão de Stern-Volmer para os dois valores de pHs.

Na figura 14, são apresentados os experimentos de supressão por acrilamida para os valores de pH 5,0 e 7,0, e os valores para as constantes de supressão de Stern-Volmer para dois valores de pH. Para pH 5,0 ocorre um ligeiro aumento na eficiência do processo indicando uma maior exposição dos triptofanos ao meio aquoso.

A figura 15 (A) mostra o espectro CD em pHs entre 5.0 e 7.0. Foi calculada a razão da elipicidade molar entre 200 nm a 218nm (Q_{200}/Q_{218}), e o resultado na figura 15 (B) mostra a Q_{200}/Q_{218} em função do pH.

Os resultados de CD apoiam esta observação, mostram que as mudanças estruturais da α -toxina com diminuição do pH entre 7 a 5 não envolvem mudanças radicais em estrutura secundária. Entretanto, os resultados obtidos tanto por fluorescência intrínseca (figura 13(B)) quanto por CD (figura 15 (B)) permitem concluir que há uma transição estrutural entre pH 7,0 e 5,0. Os dados sugerem que a transição resulta numa maior exposição dos triptofanos, levando a um decrescimo no centro de massa do espectro de fluorescência correspondendo a um deslocamento para o vermelho da radiação emitida.

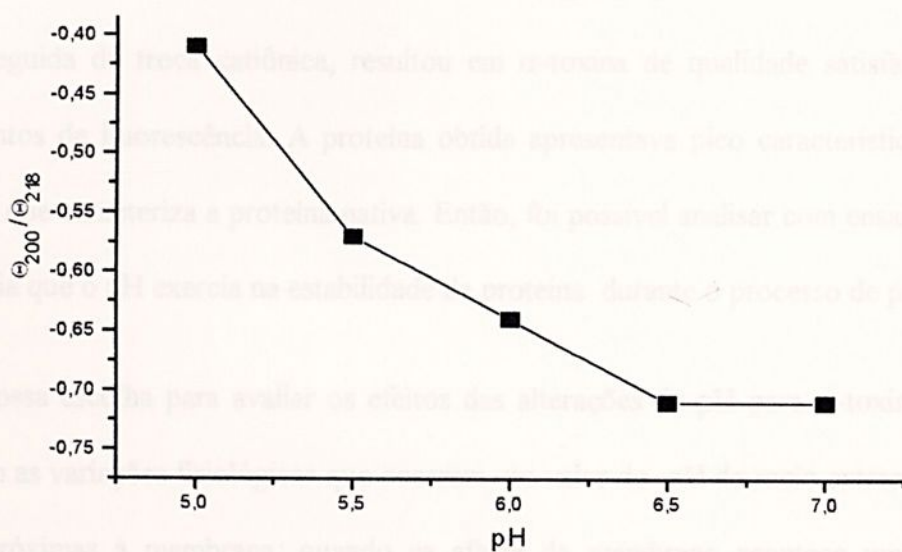
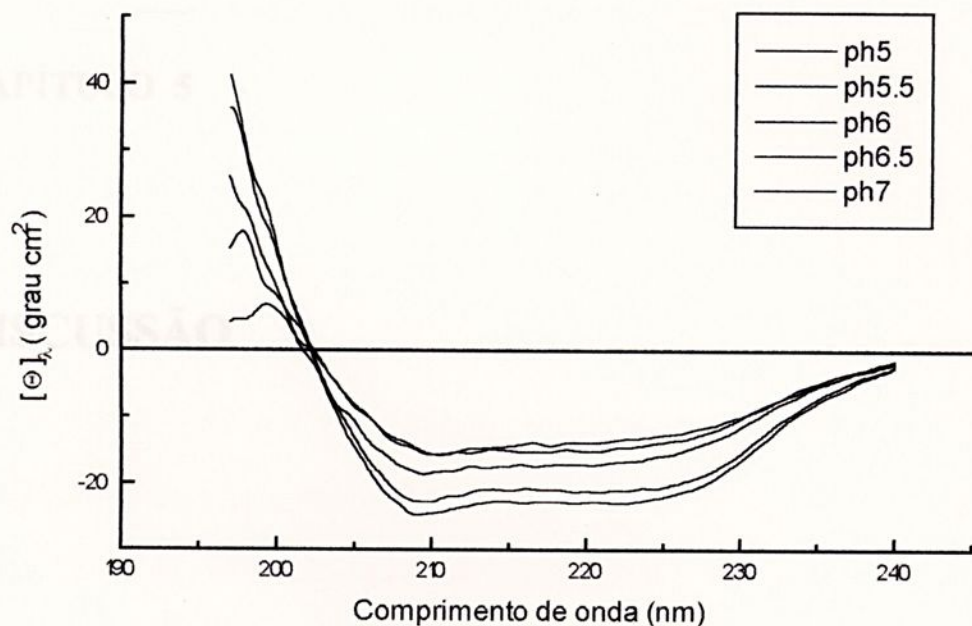
A exposição dos triptofanos ao meio polar facilita o acesso ao supressor, resultando num aumento na constante de supressão de Stern-Volmer.



(B)

Figura 15: (A) Representa os espectros de CD para UV distante e em (B) a análise da razão da elipicidade.

(A)



(B)

Figura 15: (A) Representa os espectros de CD para UV distante e em (B) a análise da razão da elipcidade.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO

O processo de purificação foi a etapa de maior dificuldade e tempo empregado para a obtenção de α -toxina pura. Pelo processo de cromatografia que inclui duas técnicas - filtração em gel seguida de troca catiônica, resultou em α -toxina de qualidade satisfatória para os experimentos de fluorescência. A proteína obtida apresentava pico característico entre 333-338 nm o que caracteriza a proteína nativa. Então, foi possível analisar com ensaios biofísicos, a influência que o pH exercia na estabilidade da proteína durante o processo de purificação.

Nossa escolha para avaliar os efeitos das alterações de pH para α -toxina teve como motivação as variações fisiológicas que ocorrem no valor do pH do meio extracelular para as regiões próximas à membrana, quando se afasta da membrana acontece uma diminuição gradativa nas concentrações de prótons. O efeito do pH na estabilidade e estrutura da proteína foi monitorado por alterações nos espectros de emissão de fluorescência intrínseca e por dicroísmo circular ambos na presença e ausência dos agentes desnaturantes.



Nossos experimentos foram realizados com a utilização de dois agentes desnaturantes - uréia e GdnHCl. As curvas de desnaturação obtidas permitiram calcular os valores da energia livre de Gibbs, em função de valores de pH e para diversas concentrações dos agentes desnaturantes.

Foi observado um duplo comportamento nas curvas de desnaturação com uréia para $\text{pH} > 6,0$, (figura 7), com característica menos acentuada em GdnHCl, para as diferentes concentrações de α -toxina. No entanto, em $\text{pH} 5,0$ ou para valores de $\text{pH} < 6,0$, o comportamento é uniforme. Isto significa, que a desnaturação em meios com pH altos, envolve a formação de um estado intermediário. O aumento na concentração da proteína provoca um deslocamento nas curvas de desnaturação para o agente desnaturante uréia para $\text{pH} 7,0$ (figura 8B). No entanto, o deslocamento é discreto para GdnHCl no mesmo pH (fig. 9B). O deslocamento é dependente da concentração da proteína, sugerindo uma dissociação de uma forma multimerica. Em pH baixo, esse comportamento não é observado. Ainda não está definido se essa dissociação, é a transição de um estado dimerico (estado encontrado em $\text{pH} > 6,0$) $\Leftrightarrow$ monomérica (estado encontrado em $\text{pH} < 6,0$) (figura 8 e 9). As análises até aqui realizadas, sugerem apenas uma dissociação e não permitem distinguir se é dimerica. Pode-se, no entanto propor que o comportamento não uniforme para $\text{pH} > 6,0$ está relacionado com a desnaturação em duas etapas: multímero $\Leftrightarrow$ intermediário $\Leftrightarrow$ monômero.

A análise das duas transições foi feita utilizando uma extrapolação linear, que consiste em uma aproximação na análise dos valores encontrados para a energia livre de Gibbs (figuras 8 e 9); porém, pode-se concluir que apesar da estabilidade do estado intermediário ser diferente para os pHs 5,0 e 7,0. Os valores de ΔG_1 que apresentam como característica a transição multímero $\Leftrightarrow$ monômero, sugere que a conformação oligomérica da proteína é independente do pH. O valor de ΔG_2 mostra que existe uma dependência dos valores de pH.

Em pH 7,0, a forma dimerica provavelmente é a mais estável e consequentemente encontrada em maior quantidade. Já em pH com valor menor, como pH 5,0 ocorre uma mudança conformacional que desestabiliza a forma multimérica causando sua dissociação.

Sugerimos que para pH 7,0, a estabilidade da proteína no estado multimerico é mantida pelo efeito hidrofóbico e os fatores eletrostáticos que contribuem para a estabilidade da forma monomérica da α -toxina estão neutralizadas. Assim, em pH 7,0, é necessário uma quantidade maior do agente desnaturante uréia que em pH 5,0 para que ocorra a desnaturação. Os valores calculados de ΔG_0 para a titulação de pH com GdnHCl contrastam com a diminuição dos valores de ΔG_0 para uréia, indicando que um componente eletrostático exerce uma função significativa na estabilidade da α -toxina em solução. A transição do ΔG_0 ocorre próximo do pH 6,5, indicando que aminoácidos com pK_a próximos destes valores estão envolvidos na estabilidade. A histidina tem pK_a entre 6-6,5, e em nossos experimentos atuais de purificação estamos obtendo proteína do mutante H35N, e pretendemos fazer comparações entre o mutantes de histidina e o tipo selvagem. O pH envolvido na segunda transição, tem ponto médio em torno do pH 6,2, envolvendo aminoácidos que apresentam pK próximos desse valor, como a histidina. Sendo assim, a histidina está envolvida na estabilidade da forma monomérica por forças eletrostáticas.

Estudos recentes na agregação de um peptídeo sintético, demonstram uma forte correlação entre alta interação eletrostática e um aumento na estabilidade com uréia (Monera et al., 1994). O modelo propõe que um sal como a GdnHCl, pode bloquear e neutralizar as cargas quando em altas concentrações, assim os efeitos observados com GdnHCl, indicam que é um agente adequado para a perturbação das interações hidrofóbicas ou não iônicas na estabilidade da proteína. As figuras 7(A) e 7(B) mostram dois efeitos importantes dos agentes desnaturantes uréia e GdnHCl encontrados na análise das curvas de desnaturação. Primeiro :

são os efeitos da interação eletrostática e interação hidrófoba a que está sujeita a α -toxina os responsáveis de sua estabilidade e segundo, os resultados evidenciam claramente que valores diferentes para a energia livre de Gibbs são obtidos com o uso de agentes desnaturantes com propriedades diferentes, pois dependem da natureza das interações que estão envolvidas na estabilidade da estrutura da proteína analisada.

Além dos valores da energia livre de Gibbs, os valores da figura 12 da inclinação da reta (m), nos experimentos com uréia permitem uma análise quantitativa da cooperatividade do processo de desnaturação. Dos valores encontrados para a energia livre de Gibbs para a uréia (fig. 11), o maior valor, sugere que ocorre uma forte relação cooperativa. A exposição de um dos sítios deve provocar uma reação em cascata para a exposição de outros sítios facilitando assim, a entrada de mais moléculas do agente desnaturante. Para ΔG_1 , o valor de m é praticamente constante, sugerindo apenas um pequeno efeito cooperativo.

A detecção, de mudança estrutural, devido a variações nos valores do pH, por técnicas sensíveis nas propriedades espectrais, na qual foi aplicada todos os valores de pH era previsível. Na ausência de desnaturante, a mudança estrutural ocorre entre os valores de pH 5,0 e 7,0.

A fluorescência intrínseca do triptofano é sensível ao ambiente dos 8 triptofanos do monômero da α -toxina. O cálculo do centro de massa pelo espectro mostra uma pequena diminuição e assim, o número de onda que é o inverso do comprimento de onda, corresponde a um aumento na emissão de radiação de comprimentos de ondas maiores indicando uma transição que começa no pH 6,5. Os resultados indicam que a mudança no ΔG_0 está associada ao aumento na emissão de radiação de comprimentos de ondas maiores, ou seja o triptofano começa a ser mais exposto quando o pH é reduzido. Este resultado é consistente com os

resultados dos experimentos da supressão onde foi observado um pequeno aumento na constante de supressão Stern-Volmer para o pH 5,0, significando que o agente supressor teve acesso ao fluoróforo. Portanto, as medidas experimentais levam a concluir que a variação de pH altera a estrutura terciária da proteína.

O dicroísmo circular averigua o conteúdo da estrutura secundária da proteína. Análises dos espectros do sinal de dicroísmo circular para α -toxina para UV distantes em função do pH, usando a razão do sinal do comprimento de onda para 200nm/218nm, indicam um pequeno aumento de α -hélice com o decréscimo de pH, indicando uma mudança na estrutura secundária a um pH similar ao das mudanças observadas nos experimentos de fluorescência.

Estas mudanças na estrutura secundária e terciária com o decréscimo de pH, levam a estados desnaturados da proteína, supostamente dois estados, com diferentes para a estabilidades ante a variação de valores do pH. O uso de dois agentes desnaturantes com propriedades diferentes, foi útil para caracterizar as interações envolvidas nesta estabilidade, já que é importante lembrar que a α -toxina não apresenta cisteínas. Um outro fator a ser considerado, é que a proteína no ambiente fisiológico esta sujeita a mudanças de pH, sal, colesterol e forte campo elétrico próximo à membrana. A reação de desnaturação foi descrita admitindo equilíbrio termodinâmico, considerações cinéticas devem permitir uma avaliação mais segura das frações de proteína no estado nativo e desnaturado.

A transição que ocorre entre pH 6.0 $\rightarrow$ 6,5, é caracterizada por uma mudança sutil na estrutura secundária e terciária somada a uma alteração considerável na estrutura quaternária. Estas propriedades são consistentes com a transição multimerica-monomérica sugerida pelas formas das curvas de desnaturação por pH com uréia. Para nós, esta transição torna a α -toxina

menos estável nas condições de pH fisiológico próximo à membrana (pH 5,0), o que reduz a “barreira energética” na conversão hidrofílica/hidrofóbica da proteína.

A sequência lítica após os dados da análise com os agentes desnaturantes e pH, pode ser reestruturada a partir da proposta por Walker & Bayley, 1995, onde :

multímero $\Rightarrow$ dissociação do multímero $\Rightarrow$ formação do heptâmero $\Rightarrow$ poro

pH 7,0 pH 5,0 próximo a membrana na membrana

CONCLUSÃO

Foi possível observar a formação de poros em membranas de lipídios com a utilização de um agente desnaturante. O processo de purificação apresentou as mesmas dificuldades encontradas no decorrer do trabalho.

A facilidade de obtenção de dados de variação de pH em processos de purificação em associação com a informação da fisiologia que próximo a membrana ocorre um gradiente de pH, levou a realização de alguns experimentos. Um desses experimentos consistiu na análise da estabilidade da proteína sob titulação de pH de 5,0 a 7,5. O desnaturante usado inicialmente consistiu ureia, mas como as mudanças conformacionais não foram detectadas de forma clara um outro agente desnaturante o GuHCl foi utilizado. Foram encontrados resultados diferentes para os dois agentes desnaturantes.

A averiguação de mudanças conformacionais na estrutura terciária foi feita com a utilização da técnica de fluorescência com titulação de pH no presença dos agentes

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO

Foi possível expressar a α -toxina recombinante em nosso laboratório bem como sua purificação. O processo de purificação representou as maiores dificuldades encontradas no decorrer do trabalho.

A fragilidade da α -toxina diante da variação do pH nos processos de purificação em associação com a informação da fisiologia que próximo a membrana ocorre um gradiente do pH, levou a realização de alguns experimentos. Um desses experimentos, consistiu na análise estabilidade da proteína sob titulação de pH de 5,0 a 7,5. O desnaturante usado inicialmente continha ureia, mas como as mudanças conformacionais não foram detectadas de forma clara um outro agente desnaturante o GndHCl foi utilizado. Foram encontrados resultados diferentes para os dois agentes desnaturantes.

A averiguação de mudanças conformacionais na estrutura terciária foi feita com a utilização da técnica de fluorescência com titulação de pH na presença dos agentes

desnaturantes e para analisar possíveis mudanças na estrutura secundária foi utilizado o dicroísmo circular somente para a titulação de pH.

Dos resultados obtidos concluímos que :

- 1) O pH afeta a estabilidade da proteína;
- 2) Os agentes desnaturantes uréia e GndHCl agem diferentemente, o que implica a ocorrência de duas forças estabilizadoras : interação hidrofóbica e interação eletrostática;
- 3) Foram calculados dois valores para energia livre de Gibbs para uréia : um dependente do pH e outro independente;
- 4) Nas curvas de desnaturação obtidas com uréia, ocorre uma transição entre 6,0 - 6,5, permitindo inferir que aminoácidos com pK próximos desses valores como a histidina, estejam relacionados com esse efeito;
- 5) As curvas de desnaturação obtidas com uréia dependem da concentração da α -toxina, isto é, apresentam comportamento envolvendo duas espécies. Assim, a desnaturação deve envolver um estado intermediário - um multímero estável para $\text{pH} > 7,0$;
- 5) As mudanças conformacionais consistem provavelmente na alteração da estrutura quaternária e afetam sutilmente as estruturas secundárias e terciárias.

REFERÊNCIAS

Experimentos futuros podem ser utilizados para averiguar a formação desse estado multimerico. Um desses recursos é a cromatografia de filtração em gel, que é utilizada para separar os multímeros dos monômeros em um gradiente de uréia (Endo et al, 1982). Esses dados serão reforçadas pela análise em gel de poliacrilamida com a reação de "cross-linking". As informações obtidas com a utilização das duas técnicas podem fornecer informações sobre a associação/dissociação da α -toxina.

1. Bhakdi, S., & Tranum-Jensen, J. (1982) Binding and partial inactivation of *S. aureus* α -toxin by human plasma low density lipoproteins. *J Biol Chem* 258: 5993-5994.
2. Bhakdi, S., & Tranum-Jensen, J. (1984) Mechanism of complement cytotoxicity and concept of channel-forming proteins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 107: 147-223.
3. Bhakdi, S., & Tranum-Jensen, J. (1985) Damage to cell membranes by pore forming bacterial cytolytic. *Prog Allergy* 40: 1-43.
4. Beles, D.W., Samura, M. M. (1988) Unfolding energy changes determined by the least extrapolation method. 2. Incorporation of ΔG_{un} values in a thermodynamic cycle. *Biochemistry* 27: 8059-8074.
5. Creighton, T. (1993) *Proteins* (2nd edition). New York: W.H. Freeman and Co.
6. Dill, K. (1990) Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* 29: 7133-7135.
7. Endo, S.; Saito Y., Wada A. (1981) Dominant-gradient chromatography for the study of protein denaturation: principle and procedure. *Anal Biochem* 131, 108-120.
8. Fawcett, R., Bhakdi, S., Sotgioli, A., Tranum-Jensen, J., Kraus, T., Wellenish, H.J. (1981) On the mechanism of membrane damage by *S. aureus* α -toxin. *J Cell Biol* 91: 83-94.
9. Gennis, E. J., Brink, O., Robinson, R. M., Song, L., Cheky, S., Shastak, C. (1994) subunit stoichiometry: staphylococcal α -haemolysin in crystal and membranes a heptameric transmembrane pore. *Proc Natl Acad Sci* 91: 12828-12831.
10. Gray, S. S. & Kehoe, M. (1984) Primary structure of α -toxin from *S. aureus* Wood 46. *Infect Immun* 46: 615-618.
11. Greene, R. R. & Pace, C. N. (1974) Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, α -chymotrypsin and β -lactoglobulin. *J Biol Chem* 249: 5388-5393.
12. Hlgas, H., Nakas, T. (1985) Conformational alterations in α -toxin from *S. aureus* concomitant with the transformation of water-soluble monomer to the membrane oligomer. *Biophys Res Commun* 130: 175-181.
13. Jelfsiewicz, J., S. Sotgioli, M. Korbek, and C. Zuk. 1985. Histochemical demonstration of changes in enzymatic activity of KB cell produced by staphylococcal alpha and beta hemolysins. *J Infect Dis* 118: 421-429.
14. Kehoe, M., Duncan, L., Foster, T., Fairweather, N., & Douglas, G. 1983. Cloning, expression and mapping of the *S. aureus* α -haemolysin determining in *Escherichia coli* K12. *Infect Immun* 41: 1105-1111.
15. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-683.
16. Lakowicz, J.R. 1983. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, N. Y.

REFERÊNCIAS

1. **Arbuthnott, J.P., Freer, J.H., Bernheimer, A.W.** (1967) Physical states of staphylococcal alpha toxin. *J. Bacteriol.* 94: 1170-1177.
2. **Bernheimer, A. W., L.L. Schwartz.** (1963) Isolation and composition of staphylococcal alpha toxin. *J. Gen. Microbiol.* 30:455-468.
3. **Bernheimer, A. W., L.L. Schwartz.** (1965) Effects of staphylococcal and other bacterial toxins on platelets in vitro. *J. Gen. Microbiol* 30:455-468.
4. **Bhakdi, S., Fussle, R. e Tranum-Jensen, J.** (1981) Staphylococcal α -toxin : oligomerization of hydrophilic monomers to form amphiphilic hexamers induced through contact with deoxycolate detergents micelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 5475-5479.
5. **Bhakdi, S., R. Fussle, G. Utermann, J. Tranum Jensen.** (1983) Binding and partial inactivation of *S. aureus* α -toxin by human plasma low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 258: 5899-5904.
6. **Bhakdi, S., & Tranum-Jensem J.** (1984) Mechanism of complement cytolysis and concept of channel-forming proteins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 107:147-223.
7. **Bhakdi, S., & Tranum-Jensem J.** (1988) Damage to cell membranes by pore forming bacterial cytolysis. *Prog. Allergy* 40:1-43.
8. **Bolen, D.W., Santoro, M. M.** (1988) Unfolding energy changes determined by the linear extapolation method. 2. Incorporation of ΔG_{N-u} values in a thermodynamics cycle. *Biochemistry* 27:8069-8074.
9. **Creighton, T.** 1993. *Proteins* (2nd edition). New York: W.H. Freeman and Co.
10. **Dill K.** (1990) Dominant forces in protein folding. *Biochesmitry* 29:7133-7135.
11. **Endo, S.; Saito Y., Wada A..** (1983) Denaturant- gradient chromatography for the study of protein denaturation: principle and procedure. *Anal Biochem* 131, 108-120
12. **Fussle, R., Bhakdi, S., Sziegoleti, A., Tranum-Jensem, J., Kranz, T., Wellensiek, H.J.** (1981) On the mechanism of membrane damage by *S. aureus* α -toxin. *J. Cell Biol.* 91:83-94.
13. **Gouaux, E. J., Braha, O., Hobaugh, R. M., Song, L., Cheley, S., Shustak, C.,** (1994) subunit stoichiometry staphylococcal α -haemolysin in crystal and membranes a heptameric transmembrane pore. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:12828-12831.
14. **Gray, S. S. e Kehoe, M.** (1984) Primary sequence of the α -toxin from *S. aureus* Wood 46. *Infect. Immun.* 46, 615-618.
15. **Greene, R. F. e Pace, C. N.** (1974) Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, α -chymotrypsin and β -lactoglobulin. *J Biol Chem* 249:5388-5393.
16. **Ikigae, H., Nakae, T.** (1985) Conformational alteration in α -toxin from *S. aureus* concomitant with the transformation of water -soluble monomer to the membrane oligomer.. *Biophys.Res.Commun.* 130:175-181.
17. **Jeljaszewicz, J., S. Smigielski, M. Korbecki, and C. Zak.** 1965. Histochemical demonstration of changes in enzymatic activity of KB cell produced by staphylococcal alpha and beta hemolysins. *J. Infect. Dis.* 115:421-428.
18. **Kehoe, M., Duncan, I., Foster, T., Fairweather, N., e Dougan, G.** 1983. Cloning, expression and mapping of the *S. aureus* α -haemolysin determing in *Escherichia* α K12. *Infect. Immun.* 41:1105-1111.
19. **Laemmli, U.K.** (1970) *Nature* 227, 680-685.
20. **Lakowicz, J. R.** 1983. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* Plenum Press, N. Y.



21. **Monera, O. D., Zhou, N. E., Kay, M.C., Hodges, R. S.** (1993). Comparasion of parallel and antiparallel orientation of α -helical chains in two-stranded α -helical coiled-colis: Design, synthesis, and characterization. *Biol Chem* 268: 19218-19277
22. **Monera, O. D., Kay, M. C., Hodges, R. S.** (1994) Electrostatic interactions control the parallel and antiparallel orientation of α -helical chains in two -stranded α -helical coiled-coils. *Protein Science* 3:1984-1991.
23. **O'Reilly, M., J.C.S. Azevedo. S. Kennedy, T.J. Foster.** (1986) Inactivation of the alpha - haemolysin of *S. aureus* 8325 -4 by site-diricted mutagenesis and studies on the expression of its haemolysins. *Microb. Pathog.* 1:125-138.
24. **Ogston, A.** 1881 Report upon microorganisms in surgical diseases. *Br. Med. J.* May:369-375.
25. **Olofsson, A., U. Kaveus, I. Hacksell, M. Thelestam, and H. Hebert.** 1990. Crystalline layers and three-dimensional structure of staphylococcus aureus α -toxin. *J. Mol. Biol.* 214:299-306.
26. **Olofsson A., Kaveus, U. Thelestam, M. Hebert. H.** 1988. The projection structure of alpha-toxin from *S. aureus* in human platetet membrane as analysed by electron microscopy and image processing *J. Ultrastrut. Mol. Struct. Res.* 100, 194-200.
27. **Pace, C. N.** (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.*, 131:266-280.
28. **Pace, C.N.** (1990) Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem Sci* 15: 14-17.
29. **Santoro, M. e Bolen, D. W.** (1988) Unfolding free enrgy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethansulfonyl α -chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* 27:8063-8068.
30. **Shortle, D.** 1995. Staphylococcal Nuclease: a showcase of m-value effectes. *Adv Protein Chem* 46:217-247.
31. **Tanford, C.** 1970. *Adv. Protein Chem* 24:1-95.
32. **Tobkes, N., Wallace, B.A., Bayley, H.** (1985) Secondary strarnd assembly mechanism of an oligomeric channel *Biochesmitry* 24:1915-1920.
33. **Van Der Goot, G.F., Manas-González, M. J., Lakey, H. J. e Pattus, F.** (1991) A "molten-globule"membrane-insertion intermedate of the pore-forming domain of colicin A . *Nature* 354,408-410.
34. **Walker, B. & Bayley, H.** (1995) Key Residues for membrane binding, oligomerization, and pore forming activity of staphyloccocal alpha haemolysin *J Biol Chem* 270:1-7.
35. **Walker, B. & Bayley, H.** (1995) An intermediare in the assembly of a pore-forming protein trapped with a genetically-engiered switch. *J Biol Chem.* 270: 23065-23071.
36. **Walker, B., Krishnasasttry, M., Zorn, L., Kasianowicz, J M., Bayley, H.** (1992) Functional expression of the α -haemolysin of *S. aureus* in intact *E. coli* and cell lysates. *J Biol. Chem* 267,: 10902-10909.
37. **Ward, R.J. & Leonard, K.** (1992) The *S. aureus* α -toxin channel complex tha effect of Ca^{2+} ions on its interation with lipid layers. *J. Struct. Biol.* 109: 129-141.
38. **Ward, R.J., Palmer, M., Leonard, K. Bhakdi, S.** (1994) Identification of a putative membrane-inserted segment in the α -toxin of *S. aureus* . *Biochemistry* 33, 7477-7484

